



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

ANDRÉIA KARLA ANACLETO DE SOUSA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA
PRÓPOLIS VERMELHA NO SEMIÁRIDO PARAIBANO SOBRE *STREPTOCOCCUS
PYOGENES***

**POMBAL-PB
2018**

ANDRÉIA KARLA ANACLETO DE SOUSA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA
PRÓPOLIS VERMELHA NO SEMIÁRIDO PARAIBANO SOBRE *STREPTOCOCCUS
PYOGENES***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Sistemas Agroindustriais. Área de concentração: Ciências e Tecnologia em Sistemas Agroindustriais.

Orientadora: Profa. Dra. Alfredina dos Santos Araújo

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Fernandes Filho

**POMBAL-PB
2018**

S725a

Sousa, Andréia Karla Anacleto de.

Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha no semiárido paraibano sobre *Streptococcus pyogenes*/ Andréia Karla Anacleto de Sousa. – Pombal, 2019.
35f. il. color.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2018.

"Orientação: Profa. Dra. Alfredina dos Santos Araújo".

"Coorientação: Prof. Dr. Antônio Fernandes Filho"

Referências.

1. Própolis Vermelha. 2. *Streptococcus pyogenes* - Patogenicidade. 3. Atividade antibacteriana. 4. Modulação bacteriana. I. Araújo, Alfredina dos Santos. II. Fernandes Filho, Antônio. III. Título.

CDU638.135(043)



Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar



CAMPUS DE POMBAL

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DA PRÓPOLIS VERMELHA DO SEMIÁRIDO PARAIBANO SOBRE *Streptococcus pyogenes*

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.ª D.Sc. Alfredina dos Santos Araújo
Orientadora

Prof. D.Sc. Antônio Fernandes Filho
Coorientador

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

Prof.ª D.Sc. Maria do Carmo Andrade Duarte de Farias
Examinadora Externa

Pombal - PB, 28 de fevereiro de 2018

CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AGROINDUSTRIAIS
RUA: JAIRO VIEIRA FEITOSA, Nº: 1770, CEP: 58840-000, POMBAL - PB
COORDENAÇÃO DO PPCSA: 3431-4094

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e da sabedoria, por me fortalecer em todos os momentos da minha vida.

A meus pais, que me orientaram a seguir o caminho dos estudos, a fim de vencer na vida.

A meus irmãos e familiares, pelo apoio, força, encorajamento, por acreditarem em minha capacidade.

A minha amiga Rogéria Máximo, pelo exemplo de inteligência e determinação, pela amizade, pelo apoio e disponibilidade em me ajudar.

A Maria do Carmo, pelo incentivo a me inscrever na seleção do mestrado, pelos ensinamentos.

A Antônio Fernandes, pela amizade, orientação, apoio; as palavras são poucas para expressar a minha gratidão a este grande amigo.

A Alfredina, pelos ensinamentos e orientação.

A Michel, pela disponibilidade em contribuir no desenvolvimento do trabalho.

A Luiz Jardelino, pelo apoio e disposição em contribuir para a pesquisa.

A minha amiga Rogéria Seixas, pelo companheirismo, amizade, pelo exemplo de pessoa, profissional e família que me transmitiu durante nossa convivência no mestrado. Um grande presente ganhei, sua amizade.

RESUMO

A atividade biológica de produtos naturais é reconhecida no Brasil e no mundo. Os produtos apícolas têm apresentado destaque por serem de fácil obtenção e mostrarem inúmeras propriedades farmacológicas. A própolis é uma matéria resinosa colhida por abelhas de diferentes exsudatos de plantas, com funções de selar e proteger as colmeias contra proliferação de microrganismos, dentre outras. Existem relatos sobre atividades da própolis relacionadas à ação antimicrobiana, cicatrizante, antioxidante, anti-inflamatória. Cepas de *Streptococcus* na cavidade oral apresentam resistência a múltiplas drogas, o que potencializa o interesse pelo uso de produtos de origem natural com propriedades farmacológicas. O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha sobre cepas de *Streptococcus pyogenes*; como também, verificar a interação do extrato da própolis vermelha em associação a antibióticos. A concentração inibitória mínima foi determinada pelo método de microdiluição em poços e serviu para avaliação das substâncias como moduladoras da resistência aos antibióticos. O ensaio de microdiluição não demonstrou atividade antimicrobiana relevante contra *Streptococcus pyogenes*. Na avaliação da atividade modulatória, foi observada ação sinérgica do extrato da própolis vermelha com amicacina, ciprofloxacino, oxacilina; em associação com benzilpenicilina, não houve efeito sinérgico.

Palavras-chave: Própolis vermelha, *Streptococcus pyogenes*, atividade antibacteriana, modulação bacteriana

ABSTRACT

The biological activity of natural products is recognized in Brazil and in the world. Apiculture products have been highlighted because they are easy to obtain and show numerous pharmacological properties. Propolis is a resinous material harvested by bees of different plant exudates, with the functions of sealing and protecting hives against the proliferation of microorganisms, among others. There are reports on propolis activities related to antimicrobial, healing, antioxidant, anti-inflammatory action. Strains of *Streptococcus* in the oral cavity present resistance to multiple drugs, which increases the interest in the use of products of natural origin with pharmacological properties. The objective of the study was to evaluate the antibacterial activity of the hydroalcoholic extract of the red propolis on strains of *Streptococcus pyogenes*; as well as to verify the interaction of red propolis extract in combination with antibiotics. The minimum inhibitory concentration was determined by the microdilution method in wells and served for evaluation of the substances as modulators of resistance to antibiotics. The microdilution assay did not demonstrate relevant antimicrobial activity against *Streptococcus pyogenes*. In the evaluation of the modulatory activity, the synergistic action of the extract of the red propolis with ampicillin, ciprofloxacin, oxacillin; in combination with benzylpenicillin, there was no synergistic effect.

Keywords: Red propolis, *Streptococcus pyogenes*, antibacterial activity, bacterial modulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa ilustrativo da região onde foi realizada a pesquisa-----	18
Figura 2 – Amostra da própolis vermelha bruta-----	19
Figura 3 – Fluxograma da preparação do extrato da própolis vermelha-----	20
Figura 4 – Mini-spray dryer MSDi 1.0-----	20
Figura 5 – (A e B) Extrato da própolis vermelha em pó-----	21
Figura 6 – Fluxograma da Concentração Inibitória Mínima (CIM)-----	22
Figura 7 – Fluxograma da atividade moduladora-----	23
Figura 8 – Placa avaliada na CIM-----	24
Figura 9 – Placa avaliada na CIM-----	25
Figura 10 – Placa avaliada na modulação-----	26
Figura 11 – Placa avaliada na modulação-----	27
Figura 12 – Gráfico da modulação-----	27

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA – *Analysis of Variance* (Análise de variância)

C – Celsius

CFP – Centro de Formação de Professores

CIM – Concentração inibitória mínima

FPS – Fator de proteção solar

g – gramas

GAS – Group A Streptococcus

HIA – *Agar Heart Infusion*

HIV – *Human Immunodeficienty Virus*

L/min – Litro por minuto

m³/min – Metro cúbico por minuto

mL/min – Mililitro por minuto

PB – Paraíba

PCR – Proteína C reativa

S. pyogenes – *Streptococcus pyogenes*

UFC – Unidade formadora de colônia

UFC/mL – Unidade formadora de colônia por mililitro

UFMG – Universidade Federal de Campina Grande

URCA – Universidade Regional do Cariri

UV – Ultravioleta

VHS – Velocidade de hemossedimentação

µg/mL – Microgramas por mililitro

µL - Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo Geral	10
2.2 Objetivos Específicos	10
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
3.1 Gênero <i>Streptococcus pyogenes</i>	11
3.2 Patogenicidade	11
3.3 Principais Infecções causadas por <i>Streptococcus pyogenes</i>	12
3.4 Tratamento e resistência de <i>Streptococcus pyogenes</i> aos antimicrobianos	14
3.5 Própolis	15
3.6 Própolis Vermelha	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Tipo de Pesquisa	18
4.2 Local da Pesquisa	18
4.3 Obtenção do Material botânico	19
4.4 Preparação do Extrato	20
4.5 Atividade contra bactérias	21
4.5.1 Microrganismos	22
4.5.2 Antibióticos	22
4.5.3 Concentração Inibitória Mínima – CIM	22
4.5.4 Modulação	23
4.6 Análise estatística	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	24
5.2 Modulação	26
6 CONCLUSÃO	30
7 REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

A atividade biológica de produtos naturais é reconhecida no Brasil e no mundo. As plantas medicinais e seus derivados vêm, há muito, sendo utilizados pela população brasileira nos cuidados com a saúde. Em países desenvolvidos como Canadá, França, Alemanha e Itália, a adesão a esses produtos como recurso terapêutico já é praticada por 70 a 90% da população (BRASIL, 2012; WHO, 2011).

