



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA**

CAIO FELIPE PESSOA DE MACEDO

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE
EXTRATOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRAS**

BRASÍLIA, DF

2021

CAIO FELIPE PESSOA DE MACEDO

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE
EXTRATOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito para obtenção do grau de Bacharel
em Farmácia, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pd	Pessoa de Macedo, Caio Felipe DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRAS / Caio Felipe Pessoa de Macedo; orientador Erica da Silva Monteiro; co-orientador Daniela Castilho Orsi. -- Brasília, 2021. 51 p. Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de Brasília, 2021. 1. Própolis verde. 2. Própolis marrom. 3. Própolis vermelha. 4. Resazurina. 5. Atividade antibacteriana. I. da Silva Monteiro, Erica, orient. II. Castilho Orsi, Daniela, co-orient. III. Título.
----	--

Orientadora: Farmacêutica Erika da Silva Monteiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

BRASÍLIA, DF

2021

CAIO FELIPE PESSOA DE MACEDO

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE
EXTRATOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRAS**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora Farmacêutica Erika da Silva Monteiro
(FCE/ Universidade de Brasília)

Farmacêutica Ana Carolina Almeida de Oliveira Ferreira
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2021

DEDICATÓRIA

Dedico a todos que estiveram ao meu lado, em especial à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família e amigos por sempre ter me apoiado, acreditado e incentivado.

À minha orientadora Erika da Silva Monteiro e co-orientadora Dra. Daniela Castilho Orsi por ter dado todo o suporte, tempo e dedicação para a confecção deste trabalho.

Aos professores da FCE pela empenho ao ensino de qualidade, e demais colaboradores por dar o suporte para o funcionamento adequado da instituição.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilização de tempo para a leitura e avaliação deste.

Agradeço a todos que tornaram, direta ou indiretamente, possível a realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: A própolis é uma substância natural complexa sintetizada por abelhas por meio de produtos encontrados em fontes vegetais. No Brasil entre as diferentes própolis brasileiras, temos as do tipo verde, vermelha e marrom. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi realizar a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos de própolis brasileiras frente a bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Streptococcus mutans*) e Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*). **Métodos:** Foram utilizados seis extratos comerciais de própolis (incluindo própolis do tipo verde, marrom e vermelha; extratos alcoólicos e aquoso e extratos com 30 e 70% de própolis in natura). A determinação da CIM se deu pela adição de resazurina aos inóculos bacterianos testados com diferentes concentrações dos extratos de própolis, para realizar a leitura visual dos resultados, em que a cor azul caracterizou a inatividade bacteriana e a cor rosa o crescimento das bactérias. Portanto a CIM foi definida como a menor concentração dos extratos de própolis que inibiram o crescimento microbiano e apresentaram cor azul na presença da resazurina. **Resultados:** Os valores de CIM encontrados para as bactérias Gram-positivas variaram entre 0,8 mg/mL e >31,2mg/mL. Para *S. aureus*, o menor valor de CIM foi obtido com o extrato de própolis verde A (1,0 mg/mL). Para *B. cereus*, o menor valor de CIM foi obtido com o extrato de própolis marrom (0,8 mg/mL) e para *S. mutans*, o menor valor de CIM foi obtido com o extrato de própolis vermelha (1,3 mg/mL). Para as bactérias Gram-negativas os valores variaram entre 3,8 mg/mL e >160 mg/mL. Para *E. coli*, os menores valores de CIM foram obtidos com os extratos de própolis verde A (3,8 mg/mL) e vermelha (4,0 mg/mL). Para *S. enterica*, os menores valores de CIM foram obtidos com os extratos de própolis verde A e verde B (4,8 mg/mL) e para *P. aeruginosa*, o menor valor de CIM foi obtido com o extrato de própolis vermelha (3,2 mg/mL). **Conclusão:** Os resultados deste estudo mostraram que os extratos de própolis brasileiras apresentam uma melhor atividade antibacteriana para as cepas Gram-positivas em relação as Gram-negativas. Diversos fatores podem interferir na ação antibacteriana dos extratos de própolis, como localização geográfica, plantas utilizadas

pelas abelhas, sazonalidade, métodos de extração, além da estrutura bacteriana de cada cepa.

Palavras-chave: própolis verde, própolis marrom, própolis vermelha, resazurina, atividade antibacteriana

ABSTRACT

Introduction: Propolis is a complex natural substance synthesized by bees through products found in plant sources. In Brazil between the different Brazilian propolis, we have green, red and brown types. **Objectives:** The aim of this work was to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of several extracts of Brazilian propolis against the species of Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Streptococcus mutans*) as well as for the species of Gram-negative bacteria (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*). **Methods:** For this, six commercial extracts of propolis (including green, brown, and red propolis; alcoholic and aqueous extracts; in addition to extracts with 30 and 70% of propolis in natura) were used. The MIC was determined by adding resazurin to the bacterial inoculums tested with different concentrations of the propolis extracts, to make a visual reading of the results, in which the blue color characterized bacterial inactivity and the pink color the growth bacteria. Therefore, MIC was defined as the lowest concentration of propolis extracts that inhibited microbial growth and presented a blue color in the presence of resazurin. **Results:** The MIC values found for Gram-positive bacteria varied between 0.8 mg/mL and >31.2 mg/mL. For *S. aureus*, the lowest MIC value was obtained with the green propolis extract A (1.0 mg/mL). For *B. cereus*, the lowest MIC value was obtained with the brown propolis extract (0.8 mg/mL) and for *S. mutans*, the lowest MIC value was obtained with the red propolis extract (1.3 mg/mL). For *E. coli*, the lowest MIC values were obtained with green A (3.8 mg/mL) and red (4.0 mg/mL) propolis extracts. For *S. enterica*, the lowest MIC values were obtained with green A and green B propolis extracts (4.8 mg/mL) and for *P. aeruginosa*, the lowest MIC value was obtained with the red propolis extract (3.2 mg/mL). The results of this study showed that Brazilian propolis extracts have a better antibacterial activity for Gram-positive strains compared to Gram-negative strains. Several factors can

interfere with the antibacterial action of propolis extracts, such as geographic location, plants used by bees, seasonality, extraction methods, in addition to the bacterial structure of each strain.

Keywords: green propolis, brown propolis, red propolis, resazurin, antibacterial activity

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Revisão de literatura.....	13
2.1. Atividade antibacteriana e antioxidante das própolis brasileiras.....	13
2.2. Mecanismos de ação da atividade antibacteriana e antioxidante das própolis	16
2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) nos extratos de própolis.....	17
2.4. Resistência antibacteriana.....	19
2.5. A busca por novos agentes antimicrobianos.....	23
3. Objetivo geral.....	24
3.1. Objetivos específicos.....	24
4. Justificativa.....	24
5. Materiais e Métodos.....	25
5.1. Amostras de extratos de própolis.....	25
5.2. Preparo dos inóculos bacterianos.....	25
5.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis pelo método de macro diluição em caldo.....	26
6. Resultados e Discussão.....	27
7. Conclusão.....	34
8. Referências Bibliográficas.....	34
9. Anexos.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Determinação de CIM pela turbidez 18

LISTA DE TABELAS

Quadro 1- Identificação dos extratos de própolis	25
.....	
Tabela 1 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis para as bactérias Gram-positivas testadas	28
.....	
Tabela 2 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis para as bactérias Gram-negativas testadas	30
.....	
Tabela 3 – Comparação da CIM dos extratos de própolis para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC- American Type Culture Collection

°C- graus Celsius

Caldo LB- Caldo Luria Bertani

CA-MRSA- Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

CIM- Concentração inibitória mínima

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute

D.O- densidade óptica

ESBL- Extended-spectrum beta lactamase

HA-MRSA- Hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MCR- mobilized colistin resistance

mg- miligramas

mL- mililitros

MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

nm- nanômetro

OMS- Organização Mundial da Saúde

PBP- proteína de ligação de penicilina

PMQR- plasmid-mediated quinolone resistance

RRNA- ácido ribonucleico ribossômico

UFC- Unidades Formadoras de Colônias

µL- microlitros

1. Introdução

A própolis, também conhecida por “cola de abelha”, é uma substância complexa natural sintetizada por abelhas por meio de produtos coletados em fontes vegetais. A palavra “própolis” é derivada do grego: [“pro” =em favor de] + [“polis”=cidade], indicando que este produto natural é usado na defesa da colmeia. Devido à sua natureza cerosa, a própolis é utilizada pelas abelhas para manter umidade, proteção e temperatura estáveis na colmeia durante todo o ano (SFORCIN, 2016).

Conforme Anexo VI da Instrução Normativa nº 03 de 19/07/2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), define-se própolis como o produto proveniente de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto (BRASIL, 2001).

Vários estudos apontam que os efeitos farmacológicos observados na própolis são o resultado da ação sinérgica de seus compostos químicos. Vários tipos de própolis foram relatados no mundo, pois há uma variedade de acordo com a flora de determinada região geográfica onde as abelhas fazem a coleta do material vegetal para a sua produção. Por isso a composição da própolis depende das origens das fontes vegetais de diferentes regiões geográficas do mundo (AHANGARI; NASERI; VATANDOOST, 2018).

A própolis brasileira mais produzida é conhecida internacionalmente como própolis verde e tem como principal fonte vegetal à espécie *Baccharis dracunculifolia* D.C., conhecida popularmente como alecrim do campo. A própolis verde é um produto tipicamente brasileiro e ganhou a preferência no mercado mundial de própolis (MACHADO et al., 2016). A própolis verde contém compostos prenilados, não-prenilados e ácido p-cumárico, como por exemplo, o artepilina C que é um importante marcador da própolis verde brasileira. As diversas propriedades farmacológicas da própolis verde são atribuídas à presença desses compostos em altos níveis (VEIGA et al., 2017).

