



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Heidy Carvalho dos Santos

**Produção da própolis em Casa Nova, BA e sua atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus* spp. isolados da mastite de pequenos ruminantes**

Petrolina-PE

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Heidy Carvalho dos Santos

**Produção da própolis em Casa Nova, BA e sua atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus* spp. isolados da mastite de pequenos ruminantes**

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco -UNIVASF, Campus de Ciências Agrárias, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Mari Yamamoto  
Co-orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eva Mônica Sarmiento da Silva  
Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Petrolina-PE

2014

S237p Santos, Heidy Carvalho dos  
Produção da própolis em Casa Nova, BA e sua atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus* spp. isolados da mastite de pequenos ruminantes / Heidy Carvalho dos Santos. -- Petrolina, 2015.  
51f. : il.; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2015.  
Orientadora: Profª. Drª. Sandra Mari Yamamoto.

Referências.

1. Própolis – Antibiótico. 2. Bactérias. 3. Mastite - Caprinos. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco

CDD 618.19

## Folha de aprovação

## **Agradecimento (s):**

À Deus em primeiro lugar pelo dom da vida e por toda força que me foi concedida para alcançar esta vitória!!

À toda minha família pelo apoio e compreensão. À minha mãe que é minha fortaleza e meu exemplo de vida a seguir, sem ela hoje eu não teria conseguido essa vitória. Ao meu irmão, pela paciência, por toda a disponibilidade sempre que precisei.

Aos professores que fizeram parte desta caminhada em especial a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Mari Yamamoto pela confiança e por todo o apoio, a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eva Mônica Sarmento da Silva por mais uma oportunidade de poder trabalhar ao seu lado, ao Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa, pelo tempo e disposição que foram de extrema importância para conclusão deste trabalho e a Dr<sup>a</sup> Gisele Veneroni Gouveia, pela ajuda e auxílio.

À Rosangela (Rosinha), apoio e por toda disposição tornando as coisas sempre mais fáceis.

Aos meus amigos Emerson Matos e Maria de Fátima que sempre estiveram ao meu lado durante esses dois anos.

À família do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, pela ajuda e paciência.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Também sou grata a todos aqueles, não citados, que de diversas formas, seja através de uma palavra de apoio ou um sorriso, tornaram essa caminhada menos árdua.

“Sempre me sinto feliz, sabes por quê? Porque não espero nada de ninguém. Esperar sempre dói. Os problemas não são eternos, sempre têm solução. O único que não se resolve é a morte. A vida é curta, por isso, ame-a!”

Shakespeare

## RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar a produção de própolis no município de Casa Nova, BA bem como os efeitos antimicrobianos da própolis em diferentes solventes e concentrações frente a isolados de *Staphylococcus* spp., obtidos de casos de mastite em caprinos. Para verificar a produção da própolis, foram utilizados coletores de própolis inteligente, distribuídas ao acaso em 5 (cinco) colônias de abelhas de *Apis mellifera*, alojadas em colmeias padrão Langstroth. A própolis coletada foi pesada e encaminhada para avaliação físico-química, com detecção das substâncias naringenina, kanferol e isoramnetina, sendo os dois últimos os principais flavonóides. Os valores de produção de própolis variaram de 49,817 g a 79,851 g. Para o levantamento da flora apícola da região, foi feita coleta de espécies botânicas que estavam em floração e que apresentavam abelhas africanizadas em atividade de forrageamento. Foram coletadas 25 espécies de plantas de 13 famílias diferentes. A atividade antibacteriana *in vitro* da própolis foi mensurada em 34 isolados de *Staphylococcus* ssp., obtidos de casos de mastite subclínica em caprinos, por meio da determinação da concentração bactericida mínima (CBM). Os valores de CBM dos extratos mostraram que as menores concentrações (97,6, 195,3 e 390,6 µg/mL) não foram capazes de causar a sensibilidade nos isolados de *Staphylococcus* spp. As melhores concentrações capazes de ocasionar a maior mortalidade dos isolados foram de 6250, 3125 e 1562,5 µg/mL respectivamente. Os isolados foram considerados resistentes ao extrato hexânico, com maior porcentagem (89,70%) de bactérias resistentes em relação ao extrato em acetato de etila (43,38%) e ao extrato etílico (27,32%). Assim, o extrato etílico de própolis demonstrou melhor eficácia sobre as bactérias *Staphylococcus* spp. Por meio do teste de aderência à microplacas, observou-se que 20,78% dos 34 isolados, não foram capazes de formar biofilme (negativo), 14,70% foram classificados como moderados, 64,70% em fracos e nenhum como forte produtores de biofilme. Verificou-se que o extrato etílico foi mais relevante em intervir sobre o biofilme estafilocócico em 0 hora. Em 24 horas o melhor extrato observado foi o extrato em acetato de etila.

Palavras-chave: bactéria, caprinos, extrato de própolis, solventes

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the production of propolis in the municipality of Casa Nova, state of Bahia, as well as the antimicrobial effects of propolis in different solvents and concentrations in relation to isolates of *Staphylococcus* spp, obtained from cases of mastitis in goats. To check the production of propolis, were used intelligent collectors of propolis, randomly distributed in 5 (five) bee colonies of *Apis mellifera*, housed in hives standard Langstroth. The propolis collected was heavy and forwarded for evaluation physical-chemical, with detection of substances naringenin, kanferol and isorhamnetin, the last two being the main flavonoids. The production values of propolis vary from 49.817 g 79.851 g. For the survey of flora bee of the region, was made collection of botanical species that were flowering and that had africanized honey bees in foraging activity. We collected 25 species of plants from 13 different families. The antibacterial activity in vitro of propolis was measured in 34 isolates of *Staphylococcus* ssp. obtained from cases of subclinical mastitis in goats, by determining the bactericidal concentration minimum (CBM). The values of CBM of extracts showed that the lower concentrations (97.6, 195.3 and 390.6  $\hat{1}$ /<sub>4</sub>g/mL were not able to cause the sensitivity in isolates of *Staphylococcus* spp. . The best concentrations capable of causing the greater mortality of isolates were from 6250, 3125 and 1562,5  $\hat{1}$ /<sub>4</sub>g/mL, respectively. Isolates were considered resistant to hexane extract, with the greatest percentage (89,70 %) of resistant bacteria in relation to the extract in ethyl acetate (43,38 %) and extract the ethyl ( ) (27,32 % ). Thus, the ethanol extract of propolis showed better results on the bacteria *Staphylococcus* spp Through the test of adhesion to the microplates, it was observed that 20,78% of 34 isolates, were not able to form biofilm (negative), 14.70% were classified as moderate, 64.70% in weak and none as strong producers of biofilm. It was found that the ethanol extract was more relevant to intervene on the staphylococcal biofilm in 0 hour. In 24 hours the best extract observed was the extract in ethyl acetate.

Keywords: bacteria, goats, propolis extract, solvents

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Coleta de própolis.....	24
Figura 2 - Plantas coletadas no município Casa Nova- BA, 1 <i>Antigonon leptopus</i> ; 2 <i>Senna occidentalis</i> ; 3 <i>Leucaena Leucecephala</i> ; 4 <i>Piptadenia moniliformis</i> .....	25
Figura 3 - Extração da própolis e obtenção dos extratos.....	25
Figura 4. Extração da própolis e obtenção dos extratos.....	27
Figura 5. Produção de própolis em função da temperatura no município de Casa Nova- BA no período de janeiro a setembro de 2013.....	31
Figura 6. Flavonóides identificados na fração AcOEt da própolis coletada no município de Casa Nova, BA (1) Naringenina, (2) Kanferol e (3) Isoramnetina.....	34
Figura 7. Produção de biofilme por isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema de eluição para análise cromatográfica (HPLC-DAD) da fração AcOEt da própolis coletada na região de Casa Nova-BA.....	26
Tabela 2. Classificação dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. quanto a sua produção de biofilme.....	29
Tabela 3. Espécies de plantas apícolas coletadas no município de Casa Nova, BA.....	32
Tabela 4. Valores médios proporcionais para o extrato etanólico; extrato em acetato de etila e extrato hexânico na avaliação de bactérias de <i>Staphylococcus</i> spp., sobre a porcentagem de isolados resistentes e sensíveis (%)......	34
Tabela 5. Valores de CBM, referentes à atividade antimicrobiana, bem como das frações de EtOH, AcOEt e Hexano sobre a porcentagem de isolados resistentes e sensíveis (%)......	35
Tabela 6. Classificação dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. quanto a sua produção de biofilme em contato com os extratos etílico, em acetato de etila e hexânico.....	37
Tabela 7. Atividade dos extratos sobre o biofilme consolidado de <i>Staphylococcus</i> spp.....	39

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Produção de Própolis.....	14
2.2 Características Botânica.....	15
2.3 Propriedades da Própolis.....	16
2.4 Composição Química da própolis.....	17
2.5 Ação antibacterina da própolis frente a bactérias de mastite.....	19
2.6 Produção e importância do Biofilme sobre <i>Staphylococcus</i> spp.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo Geral.....	23
3.2 Objetivo Específico.....	23
4. MATERIA E MÉTODOS.....	23
4.1 Local de Coleta.....	23
4.2 Produção e caracterização das amostras de própolis.....	24
4.3 Coleta do material botânico.....	24
4.4 Análises Fitoquímica do extrato de Própolis.....	25
4.5 Isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.....	27
4.6 Análise da sensibilidade dos isolados ao extrato de própolis.....	27
4.7 Quantificação do Biofilme.....	28
4.8 Interferência do extrato de própolis com o biofilme em formação nos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.....	29
4.9 Interação do extrato de própolis com o biofilme consolidado nos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.....	29
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
6.1 Produção e caracterização das amostras de própolis.....	30
6.2 Sensibilidade dos isolados ao extrato de própolis.....	34
6.3 Quantificação da produção de biofilme.....	36

6.4 Capacidade dos extratos em interferir na formação do biofilme.....	37
6.5 Capacidade dos extratos em interferir com o biofilme consolidado.....	38
7. CONCLUSÃO.....	39
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sustentável surge como alternativa à crise gerada pelo crescimento desenfreado e tem como solução um aumento de atividades produtivas e voltadas à redução de impacto que elas podem causar (SANTOS e RIBEIRO, 2009).