Em meio à enorme biodiversidade nacional, os produtos de origem apícola têm apresentado destaque por serem de fácil obtenção e mostrarem inúmeras propriedades farmacológicas. No mercado nacional e internacional de produtos apícolas, a comercialização da própolis tem sido relevantemente difundida. Sua inserção no mercado é motivada principalmente pelas atividades biológicas atribuídas aos seus constituintes químicos. Por conseguinte, observa-se um aumento crescente do valor agregado ao produto (MARTINEZ; SOARES, 2012).

A própolis é uma matéria resinosa colhida por abelhas de diferentes exsudatos de plantas. Esta resina é usada pelas abelhas para selar e proteger as colméias contra a proliferação de microrganismos, incluindo fungos e bactérias (ANAUATE NETO et al., 2013). O extrato da própolis tem sido utilizado há milhares de anos na medicina popular para inúmeras finalidades (NOGUEIRA et al., 2007).

Existem relatos sobre atividades da própolis relacionadas à ação antimicrobiana, cicatrizante, antioxidante, imunomodulatória, anti-inflamatória, hipotensiva, anestésica, anticariogênica, dentre outras. Estes relatos, no entanto, carecem de comprovação da efetividade (BARBOSA et al., 2009; MAEKAWA et al., 2013).

Mais de 200 substâncias já foram identificadas na composição da própolis de regiões diferentes, como ácidos fenólicos, flavonóides, ésteres, diterpenos, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, alcoóis, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais (FUNARI; FERRO, 2006).

Convém ressaltar que a composição da própolis é determinada pelas características fitogeográficas existentes onde a colméia está localizada. Em uma mesma localidade, a colméia sofre também influência sazonal (SOUSA et al., 2007). Em razão da vasta variabilidade da flora brasileira, a composição da própolis é bastante complexa, existindo também variações relacionadas à origem genética das abelhas coletoras da própolis (SILVA et al., 2006).

As abelhas africanizadas trazidas ao Brasil são da espécie *Apis mellifera* e são classificadas em sete espécies diferentes: *Apis flórea*, *Apis cerana*, *Apis mellifera*, *Apis laboriosa*, *Apis andreniformes*, *Apis koschevnikov* e *Apis dorsata*. As abelhas do gênero *Apis* foram trazidas ao Brasil no século XIX e atualmente têm ampla distribuição em todo o país. Existem controvérsias se essas abelhas causam algum impacto sobre a fauna de abelhas nativas (MENDES et al., 2009).

As abelhas nativas *Melipona scutellaris*, por sua vez, são também denominadas “meliponíneos”. No Brasil, são responsáveis por 60 a 90% da polinização, conforme a região onde estão inseridas. Embora sua produção seja inferior a da *Apis mellifera*, é considerada de ótima qualidade. Tendo em vista a discrepância entre os hábitos dessas abelhas, sua produção e atividade biológica podem também apresentar diferenças (MICHENER, 2007; GONÇALVES, 2010).

Um grande número de cepas de bactérias, como as de *Streptococcus* na cavidade oral, apresentam resistência a múltiplas drogas, impactando fortemente nas taxas de morbimortalidade devido a infecções (RODRIGUES; BERTOLDI, 2010). Esse quadro tem potencializado a preocupação da população pelo uso de produtos com propriedades farmacológicas de origem natural, aliado ao interesse pelo consumo de produtos menos agressivos e a conveniência relacionada à possibilidade de acesso com menor custo (PACKER; LUZ, 2007).

Tendo em vista minha experiência como médica de família em áreas urbanas e rurais, temos observado a prevalência de infecções bacterianas da cavidade oral por espécies de *Streptococcus*. Por consequência, a busca de ampliar minhas alternativas terapêuticas configura-se uma constante. Não obstante a comprovação científica de algumas atividades biológicas da própolis, ainda existem várias lacunas que serão preenchidas ao longo dos anos a partir de pesquisas como esta.

Diante do exposto, questiona-se: Há atividade antibacteriana no extrato hidroalcoólico da própolis vermelha sobre *Streptococcus pyogenes*? Espera-se que os resultados sejam positivos e assim possam colaborar com o controle e/ou diminuição de infecções bacterianas por *Streptococcus pyogenes* e com os altos custos no tratamento dessas infecções.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha, sobre cepas de *Streptococcus pyogenes*.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato da própolis vermelha contra cepas de *Streptococcus pyogenes*;

Verificar a interação do extrato da própolis vermelha em associação com a amicacina, benzilpenicilina, ciprofloxacino e oxacilina.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Gênero *Streptococcus pyogenes*

O gênero *Streptococcus* corresponde a um grupo de bactérias em formato de cocos que se coram pelo Gram; se dispõem aos pares ou em cadeias, sendo aeróbia facultativa a maioria. Apresentam necessidades nutritivas complexas; muitas bactérias deste gênero fazem parte da flora normal do organismo humano, estando presentes em mucosas do trato genital, digestivo, respiratório e na pele (MANSANO e RAMOS, 2010).

Pela sua capacidade hemolítica, esse gênero pode ser classificado em *Streptococcus* beta-hemolíticos, o qual fazem a lise total das hemácias, e *Streptococcus* não beta-hemolíticos (RODRIGUES et al., 2014).

O *Streptococcus pyogenes* é o principal representante dos *Streptococcus* beta-hemolíticos; é uma bactéria extracelular, que se agrupa na forma de cocos em cadeia. Foi primeiramente caracterizado por Rebeca Lancefield como Estreptococo Beta-hemolítico do grupo A ou GAS (GAS, do inglês Group A Streptococcus); é constituído por um polímero de ramnose e N-acetil-D-glucosamina (AMICIS et al., 2012).

Alguns constituintes celulares e substâncias produzidas pelo *Streptococcus pyogenes* favorecem a sua virulência. A maioria das espécies possui uma cápsula de ácido hialurônico que protege a bactéria contra a fagocitose.

Ancorada na parede e se estendendo até a superfície da bactéria, encontra-se a Proteína M, uma proteína fibrilar com atividade anti-fagocitária; tem função de adesão à fibronectina, interage com o fibrinogênio mascarando a presença da bactéria no organismo, fixa-se à porção Fc dos anticorpos, bloqueando as suas interações com os fagócitos.

Considerada uma de suas principais adesinas, a Proteína F promove a adesão do *Streptococcus pyogenes* à mucosa da faringe. A proteína inibidora do complemento anula função lítica do sistema complemento.

O *Streptococcus pyogenes* produz duas hemolisinas, as estreptolisinas S e O; evidências mostram serem responsáveis pela morte de fagócitos, contribuindo para a virulência. Ainda produzem exotoxinas pirogênicas que se comportam como superantígenos e induzem produção de interleucinas (TRABULSI – ALBERTUM, 2015).

3.2 Patogenicidade

Streptococcus pyogenes causam infecções que se iniciam em vias aéreas superiores ou na pele. Em vias aéreas superiores, a transmissão se dá por meio de aerossóis, iniciando a

infecção por adesão da bactéria ao epitélio da mucosa. Apesar da faringite apresentar evolução variável e processo autolimitado, pode complicar o quadro clínico com escarlatina, choque tóxico, bacteremias.

A escarlatina e o choque tóxico, por sua vez, são consequentes a ação de toxinas, e a bacteremia por invasão da corrente sanguínea. A febre reumática, por exemplo, é a complicação não-supurativa principal, de origem autoimune (TRABULSI – ALBERTUM, 2015).

As infecções dérmicas podem ser adquiridas a partir de contato com pacientes infectados por *Streptococcus pyogenes* com piodermite; podendo evoluir para infecções superficiais ou profundas, estas de prognóstico desfavorável. As infecções cutâneas podem apresentar como seqüela não-supurativa a glomerulonefrite difusa aguda, de natureza imunológica (TRABULSI – ALBERTUM, 2015).