A própolis vermelha é encontrada em colmeias localizadas em troncos de arbustos de manguezais e ao longo da costa da região nordeste, em especial nos estados de Alagoas, Bahia, Paraíba, Sergipe e Pernambuco. Sua origem botânica foi atribuída principalmente a *Dalbergia ecastophyllum* e foi observado que as abelhas coletam o exsudato de coloração vermelha dessa planta conhecida por nome popular como marmeleiro da praia ou rabo-de-bugio. Amostras do exsudato dessa planta e de extratos de própolis vermelhas foram comparadas revelando o mesmo perfil cromatográfico entre ambos (MACHADO et al., 2016).

A própolis marrom apresenta origem botânica variada (BITTENCOURT et al., 2015). O estudo de Park et al. (2002), indicou que um tipo de própolis marrom produzida principalmente no nordeste brasileiro tem como origem botânica principal as folhas de *Hyptis divaricata*. E recentemente Fernandes et al. (2014) reportaram um estudo com uma própolis marrom coletada na região do Cerrado brasileiro (Mato Grosso do Sul).

2. Revisão de literatura

2.1. Atividade antibacteriana e antioxidante das própolis brasileiras

A própolis pode ser definida como uma mistura complexa de pólen, resina e substâncias balsâmicas coletadas por abelhas dos botões, flores e exsudatos vegetais e secreções salivares das abelhas. Sendo um produto apícola de origem vegetal, sua composição química e atividade biológica dependem da especificidade da flora local, estação de colheita e espécies de abelhas (TORRES et al., 2018). Atualmente, a própolis é um medicamento natural encontrado em muitas lojas de produtos naturais. Também é usada em cosméticos e na medicina alternativa para o tratamento de várias doenças (WAGH, 2013).

Segundo Bankova e colaboradores (2014), o tipo de própolis brasileira mais popular é a própolis verde, originada do arbusto de *Baccharis dracunculifolia*, o alecrim do campo, pertencente à família *Asteraceae* (SFORCIN et al., 2012). Esta própolis é caracterizada pelo predomínio de sesquiterpenos, dentre eles o nerolidol, o β -cariofileno, o espatulenol e o δ -cadineno e também pela presença de compostos

fenólicos, como o ácido cafeoilquínico e derivados prenilados do ácido cinâmico (artepilina C e bacarina) (BANKOVA et al., 2014; MACHADO et al., 2012).

Contudo, podem ocorrer alterações nos principais constituintes em amostras de própolis verde de diferentes regiões. No estudo de Bankova et al. (2014), o cariofileno, espatulenol e δ -cadineno foram os principais compostos de amostras dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Piauí. Já a própolis verde de Minas Gerais, se mostrou rica em nerolidol, β -cariofileno e selina-3,7 (11) dieno. No estudo de Salgueiro e Castro (2016), houve diferenças em relação aos conteúdos de compostos fenólicos e flavonoides totais nas amostras de própolis verde de diferentes regiões, confirmando a influência da origem da matéria-prima na composição química e nas características dos extratos de própolis.

No estudo de Cruz et al. (2019), o extrato alcoólico da própolis verde apresentou atividade antibacteriana frente a cepas de bactérias Gram-positivas resistentes a vários antimicrobianos, mostrando ser promissor no controle desses patógenos multirresistentes. No estudo de Vasconcelos et al. (2019), tanto as bactérias da espécie *Streptococcus pyogenes* quanto as bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* mostraram-se sensíveis aos extratos de própolis verde utilizados. E, no estudo de Salgueiro e Castro (2019), todos os extratos de própolis verde mostraram uma elevada atividade antioxidante e pode-se sugerir que as substâncias responsáveis pela atividade antioxidante foram em sua maioria os constituintes fenólicos presentes.

No que diz respeito à própolis vermelha, esta é coletada no Nordeste do Brasil e foi relatada como derivada da resina vegetal de *Dalbergia ecastophyllum*, conhecida popularmente como marmeleiro da praia (SILVA et al., 2008). Estudos recentes que buscaram caracterizar a própolis vermelha brasileira encontraram compostos como: elemicina, isoelemina, metil isoeugenol, metil eugenol, formononetina, biochanina A, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina, homopterocarpa, quercetina e vestitol, que permitem sua diferenciação de outros tipos de própolis brasileiras (MENDONÇA et al., 2015).

Assim como a própolis verde, a própolis vermelha brasileira também apresenta inúmeras propriedades biológicas como atividade antioxidante e

antimicrobiana (FROZZA et al., 2013). Essas propriedades são atribuídas em parte aos compostos fenólicos, que estão presentes em grande quantidade na própolis vermelha brasileira, mas outras substâncias envolvidas nessas atividades biológicas estão sendo pesquisadas (NETO et al., 2017).

No trabalho de Neto et al. (2017), os testes antibacterianos mostraram que a própolis vermelha coletada no estado de Pernambuco é eficaz contra cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Nas análises de Martins et al. (2019), o extrato de própolis vermelha apresentou atividade antibacteriana contra as cepas testadas, exibiu citotoxicidade aceitável e reduziu a colonização de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei* em um modelo de biofilme de disco de membrana, com resultados semelhantes aos obtidos para a clorexidina. Além disto, no estudo de Mourão (2013), foi demonstrado que a própolis vermelha possui elevada atividade antioxidante in vitro e in vivo.

Em relação à própolis marrom, a sua fonte botânica não está bem definida, podendo ser de espécies de *Araucaria*, *Eucalyptus* e *Baccharis*, dentre outras (SERAFIM, 2019). Em geral, a sua composição varia substancialmente de acordo com a área geográfica de coleta, no entanto, a presença de terpenos como principal classe química, bem como uma grande variedade de ésteres, álcoois e aldeídos podem ser comuns entre amostras de própolis marrom coletadas de diferentes regiões (OLEGÁRIO et al., 2019). Dentre os inúmeros efeitos biológicos relatados para a própolis marrom, observou-se que tanto a própolis quanto alguns de seus compostos isolados possuem efeito antimicrobiano e antioxidante (BERRETTA et al., 2016; LORINI et al., 2018).

No trabalho de Bastos et al. (2011), das 23 amostras de própolis marrom avaliadas, sete amostras (30,4%) apresentaram atividade antibacteriana para *E. coli*, com halos de inibição entre 10,0 e 11,3 mm, sendo possível observar que quanto maior o teor de compostos fenólicos, maiores os halos de inibição para as amostras consideradas ativas. No estudo de Picoli et al. (2016), o extrato alcoólico de uma amostra de própolis marrom do Sul do Brasil apresentou em sua composição importantes ácidos fenólicos e flavonoides com comprovada ação antimicrobiana. O tempo de ação necessário para total eliminação das bactérias foi de 2 horas para o

gênero *Streptococcus*, 3 horas para *Staphylococcus* spp. e 4 horas para *E. coli.*, demonstrando que o extrato alcoólico de própolis marrom apresenta potencial para ser utilizado na atividade leiteira como forma de prevenção de mastite bovina. E no trabalho de Lorini et al. (2018), foi demonstrado o potencial antioxidante da própolis marrom, e que este potencial foi maior quando comparado a própolis vermelha.

2.2. Mecanismos de ação da atividade antibacteriana e antioxidante das própolis

O extrato etanólico da própolis inibe o crescimento microbiano por impedir a divisão celular, levando assim a bacteriólise, pois produz defeitos na parede celular, desorganiza o citoplasma, além de inibir a síntese proteica (AGUIAR, LIMA e ATHAYDE, 2014). Geralmente, observa-se que a atividade antibacteriana da própolis é maior em relação às bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas.

As propriedades antimicrobianas da própolis podem estar relacionadas à presença de flavonoides, como galangina e pinocembrin. Estas substâncias têm propriedades de inibição de várias enzimas. Sua ação pode ser competitiva ou mesmo alostérica. No caso da ação antibacteriana, pode ocorrer uma inibição da DNA polimerase, como comumente ocorre no mecanismo de ação de grande parte dos antimicrobianos. Esse efeito antibacteriano dos flavonoides deve-se aos grupos fenólicos hidroxilos que apresentam afinidade pelas proteínas e, por esse motivo, atuam como inibidores de enzimas bacterianas, assim como interferem nas suas vias de síntese (AGUIAR, LIMA e ATHAYDE 2014).

Em relação a atividade antioxidante da própolis, estudos apontam que é atribuída ao alto teor de compostos fenólicos e flavonoides presentes nesta substância natural. Nas análises de Silva et al. (2017), os extratos etanólicos de própolis mostraram uma maior atividade antioxidante do que os extratos supercríticos de própolis, o que pode ser explicado pelo fato de que a extração com etanol rende maiores quantidades de polifenóis e flavonoides e, conseqüentemente, possibilita maior capacidade antioxidante do extrato de própolis.

A ação antioxidante dos compostos fenólicos ocorre pela redução ou inibição dos radicais livres, através da transferência de um átomo de hidrogênio de seu

grupo hidroxila. O mecanismo de reação de um composto fenólico com um radical peroxil ($\text{ROO} \bullet$) envolve uma transferência combinada do cátion de hidrogênio do fenol para o radical, formando um estado de transição de uma ligação H-O com um elétron (SANTOS-SÁNCHEZ et al., 2019).