Segundo VIDAL (2010) a apicultura no Brasil tem alcançado grande desenvolvimento entre as demais atividades agropecuárias nos últimos anos, com destaque para a Região Nordeste. O Brasil apresenta características de clima e flora que lhe confere competitividade frente aos grandes produtores mundiais dessa atividade.

A diversidade da flora, a fonte exótica de néctar e pólen, a vasta extensão territorial detentora de potencial para a apicultura, a rusticidade das abelhas e características do clima conferem ao Brasil situação privilegiada para a produção apícola. Além disso, as condições de mercado externo favoreceram o desenvolvimento da atividade no país (VIDAL, 2010).

Diversos trabalhos são desenvolvidos com os produtos apícolas, dentre eles destaca-se a própolis, utilizada principalmente como antibióticos nas áreas médica, zootécnica e veterinária (PEREIRA et al. 2002). Assim sabe-se que os produtos apícolas, a cada dia ganham mais espaços na terapia de várias doenças. As vantagens do uso de própolis em relação a antimicrobianos sintéticos são as menores taxas de toxicidade e resistência microbiana (MARCUCCI, 1995).

Existem diversas enfermidades que acometem os rebanhos leiteiros, principalmente aquelas ocasionadas por microrganismos (ANDERSON et al. 2004). Dentre eles destaca-se os casos de mastite em caprinos e ovinos no Brasil, causados pelos *Staphylococcus* spp. (COUTINHO et al. 2006, DOMINGUES et al. 2006, LANGONI et al. 2006, ALMEIDA 2009, BOLSANELLO et al. 2009). Em criações leiteiras, a frequência de mastite pode oscilar entre 22% e 75% (LIMA JÚNIOR et al. 1995). Na região Nordeste, sinais clínicos desta enfermidade foram relatados em 51,2% dos rebanhos de caprinos e ovinos (PINHEIRO et al. 2000).

Desta forma, Langoni et al. (1996) em estudos da eficácia antimicrobiana do extrato etanólico de própolis contra agentes bacterianos *in vitro*, constataram que houve uma inibição de 100% do crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis* e, respectivamente, 90% e 91% de inibição das estirpes de

*Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*, testadas, sendo essas espécies bacterianas as mais importantes e prevalentes na etiologia da mastite de ruminantes.

Dessa forma, os produtos oriundos das abelhas *Apis mellifera* têm sido amplamente discutidos e aplicados na produção animal, em função da sua ampla atividade biológica, onde os mesmos apresentam atividade antimicrobiana.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Produção da própolis**

A apicultura é uma atividade que vem ganhando mais espaço e valor dentro da produção agropecuária, ajuda na polinização de várias culturas e ao mesmo tempo se beneficia delas para uso na sua alimentação. Segundo Dousoto (2010), dificilmente alguém faz cultivos para formação de pasto apícola exclusivo para as abelhas, a finalidade principal sempre é a cultura em si e as abelhas entram para melhorar a produtividade.

Atualmente pesquisadores têm direcionado suas atenções à flora brasileira já que a própolis é um produto natural e proveniente desta flora e, vem despertando bastante interesse. Entretanto sua composição pode ser intensamente influenciada pelas variações ambientais, tais como: fauna, flora, clima, temperatura, época da colheita entre outros (NUNES et al. 2009; LINS et al. 2010).

A própolis é o produto oriundo de substâncias resinosas, que apresenta coloração variada, além de ser gomosa e balsâmica, sendo coletada por abelhas de diversas espécies, como *Scaptotrigona* aff. *postica* Latreille, 1807 (SOUZA et al. 2012), *Tetragona clavipes* Fabricius, 1804 e *Melipona mondury* Smith, 1863 (FREITAS et al. 2012), *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, 1811 e *Trigona recursa* Smith, 1863 (BARTH 2006) e *Apis mellifera* Linnaeus, 1758.

Comercialmente, a própolis tem ocupado um lugar de destaque nos mercados nacional e internacional de produtos apícolas. Tal crescimento está atribuído essencialmente à constatação das diferentes atividades biológicas encontradas aos componentes químicos deste produto (TEIXEIRA et al. 2003). Um dos principais produtores mundiais de própolis é o Brasil, cuja produção é de aproximadamente 100 toneladas anuais, sendo destinada à maior parte à exportação, tanto na forma

bruta como em produtos manufaturados, representando uma enorme fonte de renda e alcançando elevados preços no comércio exterior (MACHADO et al. 2012).

O Japão, por exemplo, consome cerca de 92% da própolis *in natura* produzida no Brasil (PICKLER, 2009), sendo responsável pelo aumento da produção e expansão, impulsionando o mercado e a geração de renda para o apicultor.

Minas Gerais é o estado brasileiro que tem maior produção de própolis, por ano é coletado cerca de 29 toneladas que fica em torno de 70% da produção nacional. Além disso, Minas tem se tornado referência mundial na qualidade de sua própolis e hoje já é produtor apícola com maior volume em exportações (SAMPAIO, 2012).

Ainda de acordo com Sampaio (2012), o Estado mineiro oferece fatores e condições favoráveis de clima como, altitude média e temperaturas ideais para o desenvolvimento da atividade e produção da própolis. Esses fatores podem provocar alterações do pasto apícola e mudanças que venham a afetar a composição química da própolis, dificultando assim a sua comercialização, bem como a profissionalização do setor.

## **2.2 Características Botânicas**

A própolis foi classificada em diferentes grupos de acordo com a origem botânica e sua composição química. Porém, essa classificação ainda é subestimada, uma vez que as abelhas podem coletar resina numa grande diversidade de plantas (SILVA, 2008). Devido à ampla variedade vegetal existente no Brasil para a retirada de resina e produção da própolis, até agora apenas algumas variedades tiveram a origem botânica identificada (PARK et al. 2002). Segundo Aguero et al. (2010), as fontes de resinas e exsudatos vegetais disponíveis variam de região para região e dependem do clima, solo e outros fatores.

O estudo de plantas fornecedoras de resina para as abelhas é importante para a preservação, manejo e produção apícola (VIDAL et al., 2008). As origens geográficas das substâncias presentes na própolis bem como as diferenças genéticas das abelhas que coletam a resina tornam a composição química bastante

complexa (BARBOSA, 2009). Assim, própolis de diferentes locais podem ter constituintes químicos diferentes (HERNANDEZ et al. 2010).

### **2.3 Propriedades da própolis**

Vários fatores interferem na qualidade e quantidade de própolis produzida, assim diversas pesquisas de várias regiões do Brasil e do mundo têm sido realizadas com a finalidade de analisar os fatores que podem causar variação na própolis, tais como estações do ano, a flora da região (SOUZA et al. 2010) e características genéticas das abelhas (MARTINEZ & SOARES, 2012). Isso destaca a importância de um estudo individualizado do local dos apiários, devido à diferença entre os tipos de mancha na paisagem e as variações sazonais de cada região.

Segundo Hernandez et al. (2010) a atividade biológica da própolis é atribuída às substâncias derivadas das plantas coletadas para a sua produção, podendo esta produção da própolis ser feita por até duas ou mais espécies vegetais. Por isso, embora seja um produto de origem animal, alguns compostos químicos da própolis são derivados da fonte botânica utilizada pelas abelhas, principalmente aqueles com ação biológica (SALATINO et al. 2005).

Quanto à sua coloração, pode variar do amarelo claro, marrom esverdeado ao negro, dependendo da vegetação de origem e dos fatores ambientais do local de produção. Algumas são fibrosas e firmes, enquanto outras são gomosas e maleáveis, possuindo composição química complexa (MARCUCCI et al. 2001, SALATINO et al. 2005). Mas de forma geral, quando recolhida de uma colmeia de abelhas, apresentam em sua composição básica cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra (MONTI et al. 1983; CIRASINO et al. 1987).

Geralmente as abelhas melíferas coletam a resina na vegetação próxima da colméia. O espectro de voo dessas abelhas abrange um raio de aproximadamente 4 a 5 km em torno da colmeia, de onde abelhas campeiras coletam também outros produtos (pólen e néctar) para alimentação. Ainda não são conhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, mas sabe-se que elas são seletivas neste aspecto (SALATINO et al. 2005; TEIXEIRA et al. 2005).

A própolis é utilizada como complemento alimentar e em medicamento, assim suas propriedades biológicas e terapêuticas têm sido reconhecidas e comprovadas: contra células cancerígenas, atividade antiinflamatória (SILICI e KUTLUCA, 2005), antiviral (AMOROS et al. 1992), antibacteriana (SCAZZOCCHIO et al. 2006), antifúngica (OLIVEIRA et al. 2006, ALY & ELEWA, 2007) e contra protozoários (HIGASHI e CASTRO, 1994, SILVA CUNHA et al. 2004), hepatoprotetora, regeneradora tecidual, citotóxica (BANSKOTA et al. 2000), antioxidante (OLDONI et al. 2011) e cicatrizante (SOUZA et al. 2009).

A ação antimicrobiana da própolis tem sido amplamente investigada (SILVA, 2008) e depende do solvente utilizado para preparar o extrato. Desta forma pesquisadores estudam um meio de produzir um extrato aquoso de própolis com as mesmas qualidades do extrato alcoólico, porém sem as desvantagens deste, como o sabor residual e algumas reações adversas e contra indicações (MELLO et al. 2010).

Alguns pesquisadores relatam a viabilidade do extrato oleoso de própolis que foi capaz de extrair substâncias bioativas responsáveis por atividade antimicrobiana e citotóxica e que conserva as características organolépticas da própolis (BURIOL et al. 2009).

## **2.4 Composição Química da Própolis**

A composição química e as atividades biológicas das própolis dependem dos aspectos ambientais como, por exemplo, pluviosidade, variações de temperatura e pasto apícola. As mudanças climáticas bem como as alterações do pasto apícola, que ocorrem durante o ano, podem modificar o produto natural em sua composição química, dificultando a comercialização e a padronização do mesmo. Com relação à variação sazonal, a diminuição em alguns componentes biologicamente ativos pode ser acompanhada pelo aumento de outros (NUNES et al. 2009). Estudos que abordam o efeito da sazonalidade são muito importantes para a caracterização da matéria-prima de uma determinada região, uma vez que questões climáticas também se diferenciam em função da região onde o produto natural é obtido (SIMOES-AMBROSIO et al. 2010).