3.3 Principais Infecções causadas por *Streptococcus pyogenes*

A faringoamigdalite aguda é um problema de saúde pública, especialmente em crianças, em todo o mundo; maioria dos casos de etiologia viral benigna e de curso autolimitado. Porém, em alguns casos, a etiologia é bacteriana, apresentando como principal agente etiológico o *Streptococcus* beta-hemolítico do grupo A, podendo apresentar graves complicações, sendo a principal a febre reumática (BARBOSA JUNIOR et al., 2014).

A febre reumática e a doença reumática cardíaca podem ocorrer como seqüelas autoimunes em pacientes infectados por *Streptococcus pyogenes*. Quando as válvulas cardíacas são danificadas pela patologia, pode haver evolução para óbito por insuficiência cardíaca. Crianças e adultos jovens são os mais acometidos por febre reumática, sendo a doença reumática cardíaca a seqüela mais grave (AMICIS et al., 2012).

O diagnóstico da febre reumática é baseado em critérios: os critérios de Jones, que foram revisados e publicados em 2015. Os critérios maiores são: cardite, artrite, coréia, eritema marginado, nódulo subcutâneo; os critérios menores são: poliartralgia, febre, elevação do VHS e/ou PCR, intervalo PR prolongado corrigido para a idade (PEREIRA et al., 2016).

O paciente é avaliado como de baixo risco ou risco moderado/alto, também analisado se é o primeiro surto de febre reumática ou recidiva; para conclusão do diagnóstico é necessário evidência comprovada de infecção prévia pelo *Streptococcus* beta-hemolítico do grupo A. A profilaxia primária para esta condição clínica é diagnóstico precoce e tratamento eficaz das infecções de vias aéreas superiores causadas pelo *Streptococcus pyogenes* (PEREIRA et al., 2016).

Ainda em se tratando da discussão proposta, convém mencionar que a endocardite infecciosa causada por *Streptococcus pyogenes* apresenta morbidade e mortalidade significativas; apesar de tratamento adequado, apresenta prognóstico reservado devido a seu potencial de progressão, podendo evoluir para óbito (WEIDMAN et al., 2010).

A Bacteremia causada por *Streptococcus pyogenes* provém de uma fonte primária; em crianças, esta fonte é mais comum em faringites e infecções de pele. Houve uma diminuição da incidência de endocardite após o advento dos antibióticos, com tratamento adequado e precoce das infecções piogênicas, impedindo a semeadura da bactéria em endocárdio (WEIDMAN et al., 2010).

Além disso, a glomerulonefrite difusa aguda pós-estreptocócica tem associação com infecção primária de pele ou via aérea superior causada pelo *Streptococcus pyogenes*. Apresenta-se clinicamente como síndrome nefrítica (hematúria, edema, hipertensão e oligúria) (RODRIGUES et al., 2016).

Ressalta-se que a prognóstico e curso clínico da doença são mais favoráveis em crianças, nestes pacientes são raras a manifestação de proteinúria maciça e complicações cardiovasculares. Em adultos ou pacientes com quadro clínico incomum, torna-se necessário biópsia renal para elucidação diagnóstica (RODRIGUES et al., 2016).

Anualmente, segundo a Organização Mundial de Saúde, são diagnosticados 600 milhões de novos casos de faringoamigdalite aguda, causada por *Streptococcus pyogenes*, em crianças em todo o mundo. Desses casos, aproximadamente 500 mil evoluem com febre reumática e 300 mil com cardite reumática. Estatísticas revelam que a prevalência dos casos de febre reumática em países menos desenvolvidos, incluindo a América Latina, é três vezes maior que nos países mais desenvolvidos (BARBOSA JUNIOR et al., 2014).

No Brasil, estudos realizados pelas Sociedades Brasileiras de Cardiologia, Pediatria e Reumatologia revelam que, anualmente, são diagnosticados aproximadamente 10 milhões de casos de faringoamigdalite aguda de causa estreptocócica, que evoluem para febre reumática em 30 mil casos, dos quais 15 mil evoluem com acometimento cardíaco (BARBOSA JUNIOR et al., 2014).

Em 2007, internações de pacientes com febre reumática ou cardite reumática custaram ao Sistema Único de Saúde o valor aproximado de 10 milhões de reais; 31% das cirurgias cardíacas realizadas neste ano foram em pacientes com complicações cardíacas da febre reumática (BARBOSA JUNIOR et al., 2014).

3.4 Tratamento e resistência de *Streptococcus pyogenes* aos antimicrobianos

A literatura evidencia que os antibióticos de primeira escolha para o tratamento de infecções por *Streptococcus pyogenes* são: fenoximetilpenicilina (penicilina V oral) ou amoxicilina por 10 dias, ou ainda penicilina G benzatina por via intramuscular em dose única. Se houver alergia à penicilina, pode ser usado estolato de eritromicina por 10 dias ou azitromicina por 5 dias. O estado da arte não recomenda como primeira escolha a azitromicina, pois o *Streptococcus pyogenes* desenvolve resistência aos macrolídeos rapidamente (BALBANI et al., 2009).

A penicilina é o antimicrobiano indicado para o tratamento de infecções estreptocócicas, desde 1940; justificando-se pelo baixo custo, baixa frequência de reações adversas e ao espectro de ação limitado (SCALABRIN, 2003).

Em pesquisa com crianças rurais da Argentina, Delpech et al. (2017) não detectaram resistência de cepas de *Streptococcus pyogenes* a penicilina e cefotaxima, como também não foi observado em outros países.

Por sua vez, um estudo realizado em 25 instituições de oito países europeus evidenciou que, não houve expressão de resistência desta bactéria à penicilina ou cefotaxima (GRACIA, 2009).

Na pesquisa realizada por Delpech et al. (2017), por exemplo, foi verificada elevada prevalência de resistência do *Streptococcus pyogenes* às tetraciclina, de importante relevância pois se associa à resistência à eritromicina.

A resistência das bactérias aos antimicrobianos se tornou um problema de saúde pública, aumentando a morbimortalidade e os custos de saúde (RODRIGUES, 2010). O desenvolvimento de resistência bacteriana está associado à utilização indevida dos antimicrobianos, de forma irracional, tornando-se uma ameaça à sociedade.

O desenvolvimento de antimicrobianos diminuiu consideravelmente, com isso as opções de tratamento para infecções bacterianas se tornam limitadas; a indústria farmacêutica não consegue acompanhar a evolução da resistência bacteriana. É necessário o uso racional de antimicrobianos, lembrando o princípio da não maleficência, diminuindo o risco de resistência bacteriana (FARIA, 2016).

3.5 Própolis

A apicultura é um ramo da zootecnia, arte da criação de abelhas com ferrão, que contribui para o homem através da produção de mel, própolis, geléia real, cera (OLIVEIRA, 2015).

Em decorrência do aumento do número de enxames nativos e apiários, como também pela biodiversidade da flora apícola do Brasil, a apicultura é exercida em todos os estados brasileiros, com grande potencial produtivo e com mercado lucrativo para seus produtos.

Devido à estiagem, com prejuízo das atividades agrícolas, o interesse pela apicultura tem aumentado no interior da Paraíba, como uma nova atividade que exige menor consumo de água com bom retorno financeiro; há fornecimento de renda para o apicultor, ocupação de mão-de-obra familiar ou contratada e contribuição com a preservação da flora nativa (OLIVEIRA, 2015).

A palavra própolis é de origem grega, “pro” “em defesa de” e “polis” “cidade”; significando defesa da cidade, da colméia (ABREU, 2008). Na medicina popular a própolis era utilizada desde tempos antigos (GALVÃO et al., 2007). Era utilizada para o embalsamento dos mortos no Egito antigo (1700 a.C.); usada também pelos assírios, gregos, romanos, incas (PINTO et al., 2011).

A própolis era reconhecida devido a suas características medicinais por antigos médicos gregos e romanos, uma de suas utilidades foi de cicatrizante no tratamento de feridas; seu uso medicinal se perpetuou na Idade Média (RIGH, 2008).

Ainda em se tratando da própolis, explicita-se que a mesma é uma resina de composição complexa, coletada por abelhas da espécie *Apis mellífera* a partir de diversas partes de plantas como botões florais, brotos, exsudatos resinosos (OLDONI, 2007). Ao produto coletado das plantas, as abelhas acrescentam secreções salivares, pólen e cera, justificando a variação de cores, textura e consistência (PINTO et al., 2011); apresenta também influência em suas características de acordo com variações ambientais, como: flora, fauna, clima, época de colheita (PORTILHO et al., 2013).