Contudo, Machado et al. (2016) relataram que a concentração total de compostos fenólicos ou flavonoides não é o único fator responsável pelas propriedades antioxidantes da própolis. A natureza química dos compostos fenólicos e, talvez, a presença de outros compostos contribuem para a capacidade antioxidante total dos extratos de própolis.

2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) nos extratos de própolis

De acordo com a CLSI (2015), a Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento de um microrganismo, determinado por turbidez em testes de sensibilidade por diluição em caldo. A Figura 1 apresenta um esquema de determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) (CLSI, 2015): Onde se tem CIM de 16 $\mu\text{g/mL}$ e CBM de 32 $\mu\text{g/mL}$. Se vê a determinação de CIM pela turbidez, onde o tubo com 16 $\mu\text{g/mL}$ do agente antimicrobiano não apresenta turbidez e o tubo com 8 $\mu\text{g/mL}$ do agente antimicrobiano apresenta turbidez. Na determinação de CBM através do crescimento de colônias em placas, se vê que a placa com 32 $\mu\text{g/mL}$ do agente antimicrobiano não apresenta crescimento e a placa com 16 $\mu\text{g/mL}$ do agente antimicrobiano apresenta crescimento.

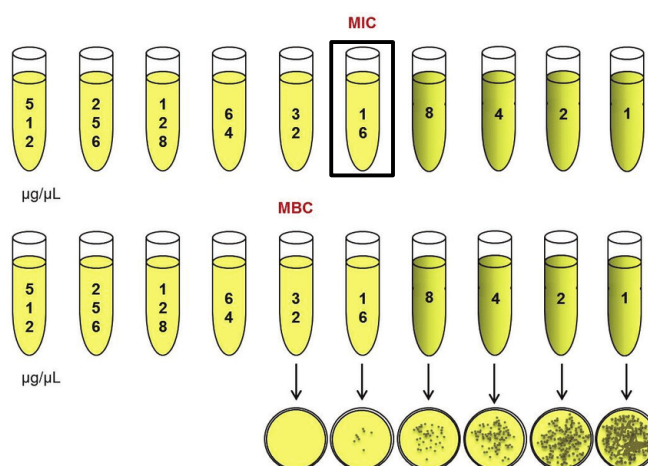


Figura 1. Esquemática do ensaio para determinação de CIM e CBM. Fonte: KARAMAN et. al., 2017.

Como os extratos de própolis são pouco solúveis em meio aquoso, o contato destes com a solução aquosa diluente do teste deixa a solução diluída com aspecto leitoso e, portanto, com elevada turbidez. Assim o método convencional de leitura da turbidez a 625 nm, após incubação das diferentes diluições do agente antimicrobiano com o inóculo bacteriano foi inviabilizada nos testes com os extratos de própolis. Então, a metodologia para a determinação da CIM foi modificada de acordo com Ristivojević et al. (2018). Após o período de incubação das diferentes diluições do agente antimicrobiano com o inóculo bacteriano, o método colorimétrico da resazurina sódica 0,01% foi utilizado, aplicando-se 10 µL da solução de resazurina em 100 µL de cada teste, para realizar a leitura visual dos resultados, em que a cor azul caracterizou a inatividade bacteriana e a cor rosa caracterizou o crescimento das bactérias. Portanto, a CIM foi definida como a menor concentração dos extratos de própolis que inibiram o crescimento microbiano e apresentaram cor azul na presença da resazurina. Esse reagente apresenta cor azul e se torna rosa e fluorescente quando reduzido a resorufina pelas enzimas óxido-redutases presentes nas células vivas (SARKER, NAHAR e KUMARASAMY, 2007).

ELSHIKH et al. (2016) relataram que os problemas com a baixa solubilidade do composto em testes de microdiluição foram amplamente superados pela

incorporação de resazurina, uma vez que o teste agora inclui uma medida da atividade bacteriana confiável. A mudança de cor proporcionada pelo método pode ser observada visualmente e, portanto, o espectrofotômetro não é necessário neste ensaio, em comparação com o ensaio de turbidez convencional (TEH et al., 2017).

As medidas de Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima podem ser alcançadas e comparadas entre si quando as metodologias e protocolos padronizados são seguidos (KARAMAN et al., 2017). Desta forma a escolha do ensaio correto para avaliar o potencial antimicrobiano de extratos e compostos é importante para a geração de dados de alta qualidade com maior precisão, velocidade e eficiência (SARKER, NAHAR e KUMARASAMY, 2007). O ensaio de resazurina modificado corrige as imprecisões de turbidez, especialmente em relação às determinações de CIM e permite que os resultados sejam comparáveis para diferentes cepas bacterianas. O método é fácil de seguir e preciso. A geração de um valor de CIM preciso, que pode ser comparado aos valores dos antimicrobianos existentes, dá ao cientista o conhecimento para decidir se vale a pena prosseguir com os extratos e compostos em termos de seu potencial antimicrobiano (SARKER, NAHAR e KUMARASAMY, 2007).

Estudos já demonstraram o uso da metodologia de determinação da CIM modificada. No estudo de Cabral et al. (2009), na metodologia foi utilizada a técnica da Concentração Inibitória Mínima modificada, com adição resazurina, para se verificar em quais poços houve crescimento bacteriano após testes com extratos de própolis. Neste estudo, com uma CIM variando entre 0,06 e 0,12 mg/mL, o extrato etanólico de própolis demonstrou potencial antibacteriano em concentrações menores em relação a outros estudos anteriores de própolis brasileiras. No trabalho de Dziejczak et al. (2013), o teste de sensibilidade frente a *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp. para a própolis polonesa também foi realizado pelo ensaio de microdiluição em caldo, com a adição de resazurina. Por meio da metodologia modificada, os autores observaram que o valor médio da CIM do extrato etanólico de própolis foi de 1,10 mg/mL para *S. mutans* e 0,70 mg/mL para *Lactobacillus* spp.

2.4. Resistência antibacteriana

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, que tem a forma de cocos e tende a ser arranjada em cachos que são descritos como “cachos de uva”. É um importante patógeno bacteriano humano que causa uma ampla variedade de doenças. As infecções são comuns tanto em ambientes na comunidade quanto em hospitais e o tratamento das infecções continua sendo um desafio devido ao surgimento de cepas multirresistentes (TAYLOR e UNAKAL, 2017).

Segundo Novales (2011), dois anos após o início do uso intensivo de penicilina para tratar infecções bacterianas, em 1940, surgiram as primeiras cepas de *S. aureus* produtoras de penicilinase. Em 1960, praticamente 100% das cepas já eram resistentes à penicilina. O isolamento do precursor da penicilina em 1959, o ácido 6-aminopenicilanílico, possibilitou a produção de penicilinas semissintéticas. A meticilina e a isoxazolil-penicilina (oxacilina) foram as primeiras penicilinas semissintéticas, resistentes à hidrólise pelas beta-lactamases, utilizadas no tratamento das infecções estafilocócicas no início dos anos 1960. Em pouco tempo, novos compostos menos tóxicos, como nafcilina, cloxacilina e dicloxacilina, tornaram-se disponíveis; no entanto, um ano depois, as primeiras cepas resistentes à meticilina foram identificadas graças à produção de enzimas de ligação à penicilina de baixa afinidade (NOVALES, 2011).

Nas cepas de *Staphylococcus* spp., a proteína chamada PBP 2' ou 2a é responsável pela resistência. Esta proteína é codificada pelo gene *mecA*, que faz parte do chamado SCCmec (cassete cromossômico estafilocócico), localizado na região *mec* do cromossomo bacteriano. Esta região é uma ilha de resistência que contém o gene estrutural para PBP2a e os genes *mecl* (repressor) e *mecR1* (inativador *mecl*) que atuam como elementos reguladores da transcrição. Apesar da região *mec* ser altamente conservada, a expressão a resistência fenotípica mostra grande variabilidade (NOVALES, 2011).

A resistência à meticilina em *Staphylococcus* spp. é sinônimo de resistência a todos os beta-lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos; está ainda associada à resistência múltipla aos antibacterianos estruturalmente não relacionados, como tetraciclina, macrolídeos, quinolonas e aminoglicosídeos (NOVALES, 2011). Como solução para este problema, o uso da vancomicina foi

iniciado em diferentes partes do mundo no tratamento de infecções causadas por cepas *Staphylococcus* resistentes à metilina. Como consequência, houve um aumento da resistência aos glicopeptídeos nas cepas de *Enterococcus* spp. e, 25 anos depois, foi finalmente encontrada a resistência à vancomicina também em cepas de *Staphylococcus* spp. (NOVALES, 2011).

As cepas de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) se espalharam por todo o mundo e, embora continuem sendo um problema associado ao ambiente hospitalar (Hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, HA-MRSA), na década de 1990, surgiram os primeiros casos em pacientes sem histórico de hospitalização. Essas novas cepas foram chamadas de CA-MRSA (Community acquired MRSA) (NOVALES, 2011).

Em relação à *Escherichia coli*, esta é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-negativa, em forma de bastonete, pertencente à família Enterobacteriaceae. A maioria das cepas de *E. coli* colonizam o trato gastrointestinal de humanos e animais como uma flora normal. No entanto, existem algumas cepas que evoluíram para *E. coli* patogênica adquirindo fatores de virulência (LIM, YOON e HOVDE, 2010). A *E. coli* é a causa mais comum de algumas das infecções bacterianas simples, incluindo infecções do trato urinário e bacteremia. É também o principal agente causador da meningite neonatal e pode causar uma variedade de infecções clínicas, incluindo pneumonia (PEÑA, HERNÁNDEZ e CASTILLO, 2011).

