

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom,
verde e de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) frente a micro-
organismos infecciosos de interesse em Medicina Veterinária e Humana**

Cristina Mendes Peter

Pelotas, 2015

Cristina Mendes Peter

Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) frente a micro-organismos infecciosos de interesse em Medicina Veterinária e Humana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Geferson Fischer

Coorientador (es): Dr. João Luíz Zani

Dr. Niraldo Paulino

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas

Catálogo na Publicação

P478a Peter, Cristina Mendes

Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) frente a micro-organismos infecciosos de interesse em Medicina Veterinária e Humana / Cristina Mendes Peter, Tony Picoli ; Geferson Fischer, orientador ; João Luíz Zani, Niraldo Paulino, coorientadores. — Pelotas, 2015.

75 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Própolis. 2. Atividade antibacteriana. 3. Atividade antifúngica. 4. Atividade antiviral. 5. Atividade virucida. I. Picoli, Tony. II. Fischer, Geferson, orient. III. Zani, João Luíz, coorient. IV. Título.

CDD : 636.089553

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Cristina Mendes Peter

Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) frente a micro-organismos infecciosos de interesse em Medicina Veterinária e Humana

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 25 de fevereiro de 2015.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Geferson Fischer (Orientador)
Doutor em Biotecnologia agrícola pela Universidade Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Helenice Gonzales de Lima
Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Fernanda de Rezende Pinto
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dra. Marlete Brum Cleff
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela vida e por iluminar sempre meus caminhos.

Aos meus pais, Nelson e Neiva, por todo amor e incentivo durante esses anos de estudos. Em especial minha mãe, que sempre me incentivou a lutar pelos meus sonhos e hoje estando junto de Deus, sempre será a luz que ilumina minha vida.

As minhas irmãs Juliana, Daiane, Carolina e Camila, por estarem sempre presentes, e por todo o amor e companheirismo que me é dado. Aos meus sobrinhos Arthur, Murilo e Olívia, pelo amor excepcional recíproco.

Aos meus melhores amigos/irmãos, Gabriela, Juliana, Tamires, Vanessa, Sara, Aline, Hélio e Diego, obrigada pela amizade sincera e todo o companheirismo que compartilhamos, vocês são presentes de Deus em minha vida.

Agradeço as amigas e colegas de profissão Giulia e Nathália, obrigada pela amizade sólida que construímos, foram muito importantes nesses dois anos de mestrado.

Ao meu orientador Geferson Fischer, pela oportunidade, confiança e ensinamentos durante esse período.

Ao meu co-orientador João Luíz Zani, agradeço pela confiança depositada e por sempre acreditar no meu trabalho.

Pelo companheirismo e pela disponibilidade em sempre ajudar, agradeço ao meu colega e amigo Tony Picoli.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bacteriologia e Saúde Populacional, André, Leonardo, Julia e Bárbara. Obrigada pelo apoio.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Virologia e Imunologia, Raulene, Cloé, Márcia, Fernando, José Carlos, Eliete, Débora, Maureen, Clarissa, Paulo e todos os Professores e estagiários, obrigada pelo carinho.

Ao Centro de Pesquisa e Diagnóstico em Micologia Veterinária (MICVET), pela disposição e auxílio na execução do projeto. Em especial à colega Stefanie.

Aos amigos do Departamento de Farmácia, da Universidade Anhanguera de São Paulo, Artur, Cristina, Matheus, Aparecida e Ivair pelo ajuda na execução do trabalho e também pelo carinho e amizade recebidos. Em especial ao amigo Artur, obrigada pela apoio e paciência em me auxiliar. Aos Professores Niraldo Paulino e Cristina Marcucci pelo apoio e orientação na execução do estudo.

Agradeço à banca Dr. Marcelo de Lima, Dr^a Helenice Gonzales Lima e Dr^a Fernanda de Rezende Pinto pela disposição e disponibilidade.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram e compartilharam deste processo de formação, e com quem compartilhei estes últimos anos.

Obrigada a todos!

Resumo

PETER, Cristina Mendes. **Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) frente a micro-organismos infecciosos de interesse em Medicina Veterinária e Humana.** 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica e antiviral), toxicidade celular e composição química de extratos hidroalcoólicos da própolis marrom (PM), verde (PV) e de abelhas nativas jataí (PJ). A atividade antibacteriana da própolis foi analisada pelo método de Microdiluição frente à *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*. Para a atividade antifúngica, foi utilizada metodologia semelhante, frente à *Candida lipolytica*, *Candida parapsilosis*, *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis*. A atividade antiviral foi avaliada através de dois métodos distintos de tratamento das células com os extratos: antes e depois da inoculação viral, frente ao Herpes Vírus Bovino (BoHV-1) e ao Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e quantificado pelo teste de MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)- 2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) e a atividade virucida, avaliada através de diferentes diluições dos vírus, temperaturas e tempos de incubações e analisadas por observação microscópica e quantificadas através da Dose Infectante (D.I.) 50%. A toxicidade foi avaliada através de diferentes concentrações e a viabilidade celular quantificada por MTT. À composição química das própolis foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os resultados da atividade antibacteriana demonstraram que PM obteve valores menores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), quando testados frente à *S. aureus* (6,7 mg/mL; 13,4 mg/mL, respectivamente), e *E. coli* (29,4 mg/mL; 54,3 mg/mL) quando comparados ao PV e PJ. Contudo frente *Streptococcus* sp., os menores valores de CIM e CBM encontrados foram da PV ($p < 0,01$). Na atividade antifúngica as PM, PV e PJ apresentaram eficácia à *Candida* sp. e *Sporothrix* sp. A PJ apresentou menor toxicidade, em sequência PV e PM. Na atividade antiviral, os extratos foram mais eficazes quando acrescentados no pré-tratamento e a PM e PV foram mais eficazes ao BoHV-1, enquanto a PJ ao BVDV. Na virucida, a PV a 37°C obteve valores diferentes e menores ($\log = 2,67$) em relação a PM ($\log = 3,5$) e PJ ($\log = 3,76$). No entanto, para BVDV a PJ apresentou os melhores resultados para ambas temperaturas. Os resultados demonstram o potencial da própolis como antimicrobiano no tratamento de doenças em Medicina Veterinária e Humana.

Palavras-chave: própolis; atividade antibacteriana; atividade antifúngica; atividade antiviral; atividade virucida

Abstract

PETER, Cristina Mendes. **Antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts of propolis brown, green and jataí bees (*Tetragonisca angustula*) against infectious microorganisms of interest in Veterinary Medicine and Human.** 2015. 75 f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity (antibacterial, antifungal and antiviral), cell toxicity and chemical composition of hydroalcoholic extracts of brown propolis (PM), green (PV) and native bees jataí (PJ). The antibacterial activity of propolis was analyzed by microdilution method against the *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*. For the antifungal activity, similar methodology was used, compared to *Candida lipolytica*, *Candida parapsilosis*, *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. The antiviral activity was measured using two different methods of treatment of the cells with the extracts: before and after the viral inoculation against Bovine Herpes virus (bovine herpesvirus type 1) and Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and quantitated by assaying MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyl-2H-tetrazolato bromine) and virucidal activity, measured using different dilutions of virus, temperatures and incubation times and analyzed by microscopic observation and quantified by the infective dose (ID) 50%. Toxicity was evaluated using different concentrations and cell viability measured by MTT. In the chemical composition of propolis was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods. The results demonstrated that the antibacterial activity had lower values PM Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) when tested against *S. aureus* (6.7 mg/mL; 13.4 mg/mL, respectively) and *E. coli* (29.4 mg/mL, 54.3 mg/mL) compared to the PV and PJ. However front *Streptococcus* sp., the lowest values of MIC and MBC were found of PV ($p < 0.01$). In the antifungal activity PM, PV and PJ showed efficacy to *Candida* sp. and *Sporotrix* spp. The PJ showed lower toxicity in PV and PM sequence. In the antiviral activity, the extracts were more effective when added in the pre treatment and the PM and PV were more effective in BoHV-1, while the PJ to BVDV. In virucidal, PV obtained at 37°C and under different values ($\log = 2.67$) compared to PM ($\log = 3.5$) and PJ ($\log = 3.76$). However, for BVDV PJ showed the best results for both temperatures. Results show the potential of propolis as an antimicrobial in the treatment of diseases in Veterinary Medicine and Human.