Estudos sobre a atividade de produtos naturais tem sido priorizados visando principalmente à atividade biológica. A eficácia destes produtos tem sido reconhecida e os desafios são identificar novos compostos bioativos e entender seus mecanismos de ação (OLDONI, 2007). Devido à riqueza da flora brasileira, os estudos com as plantas empregadas popularmente tem propiciado a busca destas moléculas (COUTINHO et al. 2009).

A maior parte dos trabalhos encontrados na literatura refere-se à própolis verde, e apenas nos últimos anos a própolis vermelha tem sido objeto de estudo. Esta possui uma importante fonte de compostos com atividades biológicas, sendo uma delas a atividade antioxidante (OLDONI et al. 2011). Segundo Alencar et al. (2007), a própolis vermelha brasileira possui novos compostos bioativos nunca antes encontrados nos produtos já estudados. Estudo realizado por Cabral et al. (2009), concluiu que a própolis vermelha possui alta atividade antioxidante e antibacteriana e as sub-frações obtidas são mais ativas biologicamente que o extrato bruto.

Em várias partes do mundo, a própolis vem sendo comercializada pela indústria farmacêutica como uma medicina alternativa (LOTTI et al. 2010). É usada como um selante nos espaços abertos da colmeia e contém basicamente cera, substâncias vegetais e outras secreções da abelha (LOTTI et al. 2010).

Segundo Hernandez et al. (2010), os estudos sobre a composição química e as propriedades biológicas da própolis estão ligadas diretamente e podem ajudar a estabelecer critérios para o controle de qualidade das amostras de própolis. No Brasil, a qualidade da própolis é verificada utilizando parâmetros normatizados pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001), onde o teor de flavonóides, bem como a composição centesimal da mesma deve ser avaliado.

Até o momento, os principais compostos químicos isolados da própolis podem ser organizados em alguns grupos principais como ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, alcoóis, aldeídos, ácidos graxos, aminoácidos, esteróides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, bem como minerais. De todos esses grupos de compostos, certamente o que mais vem chamando a atenção dos pesquisadores são os flavonóides (HAVSTEEN, 2002).

Os componentes fenólicos, entre eles os flavonóides são os compostos isolados com mais frequência e boa parte das propriedades terapêuticas dependem

da associação destes com outros constituintes menos comuns, como os derivados do ácido cinâmico e os diterpenos. (NUNES et al. 2009; LINS et al. 2010).

Segundo Williams et al. (2004), após a ingestão, os flavonóides participam em diversos processos fisiológicos, auxiliando na absorção e na ação de vitaminas, atuam nos processos de cicatrização como antioxidantes, além de apresentarem atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune. Diversos outros compostos têm sido relacionados com as propriedades medicinais da própolis (AWALE et al. 2005). O melhor conhecimento de suas propriedades e características visa além da pesquisa e desenvolvimento de novos remédios, a agregação de valor econômico à própolis bruta, a fim de gerar uma fonte econômica de exploração agrícola e extrativismo autossustentável.

Vieira (2012) destacou a importância da própolis como antibactericida com ênfase para ação sobre as espécies de bactérias gram-positivas e menor poder sobre as gram-negativas, além da sua utilização em indústrias de cosméticos e alimentos.

Entretanto no Brasil, uma enorme quantidade de marcas e produtos à base de própolis encontra-se disponíveis em lojas de produtos naturais, tais como balas, chocolates, doces, chá, protetor solar, gel pós-barba, xampus, cremes para pele, soluções antissépticas, pastas de dente, sabonetes, batons, cápsulas, extratos, spray bucal, pastilhas, xaropes, comprimidos etc. (PARK & IKEGAKI, 1998; LENGLER, 2012).

## **2.5 Ação antibacteriana da própolis em bactérias de mastite**

A mastite, especialmente em sua forma subclínica, é a doença que mais causa prejuízos à produção leiteira, pois afeta a produção, a qualidade do leite, além de reduzir o rendimento industrial dos derivados lácteos. Patógenos secundários que afetam a glândula mamária, em especial, *Staphylococcus coagulase-negativa* (SCN) se tornam os agentes causadores de mastite mais predominantes em rebanhos leiteiros (SAMPIMON et al. 2010).

A mastite resulta em perdas econômicas significativas que estão associadas com redução na produção de leite (mais de 70%), custo com tratamento e serviços médicos veterinários (7%), descarte de leite durante o período de tratamento (9%),

aumento da mão-de-obra (1%) e descarte de animais precocemente (14%) (SHARMA et al. 2012).

Os microrganismos que comumente causam mastite podem ser classificados em dois grupos: patógenos ambientais e patógenos contagiosos. Os patógenos ambientais são descritos como invasores oportunistas do úbere, não adaptados a sobreviver no seu interior, vivendo no ambiente contaminado que apresenta condições sanitárias precárias, fornecendo o ambiente perfeito para a proliferação desses microrganismos, sendo os principais a *Escherichia coli*, o *Streptococcus dysgalactiae* e o *Streptococcus uberis* (AMORIM et al. 2010; MARTINS et al. 2010). Já os contagiosos, a sobrevivência dos microrganismos é no interior da glândula mamária, podendo provocar a excreção do agente infeccioso e a transmissão para outro animal. Dentre os patógenos mais importantes são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* (MARTINS et al. 2010).

A espécie *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos de maior importância, sendo encontrados principalmente nas glândulas mamárias, na pele do úbere e tetos infectados (FONTANA et al. 2010).

A antimicrobianaoterapia é uma das principais ferramentas para o controle da mastite provocada por *Staphylococcus aureus*, entretanto a aplicação de testes de susceptibilidade pode direcionar a escolha do melhor tratamento a ser utilizado (MORONI et al. 2006).

Esses microrganismos representam um problema muito grande à saúde pública, uma vez que mesmo o leite pasteurizado pode apresentar contaminação por enterotoxinas termoestáveis, podendo causar distúrbios alimentares (ANDRADE, 2010; DRESCHER et al. 2010).

O combate à doença tem sido muitas vezes feito por meio de antibióticos, mas estes fármacos podem deixar resíduos no leite e gerar fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis, bem como efeitos tóxicos e carcinogênicos, por alterações no equilíbrio da microbiota intestinal (FREITAS et al. 2005). Por isso, têm-se estimulado a busca por meios alternativos que reduzam ou eliminem tais problemas.

Dessa forma, substâncias como a própolis podem inibir a capacidade de crescimento de microrganismos e causar uma desorganização do citoplasma, da membrana plasmática e da parede celular (PARADISI et al. 2002), princípio este

ligado intimamente à presença de compostos como flavonóides e fenóis (HULIN et al. 1998).

De acordo com Nagai et al. (2006) a atividade antimicrobiana da própolis é largamente relatada, apresentando um efeito inibitório intenso sobre o crescimento microbiano. Langoni et al. (1996), estudando o efeito antimicrobiano *in vitro* do extrato de própolis e obtiveram uma sensibilidade de 100% para os isolados de *S. aureus*, *Corynebacterium* spp., *C. albicans*, *Enterobacter aerogenes*, além de 91% para *E. coli*, 90% para *S. agalactiae*, 87,5% para *Klebsiella pneumoniae*, 85,7% para *P. aeruginosa* e 81,3% para *Salmonella* spp.

Também Portilho et al. (2013) observaram que a própolis produzida no estado do Tocantins possuía atividade antibacteriana principalmente para as bactérias gram-negativas (*Salmonella* e *E.coli*) e as bactérias gram-positivas testadas (*S. aureus* e *S. epidermidis*), sendo que o extrato de própolis foi mais eficiente contra os isolados de *S. epidermidis*. Com relação à atividade antifúngica o extrato foi mais eficiente quando testado contra os isolados *C. tropicalis* quando comparada a outra espécie (*C. albicans*).

Portanto, alternativas de tratamento da mastite vêm sendo criadas como a utilização do extrato etanólico de própolis, pois esta auxilia na diminuição dos prejuízos econômicos gerados em rebanhos leiteiros, tornando o produto mais seguro à saúde pública e ao meio ambiente além da sua produção servir como incentivo a criação de abelhas pelos apicultores familiares (TAVARES, 2000).

## **2.6 Produção e importância do biofilme sobre os *Staphylococcus* spp.**

Infecções causadas por agentes etiológicos amplamente resistentes aos antimicrobianos representam um dos grandes desafios atuais da saúde pública, acarretando em altas taxas de mortalidade, aumento no tempo de internação e nos gastos do sistema de saúde (NEIDELL et al. 2012).

Biofilmes têm sido descritos em muitos sistemas desde que Antony Van Leeuwenhoek, em 1675, examinou “microrganismos” no seu próprio dente, mas a teoria geral da existência de biofilmes só foi promulgada em 1978 (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978). Desde então, estudos têm revelado que a maioria das bactérias não cresce como células individuais, mas em comunidades estruturadas

como organismos pseudomulticelulares ou biofilmes, estando presentes em praticamente todos os ecossistemas naturais e patogênicos (LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010).

A adesão bacteriana seja em uma superfície biótica (como células e tecidos animais ou vegetais) ou abiótica (inanimada, como plásticos e metais), é o primeiro estágio na formação de biofilmes e é considerado um processo bastante complexo. Como regra geral, a adesão primária (ou adesão reversível) entre bactérias e superfícies, a adesão a superfícies bióticas é acompanhada por interações moleculares mediadas por ligações específicas do tipo receptor-ligante, enquanto a abióticas ocorre mediada por interações físico-químicas não específicas (DUNNE, 2002).

Estes biofilmes podem ser definidos como agregados de células bacterianas aderidos a uma superfície e envoltos por uma matriz secretada por estas bactérias, denominada EPS (*Extracellular polymeric substance*). Usualmente, esta matriz é composta de exopolissacarídeos, proteínas e até mesmo DNA (LÓPEZ et al. 2010).

Sabe-se que o gene *icaA* codifica a enzima N-acetilglucosaminotransferase, que está diretamente envolvida na síntese do exopolissacarídeo N-acetilglucosamina, também chamado de adesina polissacarídica intercelular (PIA), enquanto o gene *icaD* está associado a máxima expressão da enzima N-acetilglucosaminotransferase. (CRAMTON et al. 1999; ARCIOLA et al. 2001; GOTZ, 2002).

