

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**ATIVIDADE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS FRENTE A MICRO-ORGANISMOS  
PATÓGENOS E PROBIÓTICOS**

**LAYSE FERREIRA DE BRITO**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**ATIVIDADE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS FRENTE A MICRO-  
ORGANISMOS PATÓGENOS E PROBIÓTICOS**

**LAYSE FERREIRA DE BRITO**

*Sob a Orientação da Professora*  
**PhD Rosa Helena Luchese**

*e Co-orientação do Professor*  
**Dr. André Fioravante Guerra**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos** no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

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

B862a Brito, Layse Ferreira de, 1993-  
Atividade de extratos de própolis frente a micro  
organismos patógenos e probióticos / Layse Ferreira de  
Brito. - Seropédica, 2019.  
32 f.: il.

Orientadora: Rosa Helena Luchese.  
Coorientadora: André Fioravante Guerra.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2019.

1. Própolis. 2. Antimicrobiano. 3. Patógenos. 4.  
Probióticos. I. Luchese, Rosa Helena, 1957-, orient.  
II. Guerra, André Fioravante, 1983-, coorient. III  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos. IV. Título.

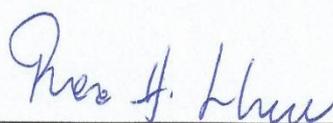
*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de  
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.*

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

LAYSE FERREIRA DE BRITO

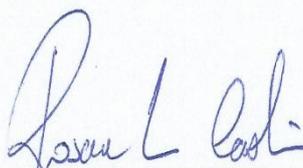
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14/02/2019.



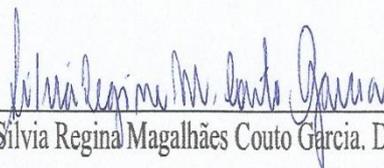
---

Rosa Helena Luchese. PhD. PPGCTA/UFRRJ  
(Orientadora)



---

Rosane Nora Castro Dr<sup>a</sup>. ICE/UFRRJ



---

Sílvia Regina Magalhães Couto Garcia, Dr<sup>a</sup>. Sc. UFRJ

## AGRADECIMENTOS

Àquele que sempre esteve ao meu lado, mesmo não podendo enxergá-lo mas sempre pude sentir sua onipresença, Deus.

Aos meus amores, a minha família, Francisco, Maria de Jesus e Flauber, que apesar de milhares de quilômetros de distância emanavam muito amor e felicidade a cada vitória alcançada, bem como expressado na graduação, essa conquista é nossa.

À minha orientadora PhD Rosa pela confiança depositada em mim para a realização desse trabalho e por me fazer gostar mais ainda desse mundo belíssimo da microbiologia.

À D. Regilene Antunes e D. Sandra Nunes por terem sido como verdadeiras mães aqui no estado do Rio de Janeiro, vocês tem de mim, o amor, gratidão e reconhecimento de filha.

Ao pessoal do laboratório de Microbiologia do DTA, em especial a Edina Rodrigues, Edlene Ribeiro e Roberto Laureano que não mediram esforços para me ajudar, pela disponibilidade e até pelas conversas descontraídas durante os experimentos.

Aos meus amigos e familiares da Paraíba, que são tantos que não irei citar para não ter o despautério de esquecer alguém, sempre enviando boas vibrações, orações e que sempre se fizeram presentes, estou voltando.

Aos amigos que fiz nesses anos de Rio de Janeiro, em especial a Alyne Alves, Isabella Antunes, Marianna Reis, Ryan Pinheiro pela força, pelos laços criados, pelas saídas maravilhosas. Se a caminhada aqui foi mais leve e prazerosa, foi graças a vocês, que permanecemos assim, amigos. Voltarei sempre que puder.

À toda minha turma de mestrado 2017.1 como também outros alunos do PPG por terem me acolhido tão bem, pelo apoio, pelas dicas, pelas choppadas, pelo ombro amigo, até pelos aperreios compartilhados.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Química Medicinal e Química do Mel, do Instituto de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo fornecimento dos extratos de própolis.

À UFRRJ, lugar lindo que em tão pouco tempo me fez sentir em casa, uma verdadeira ruralina, ao PPGCTA pela oportunidade de cursar o mestrado, em especial a Maria Ivone e a Lucimar que me receberam muito bem.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – pelo financiamento desse estudo. (Código de Financiamento 001).

## EPÍGRAFE

*“Quem como Deus?”*

(São Miguel Arcanjo)

## RESUMO

BRITO, Layse Ferreira de. **Atividade de extratos de própolis frente a micro-organismos patógenos e probióticos**. 2019. 41 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Existe um interesse enorme no uso de substâncias naturais, como a própolis no combate a infecções, principalmente por micro-organismos multirresistentes a antibióticos, tendo em vista a questão da resistência bacteriana. Mel e especialmente a própolis são ricos em compostos antioxidantes e antimicrobianos. Muito dos compostos antioxidantes presentes na própolis afeta a viabilidade de uma série de micro-organismos indesejáveis, mas o papel destas substâncias sobre a atividade de micro-organismos probióticos ainda não foi determinada. Bactérias probióticas tanto do gênero *Bifidobacterium* como *Lactobacillus* são beneficiadas em ambientes com baixo potencial redox e a presença de compostos antioxidantes em muitos casos estimula seletivamente seu crescimento ou atividade. Assim é necessário conhecer mais a fundo os efeitos de compostos fenólicos presentes nos extratos de própolis sobre estas bactérias. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito dos extratos de própolis em micro-organismos patógenos, como também em bactérias probióticas. Utilizando-se dos métodos de difusão em ágar e concentração inibitória mínima foi estudada a atividade e o potencial de ação dessa substância natural sobre dois grupos de micro-organismos. Foi observado que a maceração em água não extrai os compostos bioativos presentes nestas amostras, diferentemente dos extratos etanólicos que apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (*S. aureus*) e atividade antifúngica (*Candida albicans*) comparável à da anfotericina B. Os extratos EEP12 e EEP13 foram os mais promissores para o uso como agentes protetivos contra agentes patogênicos e deteriorantes. Os EEP12 e EEP13 continham respectivamente 16,4 e 9,3 mgE<sub>AG</sub>/100mg de ácidos fenólicos e 8,0 e 4,7 mgE<sub>QU</sub>/100mg de flavonoides. Além disso, diferentemente da levedura probiótica *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus* probióticos do grupo casei não foram significativamente inibidos pelos extratos, tornando a própolis um atrativo produto para ser usado como aditivo alimentar, inclusive em alimentos fermentados, além de uma atraente substância de uso clínico, devido sua ação em patógenos.

**Palavras chaves:** própolis; antimicrobiano; patógenos; probióticos.

## ABSTRACT

BRITO, Layse Ferreira de. **Activity of propolis extracts against pathogenic and probiotic microorganisms**. 2019. 41 p. Dissertation (Master in Science and Food Technology). Institute of Technology, Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

There is a huge interest in the use of natural substances, such as propolis in the fight against infections, especially by multi-resistant microorganisms due to the question of bacterial resistance. Honey and especially propolis are rich in antioxidant and antimicrobial compounds. Most of the antioxidant compounds present in propolis affect the viability of a number of undesirable microorganisms, but the role of these substances on the activity of probiotic microorganisms has not yet been determined. Probiotic bacteria of both the genus *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are benefited in environments with low redox potential and the presence of antioxidant compounds in many cases selectively stimulates their growth or activity. Therefore, it is necessary to know more about the effects of phenolic compounds present in propolis extracts on these bacteria. The aim of this research is to evaluate the effect of propolis extracts on pathogenic microorganisms, as well as on probiotic bacteria. The activity and potential of these natural substances on both groups of microorganisms was studied using the methods of diffusion in agar and minimum inhibitory concentration. It was observed that the maceration in water does not extract the bioactive compounds present in these samples, unlike the ethanolic extracts that showed anti-microbial activity against gram-positive bacteria (*S. aureus*) and antifungal activity (*Candida albicans*) comparable to amphotericin B. The extracts EEP12 and EEP13 were the most promising for use as protective agents against pathogens and spoilage agents. The EEP12 and EEP13 contained respectively 16.4 and 9.3 mg<sub>EAG</sub>/100mg of phenolic acids and 8.0 and 4.7 mg<sub>EQV</sub>/100mg of flavonoids. In addition, unlike the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*, probiotic *Lactobacillus* from the *L. casei* group were not significantly inhibited by the extracts, making propolis an attractive product to be used as a food additive, including fermented foods, as well as an attractive substance for clinical use due to its action on pathogens.

**Key words:** propolis ; antimicrobial; pathogenic; probiotics.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	- Atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária de própolis.....	16
<b>Tabela 2</b>	- Indicadores de qualidade físico-química dos EEP.....	23
<b>Tabela 3</b>	- Resultados das análises da CIM.....	31

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema da distribuição dos extratos e controle na placa de microtitulação para análise da CIM.....21
- Figura 2** - Diâmetro da zona de inibição de cepas de *S. aureus* obtidos por ação de extratos etanólicos de própolis (EEP) em comparação ao controle (Ampicilina).....25
- Figura 3** - Diâmetro da zona de inibição de cepa de *S. Typhimurium* obtidos por ação de extratos etanólicos de própolis (EEP) em comparação ao controle (Gentamicina).....26
- Figura 4** - Diâmetro da zona de inibição de *Candida albicans* obtidos por ação de extratos etanólicos de própolis (EEP) em comparação ao controle (Anfotericina B).....26
- Figura 5** - Diâmetro da zona de inibição de *S. boulardii* obtidos por ação de extratos etanólicos de própolis (EEP) em comparação ao controle (Anfotericina B).....27
- Figura 6** - Diâmetro da zona de inibição de cepas de *Lactobacillus* obtidos por ação de extratos etanólicos de própolis (EEP) em comparação ao controle (Vancomicina).....28
- Figura 7** - Diâmetro da zona de inibição de cepas de *Lactobacillus* obtidos por ação de extratos etanólicos de própolis (EEP) em comparação ao controle (Vancomicina).....29

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	OBJETIVOS .....	3
2.1	Objetivo Geral .....	3
2.2	Objetivos Específicos .....	3
3	REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1	Histórico, Definição e Função da Própolis na Colmeia.....	4
3.2	Própolis: Composição Química, Características Físicas-Químicas e Extração.....	4
3.3	Contexto da Própolis no Brasil .....	5
3.4	Aplicações e Propriedades Biológicas da Própolis.....	5
3.4.1	Atividade antimicrobiana em relação ao potencial antioxidante da própolis.....	6
3.5	Micro-organismos Probióticos .....	7
3.5.1	<i>Lactobacillus</i> .....	8
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	10
4.1	Materiais.....	10
4.1.1	Origem geográfica das amostras de própolis .....	10
4.1.3	Culturas microbianas.....	10
4.2	Métodos .....	10
4.2.1	Preparo dos extratos de própolis .....	10
4.2.2	Caracterização química dos extratos .....	11
4.2.1	Método difusão em ágar.....	11
4.2.2	Método da concentração inibitória mínima (CIM) .....	12
4.3	Análises Estatística.....	13
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	14
5.1	Indicadores de Qualidade Físico-química dos Extratos Etanólicos de Própolis ..	14
5.2	Atividade Antimicrobiana Contra Micro-organismos Potencialmente Patogênicos	15
5.3	Atividade Antimicrobiana Contra Micro-organismos Probióticos.....	18
5.4	Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	20
6	CONCLUSÕES.....	23
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	24

# 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são uma fonte interessante de novas substâncias terapêuticas (ZABAIU et al., 2017). Segundo a *Food and Agricultural Organization of the United Nations* - FAO (1996) a própolis é uma mistura de cera de abelha e resinas de plantas coletadas pelas abelhas, particularmente de flores e brotos de folhas, sendo então misturadas com saliva e outras secreções das abelhas, como a cera. Sendo considerada uma fonte promissora de compostos para a descoberta de novos produtos farmacêuticos. Nas últimas décadas, vários trabalhos relacionados com a composição da própolis e suas propriedades biológicas foram publicados, revelando o interesse dos pesquisadores nesse produto e seu potencial para a indústria farmacêutica (ALVES e KUBOTA, 2013; BANKOVA et al., 2000; CASTRO et al., 2009; GONÇALVES et al., 2011).