Keywords: propolis; antibacterial activity; antifungal activity; antiviral activity; virucidal

Lista de Figuras

ARTIGO 2 Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) frente micro-organismos infecciosos de interesse em Medicina Veterinária e Humana

Figura 1	Médias das Concentrações Inibitórias Mínimas e Bactericidas (CIM e CBM) das bactérias Gram positivas e Gram negativas frente aos extratos de própolis marrom, verde e de abelhas nativas jataí	50
Figura 2	Citotoxicidade dos extratos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí frente a células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney)	54
Figura 3	Atividade antiviral do extrato de própolis marrom frente ao Herpes Vírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) e ao Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), sob dois métodos distintos de tratamento das células (Método I: Tratamento após inoculação viral e Método II: Tratamento antes da inoculação viral)	56
Figura 4	Atividade antiviral do extrato de própolis verde frente ao Herpes Vírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) e ao Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), sob dois métodos distintos de tratamento das células (Método I: Tratamento após inoculação viral e Método II: Tratamento antes da inoculaçãoviral)	57
Figura 5	Atividade antiviral do extrato de própolis de abelhas jataí frente ao Herpes Vírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) e ao Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), sob dois métodos distintos de tratamento das células(Método I: Tratamento após inoculação viral e Método II: Tratamento antes da inoculação viral)	58

Figura 6	Atividade virucida do extrato de própolis marrom, verde e de própolis de abelhas jataí frente ao Herpes Vírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) sob a temperatura de incubação de 22°C durante 24horas	60
Figura 7	Atividade virucida do extrato de própolis marrom, verde e de própolis de abelhas jataí frente ao Herpes Vírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) sob a temperatura de incubação de 37°C durante 24 horas.....	60
Figura 8	Atividade virucida do extrato de própolis marrom, verde e de própolisde abelhas jataí frente ao Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) sob a temperatura de incubação de 22°C durante 24 horas.....	62
Figura 9	Atividade virucida do extrato de própolis marrom, verde e de própolis de abelhas jataí frente ao Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) sob a temperatura de incubação de 37°C durante 24 horas	62

Lista de Tabelas

ARTIGO 2 Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) frente a micro-organismos infecciosos de interesse em Medicina Veterinária e Humana

Tabela 1	Identificação química dos compostos dos extratos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	44
Tabela 2	Atividade antibacteriana dos extratos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí frente à <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> e <i>Streptococcus uberis</i> , através das médias das concentrações de CIM e CBM (mg/mL)	47
Tabela 3	Atividade antifúngica dos extratos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí através das médias das concentrações de CIM e CFM (mg/mL) obtidas de cada agente fúngico	51

Sumário

1 Introdução	11
2 Objetivos.....	15
3 Artigos	16
3.1 Artigo 1.....	16
3.2 Artigo2	32
4 Considerações Finais	71
Referências	72

1 Introdução

A própolis é um material resinoso, produzido pelas abelhas a partir do exsudato de diversas partes das plantas e de várias fontes vegetais (BANKOVA et al., 2000). Esses constituintes são biotransformados pela adição de cera e pela ação sobretudo da enzima 13-glicosidase, produzida nas glândulas salivares das abelhas, e utilizam a própolis como um selador, conferindo proteção à colmeia (BANKOVA et al., 2014).

Seu perfil químico qualitativo e quantitativo é variável dependendo da origem geográfica, como as plantas fornecedoras de resina e a espécie de abelha coletora (BASTOS et al., 2011). A fonte vegetal é o principal determinante da composição química da própolis, e como consequência, das propriedades biológicas a partir de uma determinada região. Bankova et al. (2014) descrevem que o controle da origem geográfica da própolis é fundamental para assegurar uma composição constante e alcançar uma melhor padronização possível.

Bastos et al. (2011), descrevem que amostras de própolis brasileiras possuem propriedades biológicas e composição química distintas para o produto coletado em diferentes regiões. Pereira et al. (2002), descrevem que essa variação é facilmente explicada pela vasta biodiversidade brasileira, bem como, até certo ponto, a capacidade bioquímica das abelhas em modificar a composição nativa ou adicionar seus componentes próprios a própolis.

A composição química da própolis é derivada de uma série de substâncias bioativas: ceras, resinas, bálsamos, óleos essenciais e pólen e outros compostos como ácido cinâmico, compostos fenólicos e flavonóides, terpenos, ácidos aromáticos derivados do ácido cafeico, ácidos graxos e aminoácidos. Destacam-se os flavonóides e ácidos fenólicos, os quais conferem efeitos terapêuticos à própolis (UZEL et al., 2005).

Bankova et al., (1999) descreveram que as espécies de *Baccharis* e *Araucária* são importantes fontes de própolis no estado de São Paulo. Além disso, Midorikawa et al. (2001), referiram que a *Baccharis dracunculifolia* é uma fonte importante não apenas nas amostras de São Paulo, mas também em outras de

outros estados do Brasil, sendo esta popularmente conhecida como “alecrim do campo”.

Park et al. (2000) classificaram a própolis brasileira em 12 tipos distintos, através do perfil químico obtido pelas técnicas de espectrofotometria de absorção na região UV-visível, Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CCDAE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), atividade antimicrobiana e antioxidante. Posteriormente, Trusheva et al. (2004), identificaram um novo tipo de própolis no estado de Alagoas, na qual dois isoflavonóides foram identificados (pterocarpano medicarpina e isoflavana isosativana). Essa amostra de própolis demonstrou-se ser distinta das 12 anteriormente tipificadas por Park et al. (2000), sendo assim denominada de própolis e sua origem botânica predominante *Dalbergia ecastophyllum* (ALENCAR et al., 2005).

A própolis tem uma vasta gama de atividades biológicas (BANSKOTA et al, 2001), e por esta razão, tem sido usado como um remédio natural desde os tempos antigos. Os mecanismos pelos quais a própolis atua em nível celular ainda não são totalmente elucidados. Drago et al. (2007) citam como mecanismos na ação antibacteriana, a inibição da divisão celular, a ruptura da membrana e da parede celular e a inibição de síntese proteica, e sugerem ainda que essa atividade pode estar relacionada à ação sinérgica de seus componentes.

A maior ou menor eficiência do extrato de própolis está muito ligada ao solvente utilizado e ao processo de extração. Os processos e solventes que extraem maiores quantidades de substância fenólicas, onde se concentra a maior atividade farmacológica, devem ser preferidos (MARCUCCI et al., 1990). O álcool hidratado 70% resulta na maior extração de compostos fenólicos e nesta concentração se obtém uma tintura livre de cera (WOISKI e SALATINO, 1998).

Na literatura há descrito várias atividades terapêuticas da própolis, dentre essas atividades a antibacteriana (ORTEGA et al., 2011; SANTANA et al., 2012), antifúngica (SALOMÃO et al., 2008; BÚFALO et al., 2009), antiparasitária (GRESSLER et al., 2012), antiinflamatória (MARCUCCI et al., 2001), antiviral (CUETO et al., 2011; BANKOVA et al., 2014), antitumoral (ARAÚJO et al., 2010), imunomoduladora (FISCHER et al., 2008; BATISTA et al., 2012), entre outras.

Segundo Bankova et al. (2005) a própolis brasileira deve suas ações antimicrobianas à presença de ácidos p-cumáricos, prenilados e diterpenos. Sua composição *in natura* apresenta cerca de 55% de resinas e bálsamos, 30% deceras, 10% de óleos voláteis, 5% de pólen, além de impurezas (Woisky e Salatino, 1998).