Nos últimos anos, houve aumento da resistência desse microrganismo aos principais antimicrobianos de uso clínico como ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina, tetraciclina e estreptomicina, tanto em linhagens de origem humana quanto animal (PEÑA, HERNÁNDEZ e CASTILLO, 2011). Os mecanismos mais problemáticos em *E. coli* correspondem à aquisição de genes que codificam para β -lactamases de espectro estendido (conferindo resistência a cefalosporinas de amplo espectro), carbapenemases (conferindo resistência a carbapenêmicos), 16S rRNA metilases (conferindo resistência aos aminoglicosídeos), genes de resistência a quinolonas mediada por plasmídeo (PMQR) (conferindo resistência às quinolonas) e genes *mcr* (conferindo resistência a polimixinas) (POIREL et al., 2018).

No que se refere à *Klebsiella pneumoniae*, uma bactéria gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, percebe-se a sua importância devido ao seu aumento desproporcional como agente causal de infecções de difícil tratamento, com envolvimento muito variado: trato urinário, pulmões, tecidos moles, ferida cirúrgica e sepse. Há um claro aumento da prevalência de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a antimicrobianos, o que também explica períodos prolongados de hospitalizações e um aumento da taxa de mortalidade (TORO e CORREIA, 2010; SHURST e DAWSON, 2019).

Uma característica muito importante de *K. pneumoniae* é sua alta resistência a antimicrobianos beta-lactâmicos, principalmente pela produção de beta-lactamases, enzimas que hidrolisam essas drogas, entre as quais as de maior interesse são as beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases. A parte importante desta resistência reside no fato de que os beta-lactâmicos, bactericidas poderosos, são os mais frequentemente prescritos no mundo: na verdade, eles constituem 50% do consumo global deste tipo de drogas (TORO e CORREA, 2010).

Acerca da *Salmonella*, esta é uma bactéria gram-negativa também pertencente à família Enterobacteriaceae, que pode causar infecções em muitas espécies hospedeiras e causar diferentes doenças (FRYE e JACKSON, 2013). Como o ciclo de transmissão de *Salmonella* envolve praticamente todos os vertebrados e sua veiculação está associada à ingestão de alimentos, seu controle representa um desafio para a saúde pública (BRASIL, 2011).

Estudos já demonstraram a resistência dessa bactéria a vários antimicrobianos. Pandini et al. (2014) relataram que cepas de *Salmonella enterica* isoladas de aviários apresentaram resistência à tetraciclina (30,8%) e ao ácido nalidíxico (28,2%), seguido de cefalotina (23,0%) e ampicilina (20,5%). No estudo de Anjum et al. (2011), aproximadamente 43% das cepas de *Salmonella* isoladas abrigavam genes únicos ou múltiplos de resistência antimicrobiana, com cepas isoladas de suínos apresentando os números mais altos.

A resistência aos antimicrobianos em *Salmonella* spp. é atribuível a vários mecanismos, como degradação enzimática de alguns agentes antimicrobianos, bloqueio da permeabilidade celular a antimicrobianos, ativação de bombas de efluxo

antimicrobiano e alteração do local de ação dos medicamentos (EL-TAYEB et al., 2017).

2.5. A busca por novos agentes antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos está ascendendo a níveis perigosamente altos em todas as partes do mundo. Novos mecanismos de resistência estão surgindo e se espalhando globalmente, ameaçando nossa capacidade de tratar doenças infecciosas comuns. A resistência aos antimicrobianos ocorre naturalmente, mas o uso indevido de antimicrobianos em humanos e animais está acelerando o processo (OMS, 2020).

Nos últimos 20 anos, mais de 100 novos agentes antibacterianos foram desenvolvidos. No entanto, a maioria desses agentes antimicrobianos recentemente desenvolvidos são novos membros de classes de antimicrobianos já estabelecidas. Embora a expansão dessas classes antibacterianas tradicionais mostre potencial, como aumento de potência e melhores perfis de segurança, isso geralmente é visto como uma “estratégia de curto prazo”. Há uma grande necessidade do desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos, para que se possa oferecer uma “solução de longo prazo” (GUEGAN, 2010).

Os produtos naturais desempenham um papel fundamental na descoberta de medicamentos e, portanto, são tradicionalmente considerados os alicerces da descoberta e do desenvolvimento de novos compostos (KOPARDE, DOIJAD e MAGDUM, 2018). Compostos bioativos naturais, como polifenóis, flavonoides, antocianinas, micronutrientes e vitaminas têm sido propostos como possíveis agentes terapêuticos (MATTIOLI, 2018).

A própolis, com sua variada composição, que inclui flavonoides, terpenos, fenóis, ésteres, açúcares, hidrocarbonetos e minerais (AHANGARI, NASERI e VATANDOOST, 2018) tem seu potencial antibacteriano relatado em diversos trabalhos, e desta forma, maiores esclarecimentos sobre a própolis são necessários para garantir que esta possa ser utilizada futuramente no desenvolvimento de novos medicamentos antibacterianos (SFORCIN e BANKOVA, 2011).

3. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi realizar a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de seis extratos comerciais de própolis brasileiras (incluindo: própolis do tipo verde, marrom e vermelha; extratos alcoólicos e aquoso; além de extratos com 30 e 70% de própolis in natura) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

3.1. Objetivos específicos

- Determinar a CIM dos extratos de própolis frente as seguintes bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175;
- Determinar a CIM dos extratos de própolis frente as seguintes bactérias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica* ATCC 14028

4. Justificativa

A própolis brasileira apresenta uma variada composição química de acordo com a sua origem em diferentes regiões do país. Tal variação é explicada pela enorme diversidade da flora brasileira. No Brasil os três tipos mais citados de própolis são: a própolis verde originada do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), a própolis vermelha originada do marmeleiro da praia (*Dalbergia ecastophyllum*) e a própolis marrom que tem variada origem botânica. Vários estudos comprovam o potencial da própolis para diversas aplicações farmacológicas. Atualmente muitas bactérias desenvolveram resistência contra várias classes de antibióticos e o que se tem notado é uma intensa busca por novos medicamentos, com destaque para a própolis.

5. Materiais e Métodos

5.1. Amostras de extratos de própolis

Foram utilizados seis extratos de própolis comerciais e a Tabela 1 apresenta a identificação desses extratos de própolis.

Quadro 1. Identificação dos extratos de própolis

Amostra	Tipo de própolis	Região do Brasil	Características do extrato
1	Verde	Sudeste	Extrato alcoólico, marca A, com 30% de própolis in natura
2	Marrom	Sudeste	Extrato alcoólico, marca A, com 30% de própolis in natura
3	Verde	Sudeste	Extrato alcoólico, marca B, com 30% de própolis in natura
4	Vermelha	Nordeste	Extrato alcoólico, marca C
5	Verde	Sudeste	Extrato alcoólico, marca A, com 70% de própolis in natura
6	Verde	Sudeste	Extrato aquoso, marca A

5.2. Preparo dos inóculos bacterianos

Os inóculos foram preparados através de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani (caldo LB) com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de

densidade óptica (D.O.) a 625 nm em espectrofotômetro. Foram utilizadas as seguintes bactérias: 1) bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Streptococcus mutans* ATCC 25175) e 2) bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706, *Salmonella enterica* ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 25922).

5.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis pelo método de macro diluição em caldo

Para a determinação da CIM, foram realizadas diluições em caldo LB das culturas na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland na ordem de 1:150, resultando em uma concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. Os extratos de própolis foram diluídos em caldo LB em diferentes concentrações. Então, adicionou-se em tubos estéreis 1,0 mL do inóculo na concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL e 1,0 mL das diferentes concentrações de extratos de própolis, resultando em uma concentração final de bactérias de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL, pois ao se adicionar 1 mL dos extratos de própolis ao inóculo este ficou com metade da concentração. Como controle positivo (com crescimento das bactérias) foi utilizado 1,0 mL do inóculo na concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL e 1,0 mL de caldo LB. Como controle negativo (inibição do crescimento das bactérias) foi utilizado 1,0 mL de caldo LB e 1,0 mL de extrato de própolis. Os tubos foram incubados a 37 °C por 18 horas. Os testes foram realizados em triplicata.

Como os extratos de própolis são pouco solúveis em meio aquoso, o contato destes com o caldo LB deixou a solução diluída com aspecto leitoso e, portanto, com elevada turbidez. Assim o método convencional de leitura da turbidez a 625 nm, após incubação das diferentes diluições do agente antimicrobiano com o inóculo bacteriano, foi inviabilizada nos testes com os extratos de própolis.

Então, a metodologia para a determinação da CIM foi modificada de acordo com Ristivojević et al. (2016). Após o período de incubação das diferentes diluições do agente antimicrobiano com o inóculo bacteriano, o método colorimétrico da

resazurina sódica 0,01% foi utilizado, aplicando-se 10 μ L da solução de resazurina em 100 μ L das diluições, para realizar a leitura visual dos resultados, em que a cor azul caracterizou a inatividade bacteriana e a cor rosa o crescimento das bactérias. Portanto a CIM foi definida como a menor concentração dos extratos de própolis que inibiram o crescimento microbiano e apresentaram cor azul na presença da resazurina. A resazurina é um indicador de óxido-redução usado na avaliação da viabilidade celular. Esse reagente apresenta cor azul e se torna rosa e fluorescente quando reduzido a resorufina pelas enzimas óxido-redutases presentes nas células vivas (SCHMITT et al., 2013; SARKER et al., 2007).