Diversos estudos apontam a própolis como um composto de eficaz atividade antibacteriana frente a diversas bactérias, tendo seu potencial dependente de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, como estações do ano, método de coleta e extração, origem botânica e geográfica, (FROZZA et al., 2013; MACHADO et al., 2016; MARCUCCI, 1995; ZABAIU et al., 2017).

A maior parte da atividade antibacteriana, antifúngica e antiinflamatória da própolis é devido à presença de compostos polares, principalmente fenóis como flavonoides e ácidos fenólicos, entre os quais ácido cafeico e ácido *p*-cumárico (HUANG et al., 2014).

Desde da década de 90 o uso de probióticos teve um aumento exponencial, tanto em pacientes hospitalizados quanto no público em geral (McFARLAND, 2015). A definição de probióticos feita pela FAO e da Organização Mundial da Saúde (OMS), publicada em 2001, foi amplamente adotada e aprovada por pesquisadores, órgãos regulamentadores e consumidores. Organizações e agências como *Codex Alimentarius*, *Health Canada*, *World Gastroenterology Organization*, *European Food Safety Authority* (EFSA) e *Institute of Food Technologists* utilizaram a definição da FAO/OMS quando se refere à probióticos. Em 2013, em reunião da *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP), a definição de probióticos foi atualizada para: “Micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, confere um benefício de saúde ao hospedeiro” (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006; HEALTH CANADA, 2009; HILL et al., 2014).

Diversas são os benefícios que a utilização de probióticos pode oferecer à saúde do hospedeiro. Tais vantagens incluem a modulação da microbiota intestinal, atenuação dos efeitos de alguns tipos de diarreias, produção de vitaminas que são absorvidas, a retomada da síntese de vitaminas (principalmente as do complexo B que é prejudicada, quando na microbiota intestinal predominam determinados grupos microbianos, evitando o surgimento da hipovitaminose), promoção de resistência gastrointestinal e urogenital à colonização por micro-organismos patogênicos, reestruturação da microbiota intestinal após uma longa exposição à antibioticoterapia, estimulação do sistema imunológico e alívio da constipação intestinal (CANANI et al., 2007; COUDRAY et al., 2005; ISOLAURI, 2003; PELUSO et al., 2007; ROLFE, 2000; SCHIFFRIN et al., 1995; STEFE et al., 2008).

Existe um interesse enorme no uso de substâncias presentes na própolis no combate a infecções, principalmente por micro-organismos multiresistentes a antibióticos. Por outro lado, tanto bifidobactérias como lactobacilos são beneficiados em ambientes com baixo potencial redox e a presença de compostos antioxidantes é importante a este respeito. Leite

e mel são matrizes alimentícias ricas em substâncias antioxidantes, mas o papel destas substâncias sobre a atividade prebiótica ainda não foi determinado (LUCHESE; PRUDENCIO; GUERRA, 2017). A maioria dos compostos antioxidantes presentes na própolis afeta a viabilidade de uma série de micro-organismos indesejáveis, mas aparentemente não afeta as bactérias probióticas ou, em muitos casos, estimula seu crescimento. Assim é necessário conhecer mais a fundo os efeitos de compostos fenólicos presentes na própolis sob estas bactérias também.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito dos extratos de própolis em micro-organismos patógenos ou potencialmente patógenos, como também em bactérias probióticas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar diferenças da água e do etanol como solventes extratores na atividade antimicrobiana da própolis, utilizando o método difusão em ágar.
- Estudar a atividade antimicrobiana dos 20 extratos de própolis em 9 cepas de lactobacilos isoladas de material fecal de recém nascidos.
- Estudar a atividade antimicrobiana de extratos de própolis em diferentes solventes extratores contra *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, incluindo cepa resistente a meticilina *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Candida albicans* isolada de material fecal de recém nascidos, como também *Escherichia coli* ATCC e a *Salmonella Typhimurium* isolada de kani.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de propolis que apresentarem atividade antimicrobiana pelo método da difusão em ágar.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Histórico, Definição e Função da Própolis na Colmeia

Não é de hoje que se tem conhecimento sobre as propriedades da própolis, boa parte das civilizações antigas conheciam e utilizavam produtos derivados das abelhas como recursos valiosos em sua medicina há pelo menos 300 a.C.. A própolis foi usada pelos egípcios como um dos componentes de embalsamamento devido às suas propriedades anti-putrefativas, pelos incas como agente antipirético e, pelos médicos gregos e romanos por usarem como desinfetante bucal e como um produto antisséptico e curativo no tratamento de feridas, prescritas para terapia tópica de feridas cutâneas (BANKOVA et al., 2000; FREIRES et al., 2016; SFORCIN e BANKOVA, 2011).

Após ter sido listada na farmacopeia de Londres nos meados do século XVII, como uma droga oficial, entre os séculos XVII e XX, acabou se tornando bastante disseminado seu uso, graças a sua ação antibacteriana. Na Itália, o famoso músico Stradivari a utilizou como verniz. Na Segunda Guerra Mundial foi usada em várias clínicas soviéticas para o tratamento da tuberculose, por terem percebido a diminuição dos problemas pulmonares e a melhora do apetite dos combatentes (WAGH, 2013).

Segundo a Instrução Normativa N° 11, de 20 de outubro de 2000 – MAPA: Entende-se por mel o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia.

Originária do grego a palavra própolis, em que “pro” representa “para ou em defesa” e “polis” significa “a cidade”, indicando assim sua principal função deste produto que é a defesa da colmeia. Devido à sua natureza cerosa e suas propriedades mecânicas, a própolis é usada pelas abelhas como cimento para que possa ser mantido a umidade e temperatura estáveis na colmeia durante as quatro estações, selar fendas ou espaços abertos, evitando assim que invasores entrem e os que conseguem entrar, as suas carcaças são encobertas com própolis para evitar sua decomposição, já que não conseguem retirá-las. (AL-WAILI et al., 2012; MARCO et al., 2017; SFORCIN, 2016; SHARAF et al., 2013).

#### 3.2 Própolis: Composição Química, Características Físicas-Químicas e Extração

A própolis é composta por 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias (AL-WAILI et al., 2012). Diferentes estudos já provaram que a composição química da própolis e, conseqüentemente, seus efeitos biológicos, depende de vários fatores, como a origem geográfica, os tipos de fontes vegetais, tempo de coleta, espécie de abelha e estação do ano (BANKOVA, 2005; MASSARO et al., 2013).

Conseqüentemente a composição da própolis é bastante complexa e variável, sendo representantes de origem vegetal específica. . Alguns constituintes estão presentes em muitas amostras entre os quais . polifenóis; ácidos benzóicos e derivados; álcool cinâmico, ácido cinâmico e seus derivados; derivados de benzaldeído; álcoois, cetonas e compostos heteroaromáticos; hidrocarbonetos alifáticos; minerais; esteróis e esteróides; açúcares e

aminoácidos (HUANG et al., 2014). As proporções destes compostos podem variar de acordo com a época e local de coleta (WAGH, 2013).

A própolis é de natureza lipofílica, sendo um material frágil, mole de consistência pegajosa quando aquecida em temperaturas que variam de 25°C a 45°C. Em baixas temperaturas torna-se dura e quebradiça. Acima de 45°C, torna-se cada vez mais pegajosa e gomosa, partindo para o estado líquido a 60°C - 70°C, mas, para algumas amostras devido a sua variedade de composição, o ponto de fusão pode chegar a 100°C. Possui um cheiro característico e agradável, a variação de cor que passa pelo amarelo ao verde, do vermelho ao marrom escuro, dependendo de sua origem e idade (WAGH, 2013).

Os extratos de própolis são geralmente obtidos através de técnicas convencionais, como maceração, por Soxhlet, como também métodos alternativos, como a extração com fluido supercrítico (ALENCAR et al., 2007). É sabido que o método de extração como também o solvente irão afetar diretamente quais compostos serão extraídos da própolis, influenciando assim na seletividade e o rendimento (MACHADO et al., 2015). Dependendo da finalidade, de quais compostos deseja extrair, os mais comumente utilizados são: água, metanol, etanol, clorofórmio, diclorometano, éter e acetona. Água e álcool são os solventes que mais conseguem extrair compostos de ação bactericida, sendo o álcool o de primeira escolha devido à sua afinidade com as características químicas da matriz, por questões de polaridade (KUMAR et al., 2008).

### **3.3 Contexto da Própolis no Brasil**

Devido às suas dimensões continentais, o Brasil tem uma grande biodiversidade e assim, resultando numa grande variedade de própolis (MARCUCCI et al., 2000), até então, tem catalogado 13 tipos de própolis (PARK et al., 2002) classificaram as amostras de própolis coletadas de diferentes regiões do Brasil em 12 grupos, de acordo com a aparência e cor que os extratos apresentam. A *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae), uma planta nativa brasileira, é a fonte botânica mais importante da própolis no sudeste brasileiro, sendo conhecida como própolis verde (TEIXEIRA et al., 2006) tendo em sua composição derivados do ácido *p*-cumárico e de acetofenona (SALOMÃO et al., 2008).

Posteriormente, uma nova própolis foi encontrada em colmeias localizadas ao longo da costa e dos manguezais do Nordeste Brasileiro sendo classificada como uma própolis do grupo 13. Esta própolis é chamada própolis vermelha, com origem botânica em *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Fabaceae) (SILVA et al., 2008).

Economicamente falando, a própolis tem agregado cada vez mais valor, já que de 2010 a 2012, a própolis verde tem sido considerada uma das mais importantes do mundo, recebendo um aumento de mais de 50% no mercado internacional sendo exportada para a China, Japão e Alemanha. Assim o valor da própolis vermelha aumentou cinco vezes mais em relação aos outros tipos de própolis (FERREIRA et al., 2017; FREIRES et al., 2016).

### **3.4 Aplicações e Propriedades Biológicas da Própolis**

A venda de própolis como remédio natural vem se ampliando em muitas lojas de produtos naturais nas mais diversas formas. Aplicações da própolis incluem formulações para resfriado (infecções do trato respiratório superior, resfriado comum e infecções gripais), como também preparações dermatológicas úteis na cicatrização de feridas, tratamento de queimaduras, acne, herpes simples e genitais e neurodermatite. Está comercialmente

disponível na forma de cápsulas, soluções bucais, xaropes, cremes, pastilhas para garganta, em pó, e também em alguns outros produtos processados para se retirar a cera. A concentração em preparações de venda livre é variável, de 120 mg de própolis por comprimido a 600 mg de própolis em 15 mL de xarope. Recomendações gerais indicam uma dose três vezes por dia, independente do uso terapêutico (NINA et al., 2015; WAGH, 2013).