Entretanto os mecanismos envolvidos com a formação do biofilme estafilocócico estão relacionados à regulação por *quorum sensing* (QS). O QS bacteriana é o fenômeno pelo qual as bactérias regulam sua expressão gênica em resposta a concentração de pequenas moléculas chamadas auto-indutores, secretados por elas próprias, ou outras bactérias. O principal sistema de QS em estafilococos se chama *accessory regulation system (agr)*, que tem como molécula efetora o RNAlII (YARWOOD et al. 2004; ANTUNES et al. 2010).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar a capacidade de produção e caracterização da própolis no município de Casa Nova- BA no ano de 2013, bem como avaliar os efeitos antimicrobianos da própolis em diferentes solventes e concentrações frente a isolados de *Staphylococcus* spp., obtidos de casos de mastite em caprinos.

#### **3.2 Específico**

- Avaliar a produção mensal da própolis;
- Caracterizar a composição da própolis;
- Estabelecer os valores da Concentração Bactericida Mínima da própolis diluída em três tipos de solventes e suas frações;
- Avaliar a habilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. em produzir biofilme;
- Determinar a capacidade dos extratos em interferir com o biofilme de *Staphylococcus* spp. estabelecido ou sua formação;

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Local de coleta**

Os estudos de produção de própolis foram desenvolvidos em um apiário localizado no município de Casa Nova, BA, 09° 22' 378" latitude Sul (S), 41° 14' 462" longitude Oeste (W) em relação ao Greenwich. Os estudos foram avaliados no período de janeiro a setembro de 2013. Foram utilizadas 5 (cinco) colônias de abelhas *Apis mellifera*, alojadas em colmeias padrão Langstroth, distribuídas ao

acaso e manejadas para produção de própolis. Antes do início da fase experimental, os ninhos foram padronizados quanto à homogeneidade da cria.

#### **4.2 Produção e Caracterização das amostras de Própolis**

A própolis foi coletada utilizando o coletor de própolis inteligente, distribuídos ao acaso. A coleta foi feita mediante a raspagem das partes móveis da colméia. Em seguida o material coletado foi pesado mensalmente em balança analítica para registro da sua produção (Figura 1). Além disso, os parâmetros de temperatura média mensal, umidade relativa média mensal, índice pluviométrico e velocidade do vento foram mensurados.

Posteriormente, a própolis coletada foi encaminhada ao Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica da Universidade Federal Rural de Pernambuco para análise química.



Figura 1. Coleta da própolis

#### **4.3 Coleta do material botânico**

Para o levantamento da flora apícola da região, esta foi feita mensalmente através da coleta de espécies botânicas que estavam em floração e que apresentavam abelhas africanizadas em atividade de forrageamento (Figura 2).

As plantas coletadas foram montadas em exsiccatas e, em seguida, enviadas para a equipe do Centro de Referências para Recuperação de Áreas Degradadas da caatinga (CRAD/UNIVASF) para posterior identificação.



Figura 2. Plantas coletadas no município Casa Nova- BA, 1 *Antigonon leptopus*; 2 *Senna occidentalis*; 3 *Leucaena Leucecephala*; 4 *Piptadenia moniliformis*

#### 4.4 Análise Fitoquímica do Extrato de própolis

O extrato de própolis foi submetido a uma análise fitoquímica preliminar, visando à caracterização dos principais metabólitos secundários contidos no mesmo. Cerca de 79,4 g de própolis foram misturadas com etanol em um Becker para extração em banho de ultrassom. A solução extrativa foi evaporada obtendo-se o extrato EtOH que foi submetida a partição conforme Figura 3:

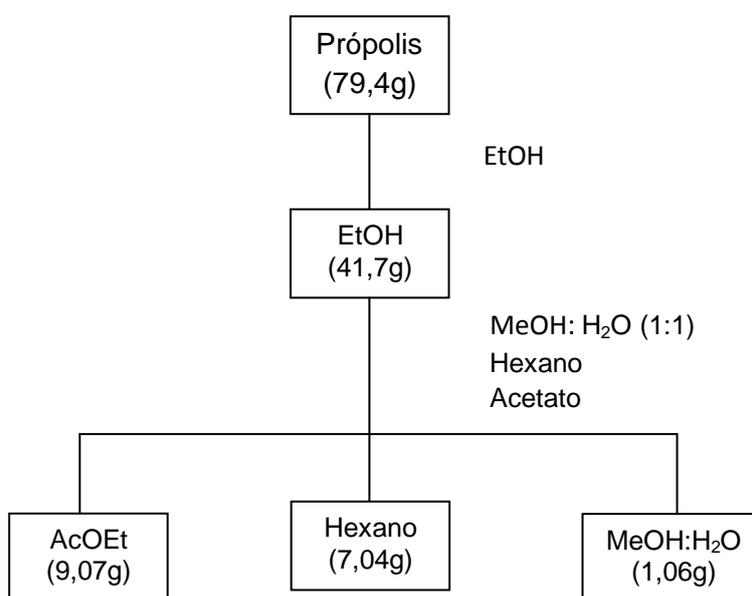


Figura 3. Extração da própolis e obtenção dos extratos

A fração AcOEt foi analisada por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) utilizando cromato folhas de sílica gel 60F<sub>254</sub> (Merck) e como revelador foi utilizado o reagente NP (ácido difenilbórico etanolamina-metanol), além da irradiação ultravioleta (254-366 nm). Também foram analisadas em

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD), cujo sistema consistiu de duas bombas de solvente modelo LC-6AD, equipado com um detector de arranjo de diodos SPD-M20A (Shimadzu, Corp., Kyoto, Japan) e injetor automático. 10mg da amostra foi solubilizada em 1 mL de MeOH grau HPLC e filtrado para injeção em HPLC. O perfil cromatográfico foi analisado no sistema de eluição: solvente A (Água Milli-Q (1% ácido fórmico) e solvente B MeOH como fase móvel (Tabela 1). O fluxo foi de 1mL/min, a temperatura do forno foi de 35 °C e os comprimentos de onda monitorados foram em 290nm-320nm.

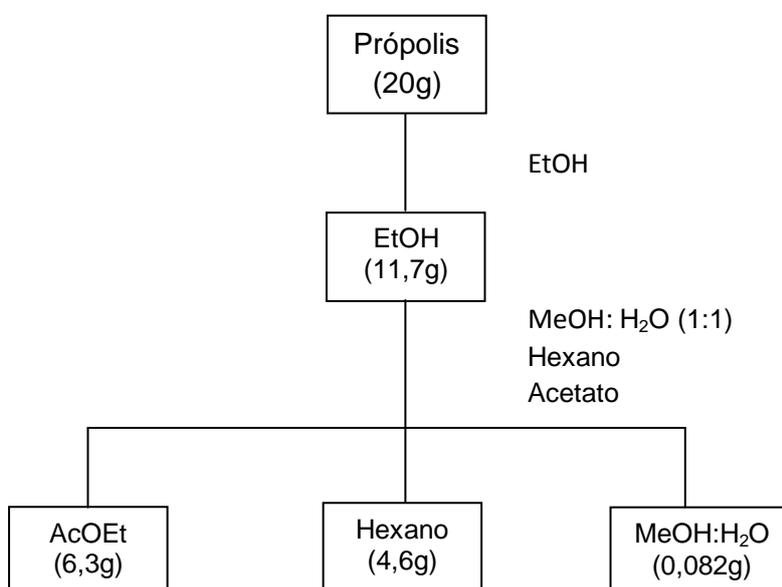
Tabela 1- Sistema de eluição para análise cromatográfica (HPLC-DAD) da fração AcOEt da própolis coletada na região de Casa Nova-BA.

Tempo (min)	Concentração B (%)
0.01	40
5.0	45
17.0	50
25.0	55
27.0	40
50.1	STOP

Concentração B (%)- solvente B MeOH  
 Stop- parada da concentração

A identificação dos constituintes da amostra foi feita por comparação com padrões de flavonóides isolados anteriormente de produtos apícolas/meliponícolas.

Na segunda amostra de própolis também coletada no município de Casa Nova, BA, cerca de 20,0 g foram submetidas ao mesmo procedimento anterior, apresentado na Figura 4.



#### Figura 4. Extração da própolis e obtenção dos extratos

A análise cromatográfica foi realizada da mesma maneira descrita anteriormente.

#### **4.5 Isolados de *Staphylococcus aureus***

Para determinação da atividade antibacteriana *in vitro* da própolis o experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do Campus Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Petrolina-PE.

Foram utilizados 34 isolados clínicos da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal. Inicialmente identificados como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, baseando-se nas características bioquímicas (Gram, catalase, coagulase, dnase e fermentação de açúcares (Holt 1994). Estes isolados foram oriundos de caprinos com mastite subclínica provenientes do município de Valente-BA, e um isolado de ATCC 25923 (PEIXOTO et al. 2014).

Foram testados as atividades antibacterianas de um extrato bruto (EtOH) e as frações (hexânica e AcOEt), produzidos com cerca de 0,25 g de própolis oriunda da amostra composta das coletas realizadas em Casa Nova, BA contra *Staphylococcus aureus*. Para aplicação dos extratos no teste de atividade antibacteriana, cada extrato foi diluído em 10 mL dos seguintes solventes: álcool etílico, acetato de etila e hexano, obtendo-se ao final uma solução estoque na concentração de 25 mg/mL para cada solução.

#### **4.6 Análise da sensibilidade dos isolados ao extrato de própolis**

A determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada baseada no documento M07-A9 (CLSI, 2012). Consistiu-se na distribuição de 200 µL caldo Muller Hinton (MH) em microplacas; em 200 L da solução estoque do extrato foi acrescido ao primeiro poço e, após a homogeneização, transferido para o segundo e assim sucessivamente. Pesou-se 0,25 g do extrato diluído em (etanólico, acetato de etila e hexânico) sendo suspensos em 10 mL dos mesmos reagentes,

obtendo-se uma solução estoque na concentração de 25.000 µg/mL. Uma vez realizadas as diluições, obteve-se as seguintes concentrações finais: 12.500; 6.250; 3.125; 1.562,5; 781,3; 390,6; 195,3 e 97,6 µg/mL.