Para a análise estatística foi feita a conversão da concentração volume/volume para massa/volume, obtendo diferentes valores de acordo com o peso seco dos diferentes extratos de própolis, os testes da CIM foram feitos em triplicata e foram comparados com os outros extratos para a mesma cepa usando o teste de Tukey.

6. Resultados e Discussão

A Tabela 2 apresenta a CIM dos seis extratos comerciais de própolis testados para as bactérias Gram-positivas, levando em consideração o peso seco de cada um dos extratos (mg/mL).

Tabela 1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis para as bactérias Gram-positivas testadas

Extratos de própolis	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>B. cereus</i> ATCC 14579		<i>S. mutans</i> ATCC 25175	
	(mg/mL)	(μ L/mL)	(mg/mL)	(μ L/mL)	(mg/mL)	(μ L/mL)
1 (Verde A)	1,0	17,0	3,8	62,5	4,8	80,0
2 (Marrom)	1,5	25,0	0,8	12,5	3,2	53,4
3 (Verde B)	1,5	25,0	1,5	25,0	3,2	53,4
4 (Vermelha)	1,7	41,7	1,3	33,3	1,3	33,3
5 (Verde 70%)	2,0	17,0	4,0	33,3	12,0	100,0
6 (Aquoso)	2,4	12,5	19,5	100,0	>31,2	>160

Os valores de CIM dos extratos de própolis para bactérias Gram-positivas variaram entre 0,8 e >31,2 mg/mL. Para *S. aureus*, o menor valor de CIM foi obtido com o extrato de própolis verde A (1,0 mg/mL). Para *B. cereus*, o menor valor de CIM foi obtido com o extrato de própolis marrom (0,8 mg/mL) e para *S. mutans*, o menor valor de CIM foi obtido com o extrato de própolis vermelha (1,3 mg/mL).

Ainda não há na literatura uma classificação estabelecida sobre os valores de CIM, entretanto, Aligiannis e colaboradores (2001) apresentaram a seguinte classificação: CIM até 0,5 mg/mL são inibidores potentes; CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL são inibidores moderados; CIM acima de 1,6 mg/mL são inibidores fracos. Levando em consideração os menores valores de CIM encontrados para cada uma das cepas, o extrato de própolis verde A, o extrato de própolis marrom e o extrato de própolis vermelha seriam classificados como inibidores moderados para Gram-positivas.

Em relação ao menor valor de CIM encontrado para cepa de *S. aureus*, com o extrato de própolis verde A (1,0 mg/mL), este foi melhor do que o resultado apresentando no trabalho de Lupatini e colaboradores (2016), onde a CIM encontrada para *S. aureus* com própolis verde foi de 1,25 mg/mL. No trabalho de Silva e colaboradores (2017), os valores de CIM para *S. aureus* com extrato de própolis verde do Sudeste variaram entre 0,5 e >1,0 mg/mL. Já no trabalho de Cruz e colaboradores

(2019), o valor de CIM para *S. aureus* foi menor, sendo este de 0,7 mg/mL, indicando maior potência do extrato de própolis verde em sua ação quando comparado ao resultado deste estudo.

No que se refere ao menor valor de CIM obtido para *B. cereus*, com o extrato de própolis marrom (0,8 mg/mL), este foi superior aos resultados encontrados no estudo de Gomes e colaboradores (2016), que relataram CIM com extrato alcoólico de própolis marrom para bactérias gram-positivas variando de 2,25 a 18,9 mg/mL. Já no estudo de Costa (2019), a CIM para *B. cereus* foi de 0,5 mg/mL, sendo uma ação mais potente do que a própolis marrom do presente estudo.

Para a cepa *S. mutans*, a menor CIM foi obtida com o extrato de própolis vermelha (1,3 mg/mL) e demonstrou resultados superiores quando comparada ao trabalho de Martins e colaboradores (2019), que encontraram valor de CIM com própolis vermelha para *S. mutans* de 4,46 mg/mL. Entretanto, o resultado foi inferior ao do estudo de Dausch (2007), o qual apresentou uma CIM com própolis vermelha para *S. mutans* de 0,01 mg/mL.

A Tabela 3 apresenta a CIM dos seis extratos de própolis comerciais testados para as bactérias Gram-negativas, levando em consideração o peso seco de cada um dos extratos (mg/mL). Os valores de CIM dos extratos comerciais para bactérias Gram-negativas variaram entre 3,8 e >160 mg/mL. Para *E. coli*, os menores valores de CIM foram obtidos com os extratos de própolis verde A (3,8 mg/mL) e extrato de própolis vermelha (4,0 mg/mL). Para *K. pneumoniae*, todos os valores de CIM foram >6,4 mg/mL. Para *S. enterica*, os menores valores de CIM foram obtidos com os extratos de própolis verde A e verde B (4,8 mg/mL) e para *P. aeruginosa*, o menor valor de CIM foi obtido com o extrato de própolis vermelha (3,2 mg/mL).

Baseando-se no critério de Aligiannis e colaboradores (2001), todos os extratos de própolis seriam classificados como inibidores fracos para Gram-negativas, considerando os menores valores de CIM encontrados para cada uma das cepas.

Tabela 2 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis para as bactérias Gram-negativas testadas

Extratos de própolis	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>S. enterica</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	ATCC 25922 (mg/mL)	(μ L/mL)	ATCC1706 (mg/mL)	(μ L/mL)	ATCC 14028 (mg/mL)	(μ L/mL)	ATCC 27853 (mg/mL)	(μ L/mL)
1 (Verde A)	3,8	62,5	>9,6	>160	4,8	80	9,6	160
2 (Marrom)	>9,6	>160	>9,6	>160	9,6	160	8,0	134
3 (Verde B)	9,6	>160	>9,6	>160	4,8	80	8,0	134
4 (Vermelha)	4,0	100,0	>6,4	>160	6,4	160	3,2	83,3
5 (Verde 70%)	6,0	50,0	>19,2	>160	19,2	160	>19,2	>160
6 (Aquoso)	>31,2	>160	>31,2	>160	>31,2	>160	>31,2	>160

Em relação ao menor valor de CIM encontrado para *E. coli* com extrato de própolis verde A (3,8 mg/mL), este resultado foi melhor do que o encontrado no trabalho de Campos (2017), o qual apresentou um valor de CIM de 68,75 mg/mL para extrato etanólico de própolis verde 30% em cepas de *E. coli*. O resultado do presente trabalho também foi melhor do que os resultados apresentados por Oliveira (2019), no qual a CIM para *E. coli* com extrato de própolis verde foi >34,28 mg/mL.

Para a cepa de *K. pneumoniae*, não foi possível determinar um valor de CIM para os extratos testados, pois a CIM para a mesma supera a concentração mais elevada testada neste estudo, necessitando testar maiores concentrações de própolis nos extratos para se encontrar a CIM, todos os valores foram maiores que 6,4 mg/mL. O resultado corrobora com a literatura, que apresenta valores de CIM altos ou não conclusivos para *K. pneumoniae*. No trabalho de Oliveira (2019), os valores de CIM para *K. pneumoniae* com extratos de própolis verde, marrom e vermelha foram >34,28 mg/mL. Nas análises de Babiker e colaboradores (2020), 33,3% das cepas apresentaram CIM de 100 mg/mL e 66,7% dos isolados de *K. pneumoniae* foram resistentes a todas as concentrações testadas de extratos de própolis, que variavam entre 12,5 e 200 mg/mL.

Os menores valores de CIM para *S. enterica* foram identificados nas própolis verde A e verde B (4,8 mg/mL). O valor de CIM encontrado no presente trabalho foi menor do que o resultado do estudo de Maia (2020), o qual apresentou valores de CIM com extrato etanólico de própolis verde do Sudeste para *S. enterica* variando de 6,25 a 25 mg/mL. O resultado do presente trabalho também apresentou uma melhor ação antibacteriana quando comparado com os resultados apresentados por Orsi e colaboradores (2006), no qual encontraram CIM para *Salmonella* com extrato etanólico de própolis originado do Sudeste de 247,5 mg/mL.

No que se refere a *P. aeruginosa*, a menor CIM encontrada foi com a própolis vermelha (3,2 mg/mL), valor que corrobora com os resultados encontrados no estudo de Aniceto e colaboradores (2020), que apresentaram CIM com diversas preparações de própolis vermelha acima de 2 mg/mL para *P. aeruginosa*. O resultado também foi de encontro com os resultados de Abreu (2018), onde a concentração inibitória do extrato da própolis vermelha para *P. aeruginosa* foi $\geq 1,0$ mg/mL.

A Tabela 4 apresenta a comparação entre os valores de CIM encontrados.