Além disso, a própolis é composta quimicamente por flavonóides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), ácidos aromáticos e ésteres, cetonas e aldeídos, terpenóides e fenilpropanóides, esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos (Lustosa et al., 2008). Estão presentes também na composição química da própolis alguns oligoelementos, tais como: alumínio, vanádio, ferro, cálcio, silício, manganês, estrôncio e vitaminas B1, B2, B6 e C (SOUSA et al., 2007).

Extratos etílicos de própolis de diferentes espécies (marrom, verde e vermelha) apresentam flavonoides e compostos fenólicos; resultados obtidos no estudo de Andrade et al. (2017) revelam alta atividade antioxidante da própolis, principalmente devido a sua composição de compostos fenólicos, sugerindo uma fonte promissora de polifenóis biologicamente ativos.

Neste sentido, a própolis apresenta algumas finalidades na colméia; é usada para vedar aberturas, para ferrar a entrada da colméia, como forma de proteção; também é utilizada para envolver, “embalsamar”, invasores que foram mortos na colméia, impedindo a degradação destes com posterior contaminação; mantém constante a temperatura da colméia. A baixa incidência de bactérias e fungos na colmeia é decorrente da ação da própolis (RIGH, 2008).

Na década de 80, o interesse pela própolis aconteceu no Brasil, com o trabalho pioneiro de Ernesto Ulrich Breyer (1981) que descreveu em sua obra, “Abelhas e saúde”, as características terapêuticas da própolis e seu uso como antimicrobiano natural (Abreu, 2008; Lima, 2006).

A composição fitoquímica da própolis reflete a grande biodiversidade do Brasil. Até o momento, foram identificados 13 tipos de própolis, caracterizadas de acordo com suas características físico-químicas. Park et al. (2002) identificaram a origem botânica de três tipos de própolis: tipo 3 – *Populus L.* família *Salicaceae*, tipo 6 (própolis marrom) – *Hypts fruticosa*, tipo 12 (própolis verde) – *Baccharis dracunculifolia* (FRANCHIN et al., 2017).

Atualmente, a própolis ganhou destaque como produto natural, conhecida pela diversidade de propriedades biológicas que possui; é utilizada como anti-inflamatório, antimicrobiano, antioxidante, imunomodulador, hipotensor, cicatrizante, anestésico, anti-cancerígeno, anti-HIV e anti-cariogênico (Barbosa et al., 2009). Em decorrência de suas atividades biológicas, tem sido sugerido o uso da própolis como suplemento alimentar (Daugusch, 2008).

3.6 Própolis Vermelha

De acordo com as características físico-químicas, a própolis brasileira foi classificada em 12 grupos. Em colméias de abelhas *Apis mellifera*, dentro de manguezais do nordeste brasileiro, foi encontrado um novo tipo de própolis, de coloração vermelha, que foi classificada como própolis do grupo 13. Sua origem botânica provém da planta *Dalbergia ecastaphyllum*, encontrada ao longo da praia e região de mangue do nordeste brasileiro (DAUGSCH, 2008).

Bispo Junior et al. (2012) observaram efeito inibitório da própolis vermelha, em baixas concentrações, frente a *Staphylococcus coagulase negativa*; na concentração de 1%, o extrato etanólico da própolis vermelha foi eficiente para *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* e *Shigella flexneri*. Neste trabalho, observou-se que houve uma maior atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, em relação as Gram-negativas. Excelentes resultados foram encontrados para a *Candida albicans*.

Experimentos realizados em ratos ressaltam a atividade anti-inflamatória tanto da própolis vermelha como da própolis verde, ação esta observada a nível tópico/local (edema de orelha), como a nível sistêmico (edema de pata). Foi observada atividade antifúngica mais efetiva do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em comparação ao de própolis verde, frente a *Candida albicans* e *Candida guilliermondii* (ABREU, 2008). Siqueira et al. (2014) demonstram em seu trabalho que a própolis vermelha apresenta potencial de inibição da *Enterococcus faecalis*.

Os extratos etanólicos e glicólicos de própolis verde e vermelha apresentam capacidade de absorção da radiação ultravioleta; extratos de própolis verde apresentam valores de absorção na região UV mais significativos que a própolis vermelha. Realizada incorporação de extratos de própolis a um filtro solar químico, observa-se aumento relativo no valor do FPS, havendo uma maior proteção contra os raios solares (NASCIMENTO et al., 2009).

Silva et al. (2017) demonstraram em seu trabalho o potencial anti-inflamatório da própolis vermelha brasileira. É sugerida a atividade da própolis vermelha inibindo citocinas pró-inflamatória e diminuindo a expressão de genes pró-inflamatórios, que ativam vias do sistema complemento e relacionados à migração de neutrófilos e macrófagos. O estudo refere que a própolis vermelha pode ser tão efetiva quanto a dexametasona, mas atuando com mecanismos de ação diferentes.

Com a finalidade de potencializar a ação de antibióticos e diminuir a incidência de efeitos colaterais, sugere-se a associação a produtos de ação antimicrobiana de origem natural. Araújo e Marcucci (2011) observaram sinergismo da própolis vermelha associada a vancomicina contra cepas de *Enterococcus faecalis*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de Pesquisa

Trata-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 se deve ao emprego do método experimental, que pode ser considerado como o método por excelência das ciências naturais (PRADONOV; FREITAS, 2013).

4.2 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-Campos de Cajazeiras-PB, por se tratar de um laboratório que dispõe de toda tecnologia para o desenvolvimento do estudo, no que concerne a todo um aparato de equipamento, materiais e profissionais capacitados para atuarem na pesquisa.

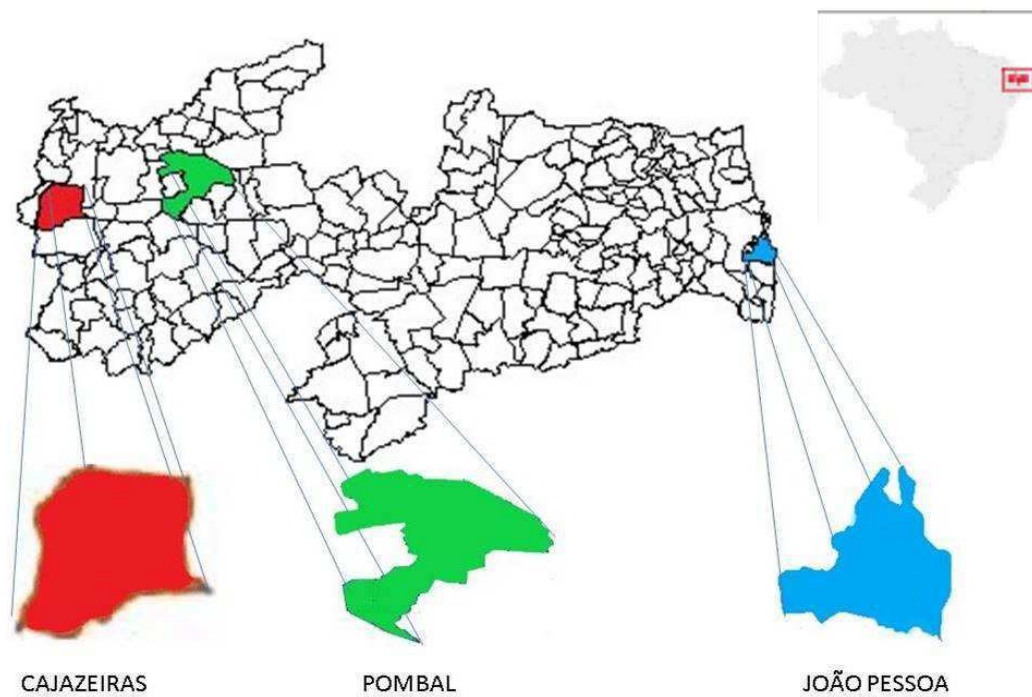


Figura 1 - Mapa ilustrativo da região onde foi realizada a pesquisa

4.3 Obtenção do Material botânico

A amostra da própolis vermelha foi obtida no apiário EDIMEL localizado na cidade de João Pessoa – PB, Região Nordeste do Brasil.



Figura 2- Amostra da própolis vermelha bruta

4.4 Preparação do Extrato

O material apícola, 50g de própolis vermelha bruta, foi pesada, macerada e posteriormente, submetida a solução hidroalcolica na concentração de 1:1 por 72 horas. 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 (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: $1,4\text{ m}^3/\text{min}$ (MASTERS, 1991).