Nos últimos anos, um crescente interesse em produzir ou descobrir novas moléculas antioxidantes para produção de alimentos funcionais tem emergido. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (1999) define alimentos funcionais como “todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica e sua eficácia e segurança deve ser assegurado por estudos científico”(VIUDA-MARTOS et al., 2008).

Visando a redução de doenças, o processo de envelhecimento como também substituição de conservantes artificiais pelos naturais, indústrias alimentícias estão desenvolvendo substâncias antioxidantes e/ou alimentos enriquecidos com antioxidantes, devido à suas propriedades bactericidas e bacteriostáticas. Neste campo, os compostos originados na colmeia, como mel, própolis e geleia real ganharam destaque (BOUAYD e BOHN, 2010; SFORCIN e BANKOVA, 2011; TOSI et al., 2007).

Em virtude de suas propriedades biológicas e farmacológicas, a própolis atraiu o interesse da ciência nas últimas décadas (GHISALBERTI, 1979). Foi visto que a própolis não é tóxica para humanos ou animais a menos que seja administrada numa dose muito alta (BURDOCK, 1998). A própolis tem sido usada na medicina popular pelo efeito profilático contra inflamação, doenças cardíacas, hepatotoxicidade por diabetes *mellitus* e câncer (BANSKOTA et al., 2001). Diversas atividades biológicas como anticancerígenas (KALOGEROPOULOS et al., 2009; KROL et al., 1996), antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngicas (NINA et al., 2015; SILVA et al., 2017; TOHAMY et al., 2014; VARGAS-SÁNCHEZ et al., 2014) foram relatadas.

### **3.4.1 Atividade antimicrobiana em relação ao potencial antioxidante da própolis**

As atividades antimicrobianas da própolis contra diferentes bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos e protozoários foram demonstrados em vários estudos (MENESES et al., 2009; NINA et al., 2015; SILVA et al., 2017). Essas atividades estão principalmente associadas ao conteúdo de flavonoides e derivados de ácidos cafeicos. Além disso, a presença de outras substâncias, como terpenoides, contribuem para a atividade antimicrobiana (BUSANI et al., 2012; ZASLOFF, 2002). Amostras de própolis com diferentes substâncias químicas mostram diferentes propriedades antimicrobianas (SALOMÃO et al., 2004; VELIKOVA et al., 2000). Estudos apontam até extratos de própolis como algo a ser inserido na alimentação de ruminantes, devido ao seu potencial antibacteriano, como alternativa ao uso de antibióticos e aditivos químicos usados na criação desses animais (AGUIAR et al., 2013).

Na **Tabela 1**, mostra-se um apanhado dos últimos 10 anos de pesquisa referente à atividades biológicas da própolis.

**Tabela 1:** Atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária de própolis.

Micro-organismos	Características do extrato	Detalhes do resultado	Referências
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Asparagus niger</i>	Método de extração fria, éter, clorofórmio, etanol, metanol e 40% de metanol).	Extrato etanólico apresentou maior zona de inibição do que os metanólicos contra todos os micro-organismos.	(KUMAR et al., 2008)
<i>Bacillus subtilis</i> , MRSA, <i>Micrococcus Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Proteus vulgaris</i> .	Método a frio usando como solvente álcool a 70 e 96%.	Mostraram diferença significativa, tendo como diferença o gram da bactéria.	(GUMGU MJEE, 2010)
<i>Salmonella Typhi</i>	Extraído com etanol a 70% e evaporado o solvente.	<i>S. Typhi</i> foi suscetível ao extrato brasileiro e búlgaro.	(ORSIA et al., 2012)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 33951 e 25923) e <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Obtenção de extratos de própolis por extração com fluido supercrítico e extração de baixa pressão	Todos os extratos tiveram atividade contra <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> , mas dependente da origem da matriz e do método de extração	(MACHADO et al., 2016)
<i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa Y)	Extratos alcoólicos com níveis mais elevados de compostos fenólicos que estudos anteriores.	As concentrações médias de epimastigotas foram reduzidas em mais de 90% por todos os extratos analisados.	(SILVA et al., 2017)

### 3.5 Micro-organismos Probióticos

A gama de mecanismos de ação dos probióticos é ampla: restaura a microbiota, destruição direta de patógenos, neutralização de toxinas patogênicas, interferência de adesão, preservação da fisiologia das células hospedeiras normais e regulação imune (McFARLAND, 2014; LIEVIN-LE MOAL e SERVIN, 2014).

A atividade antibacteriana da própolis contra bactérias probióticas não tem sido amplamente avaliada, abrindo um leque de oportunidades para o estudo sobre o efeito na

microbiota intestinal normal e também sobre a possibilidade de usar essas bactérias juntamente com o própolis como um conservante natural (MOHAMED et al., 2016).

Segundo Hill et al. (2014), por exemplo, a Health Canada vem estabelecendo desde 2009 que a quantidade de bactérias probióticas como *Bifidobacterium* (espécies *adolescentis*, *animalis*, *bifidum*, *breve* e *longum*) e *Lactobacillus* (espécies *acidophilus*, *casei*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus* e *salivarius*) em alimentos deve ser de, pelo menos,  $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) por porção. Também tem sido empregados cepas de *Enterococcus*, *Propionibacterium* e inclusive leveduras, *Saccharomyces boulardii* (CASTRO et al., 2016; MARTIN et al., 2017; MOSLEMY et al., 2016).

Para serem usadas como probióticos, mesmo entre um grupo de bactérias que é geralmente reconhecidas como seguras (GRAS – *generally recognised as safe*) por não terem natureza patogênica, há necessidade de comprovar a segurança em relação ao desenvolvimento de resistência a antibióticos e não serem  $\beta$ -hemolíticas. Também devem ter identificação internacionalmente reconhecidas de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura, sobreviverem não só a passagem pelo trato gastrointestinal através da exposição aos sais biliares e acidez gástrica, mas também serem capazes de proliferarem no intestino, como também serem consumidas num alimento que lhe deem proteção durante a passagem pelo estômago, através dessa proliferação exercerem suas vantagens sob o hospedeiro, além de ter essas vantagens comprovadas *in vivo* e *in vitro* por meio de uma dose conhecida, serem capazes de aderir ao muco ou epitélio intestinal, produzir substâncias antibacterianas e influenciar atividades metabólicas como a produção de D-lactato (PINEIRO e STANTON, 2007; ZUCCOTTI et al., 2008).

Várias intecorrências como, uso irracional de antibióticos, falta de exercícios físicos e principalmente a dieta são apontados como causa do desequilíbrio da microbiota, diminuição da presença de microrganismos benéficos, aumentando conseqüentemente os patogênicos. Essa desregulação é chamada de disbiose e acarreta alguns transtornos para o paciente como, obesidade, esteatose hepática, alergias, doenças autoimunes, desordens metabólicas e neurológicas (SCHIPPA e CONTE, 2014). O levantamento em estudos de que umas das alternativas contra a disbiose, é o uso de probióticos, tem voltado o interesse da ciência e da indústria a fim de melhor elucidar as vantagens e desvantagens do seu uso, propriedades e mecanismos de ação, como também desenvolvimento e aprimoramento de produtos tanto pela indústria farmacêutica quanto pela alimentícia (McFARLAND, 2014).

### 3.5.1 *Lactobacillus*

Bactérias do gênero *Lactobacillus* pertencem ao grupo das láticas. Juntamente com *Bifidobacterium* estão entre os micro-organismos probióticos mais importantes tipicamente associados a microbiota intestinal humana, sendo também encontrados nas mucosas vaginal e oral. São bactérias gram-positivas, catalase-negativa, não esporulada, sem motilidade, desprovidos de citocromo, que se beneficiam de atmosfera anaeróbia, mas são aerotolerantes, nutricionalmente exigentes, tolerantes a ácidos e estritamente fermentativos; o ácido lático é o principal produto final da fermentação do açúcar (HOLZAPFEL et al., 2001).

Em relação às características filogenéticas, os *Lactobacillus*, podem ser divididos em dois “*subclusters*”, não tendo correlação com as características fisiológicas do gênero. O primeiro grupo seria os homofermentadores obrigatórios e alguns heterofermentadores facultativos, já o segundo contempla todos os demais *Lactobacillus* que se encaixam nas

categorias acima citadas, principalmente os heterofermentadores facultativos, incluindo posteriormente todos da espécie *Pediococcus* (SALMINEN e WRIGHT, 1998).

O grupo *Lactobacillus casei* incluem espécies típicas do hospedeiro humano, *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, além de *L. zae* (AXELSSON, 2004; HOLZAPFEL et al., 2001). Essas espécies apresentam comportamento fisiológico e necessidades nutricionais muito similares, multiplicando-se em condições ambientais bastante semelhantes (DESAI, SHAH e POWELL, 2006; FELIS et al., 2001).

Os *Lactobacillus* são exigentes quanto aos nutrientes necessários para seu crescimento, requerem uma mistura complexa de aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, ésteres, sais, derivados de ácidos nucleicos e vitaminas. No entanto, apesar de suas exigências nutricionais, possuem uma ampla variedade de *habitats* indo da água, solo e esgoto à microbiota comensal de plantas e do ser humano, cavidades orais, vaginais e intestinais (PATTEN e LAWS, 2015).

De fato, os *Lactobacillus* é um dos gêneros que possuem predominância na microbiota vaginal humana. No entanto, já na microbiota intestinal humana, os *Lactobacillus* estão presentes em números relativamente baixos, representando apenas 0,01-0,6% do total de bactérias fecais, segundo Patten e Laws (2015). Apesar de sua baixa abundância no microbiota intestinal, é incontestável o importante papel que desempenham na homeostase intestinal. Sendo assim, era esperado que os lactobacilos tenham recebido Presunção Qualificada de Segurança (QPS) (EFSA, 2007) e, conseqüentemente, pelo interesse da indústria alimentícia são encontrados com facilidade em diversos tipos de produtos como nos fermentados, quer como integrante da microbiota bacteriana responsável pelas transformações que ocorrem no produto ou como culturas probióticas apenas veiculada no produto alimentício .

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

O experimento foi realizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) no Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) do Instituto de Tecnologia, no laboratório de Microbiologia de Alimentos. Os extratos de própolis, assim como a sua caracterização química, foram fornecidos pelo Departamento de Química Orgânica do Instituto Química, Laboratório de Química Medicinal e Laboratório de Química do Mel da UFRRJ. Os extratos foram armazenados em embalagens de vidro âmbar em freezer a -20°C até o momento da sua utilização na determinação da atividade antimicrobiana.

#### 4.1.1 Origem geográfica das amostras de própolis

Amostras de própolis de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), foram adquiridas de apiários localizados nos municípios de Paraíba do Sul, Paracambi, Paty do Alferes, Pinheiral e Teresópolis no estado do Rio de Janeiro, entre os anos de 2014 e 2017 nos meses de janeiro a junho.