Tabela 3 – Comparação da CIM dos extratos de própolis para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas

Extratos de própolis	<i>S. aureus</i> (mg/mL)	<i>B. cereus</i> (mg/mL)	<i>S. mutans</i> (mg/mL)	<i>E. coli</i> (mg/mL)	<i>S. enterica</i> (mg/mL)	<i>P. aeruginosa</i> (mg/mL)
1 (Verde A)	1,0 ^a	3,8 ^a	4,8 ^a	3,8 ^a	4,8 ^a	9,6 ^a
2 (Marrom)	1,5 ^b	0,8 ^b	3,2 ^b	>9,6	9,6 ^b	8,0 ^b
3 (Verde B)	1,5 ^b	1,5 ^c	3,2 ^b	9,6 ^b	4,8 ^a	8,0 ^b
4 (Vermelha)	1,7 ^b	1,3 ^c	1,3 ^c	4,0 ^a	6,4 ^c	3,2 ^c
5 (Verde 70%)	2,0 ^c	4,0 ^a	12,0 ^d	6,0 ^c	19,2 ^d	>19,2
6 (Aquoso)	2,4 ^d	19,5 ^d	>31,2	>31,2	>31,2	>31,2

As médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes a $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

O menor valor de CIM encontrado para *S. aureus*, obtido com o extrato de própolis verde A (1,0 mg/mL), foi estatisticamente relevante quando comparado aos

outros extratos testados para esta cepa, indicando que de fato houve uma melhor ação. O mesmo ocorreu para menor o valor de CIM encontrado para *B. cereus*, obtido com o extrato de própolis marrom (0,8 mg/mL) e com o menor valor de CIM encontrado para *S. mutans* com o extrato de própolis vermelha (1,3 mg/mL).

Os menores valores de CIM encontrados para *S. enterica* com os extratos de própolis verde A e B (4,8 mg/mL) foram estatisticamente relevantes quando comparados aos outros extratos testados para esta cepa, indicando que de fato houve uma melhor ação. O mesmo ocorreu para menor o valor de CIM encontrado para *P. aeruginosa*, obtido com o extrato de própolis verde A (3,2 mg/mL). Para *E. coli*, não houve diferença estatística entre o menor valor de CIM encontrado com a própolis verde A (3,8 mg/mL) e o valor do extrato de própolis vermelha (4,0 mg/mL), mas houve diferença estatística com os demais extratos testados. Para os valores no qual a CIM não foi determinada, como no caso da *K. pneumoniae*, a análise estatística não foi realizada. O resultado ressalta a necessidade da realização de novas análises com maiores concentrações dos extratos de própolis para se determinar a CIM dessas cepas.

Percebe-se que a inibição do crescimento bacteriano por ação dos extratos das própolis foi mais eficaz para cepas Gram-positivas, onde obteve-se menores valores de CIM, quando comparado aos valores obtidos para as cepas Gram-negativas. Resultados similares foram relatados no trabalho de Junior e colaboradores (2017), onde houve uma maior atividade da própolis vermelha frente às bactérias Gram-positivas, apresentando menores valores de CIM que os observados em bactérias Gram-negativas. No estudo de Silva e colaboradores (2017), a maioria dos extratos de própolis testados apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus*, entretanto, nenhum dos extratos analisados apresentou atividade contra *E. coli*. No estudo de Sinhorini e colaboradores (2014), evidenciou-se a grande sensibilidade de bactérias Gram-positivas frente a própolis da região de Umuarama - PR, apresentando sensibilidade em concentrações de 0,1% para *Streptococcus* e 0,25% para *S. aureus*. Já em Gram-negativas, observou-se sensibilidade bacteriana em concentrações mais elevadas, a partir de 3%.

Estes resultados podem ser explicados primeiramente pelas diferenças estruturais entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Bactérias Gram-negativas apresentam uma camada de membrana adicional denominada membrana externa (MILLER, 2016). A membrana externa corresponde a uma segunda bicamada lipídica, localizada acima do peptidoglicano, contendo fosfolipídios, lipoproteínas, proteínas e lipopolissacarídeos (SANTOS, 2012). Essa é uma barreira importante que fornece proteção contra compostos tóxicos (MILLER, 2016). Já as bactérias Gram-positivas apresentam apenas uma membrana relativamente permeável, o que pode torná-las mais suscetíveis a interações com o meio ambiente (PERUSSI, 2007).

Ademais, a diferença entre os resultados pode estar relacionada às composições de cada extrato de própolis. As atividades biológicas apresentadas dependem da composição de cada tipo de própolis. Essa composição está associada à diversidade da flora local, ao local e período de coleta e à genética das abelhas (SANTOS et al., 2019).

Os resultados obtidos para o extrato de própolis verde elaborado com 70% in natura mostraram que a elevada concentração de própolis no extrato não refletiu em maior atividade antibacteriana se comparado ao extrato de própolis verde elaborado com 30% de própolis in natura. Esse é um resultado bastante relevante do ponto de vista de custo, pois o extrato de própolis verde 70% é duas vezes o valor do custo do de própolis verde 30%, sendo este segundo mais recomendado para o tratamento, visto que são necessárias menores concentrações de própolis no extrato para inibir o crescimento bacteriano, indicando que a CIM não é proporcional a concentração de própolis no extrato. Uma hipótese para os resultados inferiores do extrato à 70%, pode ser atribuído ao fato de que uma alta concentração de própolis torna o extrato menos solúvel em meio aquoso e pode causar uma maior dificuldade deste se difundir e agir nos microrganismos.

A composição química da própolis também pode ser afetada pelos métodos de extração utilizados, influenciando diretamente na atividade funcional da própolis (YUAN et al., 2019). A exemplo, o extrato aquoso analisado só apresentou valor de CIM para *S. aureus* e *B. cereus*, indicando que existe um sinergismo entre o etanol

utilizado para a extração de própolis, ou ainda que os princípios ativos da própolis não são solúveis em água, sendo em parte perdidos no processo de extração aquosa (BUCIO-VILLALOBOS, MARTÍNEZ-JAIME, 2017).

7. Conclusão

Os resultados deste estudo, ao se verificar a CIM por meio de preparo de inóculos junto com diferentes concentrações de própolis, demonstraram que os extratos de própolis brasileiras apresentam atividade antibacteriana mais eficaz frente às bactérias Gram-positivas (CIM de 0,8 a >31,2 mg/mL) em relação as bactérias Gram-negativas (CIM de 3,8 a >160 mg/mL). Infere-se que diversos fatores podem interferir na ação antibacteriana dos extratos de própolis, como localização geográfica, plantas utilizadas pelas abelhas, sazonalidade, método de extração, além da estrutura bacteriana de cada cepa. Faz-se necessário novos estudos para que maiores concentrações dos extratos de própolis sejam testadas para cepas Gram-negativas como *K. pneumoniae* a fim de se determinar os valores de CIM e há necessidade de um estudo da composição química de cada tipo própolis.

8. Referências Bibliográficas

ABREU, R. M. S. X. **Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha do semiárido paraibano sobre *Pseudomonas aeruginosa***. Universidade Federal de Campina Grande. Dissertação de Mestrado. 2018. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/3526>

AGUIAR, C. G.; LIMA, L. G.; ATHAYDE, L. A. Efeito antimicrobiano da própolis verde frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, v. 1, n. 1, p. 14-18, 2014.

ALIGIANNIS N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.

AHANGARI, Z.; NASERI, M.; VATANDOOST, F. Propolis: chemical composition and its applications in endodontics. **Iranian Endodontic Journal**, v. 13, n. 3, p. 285, 2018.

ANICETO, P. M. J. G. et al. Atividade antibacteriana de diferentes preparações de própolis vermelha. In: SILVA, E. **Conhecimentos e Desenvolvimento de Pesquisas nas Ciências da Saúde**. Editora Atena, 2020, p. 218-232.

ANJUM, M. F. et al. Identifying antimicrobial resistance genes of human clinical relevance within *Salmonella* isolated from food animals in Great Britain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 550-559, 2011.

ASHURST, J. V.; DAWSON, A. *Klebsiella pneumoniae*. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2019.

BABIKER, K. S. et al. Efficacy of propolis extract against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae* strains isolated from patients with wound infection. *Pharmacy e Pharmacology International Journal*, v. 8, n. 5, p. 269-272, 2020.

BANKOVA, V. et. al, Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central Journal**, p. 1-8, 2014.

BASTOS, E. M. A. F. et al. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1255-1259, 2011.

BERRETTA, A. A. et al. Functional properties of Brazilian propolis: from chemical composition until the market. **Superfood and functional food: an overview of their processing and utilization**, p. 55-98, 2016.

BITTENCOURT, M. L. F. et al. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, n. 76, p. 449–457, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Brasília, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero Salmonella. 2011.

BUCIO-VILLALOBOS, C. M.; MARTÍNEZ-JAIME, O. A. Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México. **Agronomía Mesoamericana**, v. 28, n. 1, p. 223-227, 2017.

CABRAL, I. S. R. et al. Phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of Brazilian red propolis. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CAMPOS, J. V. Avaliação da atividade antimicrobiana e análise morfológica por microscopia de força atômica (AFM) da ação de extratos de própolis verde sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Embrapa Instrumentação**, p. 327-330, 2017.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Tenth Edition. CLSI document M07-A10, Wayne, Pennsylvania, USA, 2015.

COSTA, M.C. **Perfil de resistência a antimicrobianos em especiarias e o uso de revestimento com própolis na redução da carga microbiana.** Universidade do Estado da Bahia. Dissertação de Mestrado, 2019. Disponível em: <https://www.ufrb.edu.br/pgmicrobiologia/dissertacoes/category/11-2019?download=97:milena-da-cruz-costa-2019>

CRUZ, A. I. C. et al. Atividade antimicrobiana da própolis verde frente a bactérias resistentes a antimicrobianos comerciais. In: SILVA, F. F. **Qualidade de Produtos de Origem Animal 2.** Ponta Grossa, Paraná: Editora Atena, 2019. p.91-96. 2019.

DAUGSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas.** Universidade Estadual de Campinas. Tese de Doutorado. 2007. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/255849/1/Daugsch_Andreas_D.pdf

DZIEDZIC, A. et al. The antibacterial effect of ethanol extract of polish propolis on Mutans Streptococci and Lactobacilli isolated from saliva. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

ELSHIKH, M. et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 6, p. 1015-1019, 2016.