Na preparação do inóculo, colônias foram replicadas em Ágar MH. Após 24 horas, realizou a turvação de do inóculo a 0,5 da escala McFarland. Desta suspensão, foram inoculados 10 µL nos poços das microplacas contendo diluição dos extratos. Assim foram inoculados 10 µL de caldo MH contendo os isolados de *S. aureus* em cada poço. Além dos poços contendo o extrato, as bactérias foram distribuídas nos poços que continham apenas o caldo MH mais o solvente (álcool etílico, acetato de etila e hexano). Como controle positivo foi inoculado apenas o caldo MH com ATCC 25923 e como controle negativo, uma cepa de *S. epidermidis*. para cada tratamento testado. Em seguida, o material foi incubado a 37 °C por 24h, em condições de aerobiose. Após este período, retiraram-se amostras do conteúdo de cada poço das microplacas e que foram inoculadas em placas de Petri com, MH e incubando-as por 24 horas a 37 °C. A concentração bactericida mínima (CBM) foi definida como sendo a menor concentração do extrato em estudo capaz de causar a morte do inóculo.

#### **4.7 Quantificação do biofilme**

A quantificação da formação de biofilme dos isolados foi realizada segundo metodologia proposta e adaptada de Merino et al. (2009) por meio do teste de aderência em microplacas. Primariamente as colônias isoladas foram inoculadas em 3 mL do TBS com glicose (0,25%) e incubadas a 37°C por 24 h. De cada amostra retirou-se 200 µL onde foram inoculados em placas de microdiluição e novamente incubados a 37°C por 24 h. Após as 24 h, foram efetuadas três lavagens com 200 µL de água destilada. Em seguida os poços foram corados com 100 µL de cristal de violeta genciana 0,25% por 3 minutos e novamente foram lavados com água destilada. Para dissolver o corante, foram utilizados 200 µL do álcool-acetona (80:20) para diluição dos cristais. A absorbância foi medida em leitor de microplacas de Elisa Easys e mensurada em filtro de 620 nm. Como controle positivo foi utilizada cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, caracterizada genotipicamente para produção de biofilme, e como controle negativo, uma cepa de *S. epidermidis*.

De acordo com os valores de densidade ótica (DO) obtidos na leitura, os isolados foram classificados como dispostos na Tabela 2:

Tabela 2. Classificação dos isolados de *Staphylococcus* spp. quanto a sua produção de biofilme.

Classificação	Critério
Negativo	$DO_A < DO_{CN}$
Fraco	$DO_{CN} < DO_A < 2 \times DO_{CN}$
Moderado	$DO_{CN} < DO_A < 4 \times DO_{CN}$
Forte	$DO_A > 4 \times DO_{CN}$

DO<sub>A</sub>: Densidade ótica da amostra teste; DO<sub>CN</sub>: Densidade ótica do controle negativo.

#### **4.8 Interferência do extrato de própolis com o biofilme em formação nos isolados de *Staphylococcus* spp.**

Os inóculos bacterianos foram cultivados em 10 mL de TBS com 1% de glicose, por 24h a 37°C. Dos quais, 100µl foram acrescidos nos poços da microplaca, que previamente haviam sido adicionados 100µl do extrato de própolis ou 100µl de meio de cultura nos controles. A concentração do extrato utilizada foi equivalente à metade do valor de CBM observado na microdiluição em placa (0,5 CBM). Após 24 h de incubação a 37°C, as placas foram submetidas à coloração por violeta de genciana. A eficácia do extrato em interferir com a formação do biofilme foi definida pela equação: DO média dos poços tratados/DO média dos poços controle x 100, utilizando metodologia Adaptada de Nostro et al. (2007).

#### **4.9 Interação do extrato de própolis com o biofilme consolidado nos isolados de *Staphylococcus* spp.**

Segundo proposto por Nostro et al. (2007) a formação de biofilme em microplacas foi alcançada a partir da incubação de 100µl da suspensão bacteriana em microplacas por 24 h a 37°C. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com água destilada, para a remoção das células não aderidas, e então acrescida de 200 µl do extrato de propólis (0,5; 0,25; 0,125 CBM). A DO foi determinada

imediatamente após a adição do extrato (0h) e 24h depois. A interferência do extrato no biofilme consolidado foi definida pela equação:  $DO_{0h} \text{ média} / DO_{24h} \text{ média} \times 100$ .

## **5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises foram realizadas no programa SISVAR, a análise de variância e Teste F foram feitos com 1% de significância. Considerou-se cada isolado bacteriano uma unidade, sendo os ensaios realizados em triplicata. A média da CBM obtida de cada isolado bacteriano foi considerada como sendo a variável resposta. As densidades ópticas dos isolados, na presença dos extratos de própolis, bem como as médias relacionadas à capacidade do extrato interferir com o biofilme consolidado foram comparadas por meio do teste de médias.

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Produção e Caracterização das amostras de própolis**

Na Figura 5 são apresentados os valores médios da produção de própolis em função da temperatura em Casa Nova, BA, com valores que variaram de 49,817 g a 79,851 g para produção de própolis, 24,2°C a 27,5°C para temperatura ambiente e para umidade 56% e 65%. Observou-se que, as menores temperaturas foram registradas nos meses de julho e agosto e temperaturas mais elevadas foram verificados nos meses de setembro e abril de 2013. Com relação a produção de própolis, observou-se que os meses de maio, julho e junho houve uma melhor produção.

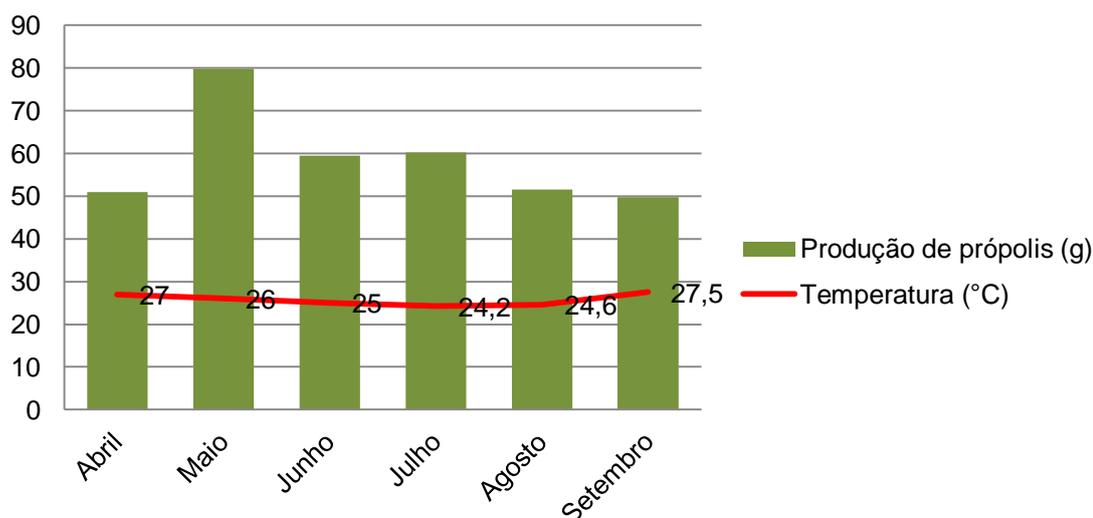


Figura 5. Produção de própolis em função da temperatura no município de Casa Nova- BA no período de janeiro a setembro de 2013.

Ressalta-se que os dados obtidos são inéditos, pois não existem registros de produção para o município de Casa Nova, BA.

LIMA (2012) avaliando a produção de própolis produzida nos sertões cearenses, em Limoeiro do Norte, em cinco apiários, a produção média variou de 185,28 a 82,56 g.

Já Clarton (2004), também avaliando a produção de própolis produzida em colônias de *Apis mellifera* em Cruz das Almas, BA verificou que no período onde houve uma menor precipitação pluviométrica, promoveu um incremento na coleta de resinas, favorecendo a propolização, principalmente quando se considera que neste período foram observadas temperaturas mais altas entre 22°C e 26°C e baixa umidade relativa do ar.

Santos (1996), avaliando o forrageamento de própolis em três épocas do ano, verão com mel, verão sem produção de mel e inverno com produção de mel, observou que as coletas máximas ocorreram em temperaturas superiores a 21°C. Em temperaturas abaixo de 21°C, as coletas foram nulas ou praticamente nulas. O autor concluiu que alterações ambientais relacionadas a flutuações de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica, tem a capacidade de interferir no comportamento das abelhas, tanto no interior das colméias como nas suas atividades externas.

Foram coletadas, 25 espécies de plantas de 13 famílias diferentes, (Tabela 3). Segundo Santos (2011), espécies como estas também foram encontradas no entorno do apiário do Campus de Ciências Agrárias da UNIVASF, Petrolina-PE, onde foram coletadas 23 espécies de plantas, pertencentes a 15 famílias.

Tabela 3. Espécies de plantas apícolas coletadas no município de Casa Nova, BA.

Família/Espécie	Nome popular
<b>Boraginaceae</b>	
<i>Euploca procumbens</i>	Borragem rasteira
<b>Capparaceae</b>	
<i>Cynophalla flexuosa</i>	Feijão-bravo
<b>Convolvulaceae</b>	
<i>Ipomeia cf</i>	Cliptória
<b>Euphorbiaceae</b>	
<i>Cnidoscolus quercifolius</i>	Favela
<i>Croton SP</i>	--
<i>Manihot pseudoglaziovii</i>	Maniçoba
<b>Fabaceae</b>	
<i>Poincianella pyramidalis</i>	Catingueira
<i>Mimosa verrucosa</i>	Jureminha
<i>Cenostigma cf</i>	--
<i>macrophyllum</i>	Jurema preta
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Leucena
<i>Leucaena Leucacephala</i>	Angico-de-Bezerro
<i>Piptadenia moniliformis</i>	
<b>Lamiaceae</b>	
<i>Hypenia Salzmannii</i>	Canela-de- urubu
<b>Leguminosae</b>	
<i>Senna occidentalis</i>	Fedegoso
<i>Prosopis Juliflora</i>	Algaroba
<b>Malvaceae</b>	
<i>Waltheria rotundifolia</i>	Malva
<i>Sida SP</i>	Malva
<i>Pavonia varians</i>	Pau-de-rato
<i>Waltheria SP</i>	Malva
<i>Sida galheirensis</i>	Canela-de-siriema