Pinto et al., 2001 em seus estudos verificou a eficiência da própolis através de teste de sensibilidade *in vitro*, testando o efeito de diferentes extratos de própolis, na concentração de 100 mg/mL, sobre bactérias patogênicas isoladas de leite de vacas com mastite, enquanto que o extrato etanólico de própolis inibiu o crescimento das amostras de bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negativos e *Streptococcus agalactiae*.

Miorin et al. (2003) estudaram a composição química dos extratos etanólicos de várias amostras da abelha nativa sem ferrão jataí (*Tetragonisca angustula*) e *Apis mellifera* dos estados do Paraná e Minas Gerais e obtiveram o perfil químico das amostras por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Onde identificaram altas concentrações de vários derivados do ácido cinâmico e ácidos p-cumárico em própolis da *Apis mellifera*, mas concentrações baixas na própolis de *T. angustula* partir das mesmas regiões. As amostras de *Apis mellifera* e *Tetragonisca angustula* apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. Os autores concluíram que outros compostos que não identificados pelo método analítico utilizado, poderia ser responsável pela atividade antibacteriana das amostras de *Tetragonisca angustula*.

Salomão et al. (2008) avaliando a composição de extratos etanólicos a partir de amostras de própolis brasileiras determinaram sua composição química por CLAE e avaliaram a atividade antimicrobiana contra *Trypanosoma cruzi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Com base na origem botânica predominante na região de coleta das amostras, os 10 extratos foram separados em três grupos: A (*B. dracunculifolia* e *Araucária* spp.), B (*B. dracunculifolia*) e C (*Araucária* spp.). Através da análise de regressão múltipla de todos os extratos, estes demonstraram correlação positiva, concentrações mais elevadas que levam a um maior efeito biológico. E a atividade antimicrobiana demonstrou que todas as amostras de própolis apresentaram atividades similares frente a fungos *Candida albicans* e *Sporotrix schenckii*. Ainda, os autores reforçaram

a importância do Ácido p-cumárico e seus derivados, principalmente os prenilados, e também o Ácido cafeico, sobre a atividade biológica da própolis brasileira.

Cueto et al. (2011) avaliaram a atividade antiviral de dois extratos etanólicos de própolis (EP1 e EP2), oriundos de um apiário de Santa Maria/RS e outro obtido comercialmente de Minas Gerais, frente aos vírus: *Calicivírus felino* (FCV), *Adenovírus canino* tipo 2 (CAV-2) e vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). A análise de própolis por CLAE identificou a presença de flavonóides como: rutina, quercetina e ácido gálico. A atividade antiviral de ambos os extratos evidenciaram ação frente ao BVDV e CAV-2 quando acrescentados ao cultivo celular anteriormente à inoculação viral. A própolis apresentou atividade antiviral frente aos três diferentes vírus testados.

Diante das atividades evidenciadas dos extratos de própolis, este trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de própolis marrom, verde e de abelhas nativas jataí (*Tetragonisca angustula*) frente a importantes micro-organismos de importância em Medicina Veterinária e Humana.

2 Objetivos

2.1 Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro*, efeitos citotóxicos e caracterizar quimicamente três extratos hidroalcoólicos de própolis: marrom, verde e de abelhas nativas sem ferrão jataí.

2.2 Específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos de própolis marrom, verde e de abelhas nativas sem ferrão jataí frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*;
- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí frente à *Candida lipolytica*, *Candida parapsilosis*, *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis*;
- Avaliar os efeitos citotóxicos dos três extratos frente a células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney);
- Aferir a atividade antiviral e virucida dos três extratos frente ao Herpes Vírus Bovino tipo-1 (BoHV-1) e ao Vírus da Diarréia Bovina (BVDV);
- Caracterizar os compostos químicos presentes nos três extratos da própolis por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

3 Artigos

3.1 Artigo 1

Utilização da própolis no tratamento e controle da Mastite bovina

Cristina Mendes Peter, Tony Picoli, João Luíz Zani, Giulia Soares Latosinski, Fernando Bandeira, Marcelo de Lima, Gilberto Dávila Vargas, Silvia Oliveira Hübner e Geferson Fischer.

Será submetido à revista Semina: Ciências Agrárias

1 UTILIZAÇÃO DA PRÓPOLIS NO TRATAMENTO E CONTROLE DA MASTITE BOVINA

2 USE OF PROPOLIS IN THE TREATMENT AND CONTROL OF BOVINE MASTITIS

3
4 Cristina Mendes Peter^{1, 2}; Tony Picoli²; João Luíz Zani¹; Giulia Soares Latosinski¹; Fernando
5 Bandeira²; Marcelo de Lima²; Gilberto Dávila Vargas²; Sílvia Oliveira Hübner²; Geferson
6 Fischer²

7
8 ¹Laboratório de Bacteriologia e Saúde Populacional, Faculdade de Veterinária, UFPEL,
9 Campus Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP 96160-000.
10 cristina_peter@hotmail.com, (53) 32757943; ²Laboratório de Virologia e Imunologia Animal,
11 Faculdade de Veterinária, UFPEL, Campus Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil.

12 13 RESUMO

14 Nos últimos anos, diversos trabalhos têm sido publicados demonstrando as propriedades biológicas e a
15 composição de própolis. O produto destaca-se tanto pelas suas propriedades terapêuticas, tais como
16 atividade antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica e anticariogênica, quanto pela
17 possibilidade da utilização na indústria farmacêutica e alimentícia. Nesse contexto, a própolis merece
18 destaque por combater micro-organismos patogênicos e, sua utilização no tratamento e controle da
19 mastite bovina, mostra-se como uma alternativa eficaz ao uso de antibióticos comerciais. Diante do
20 exposto, a presente revisão tem como objetivo apresentar estudos *in vitro* e *in vivo* sobre a utilização
21 da própolis no tratamento e controle da Mastite bovina.

22 **Palavras-chave:** Própolis, mastite bovina, resistência bacteriana, Saúde Pública.

23 24 ABSTRACT

25 In recent years, many papers have been published demonstrating the biological properties and
26 composition of propolis. The product stands out both for its therapeutic properties such as
27 antimicrobial, anti-inflammatory, healing, anesthetic and anticariogenic, as the possibility of use in
28 pharmaceutical and food industry. In this context, propolis noteworthy to combat pathogenic micro-
29 organisms and their use in the treatment and control of bovine mastitis, it is shown as an effective
30 alternative to commercial antibiotics. Given the above, this review aims to present *in vitro* and *in vivo*
31 studies on the use of propolis in the treatment and control of bovine mastitis.

32 **Keywords:** Propolis, bovine mastitis, bacterial resistance, Public Health.

33
34
35
36

37 **Introdução**

38 A utilização de produtos naturais em medicina humana e veterinária tem direcionado um interesse
39 cada vez mais expressivo para os produtos apícolas, tais como mel, geleia real, pólen, própolis, entre
40 outros (BASTOS et al., 2011). Individualmente, a própolis destaca-se tanto pelas suas propriedades
41 terapêuticas, tais como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica e
42 anticariogênica, quanto pela possibilidade da utilização na indústria farmacêutica e alimentícia
43 (ADELMANN, 2005; ORTEGA et al., 2011).

44 Nos últimos anos, diversos trabalhos têm sido publicados e nestes tem demonstrado as
45 propriedades biológicas e a composição de própolis. Dessa forma, evidenciando o interesse dos
46 pesquisadores pelo produto e seu potencial para o desenvolvimento de novas drogas (ALENCAR et
47 al., 2005; LUSTOSA et al., 2008; SFORCIN e Bankova, 2011; CAMPOS et al., 2014).

48 A própolis é um material resinoso coletado pelas abelhas a partir do exsudato e broto das plantas e
49 misturado com enzimas e cera das abelhas (BANKOVA et al., 2000). A palavra própolis (do grego pro
50 = em defesa ou para, e polis = cidade) demonstra sua importância para as abelhas, uma vez que é
51 usada para impedir a entrada de invasores na colmeia e embalsamar organismos mortos,
52 consequentemente evitando a decomposição e a disseminação de odores (TEIXEIRA et al., 2005;
53 BURDOCK, 1998; SIMONE-FINSTRÖM E SPIVAK, 2010).