#### 4.1.3 Culturas microbianas

Foram empregadas culturas existentes na coleção do DTA/IT/UFRRJ. Patogênicas ou potencialmente patogênicas:

*Escherichia coli* ATCC 25922 (DTA 44), *Staphylococcus aureus* ATCC 12692 (DTA 142), *S. aureus* MRSA ATCC 43300 (DTA 8), *Salmonella Typhimurium* (DTA 41) (isolada de kani), como também cepa de *Candida albicans* (DTA 134) (isolada de intestino de lactente).

Probióticas:

Cepas de *Lactobacillus* isoladas do intestino de lactentes com idade entre 7 e 21 dias, e cepas probióticas comerciais (*Lactobacillus casei*-01, Christian Hansen®, e *Sacharomyces boulardii*, isolada do suplemento probiótico Floratil, Merck®).

Os isolados de lactobacilos foram identificados genotipicamente segundo Andrighetto et al. (2001) o dendrograma da RAPD-PCR foi organizado os isolados em nove grupos distintos, com mais de 90% de similaridade genética. Foi testado um representante de cada um dos nove grupos (*clusters*), a saber: *L. rhamnosus* (DTA 76), *L. rhamnosus* (DTA 79), *L. paracasei* (DTA 81), *L. paracasei* (DTA 83), *L. paracasei* (DTA 92), *L. paracasei* (DTA 97), *L. paracasei* (DTA 102), *L. fermentum* (DTA 104), *L. fermentum* (DTA 106).

As culturas foram mantidas congeladas a -20°C em caldo Man Rogosa Shape (Merck Darmstadt, Alemanha), com 15% de glicerol (Vetec) como agente crioprotetor (GANCEL et al., 1997).

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Preparo dos extratos de própolis

O preparo dos extratos etanólicos de própolis (EEP) foi realizado no Laboratório de Química do Mel e consistiu em pesar 2.00 gramas de própolis pulverizada e submetidos a

extração com 50 mL de álcool etílico 95% GL P.A. à temperatura ambiente durante 48 horas, sob maceração dinâmica. Após esse período os extratos foram resfriados (-10°C) durante no mínimo 12 horas para separar ceras e resinas. O extrato foi então filtrado, concentrado em evaporador rotativo e armazenado até o momento das análises. Já no preparo dos extratos aquosos (EAP) pesou-se 1.5 gramas de própolis pulverizada que foram extraídas com 10 mL de água ultrapura (Milli-Q) durante 30 dias, sob maceração estática em um recipiente âmbar devidamente vedado. A mistura foi mantida em baixa temperatura (5°C) para evitar a proliferação de microranismos e agitada pelo menos por três vezes ao dia. Após o período de extração o extrato foi filtrado e armazenado em frascos âmbar.

#### 4.2.2 Caracterização química dos extratos

Os extratos foram obtidos do grupo de pesquisas do mel já com a sua composição em polifenóis determinada no Laboratório de Química do Mel. Os dois grupos principais de polifenóis, flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres, foram determinados conforme descrito por Salgueiro e Castro (2016). O conteúdo de fenólicos foi expresso em mgE<sub>AG</sub>/100mg, sendo a curva de calibração preparada com ácido gálico. Na determinação de flavonoides a curva de calibração foi preparada com quercetina e os resultados expressos em mgE<sub>QU</sub>/100mg. Todas as análises foram feitas com três repetições.

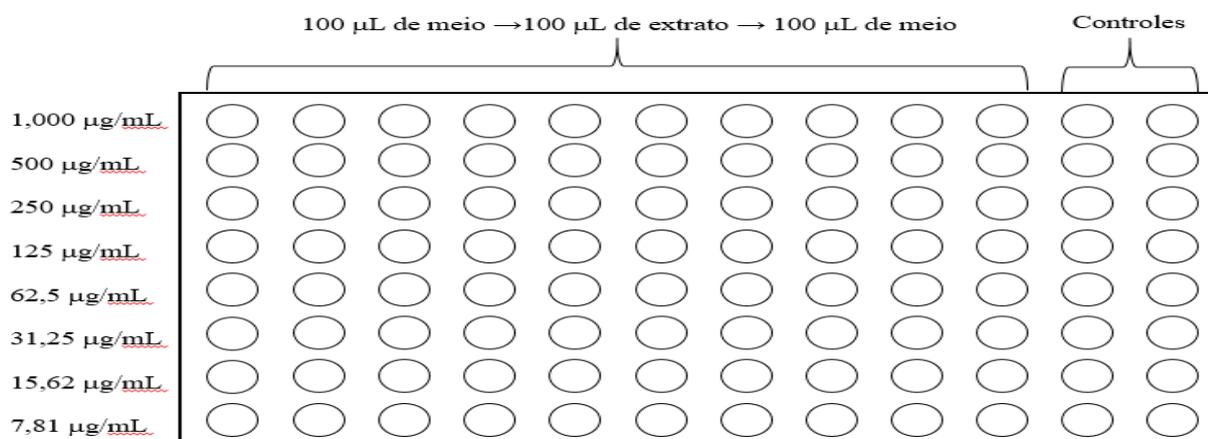
#### 4.2.1 Método difusão em ágar

A atividade antimicrobiana dos extratos de própolis foi determinada de acordo com o método de difusão em ágar descrito por Bauer e Kirby (1966) com modificações. O inóculo de cada micro-organismo foi obtido após ativação por três transferências sucessivas em caldo YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) (Himedia, Mumbai, Índia), Triptona Soja (Himedia, Mumbai, Índia) e MRS respectivamente para *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus* e *Lactobacillus*. Foram feitas curvas de calibração afim de que nas leituras as absorvâncias feitas no espectrofotômetro (SP – 1105, Bel Photonics) das suspensões fossem conter  $ca 1 \times 10^6$  UFC/mL obtendo assim a suspensão de trabalho de acordo com CLSI (2003). Com auxílio de alça de Drigalsky foram espalhadas alíquotas de 0,1 mL desta suspensão na superfície de placas de Petri contendo 20 mL de ágar MH (Mueller Hinton) (Difco, Sparks, MD, EUA), YPD, MRS, respectivamente para patógenos, leveduras e *Lactobacillus*. A seguir, com auxílio de um furador estéril de 8 mm de diâmetro foram feitos quatro poços por placa. Os poços foram preenchidos com 50 µL dos extratos de própolis. Os controles foram preparados contendo apenas álcool etílico a 95% ou água usados nas preparações dos extratos e discos de Ampicilina para gram-positivas, Gentamicina para gram-negativas, Anfotericina B para leveduras e Vancomicina para *Lactobacillus*. As placas foram incubadas por 24 e 48 horas, para patógenos e *Lactobacillus*, respectivamente. A formação de halos claros, indica atividade antimicrobiana e o tamanho dos mesmos foi medido com auxílio de um paquímetro. Para os *Lactobacillus* a interpretação da leitura dos halos foi feita de acordo com VLKOVÁ et al. (2006), sendo considerados resistentes ( $\emptyset \leq 15$  mm), moderadamente suscetíveis ( $16 > \emptyset < 20$  mm), ou suscetíveis. Para os patógenos utilizou-se os critérios do CLSI (2003) para os patógenos, conforme os antibióticos usados para cada micro-organismo, foram realizadas três repetições verdadeiras em duplicata.

#### 4.2.2 Método da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi realizada usando placas de microtitulação de 96 poços, conforme descrito na ISO 10932-2012 para lactobacilos, CLSI M27-A2 para leveduras e CLSI M07-09 para bactérias patogênicas, com modificações. Foram tomadas colônias individuais de uma placa de ágar MH, MRS ou YPD (para patógenos, lactobacilos e leveduras respectivamente) e preparadas suspensões de modo a conter  $ca\ 1 \times 10^6$  UFC/mL para bactérias e para levedura, foram feitas diluições a fim de chegar numa concentração de  $5 \times 10^3$  UFC/mL. Foi usado o meio LSM que é composto de 90% de meio IST (ISO-SENSITEST) (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) e 10% de meio MRS para *Lactobacillus*, meio MH para inoculação dos patógenos e para leveduras meio RPMI 1640 (Gibco, MD, EUA., Alíquota de 100  $\mu$ L de meio já inoculado foram colocadas em cada poço das placas de microtitulação.. No primeiro poço adicionou-se 100  $\mu$ L do extrato alcoólico na concentração de 4.000  $\mu$ g/mL e sucessivamente foram transferidos 100  $\mu$ L para o poço seguinte, fazendo que a concentração dos EEP diminuísse pela metade (2.000  $\mu$ g/mL) no primeiro poço de cada amostra de EEP. Diluições decrescentes dos EEP foram feitas a partir do primeiro poço de cada amostra de extrato numa alíquota de 100  $\mu$ L e descartando os 100  $\mu$ L restantes, logo após foi completado o volume para 200  $\mu$ L, adicionando mais 100  $\mu$ L em todos os poços com extrato, chegando a concentrações entre 1,000 a 7,81  $\mu$ g/mL.

Como controle, foram feitas suspensões dos antibióticos, Ampicilina para gram-positivas, Gentamicina para gram-negativas, Anfotericina B para leveduras e Vancomicina para *Lactobacillus* conforme descrito na ISO e no CLSI citadas acima, com o uso de uma alíquota de 200  $\mu$ L, para fins de comparação. Outros controles foram feitos também como o controle positivo, onde apenas continha 100  $\mu$ L de meio de cultura inoculado com as cepas em estudo com mais 100  $\mu$ L de água, o negativo somente com 200  $\mu$ L de meio de cultura estéril e do etanol (96%) nas mesmas concentrações que foram usados para os extratos e antibióticos (**Figura 1**). Após a incubação por 48 horas em condições de anaerobiose para os *Lactobacillus*, e em condições de aerobiose também por 24 horas para leveduras e patógenos. A CIM é a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano que é visualizado com auxílio do corante de oxirredução, rezasurina (Inlab) (0,01% m/v) adicionado num volume de 20  $\mu$ L em cada poço.. As análises ocorreram em duplicata e três repetições verdadeiras.



**Figura 1.** Esquema da distribuição dos extratos e controle na placa de microtitulação para análise da CIM.

### **4.3 Análises Estatística**

Os resultados foram avaliados quanto à normalidade e à homogeneidade de variâncias. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e Teste de Dunnett, a um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), foi usado o programa estatístico GraphPad Prism 6.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Indicadores de Qualidade Físico-química dos Extratos Etanólicos de Própolis

O teor de fenólicos e flavonoides totais e tempo de oxidação das 10 amostras de EEP é mostrado na **Tabela 1**. A atividade antioxidante assim como a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis tem sido atribuída à presença de flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres cujos maiores teores foram observados nos EEPs 5, 11 e 12. O EEP 12 apresentou o maior teor de fenólicos totais e o EEP 11 o maior teor de flavonólides.