EL-TAYEB, M. A. et al. Prevalence, serotyping and antimicrobials resistance mechanism of Salmonella enterica isolated from clinical and environmental samples in Saudi Arabia. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 499-508, 2017.

FERNANDES, F. H. et al. Assessment of the (anti)genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. **Food Research International**, v. 62, p. 20–26, 2014.

FROZZA, C. O. S. et. al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis, **Food and Chemical Toxicology**, p. 137-142, 2013.

FRYE, J. G.; JACKSON, C. R. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from US food animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 135, 2013.

GUEGAN, E. M. W. Development of new antimicrobials. **Journal of Infection Prevention**, v. 11, n. 4, p. 131-133, 2010.

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

JUNIOR, W. B. et al. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 3-10, 2012.

KARAMAN, D. Ş. Et. Al, Current Approaches for Exploration of Nanoparticles as Antibacterial Agents, **Antibacterial Agents** IntechOpen, p.61-86, 2017.

KOPARDE, A. A.; DOIJAD, R. C.; MAGDUM, C. S. Natural products in drug discovery. In: **Pharmacognosy-Medicinal Plants**. IntechOpen, 2019.

LIM, J. Y.; YOON, J. W.; HOVDE, C. J. A brief overview of *Escherichia coli* O157: H7 and its plasmid O157. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 5, 2010.

LORINI, A. et al. Chemical composition and antifungal activity of propolis on *Aspergillus flavus*. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 5, 2018.

LUPATINI, N. R. et al. Evaluation of the antibacterial activity of green propolis extract and meadowsweet extract against *Staphylococcus aureus* bacteria: importance in would care compounding preparations. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 20, n. 4, p. 333-337, 2016.

MAIA, L. M. et al. **Potencial antimicrobiano da própolis verde sobre *Salmonella enterica* subsp. *enterica***. Universidade Federal do Goiás. Dissertação de Mestrado. 2020. Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/11001>

MACHADO, B. A. S. et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil, **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1-26, 2016.

MACHADO, J. L. et al. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

MARTINS, M. L. et al. Antibacterial and Cytotoxic Potential of a Brazilian Red Propolis. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 19, 2019.

MATTIOLI, R. et al. Natural bioactive compounds acting against oxidative stress in chronic, degenerative, and infectious diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018.

MENDONÇA, I. C. G. et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 357, 2015.

MILLER, S. I. Antibiotic resistance and regulation of the gram-negative bacterial outer membrane barrier by host innate immune molecules. **MBio**, v. 7, n. 5, 2016.

MOURÃO, L. R. M. B. **Estudo in vivo da atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

NETO, M. S. R. et al. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 572-580, 2017.

NOVALES, M. G. M. Resistencia antimicrobiana del Staphylococcus aureus en México. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**, v. 68, n. 4, p. 262-270, 2011.

OLEGÁRIO, L. S. et al. Chemical characterization of four Brazilian brown propolis: An insight in tracking of its geographical location of production and quality control. **Food Research International**, v. 123, p. 481-502, 2019.

OLIVEIRA, L. A. A. **Potencial antimicrobiano dos extratos de própolis (Verde, Vermelha e Marrom)**. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Trabalho de Conclusão de Curso. 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufersa.edu.br/handle/prefix/3183>

OMS. Organização Mundial de Saúde. Antibiotic Resistance. Texto Informativo. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

ORSI, R.O. et al. Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella typhi*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 108-112, 2006.

PANDINI, J. A. et. al. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 20, n. 10, p. 1-6, 2014

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PEÑA, Y. P.; HERNÁNDEZ, M. E.; CASTILLO, V. L. Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. **Panorama. Cuba y Salud**, v. 6, n. 1, p. 30-38, 2014.

PERUSSI, J. R. Photodynamic inactivation of microorganisms. **Química nova**, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.

PICOLI, T. et al. Caracterização química e ação antibacteriana de extrato de própolis marrom da região sul do Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 38, n. 4, p. 365-371, 2016.

POIREL, L. et al. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**, p. 289-316, 2018.

RISTIVOJEVIĆ, P. et al. Profiling of Turkish propolis subtypes: Comparative evaluation of their phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities, **LWT - Food Science and Technology**, v. 95, p. 367–379, 2018.

RISTIVOJEVIĆ, P. et. Al., Antimicrobial Activity of Serbian Propolis Evaluated by Means of MIC, HPTLC, Bioautography and Chemometrics, **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p.1-15, 2016.

ROCHA, A. B. et al., Evaluation of a propolis water extract using a reliable RP-HPLC methodology and in vitro and in vivo efficacy and safety characterization, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-11, 2013.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, 2016.

SANTOS, L. M. et al. Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 4, p. 1369-1382, 2019.

SANTOS, M.C.S. Atlas citológico de conclusão do curso de citologia clínica e laboratorial da academia de ciência e tecnologia de São José do Rio Preto-SP: Morfologia e Ultraestrutura Bacteriana Gram-Negativa. São Paulo. 2020.

SANTOS-SÁNCHEZ, N. F. et al. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In: **Antioxidants**. IntechOpen, 2019.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321-324, 2007.

SILVA, B. B. et al. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM** v. 5 n.3 p. 313-316, 2008

SILVA, R. P. et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **Plos one**, v. 12, n. 3, p. 1-18, 2017.

SINHORINI, W. A. et al. Atividade antibacteriana in vitro da própolis testadas em cepas bacterianas padrão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 1, n. 2, p. 107-111, 2014.

SERAFIM, M. S. **Própolis marrom e resina de *Eucalyptus botryoides* da região de Bambuí-MG: isolamento de compostos fenólicos e avaliação da atividade antimicrobiana.** Dissertação de Mestrado. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.60.2020.tde-19122019-081542>

SFORCIN, J. M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 6, p.894-905, 2016.

SFORCIN, J. M. et al. *Baccharis dracunculifolia*: Uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira. 2012.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, ed. 2, p. 253-260, 2011

SILVA, C. J.; TEJADA, Talita S.; TIMM, C. D. Resistência de *Salmonella* isoladas de humanos e de frangos a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 4, p. 120-131, 2014.

SILVA, R. P. D. et. Al, Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts, **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p.1-18, 2017.

TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. *Staphylococcus aureus*. In: **StatPearls**. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>

TEH, C. H. et al. Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 36, 2017.

TORO, L. M. E.; CORREA, J. C. C. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno **Intrahospitalario: epidemiología y resistencia**, v. 23, n. 3, p. 240-249, 2010.

TORRES, A. R. et al, Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, p. 1-10, 2018.

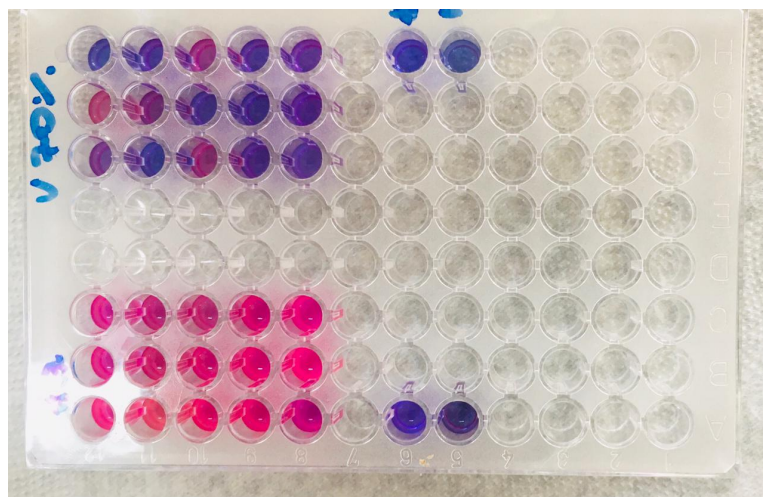
VASCONCELOS, H. G. et al. Avaliação da eficácia antibacteriana do extrato de própolis verde em bactérias causadoras de infecções nas vias aéreas. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v. 3, p. e1840-e1840, 2019.

VEIGA, R. S. et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911-920, 2017.

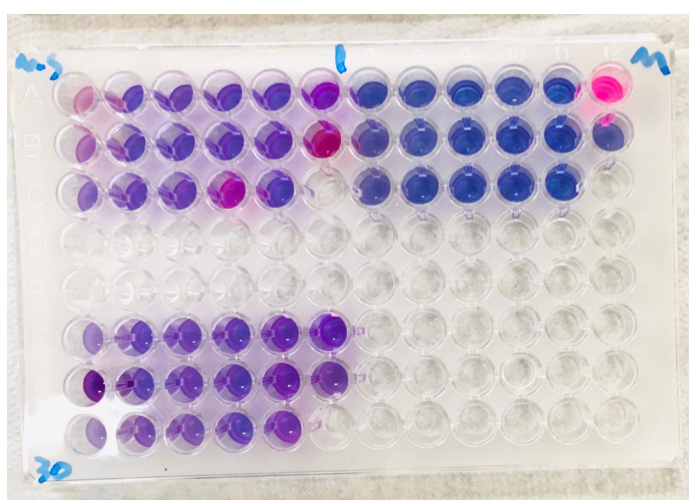
WAGH, V. D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, 2013.

YUAN, Y. et al. The phenolic compounds, metabolites, and antioxidant activity of propolis extracted by ultrasound-assisted method. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 12, p. 3850-3865, 2019.