54 A própolis apresenta grande potencial terapêutico para o tratamento de afecções provocadas por
55 diferentes micro-organismos tanto em seres humanos e animais (ORTEGA et al., 2011), atribuindo-se
56 a ela propriedades farmacológicas tanto a nível sistêmico quanto dermatológico (SFORCIN e
57 BANKOVA, 2011).

58 Há na literatura diversos trabalhos relacionando própolis e microbiologia, em sua maioria estudos
59 bacteriológicos, *in vitro* como *in vivo*, que confirmam a ação bactericida e bacteriostática da própolis
60 (SAEKI et al., 2011; PEIXOTO et al., 2012; TROCARELI et al., 2013). Esta atividade pode ser
61 atribuída à quantidade e ao tipo de compostos fenólicos que estão presentes nos diferentes tipos de
62 própolis (PINTO et al., 2001; BANKOVA, 1999).

63 Na produção e industrialização do leite bovino, um dos fatores que mais reduz a qualidade e a
64 quantidade do produto é a mastite bovina. O prejuízo gerado pela enfermidade corresponde
65 aproximadamente a 25% de todas as doenças de importância econômica (BUSATO et al., 2000;
66 ZANETTE et al., 2010).

67 O impacto decorrente da doença deve-se à redução da produção de leite, ao descarte de matrizes, à
68 redução do valor comercial dos animais, às perdas na evolução genética do rebanho e aos gastos com
69 medicamentos e mão de obra extra (DÜRR et al., 2004). Além disso, a doença causa prejuízos à
70 indústria de laticínios devido a alterações na composição físico-química do leite, e ainda apresenta-se
71 como uma ameaça à saúde dos consumidores devido à veiculação de patógenos e presença de resíduos
72 de antibióticos no leite (OLIVEIRA, 1999; SANTOS e FONSECA, 2007; SILVA e RIBEIRO, 2012).

73 Ortega et al. (2011) descrevem que o uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos
74 artificiais vem acendendo cada vez mais o número de patógenos mutantes e resistentes. Deste modo,
75 explica-se o aumento da busca por alternativas ao uso de antimicrobianos comerciais por naturais,
76 como alternativas enérgicas e econômicas ao tratamento de infecções bacterianas como a mastite
77 bovina.

78 Nesse contexto, produtos naturais usados para combater micro-organismos patogênicos merecem
79 evidência, como a própolis, cujas propriedades biológicas e terapêuticas despertam interesse, de modo
80 que sua utilização no tratamento e prevenção da mastite bovina mostra-se como uma alternativa eficaz
81 ao uso de antibióticos comerciais (TRONCARELI et al., 2013).

82 Diante do exposto, a presente revisão tem como objetivo apresentar estudos *in vitro* e *in vivo* sobre
83 a utilização da própolis no tratamento e controle da Mastite bovina.

84

85 **Mastite bovina**

86 A mastite bovina caracteriza-se como o processo inflamatório da glândula mamária, geralmente de
87 caráter infeccioso, classificada como mastite clínica ou mastite subclínica (ANDRADE, 2010;
88 ZANETTE et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

89 Os patógenos responsáveis pela mastite bovina podem ser classificados de duas formas segundo
90 suas origens e formas de transmissão: ambientais e contagiosos. Nas mastites de origens ambientais,
91 os agentes geralmente são encontrados no ambiente, sendo os principais coliformes (*Escherichia coli*,
92 *Klebsiella* ssp e *Enterobacter aerogenes*), *Streptococcus* (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus*
93 *dysgalactiae* e *Streptococcus bovis*) e enterococos (*Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*)
94 (PARDO, 1997; MARTINS et al., 2010).

95 As mastites contagiosas são classificadas devido à sobrevivência dos micro-organismos no interior
96 da glândula mamária, excreção do agente infeccioso e à transmissão para outro animal. Dentre os
97 patógenos mais importantes estão *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus*
98 *dysgalactiae* (VICARIO et al., 2009; MARTINS et al., 2010). Ainda que haja grande disparidade entre
99 os patógenos causadores de mastite bovina, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*,
100 *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* são responsáveis por cerca de
101 80% dos casos da doença nos rebanhos (RANJAN et al., 2006).

102 Segundo Schlegelová et al., (2003), particularmente, *S. aureus* destaca-se como um dos agentes
103 mais comumente encontrados nas infecções intramamárias (IIM) de bovinos em todos os continentes,
104 e também é aquele que isoladamente determina as maiores perdas na pecuária leiteira. No Brasil, esta
105 bactéria é considerada como o principal agente causal da mastite bovina, com taxas de isolamento que
106 variam entre 8,3% e 49,23% das vacas em diferentes rebanhos (LAFFRANCHI et al., 2001).

107 Dentre as medidas utilizadas para redução dos índices de mastite, está a adoção de medidas
108 higiênicas durante a ordenha, assim como a utilização de antimicrobianos no controle das infecções

109 intramamárias e na eliminação de prováveis fontes de infecção dentro do rebanho. No entanto, o uso
110 inadequado de antimicrobianos no tratamento da mastite pode ocasionar o aparecimento de cepas
111 resistentes, comprometendo a eficiência do tratamento e ainda também o aparecimento de resquícios
112 de antibióticos no leite comprometendo a saúde humana (MENDONÇA et al., 2012).

113 Os resíduos de antibióticos no leite podem aparecer devido ao tratamento parenteral e ou
114 intramamário de animais em lactação e representam o principal ponto crítico de controle de
115 contaminação química no leite. Os riscos à saúde do consumidor são apresentados principalmente pelo
116 desencadeamento de fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis, pelos efeitos tóxicos e
117 carcinogênicos, por alterações no equilíbrio da microbiota intestinal e pela seleção de bactérias
118 resistentes no trato digestivo dos consumidores (FREITAS et al., 2005; KERR e WELLNITZ, 2014).

119

120 **Própolis**

121 Burdock (1998), descrevem que a composição química da própolis é bastante complexa, sendo
122 esta o reflexo direto da flora vegetal da qual as abelhas utilizam para a elaboração da própolis. Ainda,
123 a época da colheita do produto, técnica utilizada, como também o gênero e espécie de abelha afetam
124 sua composição (BURDOCK, 1998; BANKOVA et al., 2000).

125 Greenaway (1991), estudando a complexidade química da própolis, revelou de forma pioneira
126 através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM), a detecção
127 de mais de 150 componentes presentes na própolis, sendo assim considerada uma das substâncias mais
128 heterogêneas encontradas nas fontes naturais (Bastos et al., 2011). Posteriormente, Burdock (1998),
129 identificou e/ou caracterizou mais de 300 compostos em amostras diferentes de própolis.

130 Bastos et al. (2011), descreve que amostras de própolis brasileiras possuem propriedades
131 biológicas e composição química distintas para o produto coletado em diferentes partes do país.
132 Pereira et al., (2002), descreve que essa variação é facilmente explicada pela vasta biodiversidade
133 brasileira, bem como, até certo ponto, a capacidade bioquímica das abelhas em modificar a
134 composição nativa ou adicionar seus componentes próprios a própolis.

135 Bankova (1999), descreveram que as espécies de *Baccharis* e *Araucária* são importantes fontes
136 de própolis no estado de São Paulo. Além disso, Midorikawa et al. (2001), referiram que a *Baccharia*
137 *dracunculifolia* é uma fonte importante não apenas nas amostras de São Paulo, mas também em outras
138 de outros estados do Brasil, sendo esta popularmente conhecida como “alecrim do campo”.

139 Park (2000), classificaram a própolis brasileira em 12 tipos distintos, através do perfil químico
140 obtido pelas técnicas de espectrofotometria de absorção na região UV-visível, Cromatografia líquida
141 de alta eficiência em fase reversa (CCDAE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE),
142 atividade antimicrobiana e antioxidante. Posteriormente, Trusheva et al., (2004), identificaram um
143 novo tipo de própolis no estado de Alagoas, na qual dois isoflavonóides foram identificados
144 (pterocarpano medicarpena e isoflavana isosativana). Essa amostra de própolis demonstrou-se ser

145 distinta das 12 anteriormente tipificadas por Park (2000). Sendo assim denominada de própolis
146 vermelha e sua origem botânica predominante *Dalbergia ecastophylum* (ALENCAR et al., 2005).