---

**Nyctaginaceae**

*Boerhavia diffusa*

Pega-pinto

**Polygonaceae**

*Antigonon leptopus*

Amor agarradinho

**Portulacaceae**

*Portulaca oleracea*

Beldroega

**Rubiaceae**

*Borreria verticillata*

Vassourinha-de-botão

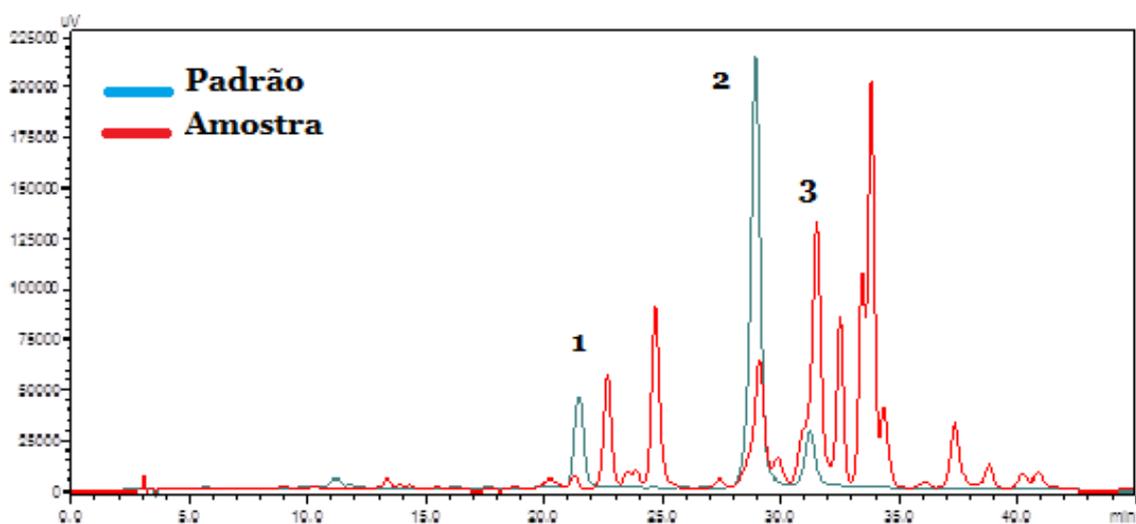
**Sapindaceae**

*Serjania glabrato*

Folha de carne

---

Com relação à análise do cromatograma obtido por CLAE-DAD e comparação com os tempos de retenção dos flavonóides padrões e espectros de ultravioleta (Figuras 6), foi possível identificar as substâncias como sendo naringenina, kanferol e isoramnetina (Figura 6), sendo os dois últimos os principais flavonóides da própolis.



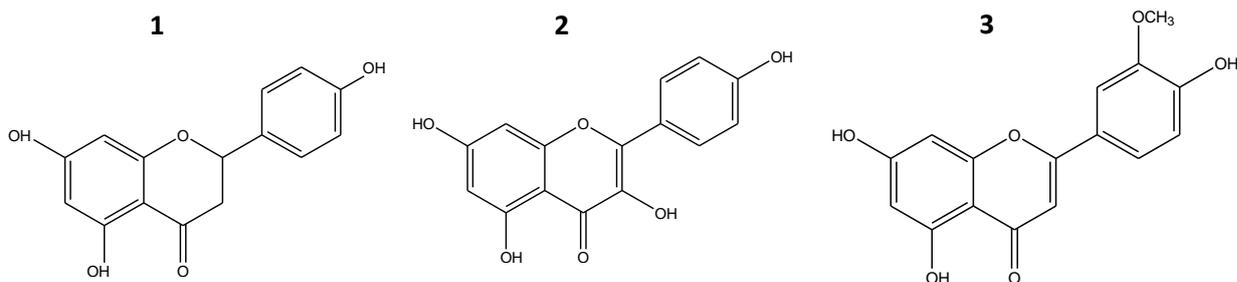


Figura 6. Flavonóides identificados na fração AcOEt da própolis coletada no município de Casa Nova, BA (1) Naringenina, (2) Kanferol e (3) Isoramnetina.

## 6.2 Sensibilidade dos isolados ao extrato de própolis

Na Tabela 4 estão demonstradas as médias da CBM dos extratos sobre a porcentagem dos isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de mastite em caprinos. Foi observado que o extrato diluído em hexano (89,70%), apresentou o menor percentual de atividade antimicrobiana em relação ao extrato em acetato de etila (43,38%) e ao extrato etanólico (27,32%), mostrando que houve uma diferença significativa entre os extratos avaliados. O extrato etílico de própolis mostrou melhor eficácia sobre as bactérias *Staphylococcus* spp., o que pode ser comparado com os resultados referentes as porcentagens de bactérias resistentes e sensíveis.

Tabela 4. Valores médios proporcionais para o extrato etanólico; extrato em acetato de etila e extrato hexânico na avaliação de bactérias de *Staphylococcus* spp., sobre a porcentagem de isolados resistentes e sensíveis (%)

Extratos (solventes)	% Sensíveis
Extrato etanólico	72,67 a*
Extrato em acetato de etila	56,49 b
Extrato hexânico	10,29 c

\* Valores médios seguidos pelas letras minúsculas nas linhas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

Segundo Pinto et al. (2001), Endler et al. (2003) e Auricchio et al. (2006), a própolis já havia apresentado uma ação antimicrobiana contra os *Staphylococcus aureus*. Esta ação se deve à presença de flavonóides, que são solubilizados em meio alcoólico, além de outros princípios ativos que sinergicamente contribuem para este tipo de atividade. O extrato etanólico de própolis tem capacidade de prevenir a

divisão celular, desorganizar o citoplasma, produzir defeitos na estrutura da parede celular, além de causar alteração na membrana citoplasmática e inibir a síntese protéica das bactérias (TAKAISI-KIKUNI & SCHILCHER, 1994).

Em trabalhos proposto por Aligiannis et al. (2001) a fração AcOEt de alguns extratos analisados puderam ser considerados com forte inibição frente aos *Staphylococcus* spp.

Os valores de CBM, referentes à atividade antimicrobiana do extrato de própolis, bem como das frações de álcool etílico, acetato de etila e hexano encontram-se na Tabela 5. Verificou-se que não houve interação entre os solventes testados, apenas entre as concentrações analisadas.

De acordo com a Tabela 5, as menores concentrações (97,6, 195,3 e 390,6 µg/mL) não foram eficazes sobre bactérias do *Staphylococcus* spp. Paralelo a isso as melhores concentrações que causaram a maior porcentagem de sensibilidade foram as de 6250, 3125 e 1562,5 µg/mL.

Tabela 5. Valores de CBM, referentes à atividade antimicrobiana, bem como das frações de EtOH, AcOEt e Hexano sobre a porcentagem de isolados resistentes e sensíveis (%)

Concentrações µg/mL	% Resistentes	% Sensíveis
97,6	85,62 a	14,37 a
195,3	71,89 ab	27,77 ab
390,6	62,74 ab	37,25 abc
781,3	46,73 b	53,26 bc
1562,5	36,92 c	63,07 c
3125	35,62 c	64,37 c
6250	34,31 c	65,68 c
12500	53,92 b	46,07 bc

\* Valores médios seguidos pelas letras minúsculas nas colunas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

Valores de inibição e valores de CBM são reportados por diversos trabalhos. No entanto a padronização de uma faixa de atividade desejada ainda não é um consenso. De acordo com Aligiannis et al. (2001), valores de CBM abaixo de 500 µg/mL são considerados de forte inibição, enquanto Rios e Ecio (2005) sugerem resultados abaixo de 1.000 µg/mL.

Tem sido apresentado que a própolis tem acentuada ação inibitória *in vitro* sobre bactérias gram-positivas. A diferença de sensibilidade entre bactérias gram-

positivas e gram-negativas frente à própolis é explicada devido às características da composição da parede celular entre os dois grupos de bactérias avaliados (NAJMADEEN & KAKAMAND, 2009).

Destacam-se também segundo Doern e Brecher (2011) que os resultados de testes *in vitro* relacionados à atividade antimicrobiana não traduzem como esperado para o observado *in vivo*, portanto testes envolvendo o uso de cobaias tornam-se indispensáveis para a melhor avaliação do potencial antimicrobiano de produtos naturais.

### 6.3 Quantificação da produção de biofilme

Por meio do teste de aderência à microplacas, observou-se que dos 34 isolados, 20,78% não foram capazes de formar biofilme (negativo) (Figura 7). Dos 34 isolados de *Staphylococcus aureus*, 14,70% foram classificados como moderados, 64,70% em fracos e nenhum dos isolados foram classificados como forte produtores de biofilme.

A  $DO_m$  observada para o controle negativo, *S. epidermidis* foi de 0,07, de modo que amostras com valores de  $DO_m$  iguais ou inferiores a 0,07 são classificadas como não produtoras (negativas), valores entre 0,07 e 0,14 são classificadas como fraco produtores, entre 0,14 e 0,28 como moderados e valores acima de 0,28 são classificadas como fortes produtores.

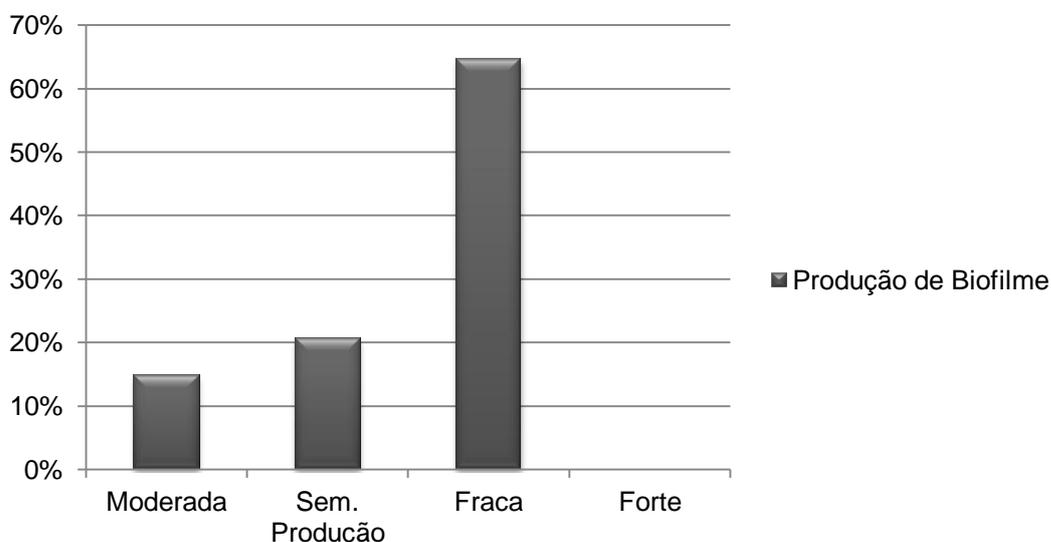


Figura 7. Produção de biofilme por isolados de *Staphylococcus* spp.