O processo de secagem por atomização consiste na mudança de um produto que se encontra no estado fluido para o estado sólido em forma de pó, através de sua passagem em um meio aquecido, numa operação contínua (MASTERS, 1991).

Para diluição utilizou-se 0,5 μg do extrato da própolis vermelha, que foi homogeneizado com 1 mL de Twin a 80% e 4 mL de água destilada, em recipiente estéril.

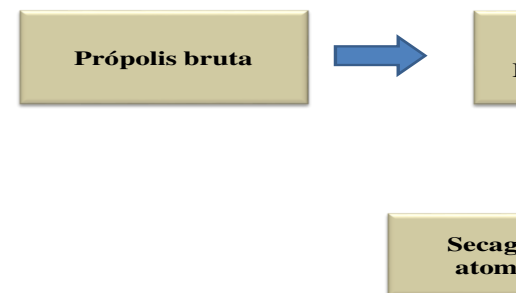


Figura 3- Fluxograma da preparação do extrato da própolis vermelha



Figura 4- Mini-spray dryer MSDi 1.0



Figura 5: (A e B) Extrato da Própolis vermelha em pó

4.5 Atividade contra bactérias

4.5.1 Microrganismos

Os experimentos foram realizados com as linhagens padrões bacterianas de *Streptococcus pyogenes* (SP-ATCC19615) 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.

4.5.2 Antibióticos

Para avaliar a atividade moduladora da ação antibiótica do extrato da própolis vermelha foram utilizados os seguintes antibióticos, ciprofloxacino, oxacilina, amicacina e benzilpenicilina.

4.5.3 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 10⁵ (Unidade Formadora de Colônia) UFC/mL (para escala de Mcfarland 0,5) e uma concentração do extrato da própolis vermelha de 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 μL do inóculo em 900 μL 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 μL em cada poço, perfazendo 09 poços.

Em sentido vertical foi utilizado 100 μL em cada poço, perfazendo 08 poços. Após essa etapa, foi realizada a microdiluição das substâncias (extrato de própolis e antibióticos) sendo 100 μL 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 a 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 μL de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido).

A leitura desse experimento tem 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. A CIM foi definida como a menor concentração na qual nenhum

crescimento bacteriano foi observado, e serviu para a avaliação das substâncias como moduladoras da resistência aos antibióticos, a concentração subinibitória foi determinada pelo CIM/8 para SP-ATCC19615. Os testes foram realizados em triplicata.

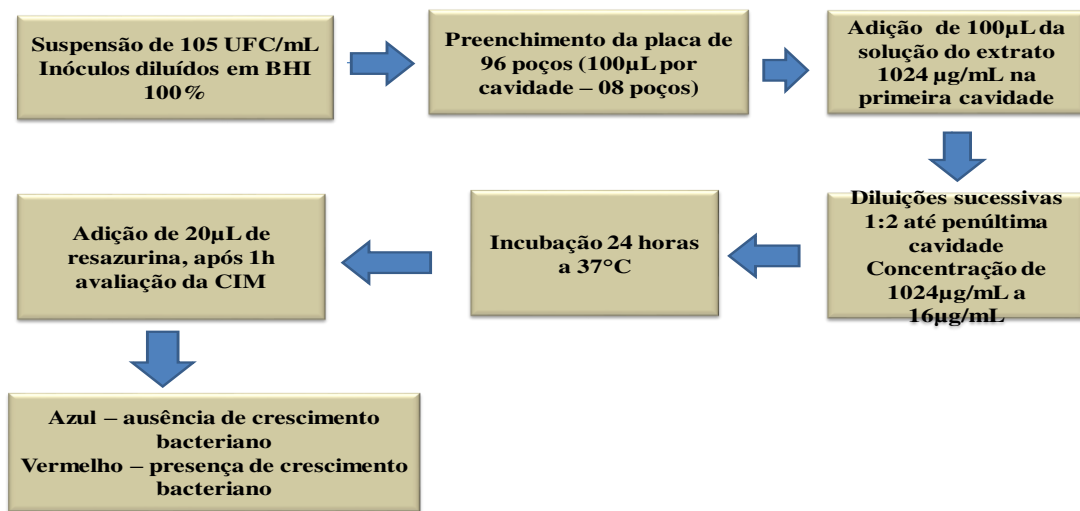


Figura 6- Fluxograma da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

4.5.4 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 µg/mL, diluídas sequencialmente 1:2 até 16 µg/mL, sendo misturadas em caldo BHI 100%, este preparado com água destilada estéril.

Em cada poço foi adicionado 100 µL de caldo BHI 100% como 128 µg/mL do extrato da própolis vermelha que foi definida pelo CIM analisado com antecedência e inóculo bacteriano (105 UFC/mL). Tais quantidades foram determinadas pela fórmula de concentração.

No primeiro poço será adicionado 100 µL de uma solução do antibiótico com 1024 µg/mL, procedendo a diluição sequencial com título 1:2 nos poços seguintes. As placas foram incubadas a 37°C e lidas depois de 24h, com revelação pela resazurina como descrito na determinação do CIM.

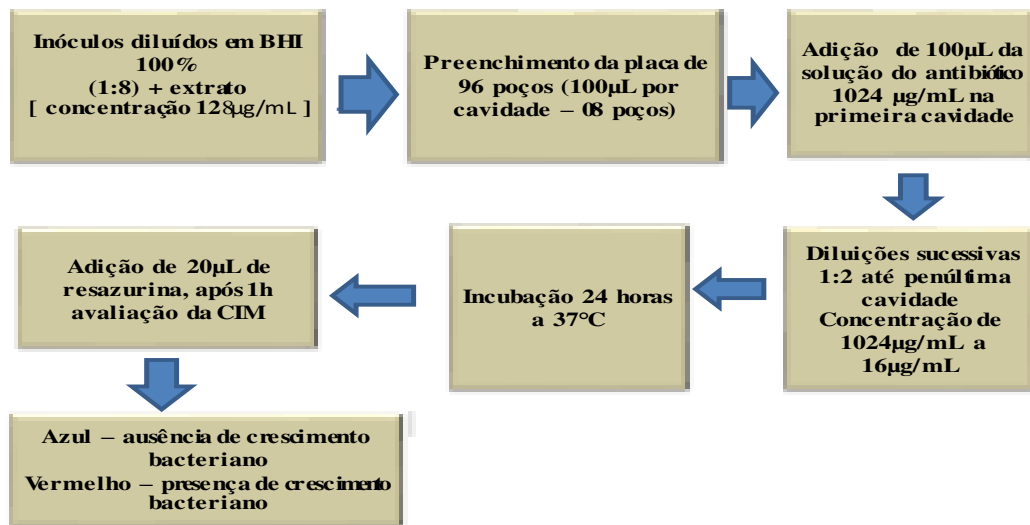


Figura 7: Fluxograma da atividade moduladora

4.6 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 Gradphpad Prisma 7.0. Quando o valor de F for significativo, comparações *post hoc* foram feitas pelo teste de Newman-Keuls. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima, revelaram que o extrato da própolis vermelha paraibana não possui atividade antimicrobiana clinicamente relevante, para *S. pyogenes* (SP-ATCC19615), pois o valor do CIM ≥ 1024 µg/mL.

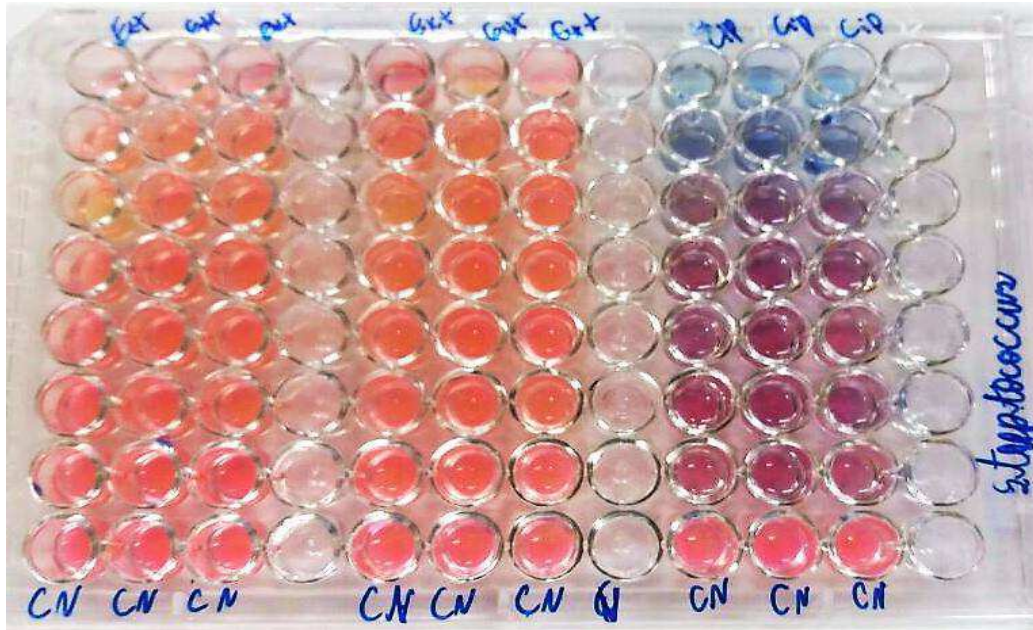


Figura 8: Placa avaliada na CIM

Outros estudos evidenciaram atividade antimicrobiana da própolis vermelha, Bispo Junior et al. (2012) observaram sensibilidade de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa*) ao extrato bruto da própolis vermelha, como também à fração hexânica, fração clorofórmica e acetanólica; foi evidenciada atividade antimicrobiana do extrato de própolis vermelha contra cepas Gram-positivas (100%), Gram-negativas (62,5%).