147 Entre as substâncias químicas isoladas, predominam os flavonoides (flavonas, flavolonas e
148 flavononas) como as principais responsáveis pelas ações antibacterianas, antivirais, antiparasitárias,
149 antioxidantes e demais propriedades farmacológicas (PINTO et al., 2001).

150 Quanto à ação antibacteriana da própolis sugere-se que o extrato etanólico de própolis tem
151 efeito bactericida devido à presença de compostos ativos, porém lábeis. Este efeito bactericida é
152 dependente da espécie bacteriana em questão, e apresenta maior eficiência contra bactérias Gram
153 positivas e para algumas espécies de Gram negativas (ORTEGA et al., 2011).

154 Takaisi-Kikuni & Schilcher (1994), realizaram estudos com a utilização de microscopia
155 eletrônica sobre o *Streptococcus agalactiae*, utilizando um extrato etanólico de própolis verde,
156 verificando seu mecanismo de ação sobre a bactéria. Por meio deste estudo verificaram intervenção do
157 crescimento bacteriano, através da interrupção da divisão celular, ocasionando assim em estreptococos
158 pseudo-multicelulares (policarióticos), desorganização de citoplasma caracterizado pela presença de
159 espaços vazios ou estruturas fibrosas (“fibrous like”) e ainda, alterações na membrana e defeitos na
160 estrutura da parede celular, ocasionando a bacteriólise parcial.

161 De acordo com Saeki et al. (2011), o mecanismo de ação da própolis ocorre principalmente
162 sobre a permeabilidade da membrana interna bacteriana aos íons, causando assim a dissipação do
163 potencial de membrana. Como o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana é essencial
164 para o micro-organismo, por manter a síntese de ATP, o transporte através da membrana plasmática e
165 a motilidade, tal ação pode, conseqüentemente, contribuir muito sobre a ação citotóxica da própolis,
166 podendo ainda diminuir a resistência das células a outros compostos bacterianos. Este fato justifica a
167 ação sinérgica entre a própolis e alguns antibióticos (KROL et al., 1993).

168

169 **Estudos *in vitro* e *in vivo* da ação da própolis frente bactérias causadoras de mastite bovina**

170 Estudos *in vitro* demonstram a eficácia antibacteriana de extratos de própolis frente a espécies
171 bacterianas causadoras da mastite bovina (LOGUERCIO et al., 2006). Langoni et al., (1994)
172 evidenciaram a eficácia de extrato de própolis verde produzido por abelhas *Apis mellifera*, oriundo de
173 um apiário do município de Botucatu/São Paulo, onde houve 100% de inibição do crescimento de
174 estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis*, e 90 e 91% de inibição de *Streptococcus*
175 *agalactiae* e *Escherichia coli*, respectivamente.

176 Entretanto, Bankova et al., (1999), avaliou três amostras de óleos essenciais de própolis, oriundos
177 de três espécies de abelhas melíferas distintas: *Meliponacompressites* do estado do Piauí,
178 *Tetragonaclavipes* e *Melipona quadrifasciata anthidioides* do estado do Paraná frente aos agentes
179 bacterianos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e, por meio da metodologia de disco-difusão
180 obtiveram como resultados, baixa atividade contra *S. aureus* e nenhuma atividade contra *E. coli*.

181 Farnesi (2007) avaliou a atividade antimicrobiana da própolis produzida por abelhas africanizadas:
182 *Apis mellifera* (própolis verde) e abelhas meliponas: *Tetragonisca angustula*, *Plebeia droryana*,
183 *Scaptotrigona bicpunctata*, *Frisiometitta varia* e *Nannotrigonatestaceicornis*, através da técnica de
184 Microdiluição em Caldo e concluiu que a própolis de abelhas africanizadas (própolis verde) foi mais
185 eficaz que a própolis de abelhas sem ferrão frente aos micro-organismos testados: *Staphylococcus*
186 *aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, não obteve
187 resultados significativos das amostras de própolis de abelhas meliponas frente a estes micro-
188 organismos. Quanto ao perfil cromatográfico das amostras, a própolis verde obteve como
189 componentes majoritários, os ácidos cafeico e p-cumárico, 3-prenil p-cumárico, 3-5diprenil-p-
190 cumárico e compostos minoritários, flavonoides. Quanto às amostras da própolis de abelhas sem
191 ferrão, encontraram-se componentes com polaridades distintas, possivelmente ácidos fenólicos,
192 fenilpropanóides ou flavonóides. Resultados estes de cromatografia, que justificam os dados obtidos
193 na atividade antimicrobiana, já que os compostos identificados como majoritários na própolis verde
194 são descritos pela sua ação eficaz contra agentes bacterianos (MARCUCCI et al., 1996; PINTO et al.,
195 2001; SANTANA et al., 2012).

196 Loguercio et al., (2006), avaliaram a atividade de uma amostra de própolis obtida de um apiário
197 comercial da região de Santa Maria, RS, contra bactérias causadores da mastite bovina, comparando
198 aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento convencional (Ampicilina (10µg),
199 Cefoperazone (75 µg), Gentamicina (10 µg), Lincomicina(2 µg), Neomicina (30 µg), Nitrofurantoína
200 (300 µg), Norfloxacin (10 µg), Oxacilina (1 µg), Penicilina (10 UI), Sulfazotrim (25 µg), Tetraciclina
201 (30 µg) e Tiamulin(30 µg). Utilizaram 36 isolados coagulase-positivos de *Staphylococcus* sp. e 27
202 isolados de *Streptococcus* sp. E como resultados, obtiveram frente ao gênero *Staphylococcus*, maior
203 porcentual de linhagens sensíveis ao extrato de própolis e Sulfazotrim (94,44%), quanto ao ao gênero
204 *Streptococcus* obtiveram maior número de linhagens sensíveis à Ampicilina (92,59%) seguido do
205 extrato de própolis, que inibiu o crescimento de 85,18% dos isolados.

206 Estudo semelhante foi desenvolvido por Saeki et al., (2011), avaliando uma amostra de própolis
207 proveniente da região de Marechal Cândido Rondon - PR, cuja flora apícola é composta
208 principalmente pelas espécies: *Plathyeniafoliosa*, *Hovenia dulcis*, *Parapiptadenia rígida*, *Mimosa*
209 *binucronata* e *Cordia trichotoma* frente a *Staphylococcus aureus* oriundo de amostras de leite
210 provenientes de 63 animais portadores de mastite, e verificaram o seu perfil de sensibilidade
211 antimicrobiana aos antibióticos comerciais e ao extrato de própolis à 30%. Dos 38 animais que
212 apresentaram crescimento de *Staphylococcus aureus*, 35 (92,10%) apresentaram sensibilidade ao
213 extrato de própolis a 30%, com diâmetros de inibição entre 6 e 18 mm frente a volumes de 40µL e 60
214 µL. E a composição química obtida por meio do teor total de flavonóides e fenólicos obtiveram-se
215 teores de 55,5% e 1,19% de compostos fenólicos e flavonóides, respectivamente. Compostos estes,
216 conhecidos por suas atividades antimicrobianas, especialmente frente bactérias (MARCUCCI et al.,
217 1996).

218 Estudos como estes demonstram *in vitro* a eficácia da utilização da própolis frente aos principais
219 agentes da mastite bovina, sobretudo *Staphylococcus aureus*, micro-organismo de extrema
220 importância na etiologia da doença.