**Tabela 2:** Indicadores de Qualidade Físico-química dos extratos etanólicos de própolis.

Amostra	Origem	Mês e Ano de Coleta	Método de Coleta	Fenólicos Totais mgE <sub>AG</sub> /100mg	Flavonoides Totais mgE <sub>QU</sub> /100mg	Tempo de Oxidação
EEP5	Paraíba do Sul	Maio - 2014	Raspagem	11.88 ±0.003	6.19 ±0.001	4.48 ±0.695
EEP11	Paracambi	Fevereiro - 2015	Raspagem	12.16 ±0.001	10.75 ±0.002	3.78 ±1.064
EEP12	Pinheiral	Maio - 2015	Placas	16.37 ±0.012	8.05 ±0.002	3.91 ±1.286
EEP13	Teresópolis	Janeiro - 2016	Raspagem	9.35 ±0.002	4.71 ±0.001	4.89 ±0.505
EEP15	Paty do Alferes	Maio - 2016	Raspagem	0.99 ±0.012	4.25 ±0.001	3.78 ±0.331
EEP18	Teresópolis	Junho - 2016	Placas	10.89 ±0.001	7.83 ±0.002	4.45 ±0.212
EEP29	Pinheiral	Maio - 2017	Placas	nd	3.25 ±0.001	12.11 ±0.391
EEP30	Pinheiral	Abril - 2017	Placas	3.81 ±0.005	3.29 ±0.001	12.98 ±0.035
EEP31A	Pinheiral	Maio - 2017	Placas	6.89 ±0.006	5.81 ±0.001	7.54 ±0.091
EEP31B	Pinheiral	Maio - 2017	Placas	5.06 ±0.011	4.47 ±0.001	6.74 ±0.145

Fenólicos totais: mg equivalentes em Ácido gálico / 100 mg de extrato bruto

Flavonoides totais: mg equivalentes em Quercetina / 100 mg de extrato bruto

Tempo de Oxidação: medido em segundos

nd: não detectado. O ensaio de Fenólicos Totais ficou fora do limite de detecção nas concentrações testadas.

Já o índice de oxidação está diretamente relacionado com o tempo e com a temperatura de armazenamento do da própolis e com a redução de seu conteúdo em substâncias antioxidantes. Verificou-se uma correlação negativa entre o teor de substâncias fenólicas e o índice de oxidação, especialmente nos EEPs 29 e 30 que apresentaram os maiores índices de oxidação e os menores teores em substâncias antioxidantes, sendo que no EEP29 não foram detectados fenólicos e um baixo teor de flavonóides.

De acordo com a Instrução Normativa Nº 3, de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, exige que os extratos de própolis contenham o mínimo de 0,25% (m/m) de compostos flavonoides, 0,50% (m/m) de compostos fenólicos e o máximo de 22 segundos de tempo de oxidação (BRASIL, 2001). Analisando os dados acima pode-se verificar que todas as amostras estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação quanto a esses três parâmetros, exceto a amostra EEP29 na qual não foi detectada a presença de compostos fenólicos.

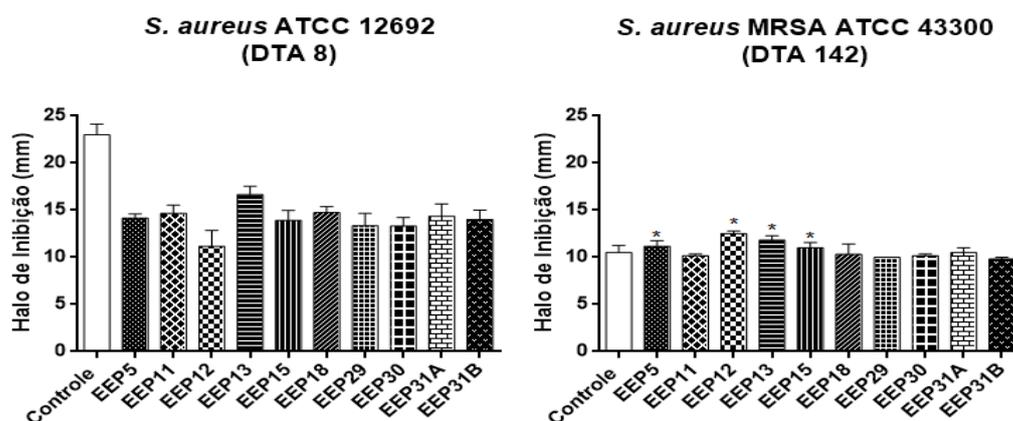
## 5.2 Atividade Antimicrobiana Contra Micro-organismos Potencialmente

### Patogênicos

O teste de difusão em ágar propiciou verificar ausência de halo claro de inibição frente aos extratos aquosos. Todas as 10 amostras de EAP não apresentaram ação antimicrobiana contra nenhum dos 16 microrganismos avaliados. Tais resultados corroboram com estudos já feitos, como em Kubiliene et al. (2018) que analisaram diferentes solventes extratores, como água, etanol e propilenoglicol e constatou que os EAP continham índices 10 a 20 vezes menores de compostos ativos em comparação aos EEP. Miguel et al. (2014) explica que devido à sua natureza fenólica, os flavonoides são bastante polares, mas são pouco solúveis em água, diferente no etanol, que mesmo sendo também polar, possui uma polaridade menor, tendo assim mais afinidade com o extrato, influenciando diretamente a capacidade antimicrobiana dos EAP.

Diferentemente dos EAP, os EEP tiveram mesmo que em diferentes proporções ação antimicrobiana. A atividade antimicrobiana dos EEPs contra *S. aureus* ATCC 12692 e *S. aureus* MRSA ATCC 43300 pode ser observada na **Figura 2**.

Os extratos de própolis mostraram capacidade inibitória significativamente menor que o controle (ampicilina) contra *S. aureus* sensível a antibióticos, mas para a cepa MRSA os resultados foram promissores sendo a capacidade inibitória de quatro amostras (EEP 5, 12, 13 e 15) significativamente ( $P < 0,05$ ) maior que o controle. Verifica-se que apenas a análise do conteúdo total em compostos fenólicos e flavonóides não é suficiente para explicar a atividade antimicrobiana verificada com estas cepas de *S. aureus*, sugerindo a necessidade de identificação das diferentes substâncias para esclarecer quais apresentam maior bioatividade contra cada uma das cepas. Surpreendentemente o EEP 29 apresentou atividade antimicrobiana, mesmo que baixa. Neste EEP não foram detectados compostos fenólicos, sugerindo que os compostos flavonóides provavelmente desempenham um papel importante nesta atividade.



**Figura 2:** Diâmetro da zona de inibição de cepas de *S. aureus* obtidos por ação de extratos etanólicos de própolis (EEP) em comparação ao controle (Ampicilina).

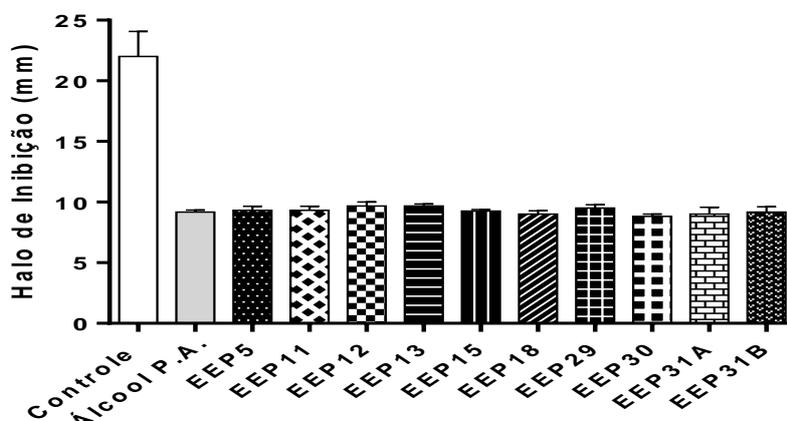
\* Diferença significativa em relação ao controle.

Por outro lado, não foi observada atividade antimicrobiana dos extratos contra Gram negativas. Não houve formação de halo de inibição contra *E. coli* ATCC 25922, enquanto para *S. Typhimurium* DTA 41 foi verificada formação de halo, porém o álcool que foi usado como solvente extrator, apresentou atuação semelhante à dos EEP como consta na **Figura 3**. Efeito inibidor do álcool foi observado apenas nesse micro-organismo. Desta forma concluiu-se que o efeito verificado foi unicamente devido a presença de álcool, sendo o único micro-organismo a apresentar halo de inibição frente ao álcool.

Uma maior atividade contra gram (+) e ineficiência contra gram (-) também foi observada por um grande número de outros estudos. De acordo com Gonçalves et al. (2011) a ineficiência dos EEP nas gram (-) se dá pelo fato de que a estrutura de seu envelope celular, que por possuir uma membrana externa de natureza lipoproteica recobrando sua parede de peptidoglicano. Além disso, possivelmente componentes da própolis podem ter sido destruídos por enzimas hidrolíticas liberadas pelas bactérias (SFORCIN, 2016).

Esses resultados corroboram com estudos feito por Sforcin et al. (2000) que concluíram uma ação significativa dos EEP contra a bactéria gram (+) *S. aureus*, que foi suscetível a baixas concentrações do extrato, porém contra a bactéria gram (-) *E. coli*, foram necessárias maiores concentrações do extrato para obter resultados satisfatórios. Da mesma forma. Grange e Davey (1990), ao avaliarem 21 cepas de bactérias, observaram que as gram (-) apresentaram uma maior resistência à própolis do que as gram (+), o que foi associado às diferenças nas estruturas das paredes celulares dessas bactérias.

***S. Typhimurium* ATCC  
(DTA 41)**

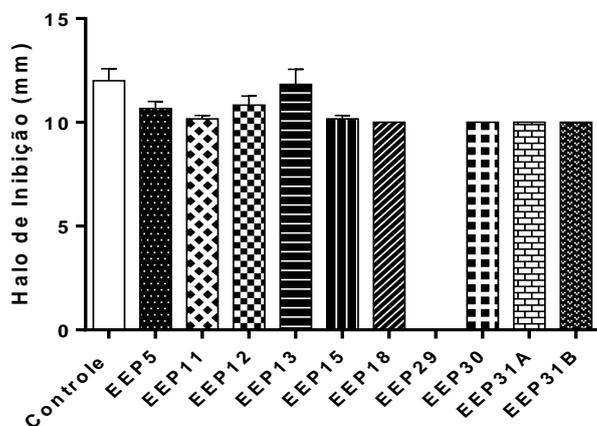


**Figura 3:** Diâmetro da zona de inibição de cepa de *S. Typhimurium* obtidos por ação de extratos etanólicos de própolis (EEP) em comparação ao controle (Gentamicina).

O efeito dos extratos contra a levedura *Candida albicans* DTA 134, pode ser visto na **Figura 4**. Observou-se que os EEPs apresentaram efeito semelhante ao controle (Anfotericina B). O melhor resultado foi do EEP13 que chegou a 98% de atuação antifúngica em comparação ao controle. Porém *C. albicans* foi resistente ao extrato EEP 29 que não apresentou ação inibitória. Este extrato apresentou os menores teores de flavonoides totais e o conteúdo de fenólicos totais abaixo do limite de detecção, sugerindo que a ação antifúngica seja devida aos compostos fenólicos, enquanto a ação antibacteriana deva ser também devida a ação dos compostos flavonóides.

A ação antifúngica dos EEPs parece promissora pois foi equivalente a do antibiótico, sugerindo que possa ser usado em substituição a estes quimioterápicos e como conservadores em alimentos nos quais a microbiota fúngica seja predominante.