Maia Araújo et al. (2011) revelam atividade antibacteriana do extrato hidroalcolólico da própolis vermelha frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, tanto na técnica do poço como na técnica de difusão em disco. Atividade antibacteriana do extrato da própolis vermelha contra cepas de *Staphylococcus aureus* é demonstrada, pelo método de microdiluição, com CIM de 135,87 a 271,74 $\mu\text{g/mL}$ (Almeida et al., 2017).

Regueira Neto et al. (2017) demonstrou que a própolis vermelha apresentou valores de CIM entre 64 e 1024 $\mu\text{g/mL}$, contra cepas de *Staphylococcus aureus*, pelo método de microdiluição em poços; o estudo foi realizado com própolis coletadas em estação chuvosa e seca, o que pode ter determinado essa variação da CIM.

De acordo com Nunes et al. (2009), há variação na composição química da própolis de acordo com a sazonalidade; no período chuvoso, as abelhas visitam arbustos e subarbustos, enquanto que no período de estiagem, as espécies lenhosas são as principais fontes de néctar, pólen e resina para as abelhas. Pode haver variação de resultados microbiológicos entre diferentes grupos de investigação pelos fatores associados à técnica de extração, origens

geográficas diferentes, época em que a resina foi extraída, como também presença de qualquer contaminante.

No estudo também foi determinada a CIM com os antibióticos, amicacina, ciprofloxacino, benzilpenicilina e oxacilina. Os resultados revelaram um valor de CIM de 1024 $\mu\text{g/mL}$ para a amicacina, 512 $\mu\text{g/mL}$ para o ciprofloxacino, 128 $\mu\text{g/mL}$ para a benzilpenicilina, 1024 $\mu\text{g/mL}$ para a oxacilina.

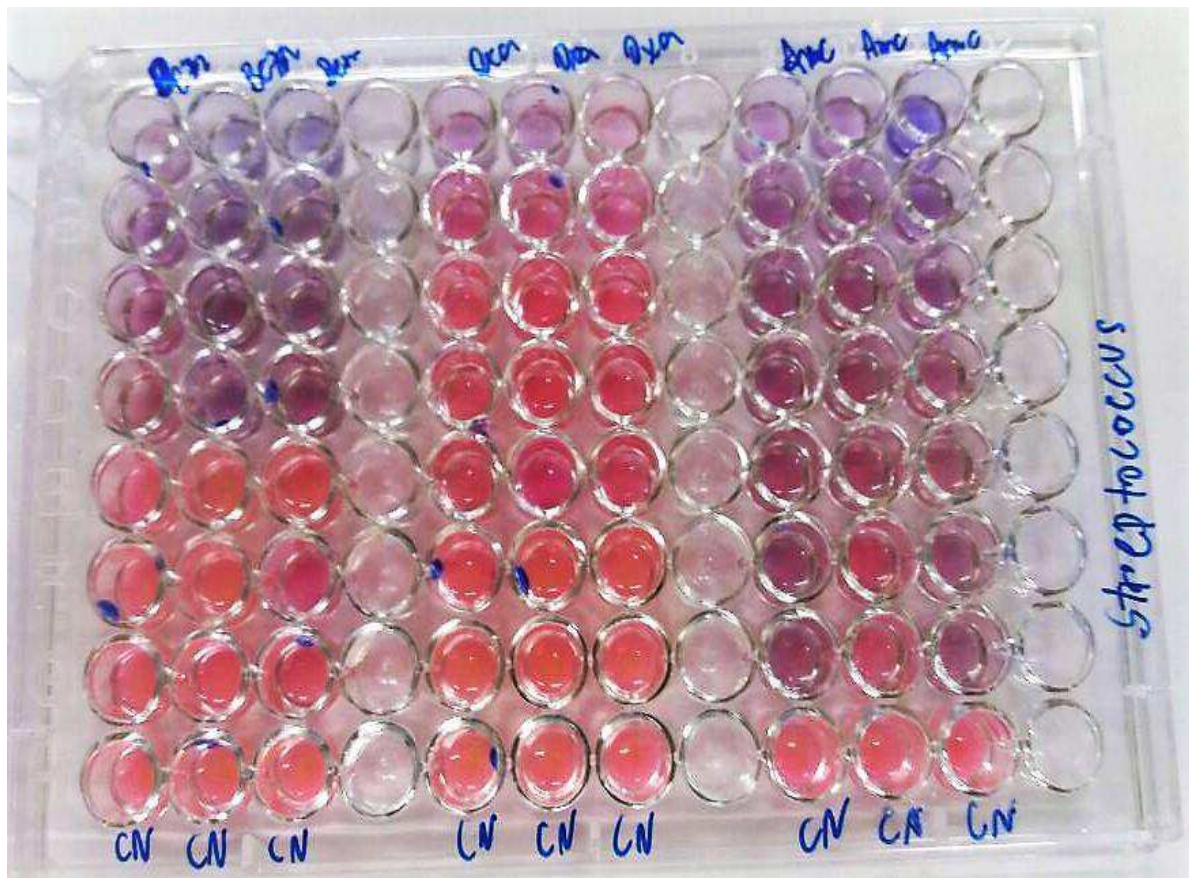


Figura 9: Placa avaliada na CIM

5.2 Modulação

O teste de modulação objetiva verificar a influência da concentração subinibitória do extrato da própolis vermelha sobre a ação de diversas concentrações de antibióticos frente a cepas bacterianas.

A concentração subinibitória é determinada por CIM/8; como não foi possível determinar a CIM do extrato da própolis vermelha, utilizou-se a concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$

dividido por 8, apresentando a concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$ a ser usada nos ensaios de modulação.

Os resultados demonstraram que a amicacina apresentou sinergismo na modulação frente a *S. pyogenes*, com redução da CIM de 1024 para 16 $\mu\text{g/mL}$. Houve antagonismo da benzilpenicilina, com aumento da CIM de 128 $\mu\text{g/mL}$ para 512 $\mu\text{g/mL}$. O ciprofloxacino apresentou sinergismo, com redução da CIM de 512 para 16 $\mu\text{g/mL}$. A oxacilina também apresentou sinergismo, com redução da CIM de 1024 para 256 $\mu\text{g/mL}$.