221 Resultados semelhantes obtidos pelos autores corroboram com estudos anteriores, onde se utilizou
222 diferentes extratos hidroalcoólicos de própolis: própolis marrom, verde e própolis de abelhas sem
223 ferrão jataí, frente a uma amostragem de 300 isolados bacterianos causadores de mastite bovina. Os
224 resultados demonstraram resistência das bactérias Gram negativas (*Escherichia coli*) frente aos três
225 tipos de própolis utilizados no trabalho, onde obteve-se como Concentração Inibitória Mínima (CIM)
226 50mg/mL e 25mg/mL para própolis de abelhas jataí e própolis marrom e verde, respectivamente. No
227 entanto, para bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*,
228 *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*), os três extratos apresentaram ação significativa
229 superior frente aos micro-organismos. Sobretudo, a própolis marrom que para *S. aureus* obteve-se
230 CIM 6,25mg/mL e para bactérias do gênero *Streptococcus* alcançou $CIM \leq 0,78\text{mg/mL}$.

231 Vargas et al. (2004) explicam a diferença de sensibilidade encontrada entre as bactérias Gram
232 positivas e Gram negativas, propondo que bactérias Gram positivas mostram-se mais suscetíveis à
233 própolis pela ação dos compostos sobre a parede celular das bactérias Gram positivas. Quanto às
234 bactérias Gram negativas, apesar de sua parede celular não ser tão rígida quanto das Gram positivas,
235 quimicamente é mais complexa e possui maior teor lipídico.

236 Sugere-se que a causa da ação bactericida sobre o gênero *Staphylococcus* seria o resultado de uma
237 ação conjunta de vários componentes, uma vez que nenhum deles possui relativa atividade quando
238 testado isoladamente (SAEKI et al., 2011). Resultados semelhantes encontrados por Bankova et al.
239 (1996), estudando o efeito a ação antibacteriana de ácidos diterpênicos de uma amostra de própolis
240 brasileira, verificaram que nenhum componente isolado possuía atividade antibacteriana sobre
241 *Staphylococcus aureus* tão eficaz quanto a utilização do extrato.

242 Autores relatam que a combinação de extratos de própolis com antimicrobianos comerciais possa
243 permitir a redução da dose clínica de determinados antibióticos, e assim, diminuir a incidência de
244 efeitos colaterais e ao mesmo tempo potencializar a antibioticoterapia no tratamento de infecções onde
245 a resistência bacteriana torna-se fator determinante (PINTO et al., 2001; SILVA, 2010; SANTANA et
246 al., 2012; VIGNOTO et al., 2014).

247 Em seus trabalhos Krol et al. (1993), estudaram oito distintos antibióticos (penicilina G,
248 doxiciclina, estreptomicina, cloranfenicol, cefradina, ampicilina e polimixina B) e o efeito descrito foi
249 significativo apenas nas concentrações 600 µg/mL de extrato etanólico. Ao encontro, Kedzia &
250 Holderna (1986), em experimento utilizando *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos,
251 quando testados frente à mistura de extrato de própolis e antibiótico, demonstraram que cerca de 70%
252 dos testes, encontraram a CIM menor que o verificado com antibióticos apenas.

253 Santana et al. (2012), estudaram o efeito de um extrato etanólico de própolis verde frente a cepas
254 de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina. Neste, observaram a eficácia do extrato

255 frente ao *S. aureus* crescidos em meios sintéticos e também leite, observação de uma possível seleção
256 das células bacterianas resistentes à própolis quando expostas a concentrações sub-inibitórias e
257 observaram através da microscopia de força atômica a influência da própolis sobre a célula bacteriana.
258 Obtiveram como resultados que o extrato alcóolico apresentou efeitos bacteriostáticos, porém sem
259 efeito bactericida e que, a dose utilizada deveria ser no mínimo 20 vezes maior para eliminação do
260 agente. As culturas de *S. aureus* não sofreram seleção quando expostas pelo menos a 60 gerações com
261 doses sub-letais, não ocasionando mudança significativa na sensibilidade da célula. E por fim,
262 observaram na microscopia de força atômica mudanças na morfologia e tamanho celular do micro-
263 organismo exposto ao extrato de própolis (0,5 mg mL⁻¹). Os autores sugerem, contudo que a utilização
264 de extrato de própolis combinado ou não com outros agentes antimicrobianos pode ser útil para o
265 controle de mastites *in vivo*.

266 Há poucos trabalhos na literatura científica sobre o uso de extratos de própolis/e ou seus
267 derivados no tratamento ou prevenção da mastite em bovinos. O primeiro relato na literatura da
268 utilização de protocolo de tratamento da mastite bovina por extrato de própolis foi em 1980, por
269 Mirolyubov e Baskov (1980). Neste estudo, foi pesquisada a eficácia da cura de diversas mastites
270 bovina, através da utilização de duas bases de extrato alcóolico de própolis com diferentes
271 concentrações. Nos animais que apresentavam a mastite serosa e catarral, aplicou-se por via
272 intramamária, 5 mL, 2 vezes ao dia e 7mL “overnight” de uma pomada com 2% de extrato de
273 etanólico de própolis. E para as mastites de caráter purulenta e hemorrágicas, aplicou-se uma pomada
274 com 5%, com a mesma posologia anteriormente citada. Como resultados, obtiveram que a produção
275 dos animais foi recuperada em 97% dos animais com mastite serosa, 96% catarral, 72% purulenta e
276 83% da mastite hemorrágica. Segundo os autores, apenas dois animais apresentaram a mastite de
277 caráter purulento, com o endurecimento do tecido glandular infectado, resultando em uma recuperação
278 de apenas 50% da produção de leite. Deste modo, os autores concluíram que a utilização das pomadas
279 a base de própolis a 2 e 5% de concentração para o tratamento de diversos tipos da mastite bovina,
280 resulta em um ótimo efeito terapêutico, agindo diretamente no processo de cura.

281 Meresta et al. (1989), testaram um protocolo para tratamento da mastite bovina com um
282 extrato de própolis. Como resultado do tratamento foi obtido a recuperação completa de 86,6% das
283 vacas que apresentaram mastite aguda, em 100% dos casos de infecção causadas por *Candida albicans*,
284 85% por *Escherichia coli*, 91% por *Staphylococcus* sp. e 84,3% por *Streptococcus* sp. Diante desses
285 resultados, os autores concluíram que a utilização da própolis apresenta-se bastante eficaz na terapia
286 de mastite causada por micro-organismos resistentes aos antibióticos convencionais.

287 Langoni et al., (1995), testaram a eficácia antibacteriana de um extrato de própolis oriunda de
288 um apiário do município de Botucatu/São Paulo. Avaliaram diferentes opções terapêuticas para o
289 controle de mastite causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros naturalmente infectados,
290 utilizaram a formulação de própolis a 30% preparada em solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 20%,
291 para facilitar a difusão no parênquima mamário. Realizaram o tratamento intramamário, após ordenha

292 completa, de manhã e à tarde, durante cinco dias, com 15 a 20 mL da formulação na dependência do
293 tamanho da glândula mamária ou quarto afetado. E como resultados alcançaram a cura clínica e
294 microbiológica em 84,8% dos tetos tratados.

295 Andrade (2010) testou o potencial antibacteriano de uma amostra de própolis originária do
296 município de União da Vitória/Paraná. Em seu estudo, através da preparação de um extrato
297 hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina, testou a eficácia deste frente às cepas de
298 *Staphylococcus aureus*, e ainda determinou a redução da contagem de mesófilos da superfície dos
299 tetos da glândula mamária. Testou a ação do extrato mediante a formação de dois grupos. No grupo 1:
300 6 animais, o tratamento foi iodo glicerinado (0,5%) e o grupo 2: 6 animais, tratamento foi o extrato
301 hidroalcoólico de própolis. Obteve 443 isolamentos bacterianos, os micro-organismos isolados com
302 maior frequência foram *Staphylococcus* spp. (33,2%), *S.aureus* (19,86%) e *Streptococcus agalactiae*
303 (13,7%). E como resultados, o extrato de própolis apresentou uma CIM de 155,46 mg/mL e
304 significativa ação inibitória sobre as cepas de *S.aureus* quando comprado ao grupo controle
305 considerável redução do Log UFC/cm² de bactérias mesófilas nas superfícies dos tetos.