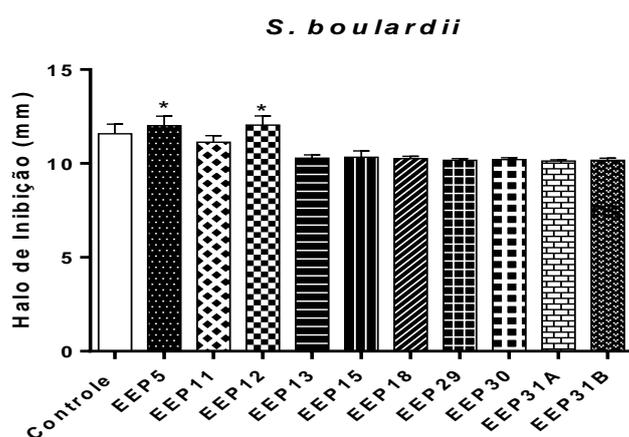
***C. albicans*  
(DTA 134)**



**Figura 4:** Diâmetro da zona de inibição de *Candida albicans* obtidos por ação de extratos etanólicos de própolis (EEP) em comparação ao controle (Anfotericina B).

### 5.3 Atividade Antimicrobiana Contra Micro-organismos Probióticos

A atividade antimicrobiana da levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* está mostrada na **Figura 5**. Comparada ao antibiótico observa-se uma atividade semelhante dos extratos ou até superior como no caso do EEP 5 e EEP 12, extratos dos quais contém os maiores valores de teor de fenólicos e flavonóides totais.

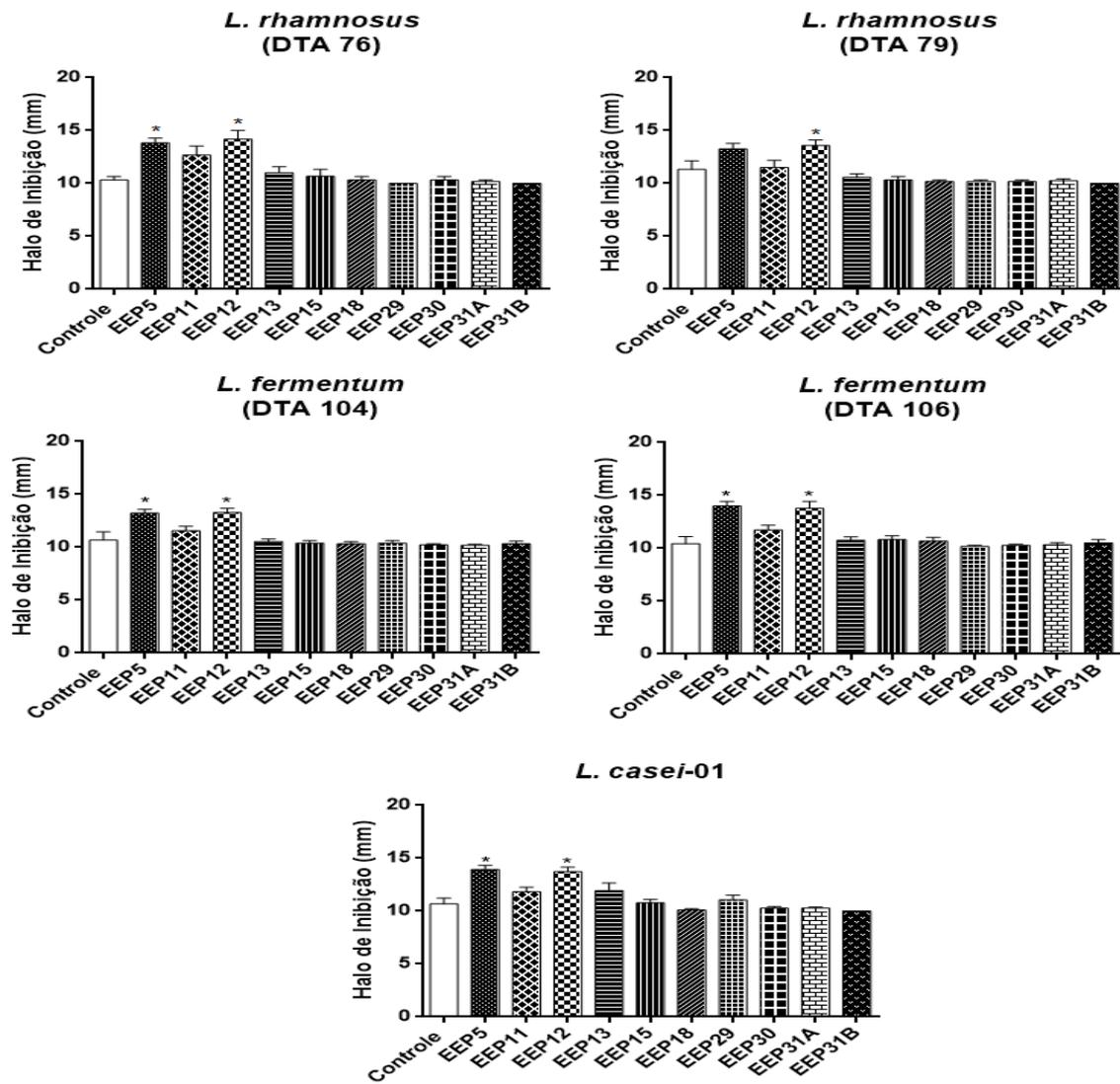


**Figura 5:** Diâmetro da zona de inibição de *S. boulardii* obtidos por ação de extratos etanólicos de própolis (EEP) em comparação ao controle (Anfotericina B).

\* Diferença significativa em relação ao controle.

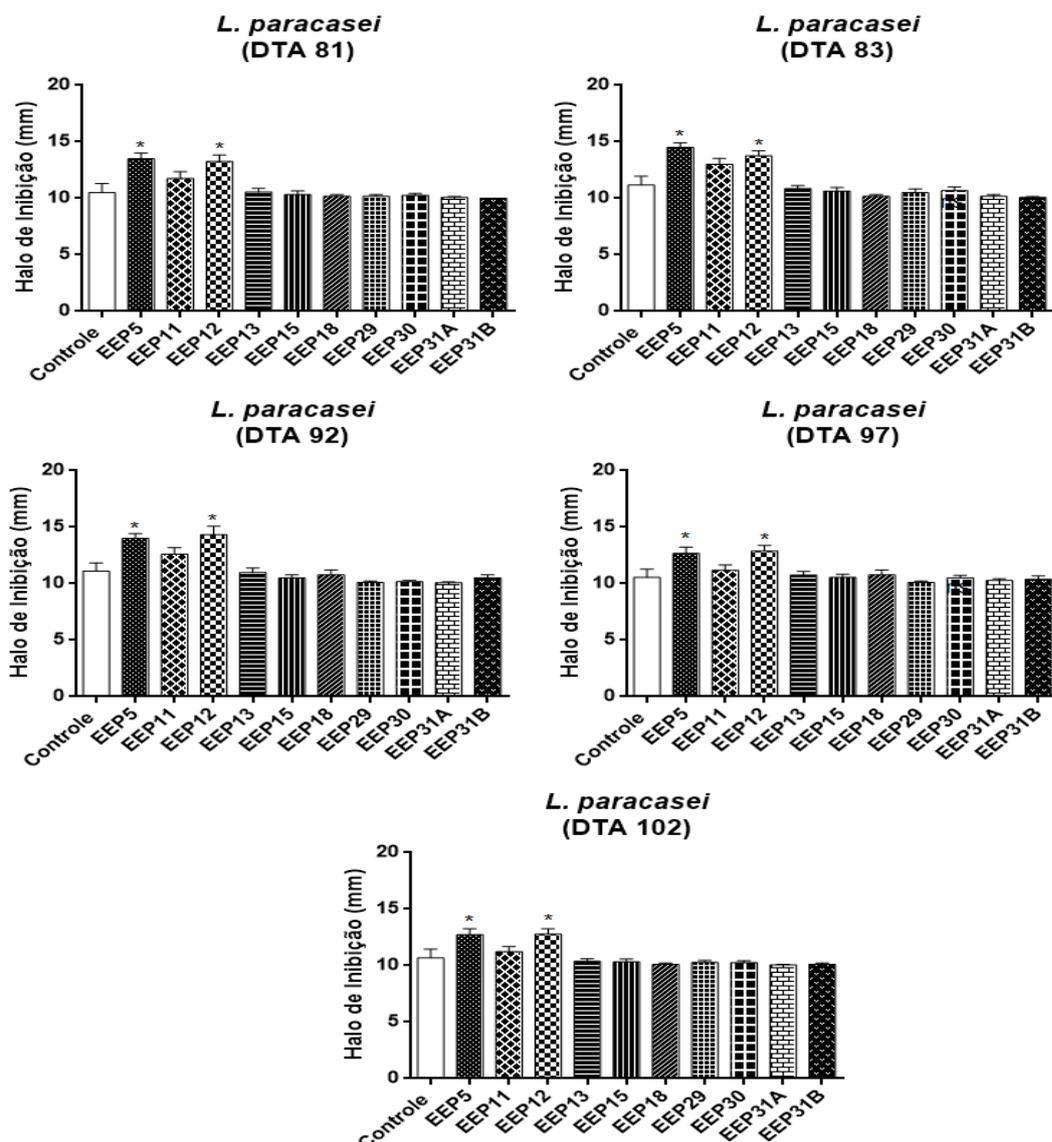
A atividade antimicrobiana dos extratos de própolis contra cepas de *Lactobacillus* foram comparadas com vancomicina (**Figura 6 e 7**), antibiótico no qual não seria esperado ação antimicrobiana já que *Lactobacillus* do grupo casei que inclui *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. fermentum* são consideradas resistentes (HAMILTON e SHAH, 1998).

De acordo com os critérios de sensibilidade estabelecidos por VLKOVÁ et al. (2006) são considerados como resistentes quando o halo de inibição for menor que 15 mm o que qualifica todas as cepas de *Lactobacillus* como resistentes tanto à vancomicina como em relação aos EEP, mesmo que tenha sido observada diferença significativa entre o controle (Vancomicina) e os EEP05 e 12 (**Figuras 6 e 7**). Conclui-se que extratos de própolis poderiam vir a ser usados como antifúngicos e antioxidantes em alimentos probióticos, sem impactar significativamente na viabilidade dos lactobacilos.



**Figura 6:** Diâmetro da zona de inibição de cepas de *Lactobacillus* obtidos por ação de extratos etanólicos de própolis (EEP) em comparação ao controle (Vancomicina).

\* Diferença significativa em relação ao controle



**Figura 7:** Diâmetro da zona de inibição de cepas de *Lactobacillus* obtidos por ação de extratos etanólicos de própolis (EEP) em comparação ao controle (Vancomicina).