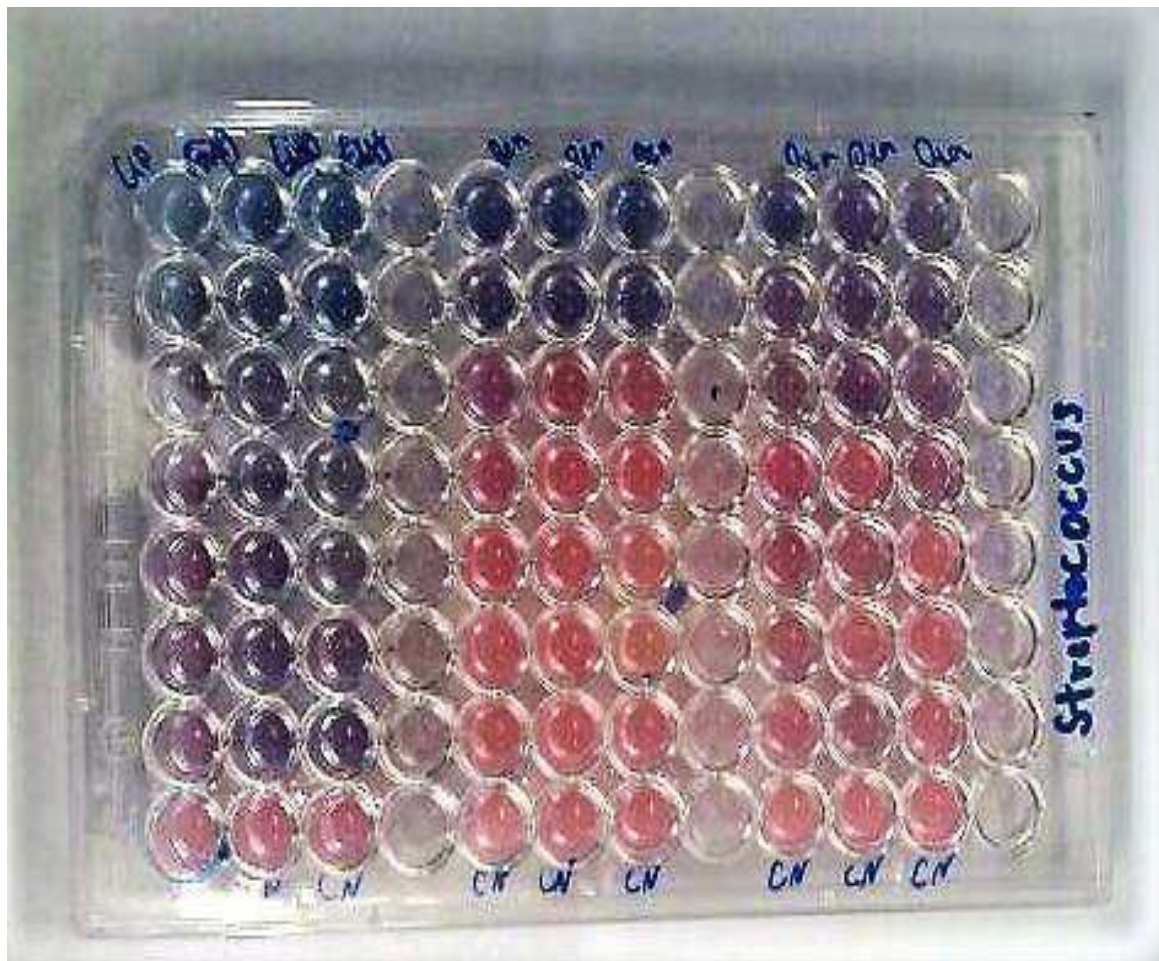


Figura 10: Placa avaliada na modulação

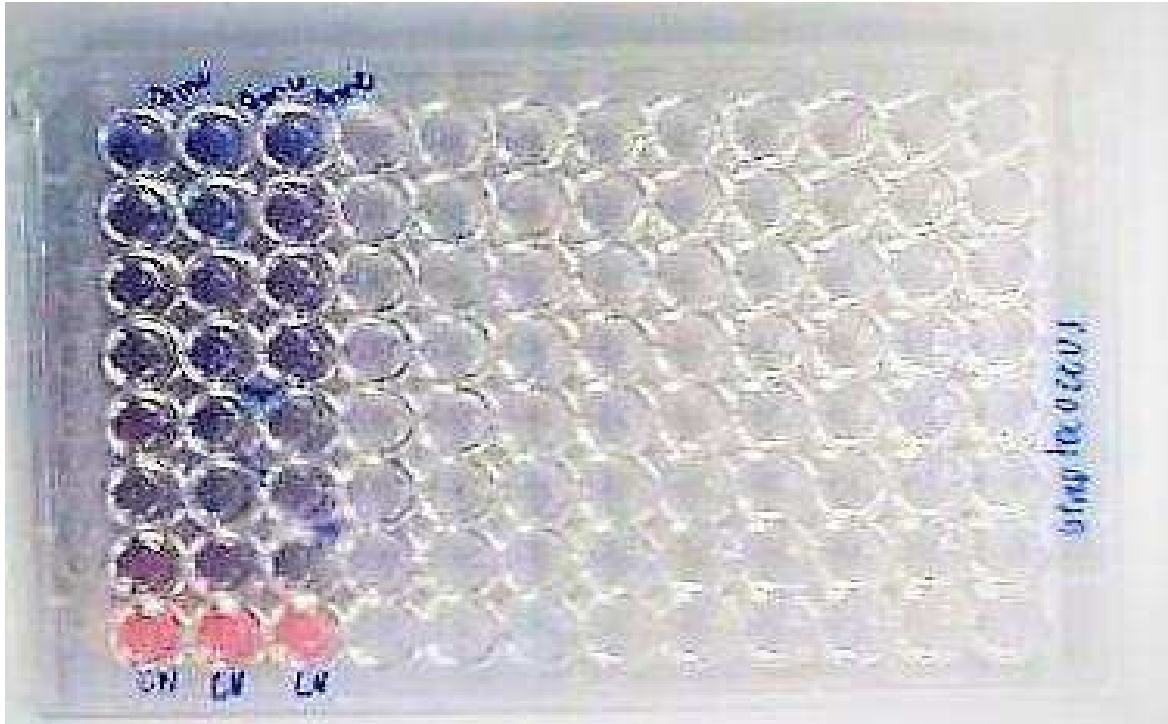


Figura 11: Placa avaliada na modulação

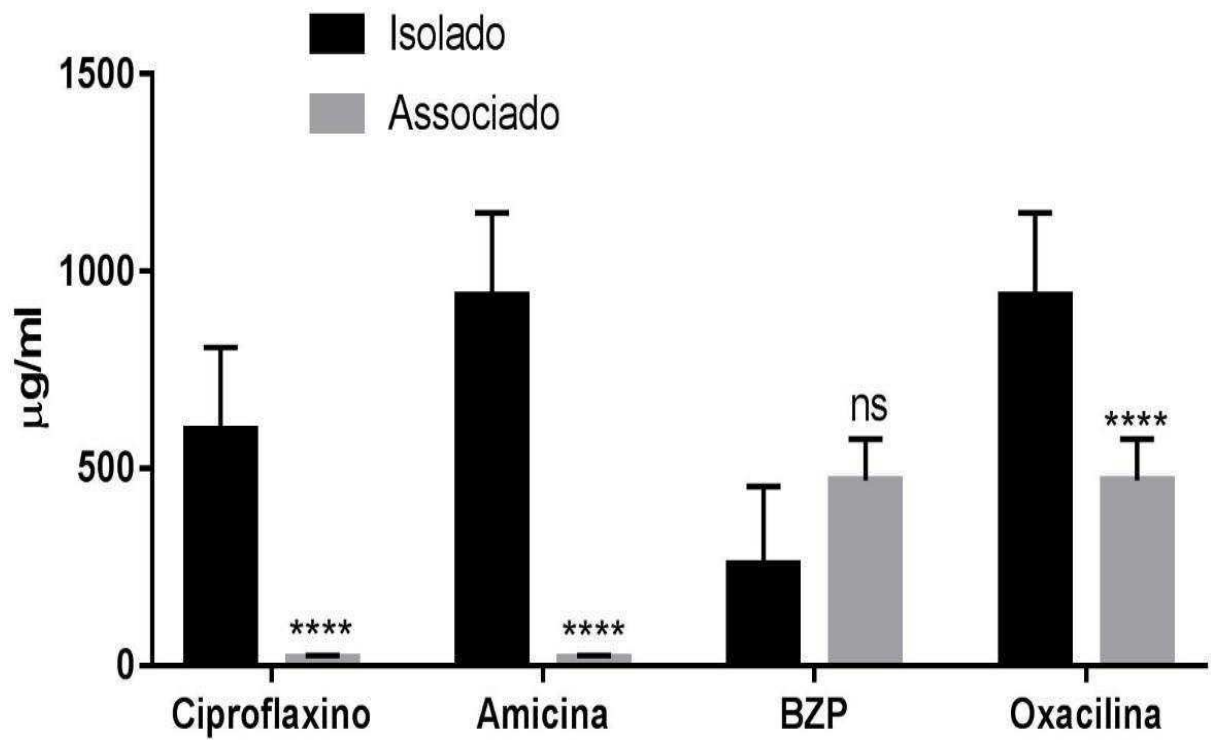


Figura 12: Gráfico da modulação

Regueira Neto et al. (2017) avaliaram em seu estudo a modulação da própolis vermelha coletada em período chuvoso e de estiagem, frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A própolis vermelha coletada em estação seca demonstrou melhorar a atividade do imipenem e gentamicina contra cepas das bactérias referidas; no entanto, não houve efeito sinérgico entre a própolis vermelha coletada em estação chuvosa e o imipenem e a gentamicina, contra as mesmas cepas bacterianas.