306 Peixoto et al. (2012), utilizaram 72 animais da raça holandesa positivos ao testes do CMT
307 (*California mastitis test*) e de tamis para avaliação de um extrato de própolis e sua eficácia frente a
308 agentes microbianos causadores da mastite bovina. Dessa forma, os animais foram divididos em três
309 grupos, cada tratamento foi constituído de 17 animais, exceto grupo controle que recebeu apenas
310 solução inerte. Os animais referentes ao grupo 1 receberam 10 mL de extrato alcoólico de própolis a
311 30%, receberam 10 mL por via oral, durante sete dias consecutivos, após cada ordenha. Os animais
312 referente ao grupo 2, além do procedimento descrito para o grupo anterior, foram submetidos à 5 mL
313 do extrato de própolis para imersão dos tetos, no momento imediatamente anterior e posterior à
314 ordenha; diariamente. Porém, os autores não obtiveram resultados significativos, já que os grupos não
315 apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, aos sete e 14 dias após realização dos mesmos,
316 além de os animais apresentarem uma alta contagem de células somáticas ao decorrer do trabalho (174
317 amostras que apresentaram CCS acima de 200 mil células por mL).

318

319 **Conclusão**

320 A própolis evidenciou efeito *in vitro* e *in vivo* frente a bactérias causadoras da mastite bovina e
321 evidenciou seu potencial como alternativa ao uso de antimicrobianos convencionais ao tratamento da
322 doença. Contudo, apesar destes resultados satisfatórios obtidos nos trabalhos científicos, há poucos
323 estudos da eficácia utilizando ambos modelos (*in vitro* e *in vivo*) de inocuidade relatados na literatura.
324 Mais estudos *in vivo* devem ser desenvolvidos, pois há a necessidade da realização de ensaios clínicos
325 capazes de determinar a dosagem terapêutica e seu real efeito na espécie bovina.

326

327

328

329 **Referências bibliográficas**

330

331 ADELMANN, J. Própolis: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade
332 antimicrobiana/antioxidante. *Dissertação de mestrado*, área: Ciências Farmacêuticas, Programa de
333 Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005

334

335 ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; GUZMÁN, J.P.; PARK, Y.P. Composição química de *Baccharis*
336 *dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Ciência Rural*.
337 v.35, n.4, p.909-915, julho/agosto. 2005.

338

339 ANDRADE, U.V.C. Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise
340 alcalina para a inibição de cultivos de *Staphylococcus aureus* e higienização de pré e pós - imersão de
341 tetos de vacas leiteiras. *Tese de Doutorado*, área: Tecnologia de alimentos, Programa de Pós-
342 Graduação em Tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2010.

343

344 BASTOS, E.M.A.F.; GALBIATI, C.; LOUREIRO, E.M.; SCOARIS, D.O. Indicadores físico-
345 químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. *Arquivo Brasileiro*
346 *Medicina Veterinária Zootecnia*.v.63, n.5, p.1255-1259. 2011.

347

348 BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; SIMOVA, S.; NIKOLOVA, N.; KUJUMGIEV, A.; POPOV, S.
349 Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*. v. 51, n. 5/6, p.
350 277-280.1996.

351

352 BANKOVA, V. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo
353 state. *Zeitschrift für Natur for schung C - A Journal of Biosciences, Tubingen*. v.54, p.401-405.1999.

354

355 BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and
356 plant origin. *Apidologie*.v.3, p.3-15. 2000.

357

358 BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and*
359 *Chemical Toxicology* .Oxford, v.36, n.4, p.347-363.1998.

360

361 BUSATO, A.; TRACHSEL, P.; SCHALLIBAUM, M.; BLUM, J.W. Udder health and risk factors for
362 subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine*. v. 44, p.
363 205-220. 2000.

364

- 365 CAMPOS, J.F.; SANTOS, U.P. dos; MACORINI, L.F.B.; MELO, A.M.M.F.de; BALESTIERI,
366 J.B.P.;PAREDES-GAMERO, E.J.; CARDOSO, C.A.L.; SOUZA, K.de P.; SANTOS, E.L.
367 Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (*Hymenoptera*,
368 *Apidae*). *Food and Chemical Toxicology*. v. 65 p.374–380. 2014.
- 369
- 370 COSTA, G.M.da.; BARROS, R.A.; CUSTÓDIO, D.A.da.; PEREIRA, U.de P.; FIGUEIREDO, D.J.;
371 SILVA, N.da S. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em
372 bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. *Arquivo do Instituto Biológico*. São Paulo, v.80, n.3, p. 297-
373 302. 2013.
- 374
- 375 FARNESI, A.P. Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em micro-organismos.
376 *Dissertação de mestrado*, Área em Ciências- Genética, Universidade de São Paulo. 2007.
- 377
- 378 FREITAS, M.F.L.; JUNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.;
379 SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in*
380 *vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do
381 Estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico*. São Paulo, v.72, n.2, p.171-177.2005.
- 382
- 383 GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATELY, F.R. The composition and plant origin of
384 propolis: a report of work at Oxford. *Bee World*. v.71, p.107–118.1991.
- 385
- 386 KEDZIA, B. e HOLDERNA, E. Investigations upon the combined action of antibiotics and propolis
387 on *Staphylococcus aureus*. *Herba Polonica*.v.32, p.187-195. 1986.
- 388
- 389 KERR,D. E. e WELLNITZ, O. Mammary expression of new genes to combat mastitis. *Journal*
390 *Animal Science*.v. 81, p. 38-47. 2003.
- 391
- 392 KROL, W.; SCHELLER, S.; SHANI, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z.Synergistic effect of ethanolic
393 extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittel-*
394 *Forschung*.v.43, n.5, p.607-609. 1993.
- 395
- 396 LAFFRANCHI, A.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. Etiologia das infecções intramamárias em vacas
397 primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. *Ciência Rural*. v.31, n.6, p.1027-1032.
398 2001.
- 399

- 400 LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; FUNARI, S.R.C.; CHANDE, C.G.; NEVES, I.R. Efeito
401 antimicrobiano “in vitro” da própolis. *Arquivo Brasileiro Veterinária e Zootecnia*. v. 48, p. 227-229.
402 1994.
- 403 LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; SILVA, R.F.; TAVARES, H.L.; MOTA, R.A.; ROCHA, N.S.
404 *Prototheca zopfii* como agente de mastite bovina: Clínica e Terapêutica. *Arquivo Brasileiro Medicina*
405 *Veterinária Zootecnia*.v.47, p.727-752.1995.
- 406
- 407 LOGUERCIO, A. P.; GROFF, A.C.M.; PEDROZZO, A.F.; WITT, N.M.; SÁ E SILVA,
408 A.M.; VARGAS, A.C. Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite
409 bovina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 41, n.2, p.347-349. 2006.
- 410
- 411 LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; NETO, J.R. Própolis:
412 atualizações sobre a química e a farmacologia. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*.v.18, n.3, p. 447-
413 454, Jul./Set. 2008.
- 414
- 415 MARCUCCI, M. C.; DE CAMARGO, F. A.; LOPES, C. M. A. Identification of aminoacids in
416 Brazilian propolis. *Z Naturforsch C, Tübingen*.v.51, n.1-2, p.11-14. 1996.
- 417
- 418 MARTINS, R.P.; SILVA, J.A.G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA FILHO E.S.
419 Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. *Ciência Animal*
420 *Brasileira*. v.11, n.1, p.181-187. 2010.
- 421
- 422 MENDONÇA, E.C.L.; MARQUES, V.F.; MELO, D.A.; ALENCAR, T.A.; COELHO, I.da S.;
423 COELHO, S.M.O.; SOUZA, M.M.S. Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em
424 *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.32, n.9, p.859-
425 864, setembro. 2012.
- 426
- 427 MERESTA, L.; MERESTA, T.; BURDZINSKI, J.; CHMURZYNSKI, P. Treatment of mastitis in
428 cows using an extract of propolis. *Medycyna Weterinarna*. v.45, p.392-395.1989.
- 429
- 430 MIROLYUBOV, M.G.; BARSKOV, A.A. Propolis for bovine mastitis. *Veterinariya*. n. 2, p. 45-
431 46.1980.
- 432
- 433 MIDORIKAWA, K.; BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; NAGAOKA, T.; MATSUSHIGE, K.;
434 MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.G.; KADOTA, S. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
435 Analysis of Propolis. *Phytochemical Analysis*.v.12, p. 366-373. 2001.