\* Diferença significativa em relação ao controle

#### 5.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

De acordo com os resultados mostrados na **Tabela 3** os extratos de própolis foram mais eficientes contra *S. aureus* MRSA ATCC 43300 em comparação com *S. aureus* ATCC 12692. Uma concentração inibitória mínima de 125 µg/mL para inibir *S. aureus* MRSA ATCC 43300 foi observada com os extratos EEP5, EEP12, EEP13 e EEP15. Já para a cepa *S. aureus* ATCC 12692 este valor de CIM foi observado apenas com o EEP13, sendo de 250 a 500 µg/mL para os demais extratos. Estes resultados estão de acordo com o verificado pelo método da difusão em ágar no qual o EEP 13 resultou no maior halo de inibição contra *S. aureus* ATCC 12692. Conforme **Tabela 2** o EEP13 não foi o que apresentou maior teor de

substâncias fenólicas e flavonoides, o que induz a conclusão de que o tipo de composto fenólico presente pode ser mais importante que a concentração total. O EEP12 que também apresentou bons resultados de inibição contra vários micro-organismos é o que possui a maior quantidade de substâncias fenólicas e a segunda maior quantidade de flavonoides.

A atividade da própolis em micro-organismos patogênicos é explicada com sendo, provavelmente, devido à sua capacidade de formar complexos com proteínas extracelulares e solúveis, bem como a complexação com as paredes celulares bacterianas, induzindo assim alterações da membrana celular microbiana. O mecanismo bactericida é devido ao vazamento de conteúdo citoplasmático, perda potencial de membrana, alteração da permeabilidade da membrana, distribuição de lipídios, entrada de peptídeos ou desencadeamento de enzimas autolíticas (ZASLOFF, 2002; BUSANI et al., 2012), por ter alterado o gradiente eletroquímico dos prótons que atravessam a membrana, responsável por manter a síntese de adenosina trifosfato, primordial para a bactéria, afetando também assim a motilidade (SFORCIN, 2016).

Os valores da CIM foram melhores para a cepa MRSA, que apresentou menor valor médio (**Tabela 3**). Embora em relação ao controle (Ampicilina) os extratos de própolis tenham mostrado melhor resultado frente a cepa MRSA pelo método da difusão em agar (**Figura 2**), comparando o tamanho dos halos das duas cepas verifica-se que são semelhantes. Os resultados sugerem que a resistência à meticilina não necessariamente interfere na atividade da própolis, mesmo que o modo de ação do antibiótico apresente algumas semelhanças aos dos extratos. A Ampicilina é um antibiótico  $\beta$ -lactâmico do grupo das penicilinas interferindo na síntese da parede celular.

Resultados semelhantes foram observados por SILVA et al. (2017) que relatou extratos de própolis com potencial antibacteriano moderado (valores de CIM variando de 250 a 500  $\mu\text{g/mL}$ ), assemelhando-se com os resultados obtidos neste estudo para a cepa ATCC 12692.

No que diz respeito as leveduras, enquanto o antibiótico (Anfotericina B) apresentou CIM de 7,81  $\mu\text{g/mL}$  para *Candida albicans*, o mais promissor entre os EEP apresentou CIM de 125  $\mu\text{g/mL}$ . SILVA et al. (2017) e GONÇALVES et al. (2011) reportaram que não houve inibição da *Candida albicans* frente aos extratos de própolis. Diferentemente para a levedura *S. boullardi* verificou-se CIM média dos extratos e do antibióticos de 7,81  $\mu\text{g/mL}$ , o que demonstra alta sensibilidade deste micro-organismo probiótico.

Com relação aos lactobacilos probióticos, observou-se resistência destes micro-organismos frente aos extratos de própolis, com valores de CIM variando entre 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Kalogeropoulos et al. (2009) também verificaram alta resistência de *Lactobacillus* frente a EEP da Grécia e boa atividade contra *Staphylococcus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*. De forma geral os autores não conseguiram estabelecer uma correlação entre a composição química dos EEP e sua atividade antimicrobiana, com exceção daqueles ricos em terpenos que apresentaram melhor atividade.

**Tabela 3:** Concentração inibitória mínima (CIM) dos EEP e antibióticos selecionados frente a micro-organismos patogênicos e probióticos.

Micro-organismo	EEP5	EEP11	EEP12	EEP13	EEP15	EEP18	EEP29	EEP30	EEP31A	EEP31B	Controle Antibiótico	Controle Álcool
	Extrato/Controle											
<i>S. aureus</i> ATCC	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	
<i>S. aureus</i> MRSA	125 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	800 µg/mL					
<i>S. tiphymurium</i>	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	62,5 µg/mL	250 µg/mL
<i>Candida albicans</i>	250 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	1000 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	7,81 µg/mL	
<i>S. boulardii</i>	7,81 µg/mL	7,81 µg/mL	7,81 µg/mL	7,81 µg/mL	7,81 µg/mL	7,81 µg/mL	7,81 µg/mL	7,81 µg/mL	7,81 µg/mL	7,81 µg/mL	7,81 µg/mL	
<i>L. casei</i> - 01	500 µg/mL		500 µg/mL	1000 µg/mL			500 µg/mL		1000 µg/mL	1000 µg/mL	1000 µg/mL	
<i>L. rhamnosus</i> (DTA 76)	500 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL		1000 µg/mL						
<i>L. rhamnosus</i> (DTA 79)	500 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL		1000 µg/mL						
<i>L. paracasei</i> (DTA 81)	1000 µg/mL		1000 µg/mL	1000 µg/mL			1000 µg/mL	1000 µg/mL				
<i>L. paracasei</i> (DTA 83)	500 µg/mL		500 µg/mL	500 µg/mL			1000 µg/mL					
<i>L. paracasei</i> (DTA 92)	500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL		500 µg/mL	1000 µg/mL	1000 µg/mL	1000 µg/mL	1000 µg/mL		
<i>L. paracasei</i> (DTA 97)	500 µg/mL		500 µg/mL	500 µg/mL		1000 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL		
<i>L. paracasei</i> (DTA 102)	1000 µg/mL		1000 µg/mL	1000 µg/mL		1000 µg/mL						
<i>L. fermentum</i> (DTA 104)	500 µg/mL		500 µg/mL	1000 µg/mL								
<i>L. fermentum</i> (DTA 106)	500 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL									

## 6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que os EAP não possuem atividade antimicrobiana, devido a água não ser um bom solvente extrator de compostos bioativos; Os EEP12 e EEP13 são os extratos mais promissores para o uso contra microrganismos patogênicos, fungos e bactérias gram (+) como *S. aureus*. Estudos mais aprofundados de determinação do tipo e quantificação de componentes bioativos dessas amostras de extratos de própolis permitirá sua utilização em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios, visto que a composição química é um fator determinante para o extrato ter ou não atividade biológica. Além do mais, um tipo específico de própolis pode ser mais adequado para cada tipo de aplicação.

Considerando própolis como produto natural e não tóxico, a alta resistência oferecida por *Lactobacillus* probióticos frente aos EEP e que baixas concentrações de EEP poderiam ser usadas como agentes protetivos de micro-organismos indesejáveis incluindo bactérias Gram positivas e leveduras, sugere-se o seu uso como aditivos em alimentos, especialmente em alimentos fermentados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIGHETTO C, ZAMPESE L AND LOMBARDI A. RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 26-30, 2001.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 dez. 1999. Seção 1, p. 23-24.

AGUIAR, S. C.; ZEOULA, L. M.; FRANCO, S. L.; PERES, L. P.; ARCURI, P. B.; FORANO, E. Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria in vitro. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1951 - 1959, 2013.

AL-WAILI, N.; AL GHAMDI, A.; ANSARI, M. J.; AL-ATTAL, Y.; SALOM, K. Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi-Resistant Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli and Candida Albicans Isolates in Single and Polymicrobial Cultures **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 9, p. 793-800, 2012.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-83, 2007.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Phenolic and favonoid content and antioxidant activity of commercial propolis samples. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A., Eds., Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, New York, Marcel Dekker, 2004.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 114-117, 2005.

BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 561-571, 2001.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state - Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 4, p. 228-237, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa Nº3**, de 19 de janeiro de 2001. Anexo VII. Brasília, DF; 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa Nº11**, de 20 de outubro de 2000. Brasília, DF; 2000.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis(propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-363, 1998.

BUSANI, M.; JULIUS, M. P.; VOSTER, M. Antimicrobial activities of *Moringa oleifera* Lam leaf extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 2792-2802, 2012.

CANANI, R. B.; CIRILLO, P.; TERRIN, G.; CESARANO, L.; SPAGNUOLO, M. I.; VINCENZO, A.; ALBANO, F.; PASSARIELLO, A.; MARCO, G.; MANGUSO, F.; GUARINO, A. Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations. **British Medical Journal**, v. 335, n. 7614, p. 340, 2007.

CASTRO, M. L.; VILELA, W. R.; ZAULI, R. C.; IKEGAKI, M.; REHDER, V. L. G.; FOGLIO, M. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 25, p. 1-6, 2009.

CASTRO, M. S.; MOLINA, M. A.; AZPIROZ, M. B.; DÍAZ, A. M.; PONZIO, R.; SPARO, M. D.; MANGHI, M. A.; CANELLADA, A. M. Probiotic activity of *Enterococcus faecalis* CECT7121: effects on mucosal immunity and intestinal epithelial cells. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, p. 1117-1129, 2016.

CHRISTIAN HANSEN. **Suplementos probióticos e fórmulas infantis**. Dinamarca, 2014. Disponível em: < <https://www.chr-hansen.com/pt>>. Acesso em: 09 nov. 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE: **Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana**. M100-S15. Pensilvânia, v. 25, 2003. Disponível em:

< [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi\\_OPASM100S15.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM100S15.pdf)>. Acesso em: 09 nov. 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE: **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda Edição**. M27-A2. Pensilvânia, v. 22, 2002. Disponível em:

<[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi\\_OPAS1M27-A2.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPAS1M27-A2.pdf)>. Acesso em: 29 jan. 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE: **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition**. Pensilvânia, v. 32, 2012. Disponível em: < <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:hm5bS3JzUHoJ:https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html%3Fid%3D564ceedf5e9d97daf08b45a2%26assetKey%3DAS%253A297254750572544%25401447882463055+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>>. Acesso em: 29 jan. 2019.

COUDRAY, C.; RAMBEAU, M.; FEILLET-COUDRAY, C.; TRESSOL, J. C.; DEMIGNE, C.; GUEUX, E.; MAZUR, A.; RAYSSIGUIER, Y. Dietary inulin intake and age can significantly affect intestinal absorption of calcium and magnesium in rats: a stable isotope approach. **Nutrition Journal**, v. 4, p. e29.1-e29.8, 2005.

DESAI, A.R.; POWELL, I.B.; SHAH, N.P. Survival and activity of probiotic lactobacilli in skim milk containing prebiotics. **Journal of Food Science**, v.69, p.57-60, 2004.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. **EFSA Journal** 587 p. 1-16, 2007.

FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F.; MIZZI, L.; TORRIANI, S. Comparative sequence analysis of *recA* gene fragment brings new evidence for a change in the taxonomy of the *Lactobacillus casei*-group. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2113-2117, 2001.

FERREIRA, J. M.; FERNANDES-SILVA, C. C.; SALATINO, A.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 11, p. 3552-3558, 2017.

FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseaseS. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 267-279, 2016.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**, Ontario, 2002. Disponível em:< [https://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)>. Acesso em: 28 de jan. de 2019.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. (FAO Food and Nutrition Paper, 85) Roma, 2006. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>>. Acesso em: 09 nov. 2018

FROZZA, C. O.; GARCIA, C. S.; GAMBATO, G.; DE SOUZA, M. D.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-42, 2013.