#### 6.4 Capacidade dos extratos em interferir com a formação do biofilme

Após a produção de biofilme ter sido caracterizada para os diversos isolados, apenas aqueles classificados como moderados foram submetidos ao ensaio, já que não houve fortes produtores de biofilme, totalizando desta forma 5 amostras, sendo que essas cinco amostras selecionadas foram testadas para os três tipos de extrato avaliados no presente estudo (Tabela 6).

O extrato em acetato de etila não mostrou nenhuma eficiência em diminuir a formação de biofilme sobre os isolados avaliados, pois os isolados passaram de moderado para forte produção de biofilme. Entretanto o extrato etanólico foi capaz de diminuir a formação de biofilme em 3 isolados e o extrato hexânico também foi eficaz em 2 isolados com a diminuição de biofilme, pois os isolados passaram de moderado para fraca produção de biofilme.

A  $DO_m$  observada para o controle negativo, foi de 0,066, de modo que amostras com valores de  $DO_m$  iguais ou inferiores a 0,066 são classificados como não produtoras (negativas), valores entre 0,066 e 0,132 são classificados como fraco produtores, entre 0,132 e 0,264 como moderados e valores acima de 0,264 são classificados como fortes produtores.

Tabela 6. Classificação dos isolados de *Staphylococcus* spp. quanto a sua produção de biofilme em contato com os extratos etílico, em acetato de etila e hexânico.

Identificação S. aureus	Produção de Biofilme em contato com o extrato de própolis		
	Extrato Etilico	Extrato em acetato de etila	Extrato hexânico
97 MD	Fraca	Forte	Forte
98 ME	Fraca	Forte	Fraca
101 ME	Forte	Forte	Fraca
102 MD	Fraca	Forte	Forte
104 MD	Forte	Forte	Forte
Médias	489.586000ab	613.832000 <sup>a*</sup>	263.202000b

\* Valores médios seguidos pelas letras minúsculas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

Estes resultados indicam que tanto o extrato etílico e o extrato hexânico são capazes de interferir com as primeiras etapas da formação do biofilme, conferindo

desta forma uma possibilidade de agir como agente profilático no início de infecções. A inibição do biofilme em formação depende de fenômenos ligados a inibição enzimática de protease e interferência com o *quorum sensing* bacteriano (GONÇALEZ-ORTIZ et al. 2014). Acredita-se que a própolis possa estar atuando neste processo.

Assim, os biofilmes são considerados estruturas intimamente ligadas com a sobrevivência microbiana tanto no meio ambiente, quanto no hospedeiro. Uma vez contidas no biofilme, as células bacterianas são capazes de resistir às defesas do hospedeiro e até mesmo a ação de 38 de antimicrobianos, uma vez que sua concentração necessária para causar a morte bacteriana pode ser até 1000x maior (WALTERS et al. 2003; FUX et al. 2004; HALL-STOODLEY e STOODLEY, 2009). Portanto, na busca por fontes alternativas ao tratamento antimicrobiano, muita atenção tem sido direcionada a substâncias capazes de interferir com o biofilme bacteriano (ABRAHAM et al. 2011; BUDZYŃSKA et al. 2011).

### **6.5 Capacidade de o extrato interferir com o biofilme consolidado**

A resistência bacteriana é associada tanto a baixa penetração dos compostos antimicrobianos no biofilme, como pelo estado fenotipicamente protegido induzido nas bactérias que compõe o biofilme, onde o metabolismo microbiano é extremamente reduzido (COSTERON et al., 1995; ALTIERI et al., 2013).

Para avaliar a interferência dos extratos testados os mesmos foram submetidos ao teste do biofilme consolidado. Observa-se que houve interação dos extratos (solventes) dentro dos horários analisados, bem como interação dos horários dentro dos extratos (solventes) avaliados no estudo (Tabela 7).

Desta forma, verificou-se que o extrato etílico foi mais relevante em intervir sobre o biofilme estafilocócico em relação aos outros extratos em 0 hora. Em 24 horas o melhor extrato observado foi o extrato em acetato de etila. E o extrato hexânico interferiu mais nas 24h após a análise dos dados.

Tabela 7. Atividade dos extratos sobre o biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp.

	Extrato (solvente)		
	Extrato etílico	Extrato em acetato de etila	Extrato hexânico
0 hora	0, 624 aA	0, 34 bB	0, 517 abA
24 horas	0, 423 bB	1054 aA	0, 57 BA

As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas e letras maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey a 1% de probabilidade

Worthington et al. (2012) apontaram como principais formas do controle do biofilme bacteriano o emprego de pequenas moléculas, a fagoterapia e mecanismos enzimáticos. Devido ao processo de obtenção de extratos vegetais, comumente empregados, visando apenas os metabólitos secundários, é improvável que os extratos vegetais consistam em uma importante fonte de terapia antibiofilme.

A literatura revela que as principais pesquisas que objetivam o emprego de produtos naturais como potenciais fontes de substâncias antibiofilme, concentram-se em interferir com as etapas iniciais da formação do biofilme (CHUSRI et al. 2012; SALTA et al. 2013).

## 7. CONCLUSÕES

A produção de própolis por *Apis mellifera* no município de Casa Nova- BA foi mais intensa nos meses de maio, julho e junho.

As plantas coletadas na região mostraram que há uma grande diversidade e que estas são espécies mais indicadas para serem inseridas em áreas onde ainda não sejam cultivadas, visando desta forma maior produção.

A análise fitoquímica do extrato de própolis revelou a presença de substâncias como naringenina, kanferol e isoramnetina, sendo os dois últimos os principais flavonóides da própolis.

O extrato etílico de própolis mostrou melhor eficácia sobre as bactérias *Staphylococcus* spp.

As menores concentrações não foram eficazes sobre as bactérias do *Staphylococcus* spp.

Dos isolados analisados, nem todos foram capazes de formar biofilme, alguns foram classificados como moderado e nenhum como forte formador de biofilme.

Tanto o extrato etílico como o extrato hexânico são capazes de interferir nas primeiras etapas da formação do biofilme nos isolados testados, podendo os mesmos ser utilizados contra bactérias.

O extrato etílico foi mais relevante em interferir sobre o biofilme em 0 hora e em 24 horas tanto o extrato em acetato de etila como o extrato hexânico interferiram sobre o biofilme.

## 8. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, S. V. P. I. et al. Antiquorum Sensing and Antibiofilm Potential of *Capparis spinosa*. **Archives of Medical Research**, v. 42, p. 658-668, 2011.

AGUERO, M. B. et al. Argentinean própolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinaeae) exudates: phytochemical characterization and antifungal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 194-201, 2010.

ALENCAR, S.M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 278-283, 2007.

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

ALMEIDA, J.F. **Agentes infecciosos causadores de mastite e parâmetros físico-químicos na qualidade do leite de cabra in natura**. 2009. 106 f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

ALY, S.A.; ELEWA, N.A. The effect of Egyptian honeybee propolis on the growth of *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin biosynthesis in ras cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 9, p. 1-5, 2007.

ALTIERI, K. T. et al. Eradication of a Mature Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Biofilm From Acrylic Surfaces. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, p. 487-491, 2013.

AMORIM R.N.L., et al. Mastite clínica em bovino causada por *Prototheca zopfii* no estado do Ceará. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, p. 307-311, 2010.

AMOROS, M. et al. Synergistic effect of flavones and flavonoids against Herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 1732-40, 1992.

ANDERSON D. E.; Hull B. H.; Pugh D. G. **Enfermidades da glândula mamária, In: Pugh D.G. (Eds), Clínica de Ovinos e Caprinos**. 1º ed. Roca, São Paulo, p.379-399, 2004.

ANDRADE, U.V.C. **Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de cultivos de *Staphylococcus aureus* e higienização de pré e pós - imersão de tetos de vacas leiteiras**. 2010. 85 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ANTUNES, L. C. M. et al. Quorum sensing in bacterial virulence. **Microbiology**, v. 156, p. 2271-2282, 2010.

ARCIOLA, C. R; BALDASSARRI, L; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2151–2156, 2001.

ARCIOLA, C. R. et al. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 76, p. 425–430, 2006.

AURICCHIO M.T. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de preparações de própolis comercializadas na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.65, p. 209-212, 2006.

AWALE, S. et al. Neoflavonoids and related constituents from nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. **Journal of Natural Products**, v.68, n.6, p.858-864, 2005.

BANSKOTA, A. H. et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, p. 239-246, 2000.

BARBOSA, M.H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, p. 318–22. 2009.

BARTH, O.M. Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidad de Ribeirão Preto, USP, Brazil. **Apiacta**, v. 41, p. 71–85. 2006.

BOLSANELLO R. X. et al. Etiologia da mastite em ovelhas Bergamácia submetidas à ordenha mecânica, criadas em propriedade de Botucatu. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, p. 221-227, 2009.

BRASIL. Instrução normativa N°. 3, de 19 de janeiro de 2001. Anexo 06: **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis**. Ministério de Agricultura e do Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de jan. 2001, Seção 1, p. 18-23. 2001.

BUDZYŃSKA, A. et al. Antibiofilm Activity of Selected Plant Essential Oils and their Major Components. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 35-41, 2011.

BURIOL, L. et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, p. 296-302, 2009.

CABRAL, I.S.R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 1-5, 2009.

CIRASINO, L.; P ISATI, A.; FASANI, F. Contact dermatitis from propolis. **Contact Dermatitis**, v. 16, n. 2, p.110-111, 1987.

CHUSRI, S; NA PHATTHALUNG, P; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Anti-biofilm activity of *Quercus infectoria* G. Olivier against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lett Appl Microbiology**, v. 54, p. 511–517, 2012.

CLARTON, L. **Avaliação da produção de própolis produzida em**

**Colônias de *Apis mellifera* em Cruz das Almas – BA.** 2004. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias – área de concentração em Produção Animal) – Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas - BA.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9. **Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2012.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

COSTERTON, J.W.; GEESEY, G.G.; CHENG, K.J. How bacteria stick. *Scientific American*, v. 238, p. 86-95, 1978.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S.S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 241-256, 2009.

COUTINHO D. A. et al. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, p.139-151, 2006.

CRAMTON, S. E. et al. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 5427–5433, 1999.