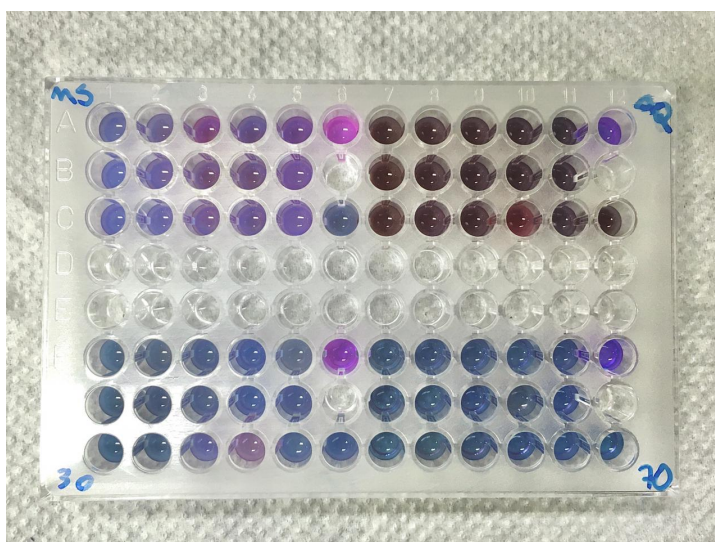
9. Anexos



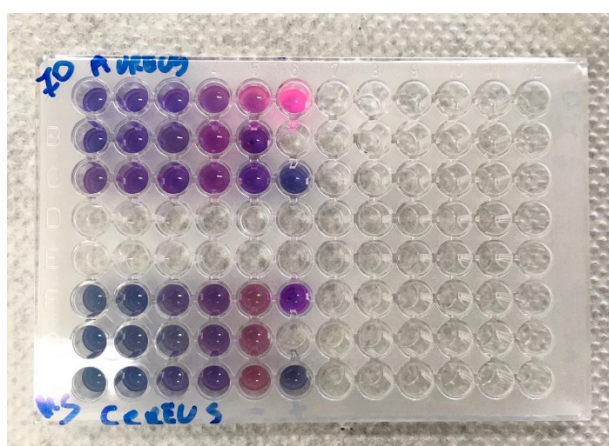
ANEXO 1.1. Imagem da determinação da CIM em microplaca utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular, com *B. cereus* ATCC 14579 e os extratos de própolis: 5) verde 70 e 6) aquoso. Cor azul = morte celular e cor e rosa fluorescente = resazurina reduzida a resorufina pelas enzimas óxido-redutases presentes nas células vivas



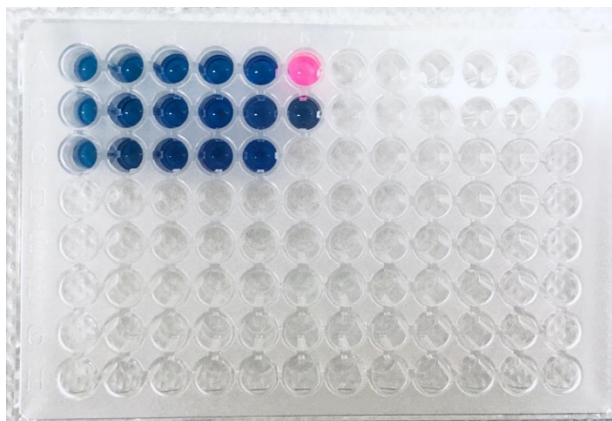
ANEXO 1.2. Imagem da determinação da CIM em microplaca utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular, com *B. cereus* ATCC 14579 e os extratos de própolis: 1) verde A; 2) marrom e 3) verde B



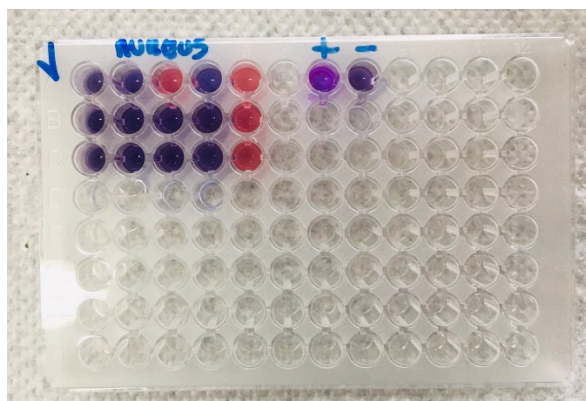
ANEXO 1.3. Imagem da determinação da CIM em microplaca utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular, com *B. cereus* ATCC 14579 e os extratos de própolis: 1) verde B; 6) aquoso; 3) verde A e 5) verde 70



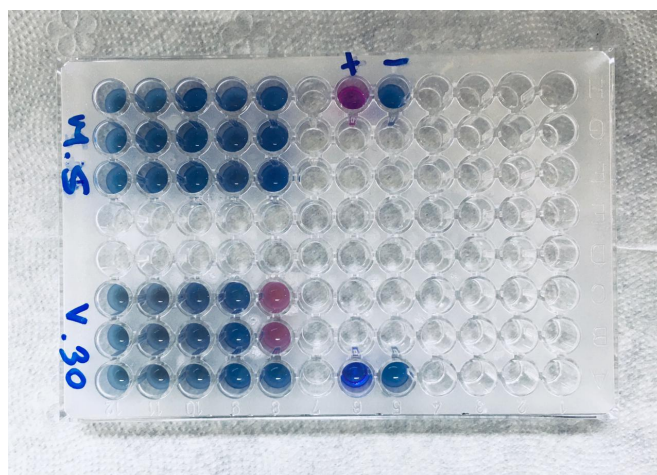
ANEXO 1.4. Imagem da determinação da CIM em microplaca utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular, com *S. aureus* ATCC 25923 e o extrato de própolis 5) verde 70 e *B. cereus* ATCC 14579 e o extrato de própolis 3) verde B



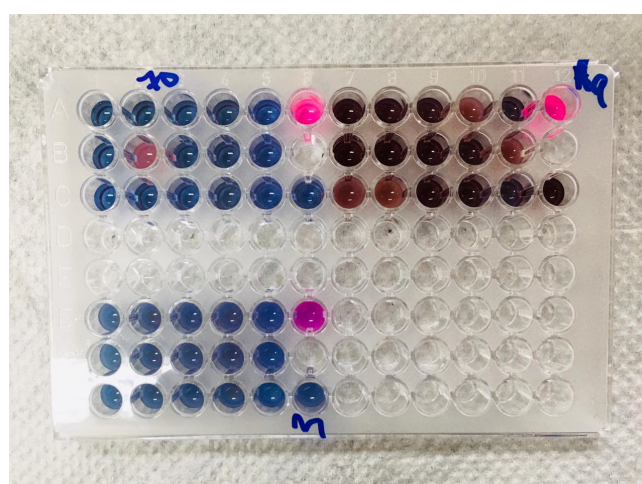
ANEXO 1.5. Imagem da determinação da CIM em microplaca utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular, com *S. aureus* ATCC 25923 e o extrato de própolis: 5) verde 70



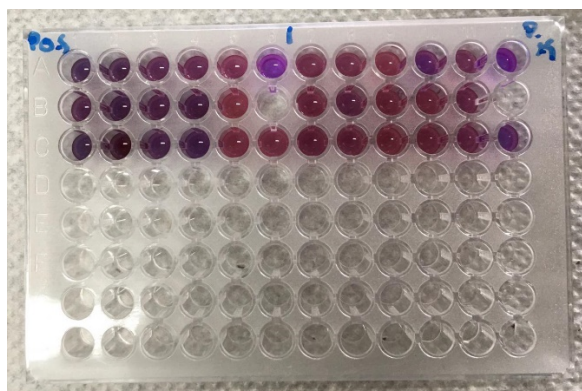
ANEXO 1.6. Imagem da determinação da CIM em microplaca utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular, com *S. aureus* ATCC 25923 e o extrato de própolis: 4) vermelho



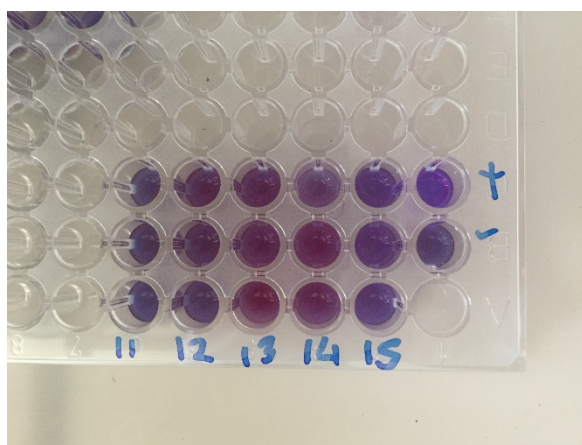
ANEXO 1.7. Imagem da determinação da CIM em microplaca utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular, com *S. mutans* ATCC 25175 e os extratos de própolis: 3) verde B e 1) verde A.



ANEXO 1.8. Imagem da determinação da CIM em microplaca utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular, com *S. mutans* ATCC 25175 e os extratos de própolis: 5) verde 70; 6) aquoso e 2) marrom



ANEXO 1.9. Imagem da determinação da CIM em microplaca utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular, com *P. aeruginosa* ATCC 27853 e o extrato de própolis: 4) vermelho



ANEXO 1.10. Imagem da determinação da CIM em microplaca utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular, com *E. coli* ATCC 25922 e o extrato de própolis: 3) verde B