GANCEL, F; DZIERSZINSKI, F; TAILLIEZ, R. Identification and characterization of *Lactobacillus* species isolated from fillets of vacuum-packed smoked and salted herring (*Clupea harengus*). **Journal of Applied Microbiology**. v. 82, p. 722-728, 1997.

GONÇALVES, G. M. S.; SANTOS, N. P.; SREBERNICH, S. M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis and açai (*Euterpe oleracea* Mart) extracts. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 3, p. 349-356, 2011.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, p. 159-160, 1990.

GUMGUMJEE, N. M. M. Chemical composition and antibacterial activity of honey beeglu (propolis) collected from china, egypt, iran, and saudi arabia. **The Egyptian Journal of Experimental Biology**, v. 6, n. 2, p. 129-136, 2010.

HAMILTON-MILER; SHAH. Vancomycin susceptibility as na aid to the identification of lactobacilli. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 153-154, 1998.

HEALTH CANADA. **Accepted claims about the nature of probiotic microorganisms in food**. Ontario, 2009. Disponível em: < <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-labelling/health-claims/accepted-claims-about-nature-probiotic-microorganisms-food.html>>. Acesso em: 09 nov. 2018.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, p. 506–514, 2014.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 365S - 73S, 2001.

HUANG, S.; ZHANG, C.-P.; WANG, K.; LI, Q. G.; HU, F.-L. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19610-19632, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO 10932-2012). **Milk and milk products. Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB)**. Etiopia, 2012. Disponível em: < [http://questin.org/sites/default/files/intl-codes/et.iso\\_.10932.2012.pdf](http://questin.org/sites/default/files/intl-codes/et.iso_.10932.2012.pdf)>. Acesso em: 29 jan. 2019.

- ISOLAURI, E. Probiotics for infectious diarrhoea. **Gut**, v. 52, n. 3, p. 436–437, 2003.
- KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S. J.; TROULLIDOU, E.; MOURTZINOS, I.; KARATHANOS, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, v. 116, p. 452-461, 2009.
- KROL, W.; SCHELLER, S.; CZUBA, Z.; MATSUNO, T.; ZYDOWICZ, G.; SHANI, J.; MOS, M. Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 19-25, 1996.
- KUBILIENE, L.; JEKABSONE, A.; ZILIUS, M.; TRUMBECKAITE, S.; SIMANAVICIUTE, D.; GERBUTAVICIENE, R.; MAJIENE, D. Comparison of aqueous, polyethylene glycol-aqueous and ethanolic propolis extracts: antioxidant and mitochondria modulating properties. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, 2018.
- KUMAR, N.; AHMAD, M. K. K.; DANG, R.; HUSAIN, A. Antioxidant and antimicrobial activity of propolis from Tamil Nadu zone **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, p. 361-364, 2008.
- LIEVIN-LE MOAL, V.; SERVIN, A. L. Anti-infective activities of lactobacillus strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 167-99, 2014.
- LUCHESE, R. H. ; PRUDENCIO, E. R. ; GUERRA, A. F. . Honey as a Functional Food. In: Prof. Dr. Vagner Arnaut. (Org.). **Honey Analyzes**, , p. 287-307, 2017.
- MACHADO, B. A. S.; BARRETO, G. D. A.; COSTA, A. S.; SERRA, S. C.; SILVA, R. P. D.; DA SILVA, D. F.; BRANDÃO, H. N.; DA ROCHA, J. L. C.; NUNES, S. B.; UMSZAGUEZ, M. A.; PADILHA, F. F. Determination of Parameters for the Supercritical Extraction of Antioxidant Compounds from Green Propolis Using Carbon Dioxide and Ethanol as Co-Solvent. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.
- MACHADO, B. A. S.; SILVA, R. P. D.; BARRETO, G. D. A.; COSTA, S. S.; DA SILVA, D. F.; BRANDÃO, H. N.; DA ROCHA, J. L. C.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A. P.; UMSZAGUEZ, M. A.; PADILHA, F. F. 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.
- MARCO, S.; PICCIONI, M.; PAGIOTTI, R.; PIETRELLA, D. Antibiofilm and Antioxidant Activity of Propolis and Bud Poplar Resins versus *Pseudomonas aeruginosa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-11, 2017.
- MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 105-112, 2000.

MARTIN, I. W.; TONNER, R.; TRIVEDI, J.; MILLER, H.; LEE, R.; LIANG, X.; ROTELLO, L.; ISENBERGH, E.; ANDERSON, J.; PERL, T.; ZHANG, S. X. *Saccharomyces boulardii* probiotic-associated fungemia: questioning the safety of this preventive probiotic's use. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, p. 286-288, 2017.

MASSARO, F. C.; BROOKS, P. R.; WALLACE, H. M.; NSENGIYUMVA, V.; NAROKAI, L.; RUSSELL, F. D. Effect of Australian propolis from stingless bees (*Tetragonula carbonaria*) on pre-contracted human and porcine isolated arteries. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e81297, 2013.

MCFARLAND, L. V. Use of probiotics to correct dysbiosis of normal microbiota following disease or disruptive events: a systematic review. **British Medical Journal Open**, v. 4, n. 8, p. e005047, 2014.

MCFARLAND, L. V. From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60 p. S85-90, 2015.

MENESES, E. A.; DURANGO, D. L.; GARCÍA, C. M. Antifungal activity against postharvest fungi by extracts from Colombian propolis. **Química Nova**, v. 32, p. 2011-2017, 2009.

MERCK. **Floratil®**. Darmstadt, 2014. Disponível em: <[http://www.merck.com.br/country.br/pt/images/Floratil\\_Bulas%20Profissional%20de%20Saude\\_27.09.2016\\_tcm512\\_135029.pdf?Version=>](http://www.merck.com.br/country.br/pt/images/Floratil_Bulas%20Profissional%20de%20Saude_27.09.2016_tcm512_135029.pdf?Version=>)>. Acesso em: 09 nov. 2017.

MIGUEL, M. G.; NUNES, S.; DANDLEN, S. A.; MARIA, C. A.; ANTUNES, M. D. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 16-23, 2014.

MOHAMED, W. F.; SHADY, H. M. A.; SAYED-AHMED, E. F.; AMER, S. A. Antibacterial activity of egyptian propolis and pollen extracts and their synergistic/antagonistic effect with lactic acid bacteria (lab) against food borne pathogenic bacteria **The Egyptian Journal of Experimental Biology**, v. 12, p. 31-43, 2016.

MOSLEMY, M.; FARD, R. M. N.; HOSSEINI, S. M.; HOMAYOUNI-RAD, A.; MORTAZAVIAN, A. M. A Review: Incorporation of *Propionibacteria* in Fermented Milks as a Probiotic. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, p. 1290-1312, 2016.

NINA, N.; QUISPE, C.; JIMÉNEZ-ASPEE, F.; THEODULOZ, C.; FERESÍN, E. G.; LIMA, B.; LEIVA, E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Antibacterial Activity, Antioxidant

Effect and Chemical Composition of Propolis from the Región del Maule, Central Chile. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18144-18167, 2015.

ORSIA, R. O.; FERNANDES, A.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M. The effects of Brazilian and Bulgarian propolis in vitro against *Salmonella* Typhi and their synergism with antibiotics acting on the ribosome. **Natural Product Research**, v. 26, p. 430-437, 2012.

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. 2502-6, 2002.

PATTEN, D. A.; LAWS, A. P. (2015). Lactobacillus-produced exopolysaccharides and their potential health benefits: a review. **Beneficial Microbes**, v. 6, p. 457–471, 2015.

PELUSO, I.; FINA, D.; CARUSO, R.; STOLFI, C.; CAPRIOLI, F.; FANTINI, M. C.; CASPANI, G.; GROSSI, E.; DI IORIO, L.; PAONE, F. M.; PALLONE, F.; MONTELEONE, G. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. **Infection and immunity**, v. 75, n. 4, p. 1730-1737, 2007.

PINEIRO, M.; STANTON, C. Probiotic bacteria: legislative framework - requirements to evidence basis. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 850-853, 2007.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 396-402, 2000.

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

SALMINEN, S.; WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. New York, Marcel Dekker, 1998.

SALOMÃO, K.; DANTAS, A. P.; BORBA, C. M.; CAMPOS, L. C.; MACHADO, D. G.; NETO, F. R. A.; CASTRO, S. L. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 87-92, 2004.

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P. R. S.; CAMPOS, L. C.; BORBA, C. M.; CABELLO, P. H.; MARCUCCI, M. C.; DE CASTRO, S. L. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p. 317-324, 2008.

SCHIFFRIN, E. J.; ROCHAT, F.; LINK-AMSTER, H.; AESCHLIMANN, J. M.; DONNET-HUGHES, A. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 3, p. 491-497, 1995.

SCHIPPA, S.; CONTE, M. P. Dysbiotic Events in Gut Microbiota: Impact on Human Health. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 5786-5805, 2014.

SFORCIN, J. M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-60, 2011.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 243-249, 2000.

SHARAF, S.; HIGAZY, A.; HEBEISH, A. Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 408-416, 2013.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V. C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2008.

SILVA, R. P. D.; MACHADO, B. A. S.; BARRETO, G. D. A.; COSTA, S. S.; ANDRADE, L. N.; AMARAL, R. G. Ú.; CARVALHO, A. A.; PADILHA, F. F.; BARBOSA, J. D. V.; UMSZA-GUEZ, M. A. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1-18, 2017.

STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 3, n. 1, p. 16-33, 2008.

TEIXEIRA, É. W.; NEGRI, G.; MEIRA, R. M. S. A.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 1, p. 85-92, 2006.

TOHAMY, A. A.; ABDELLA, E. M.; AHMED, R. R.; AHMED, Y. K. Assessment of anti-mutagenic, anti-histopathologic and antioxidant capacities of Egyptian bee pollen and propolis extracts. **Cytotechnology**, v. 66, n. 2, p. 283-297, 2014.

TOSI, E. A.; RÉ, E.; ORTEGA, M. E.; CAZZOLI, A. F. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1025-1029, 2007.

VARGAS-SÁNCHEZ, R. D.; TORRESCANO-URRUTIA, G. R.; ACEDO-FÉLIX, E.; CARVAJAL-MILLÁN, E.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-GALLAND, B.; TORRES-LLANEZ, M. J.; SÁNCHEZ-ESCALANTE, A. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Commercial Propolis Extract in Beef Patties. **Journal of Food Science**, v. 79, p. 1499- 1504, 2014.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, v. 71, p. 693-696, 2000.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; PEREZ-ALVAREZ, J. A. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. 117-124, 2008.

VLKOVÁ, E.; RADA, V.; POPELÁROVÁ, P.; TROJANOVÁ, I.; KILLER, J. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves. **Livestock Science**, v. 105, p. 253-259, 2006.

WAGH, V. D. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p. 11, 2013.

ZABAIYOU, N.; FOUACHE, A.; TROUSSON, A.; BARON, S. R.; ZELLAGUI, A.; LAHOUEL, M.; LOBACCARO, J.-M. A. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**, 2017.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.

ZUCCOTTI, G.; F., M.; RAIMONDI, C.; DILILLO, D.; AGOSTONI, C.; RIVA, E.; GIOVANNINI, M. Probiotics in clinical practice: an overview. **Journal of International Medical Research**, v. 36, p. 1A - 53A, 2008.