DOERN, G. V; BRECHER, S. M. The Clinical Predictive Value (or Lack Thereof) of the Results of *In Vitro* Antimicrobial Susceptibility Tests. **Journal of Clinical Microbiol**, v. 49, p. 11, 2011.

DOMINGUES P. F. et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês. **ARS Veterinária**, v. 22, p.146-152, 2006.

DOSOUTO R. R. **Pasto apícola. Apicultura imediata e reflorestamento apícola.** Mairiporã – SP, 2010. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/75/pasto.htm> Acesso em: 02/12/2014.

DRESCHER G. et al. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de agentes bacterianos isolados de mastite subclínica ovina na região oeste de Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, p. 188-193. 2010.

DUNNE JR., W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155-166, 2002.

ENDLER, A. L. et al. Teste de eficácia da própolis no combate a bactérias patogênicas das vias respiratórias. **Ciências Biológica e da Saúde**, v. 9, n. 2, p. 17-20, 2003.

FONTANA, V.L.D.S. et.al. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene da  $\beta$ - lactamase em *Staphylococcus aureus*. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, v.17, p. 552-559, 2010.

FREITAS, A.S.; VIT, P.; BARTH, O.M. Pollen profile of geopropolis samples collected by native bees (Meliponini) in South American countries. **Sociobiology**, v. 59, p. 1–16, 2012.

FREITAS, M.F.L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 72, p. 171-177, 2005.

FUX, C.A., WILSON, S; STOODLEY, P. Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an in vitro catheter infection model. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 4486–4491, 2004.

GONZÁLEZ-ORTIZ G, et al. New properties of wheatt bran: anti-biofim activity and interference with bacteria quorum-seneing systems. **Environmental microbiology**, v. 16, p. 1346-53, 2014.

GOTZ, F. *Staphylococcus* biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 1367-1378, 2002.

HALL-STOODLEY, L; STOODLEY, P. **Evolving cocepts in Biofilm Formation. Cellular Microbiology**, v. 11(7), p. 1034–1043, 2009.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, n. 2/3, p. 67-202, 2002.

HERNANDEZ, I.M. et al. Studies on the constituents of yellow Cuban própolis: CG-MS determination of triterpenoids and flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4725- 4730, 2010.

HIGASHI, K. O.; CASTRO, S. L. D. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have no impact on its interaction with host cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, p. 149-155, 1994.

HOLT J.G. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. **Animal Health Research Reviews**, v. 11, p. 97–121, 1994.

HULIN, V. et al. Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. **Sciences des Aliments**, v. 18, p. 563-582, 1998.

LANGONI H.; DOMINGUES P. F.; BALDINI S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**, v. 13, p. 51-54, 2006.

LANGONI, H. et al. Efeito antimicrobiano *in vitro* da própolis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, n. 2, p. 227, 1996.

LENGLER, S. 2012. **Própolis**. Brasilapicola. Disponível em <http://www.brasilapicola.com.br/node/105>; acesso 02/12/2014.

LIMA, M. C.; ROCHA, S. de A. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento**. Ibama, p. 80, 2. Ed. 2012.

LIMA JÚNIOR A. D.; NADER FILHO A.; VIANNI M. C. E. Fatores condicionantes da mastite subclínica caprina em criatórios do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, p. 463-474, 1995.

LINS, A. S. et al. Implantação das análises físicoquímicas da própolis no laboratório da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola. **Revista Eletrônica Multidisciplinar Pindorama**, Salvador, n. 1, v. 1, p. 1-20, 2010.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, p. 1-11, 2010.

LOTTI, C. et al. Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2209-2213, 2010.

MACHADO, B. A. S. et al., Estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes depositados do Brasil. **Revista Geintec-São Cristovão**, v. 2, n.3. p. 221-235. 2012.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727- 747, 2004.

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

MARCUCCI, M. C. Própolis: Chemical composition biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.

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

MARTINS, R.P. et al. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 181-187, 2010.

MELLO, B.C.B.S.; PETRUS, J.C.C.; HUBINGER, M.D. Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 166-172, 2010.

MERINO N. et al. Protein A-Mediated Multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v.191, n. 23, p. 832-843, 2009.

MONTI, M. et al. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. **Contact Dermatitis**, v. 9, n. 2, p.163, 1983.

MORONI, P. et al. Short Communication: Antimicrobial Drug Susceptibility of *Staphylococcus aureus* from Subclinical Bovine Mastitis in Italy. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2973–2976, 2006.

NAGAI, T.; et al. Characterization of honey from different floral species. Its

functional properties and effects of honey species on storage of meat. **Food Chemistry**, v. 97, p. 256-262, 2006.

NAJMADEEN H.H.; KAKAMAND F.A.K. Antimicrobial activity of propolis collected in different regions of sulaimani province-Kurdistan region/Iraq. **University of Duhok**, v. 12, p. 233-239, 2009.

NEIDELL, M.J. et al. Costs of healthcare-and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. **Clinical Infectious Disease**, v. 55, p. 807-815, 2012.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal Medical Microbiol**, v. 56, p. 519–523, 2007.

NUNES, L. C. C. et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artermia salina*. **Revista brasileira farmacogn, João Pessoa**, v. 19, n. 2, p. 524-529, 2009.

OLDONI, T.L.C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, p. 208–213, 2011.

OLDONI, T. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em saúde e ambiente) - Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP, São Paulo.

OLIVEIRA, S. M. A. et al. Patologia pós-colheita. Patologia pós-colheita; frutas, olerícolas e ornamentais tropicais. **EMBRAPA**, Brasília, 1<sup>a</sup>. Ed. 2006.

PARADISI, F.; CORTI, G.; SBARAGLI, S.; et al. Effect of antibiotic pretreatment on resistance. **Seminars in respiratory infections**, v. 17, n. 3, p. 240-245, 2002.

PARK, Y. K. et al. Própolis produzida no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, p. 997-1003, 2002.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, p. 2230–2232, 1998.

PEIXOTO, R. M. et al. Caracterização molecular, produção de biofilme e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. ao extrato de *Hymenaea martiana* Hayne. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 42, 2013.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F.R.M.; AQUINO NETO, F.R. de. Própolis: 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PICKLER, M. A. **Defensividade, higiene, produção de própolis e mel com duas gerações de Apis Mellifera**. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade estadual do Oeste de Paraná, Marechal Cândido Rondon.

PINHEIRO R. R. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 534-543, 2000.

PINTO, M.S. et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, p. 278-283, 2001.

PORTILHO, D. R. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e Antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. **Revista Científica do ITPAC**, v. 6, n. 2, Pub.1, 2013.

RÍOS, J. L; RECIO, M. C. Medicinal Plants and Antimicrobial Activity. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 100, p. 80–84, 2005.

SALATINO, A. et al. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SALTA, M. et al. Anti-Biofilm Performance of Three Natural Products against Initial Bacterial Attachment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 21757-21780, 2013.

SAMPAIO, I. M. **FEMAP- Federação Mineira de Apicultura: rentabilidade, boas condições climáticas e qualidade do produto são alguns fatores que explicam a liderança do estado no segmento**, 2012. Disponível em: <<http://www.leccomunica.com.br/novosite/node/226>>. Acesso em 02/12/2014.

SAMPIMON, O. et al. Effect of coagulase-negative staphylococci on somatic cell count in Dutch dairy herds. **Journal of Dairy Research**, v.77, n. 3, p. 318-324, 2010.

SANTOS, C. S. dos. RIBEIRO, A. S. de. Apicultura uma alternativa na busca do desenvolvimento sustentável. **Revista Verde**, v. 4, n. 3, p. 01-06, 2009.

SANTOS, H. C. dos. **Levantamento apibotânico em Petrolina-PE**. 2011. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina.

SANTOS, M. S. dos. **Estudo do forrageamento de própolis em abelhas africanizadas, *Apis mellifera***. 1996. 59 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa.

SCAZZOCCHIO, F. et al. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiology Research**, v. 161, p. 327-33, 2006.

SHARMA, N. et al. Bovine Mastitis: An Asian Perspective. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 6, p. 454-476, 2012.

SILICI, S; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of própolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 243-249, 2005.

SILVA CUNHA, I. B. et al. Antitrypanosomal activity of Brazilian propolis from *Apis mellifera*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 602-4, 2004.

SILVA, B. B. **Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica**. 2008. 51 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica) - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba/SP.

SIMÕES-AMBROSIO, L.M.C. et al. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**, v. 81, p. 1102–1108, 2010.

SOUZA, H.R. **Espectro polínico da própolis da abelha sem ferrão Tubi – *Scaptotrigona aff. postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) em**

**Barra do Corda - MA - Brasil.** In: 19ª REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO DE BOTÂNICA, 2012, São Paulo.

SOUZA W. M. A. et al. **Plantas medicinais para caprinos e ovinos.** Coleção de cartilhas sobre caprinos e ovinos para o agricultor familiar, n.1, p. 48, 2010.

SOUZA, A.P.B. Efetividade da *Delphinium staphysagria* 6cH e 30cH em ensaios biológicos para cicatrização. **Brazilian Homeopathic Journal**, v. 11: 13–14. 2009.

TAKAISI-KIKUNI N.B.; SCHILCHER. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medica**, v. 60, p. 222-227, 1994.

TAVARES, W. Problem gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 281-301, 2000.

TEIXEIRA, E. W. et al. Indicadores da origem botânica da própolis, importância e perspectivas. **Boletim da Indústria Animal**, v. 60: p. 83-106, 2003.

TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.M.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. et al. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 85- 92, 2005.

VIDAL, M. G. et al. Pollination and fruit set in pumpkin (*Cucurbitapepo*) by honey bees. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 107-113, 2010.

VIDAL, M.G.; SANTANA, N.S., VIDAL, D. Flora apícola e manejo de apiários na região do recôncavo sul da Bahia. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias Ambiental**, v. 6, p. 503-509, 2008.

VIEIRA, V. B. **Obtenção do extrato de própolis assistida por microondas, aplicação em lingüiça toscana e avaliação da sua capacidade antioxidante.** 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS.

WALTERS, M. C. et al. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to

Ciprofloxacin and Tobramycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 317–323, 2003.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 7, p. 838-849, 2004.

WORTHINGTON, R. J; RICHARDS, J. J; MELANDER, C. Small molecule control of bacterial biofilms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, p. 7457-7474, 2012.

YARWOOD, J. M. et al. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Journal Bacteriology**, v. 186, p. 1838-1850, 2004.