6 CONCLUSÃO

O ensaio de microdiluição não demonstrou atividade antimicrobiana relevante contra *Streptococcus pyogenes*.

Na avaliação da atividade modulatória, foi observada ação sinérgica do extrato da própolis vermelha em associação com amicacina, ciprofloxacino e oxacilina; em associação com benzilpenicilina não houve efeito sinérgico.

Padronização sobre locais de coleta da própolis, como também variação sazonal e formas utilizadas em sua extração, podem contribuir positivamente para assegurar melhores resultados em pesquisas futuras. As ações podem estar relacionadas com a composição química da própolis.

A continuidade dos estudos acerca dos tipos de própolis e suas atividades é sugerida, a fim de ampliar as evidências científicas, subsidiando assim novas alternativas terapêuticas, proporcionando um cuidado seguro e de qualidade.

7 REFERÊNCIAS

- ABREU, A. P. L. Estudo comparativo da atividade anti-inflamatória e antifúngica de extratos de própolis vermelha e verde. **Dissertação** (Mestrado em Farmacologia Clínica), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- ALMEIDA, E. T. C. et al. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. **Journal of Pharmaceutica Analysis**, v.7, n.5, p.280-287, 2017.
- AMICIS, K. M.; SANTOS, N. M.; GUILHERME, L. Febre reumática – patogênese e vacina. **Rev. Med.**, São Paulo, v.91, n.4, p.253-260, 2012.
- ANDRADE, J. K. S. et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**. V.101, p.129-138, 2017.
- ANAUATE NETTO, C. et al. Effects of typified propolis on mutans streptococci and lactobacilli: a randomized clinical trial. **Brazilian Dental Science**, v.16, n.2, p. 31-36, 2013. Disponível em: < <http://ojs.ict.unesp.br/index.php/cob/article/view/879/802>>. Acesso em 10 agosto 2015.
- ARAÚJO, K. C. S.; MARCUCCI, M. C. Efeito sinérgico da própolis tipificada contra *Enterococcus faecalis*. **Revista de pesquisa e inovação farmacêutica**, v.3, n.1, p. 9 – 14, 2011.
- BALBANI, A. P. S. et al. Faringotonsilites em crianças: visão de uma amostra de Pediatras e Otorrinolaringologistas. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. V.75, n.1, p.139-46, 2009.
- BARBOSA, M.H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v.22, n.3, p.318-22, 2009.
- BARBOSA JUNIOR, A. R. et al. Diagnóstico da faringoamigdalite estreptocócica em crianças e adolescentes: limitações do quadro clínico. **Revista Paulista de Pediatria**, v.32, n.4, p.285-291, 2014.
- 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.
- BRASIL. Secretaria de Atenção Básica. Práticas integrativas e Complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. **Cadernos de Atenção Básica**, n. 31. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
- DAUGSCH, A.; MORAES C. S.; FORT, P.; PARK. Y. K. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. **eCAM**. V.5, n.4, p.435-441, 2008.
- DELPECH, G. et al. Throat carriage rate and antimicrobial resistance of *Streptococcus pyogenes* in rural children in Argentina. **Journal of Preventive Medicine & Public Health**. V.50, p. 127-132, 2017.

DUATE, S. et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyl transferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26; n.4. p. 527-31, 2003.

FARIA T. V., PESSALACIA J. D. R., SILVA E. S. Fatores de risco no uso de antimicrobianos em uma instituição hospitalar: reflexões bioéticas. **Acta Bioethica**, v.22, n.2, p.321-329, 2016.

FRANCHIN, M. et al. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V.30, p.1-7, 2017.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. **Revista Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, p.171-178, 2006.

GALVÃO J. et al. Biological therapy using propolis as nutritional supplement in cancer treatment. **International Journal of Cancer Research**. v.3, p.43-53, 2007.

GONÇALVES, P. H. P. Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Friesomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas. 2010. 148f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GRACIA M.; DIAZ C.; CORONEL P.; GIMENO M. et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pyogenes* in Central, Eastern, and Baltic European countries, 2005 to 2006: The cefditoren surveillance program. **Diagn Microbial Infect Dis**. V.64, n.1, p.52-56, 2009.

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.

LONGHINI, R. et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.17, n.3, p.388-395, 2007.

LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.18, n.3, p.447-454, 2008.

MAEKAWA, L.E. et al. Effect of *Zingiber officinale* and propolis on microorganisms and endotoxins in root canals. **Journal of Applied Oral Science**, v.21, n.1, p. 25–31, 2013.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3881809/pdf/jaos-21-01-0025.pdf> >. Acesso em 10 de agosto 2015.

MAIA ARAÚJO, Y. L. F. et al. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcolico de própolis vermelha. **Scientia plena**, v.7, n. 4, 2011.

MANSANO, E. S. B.; RAMOS, E. R. P. Prevalência de *Streptococcus pyogenes* em secreção de orofaringe de acadêmicos da área da Saúde. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.3, n.2, p.161-166, 2010.

MARTINEZ, O.A.; SOARES, A.E.E. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção da própolis. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.13, n.4, p.982-990, 2012.

MASTERS, K. Spray drying handbook. Longman Scientific & Technical, New York. 1991.
MENDES, C.G. et al. As análises de mel: revisão. **Revista Caatinga**. Mossoró, v.22, n.2, p. 7-14, 2009.

MICHENER, C. D. The bees of the world. **The Johns Hopkins University Press. Baltimore**. 2007.

NOGUEIRA, M.A. et al. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Viçosa, n.1, p.93-97, 2007.

NUNES, L. C. C. et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, 2009.

OLDONI, T. L. C. Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellífera*. **Dissertação** (Mestrado em Ciências – área Ciências e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, F. L. Apicultura no sertão paraibano: principais dificuldades sob a ótica dos pequenos apicultores. **Dissertação** (Mestrado em sistemas agroindustriais), Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2015.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, n.1, p.102-107, 2007.

PARK, Y. K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.997 – 1003, 2002.

PEREIRA, B. A. F.; BELO, A. R.; SILVA, N. A. Febre reumática: atualização dos critérios de Jones à luz da revisão da American Heart Association – 2015. **Revista Brasileira de Reumatologia**. V.4, p.364-368, 2016.

PINTO, L. M. A.; PRADO, N. R. T.; CARVALHO, L. B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista eletrônica de farmacologia**. v.8, n.3, p.76-100, 2011.

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, 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>.

RIGH, A. A. Perfil químico de amostras de própolis brasileira. **Dissertação** (Mestrado em Ciências – área Botânica), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RODRIGUES, A.E. et al. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em regiões distintas no Estado da Paraíba. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.5, p.1166-1171, 2005.

RODRIGUES, B. I.; HASS, M. Post- Streptococcal Glomerulonephritis. **Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations**. Oklahoma. University of Oklahoma Health Sciences Center, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333429/> > Acesso em 20 de janeiro de 2018.

RODRIGUES, F.A.; BERTOLDI, A.D. Perfil da utilização de antimicrobianos em um hospital privado. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.15, supl.1, p.1239-1247, 2010.

RODRIGUES, G. P. et al. Efeito inibitório do extrato alcóolico de *Psidium guajava* sobre a bactéria *Streptococcus pyogenes*. **CuidArte enfermagem**, Catanduva/SP, v.8, n.2, p.71-146, 2014.

SCALABRIN, R et al. Isolamento de *Streptococcus pyogenes* em indivíduos com faringoamigdalite e teste de susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. São Paulo, v.69, n.6, 2003.

SILVA, B. B.; KAWAMOTO, D. et al. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. **Journal of Ethnopharmacology**. v.207, p. 100-107, 2017.

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

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

SOUSA, J.P.B. et al. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, João Pessoa, v.17, n.1, p.85-93, 2007.

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

WEIDMAN, D. R.; HASHAMI, A. I.; MORAIS, S. K. Two cases and a review of *Streptococcus pyogenes* endocarditis in children. **BMC Pediatric**, v.4, p.227, 2010.

WHO - World Health Organization - The world medicines situation 2011. **Traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva, 2011.