- 436 OLIVEIRA M.C.S. Manejo sanitário em sistemas intensivos de produção de leite. (Embrapa Pecuária
437 Sudeste. *Circular técnica, 18*). São Carlos: EMBRAPA - CPPSE, 22p. 1999.
438
- 439 OLIVEIRA, C.M.C.; SOUSA, M.G.S.; SILVA, N.S.; MENDONÇA, C.L.; SILVEIRA, J.A.S.;
440 OAIGEN, R.P.; ANDRADE, S.J.T.; BARBOSA, J. D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na
441 bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*.v.31, n.2, p.104-110.
442 2011.
443
- 444 ORTEGA, N.S.; CAMPO, N.B.; CABEZAS-FAJARDO, F.A. Actividad antibacteriana y composición
445 cualitativa de propoleos provenientes de zonas climáticas del Departamento del Cauca. *Artículos de*
446 *Investigación Científica y Tecnológica*. v.9, n. 1, p. 8-16, julho. 2011.
447
- 448 PARDO, P.E. Infecções intramamárias em novilhas: 1 –Etiologia das infecções intramamárias em
449 novilhas no período pós-parto; 2 – Mastite em novilhas por *Mycoplasma bovis*.*Dissertação*
450 *Mestrado*, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 1997.
451
- 452 PARK, Y. K. Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological
453 activity. *Honey be Science*, Tamagawa. v.21, n.2, p.85-90. 2000.
454
- 455 PEIXOTO, E.C.T.M.; JARDIM, J.G.; HEINZEN, E.L.; DOMINGUES, P.F.; PADOVANI, C.R.;
456 ORSI R. de O. Própolis no controle da mastite bovina. *Archives of Veterinary Science*.v.17, n.4, p.43-
457 52. 2012.
458
- 459 PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas
460 perspectivas futuras. *Química Nova*.v.25, p.321-326. 2002.
461
- 462 PINTO, M.S.; FARIA, J.E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSO, M.M.;
463 Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas de leite de vacas
464 com mastite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*.v.38, p.278-283.2001.
465
- 466 RANJAN, R.; SWARUP, D.; PATRA, R.C. Bovine protothecal mastitis: a review. *Perspectives in*
467 *Agriculture, Veterinary Sciences, Nutrition and Natural Resources*.v.1, n.17, p.1-7, 2006.
468
- 469 SAEKI, E. K.; PEIXOTO, E. C. T. de M.; MATSUMOTO, L. S.; MARCUSO, P. F.; MONTEIRO
470 R.M. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: Sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao
471 extrato alcoólico de própolis. *Acta Veterinária Brasílica*.v.5, n.3, p.284-290.2011.
472

- 473 SANTANA, H. F.; BARBOSA, A.A.T.; FERREIRA, S.O.; MANTOVANI, H.C. Bactericidal activity
474 of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *World*
475 *Journal of Microbiology and Biotechnology*. v.28, p.485–491. 2012.
- 476
- 477 SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. *Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do*
478 *leite*. São Paulo: EditoraManoleLtda, , 314p. 2007.
- 479
- 480 SCHLEGELOVÁ, J.; DENDIS, M.; BENEDÍK, J.; BABÁK, V.; RYSÁNEK, D. *Staphylococcus*
481 *aureus* isolates from dairy cows and humans on far differ in coagulase genotype. *Veterinary*
482 *Microbiology*. v.92, p.327-334. 2003.
- 483
- 484 SFORCIN, J.M., BANKOVA,V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs?
485 *Journal Ethnopharmacology*. v.27, ed. 133, n.2, p.253-60, janeiro. 2011.
- 486 SILVA, N. C. C. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas
487 medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. *Dissertação de mestrado*, Área de concentração
488 Biologia de parasitas e microrganismos, Universidade Estadual Paulista. 2010.
- 489
- 490 SILVA, R.M.da.; RIBEIRO, A.B.; Resíduos de antibióticos no leite. *SaBios: Revista Saúde e*
491 *Biologia*.v.7, n.1, p.30-44, jan./abril. 2012.
- 492
- 493 SIMONE-FINSTROM M. e SPIVAK, M. Propolis and bee health: the natural history and significance
494 of resin use by honey bees. *Apidologie*.v.41, p.295–311. 2010.
- 495
- 496 TAKAISI-KIKUNI, N. B.; SCHILCHER, H. Electron microscopicandmicrocalorimetric
497 investigations of the possible mechanism of the antibacterial laction of a defined propolis provenance.
498 *Planta Medica*.v. 60, n. 3, p. 222-227. 1994.
- 499
- 500 TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.M.S.A.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origin of
501 Green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evidence-Based Complementary and*
502 *Alternative*. v.2, p.85–92. 2005.
- 503
- 504 TRONCARELLI, M.Z.; BRANDÃO, H.de M.B.; GERN, J.C.; GUIMARÃES, A.de S.; LANGONI,
505 H. Mastite bovina sob nanocontrole: a própolis nano estruturada como nova perspectiva de tratamento
506 para rebanhos leiteiros orgânicos. *Veterinária e Zootecnia*. v 20, p. 124-136. 2013.
- 507

- 508 TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; NAYDENSKI, H.; TSVETKOVA, I.; RODRIGEZ, J.G.;
509 BANKOVA, V. New poly isoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapia*. v.75, p.
510 683 – 689. 2004.
511
- 512 VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato
513 alcóolico de própolis. *Ciência Rural*. v. 34, n. 1, p. 159-163. 2004.
514
- 515 VICARIO, P.P; GRIGORIAN, I.A; PASCOE, B.S.J.P. A rapid method for testing the efficacy of teat
516 dip formulations as bactericidal agents for the control of bovine mastitis. *Journal of Veterinary*
517 *Medicine and Animal Health*. v. 1, n.1, p. 01-04. 2009.
518
- 519 VIGNOTO, V. K. C.; NAKADOMARI, G. H.; BORDIN, J. T.W; WOSIACKI, S. R. Avaliação do
520 sinergismo e antagonismo do extrato de própolis com antibacterianos em isolados bacterianos de urina
521 de animais. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*. v. 1, supl. 1, p. 076. 2014.
522
- 523 ZANETTE, E.; SCAPIN, D. e ROSSI E.M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*
524 isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. *Unoesc & Ciência –ACBS*. v.1, n.1,
525 p.65-70. 2010.
526
527
528
529
530
531
532
533
534

3.2 Artigo 2

Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) frente a micro-organismos infecciosos de interesse em Medicina Veterinária e Humana

Cristina Mendes Peter, Tony Picoli, João Luíz Zani, Giulia Soares Latosinski, Maria Cristina Marcucci, Marcelo de Lima, Gilberto D Ávila Vargas, Silvia Oliveira Hübner, Geferson Fischer

Será submetido à revista Journal of Natural Products

1 **Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde**
2 **e de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) frente a micro-organismos infecciosos de**
3 **interesse em Medicina Veterinária e Humana**

4
5 Cristina Mendes Peter^{*(A, B)}, Tony Picoli^(B), João Luiz Zani^(A), Giulia Soares
6 Latosinski^(A); Fernando da Silva Bandeira^(B), Marcelo de Lima^(B); Gilberto D'Ávila
7 Vargas^(B); Silvia Oliveira Hübner^(B), Maria Cristina Marcucci^(C), Geferson Fischer^(B)

8
9 ^(A)Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Faculdade de Veterinária. Laboratório de
10 Bacteriologia e Saúde Populacional. Caixa postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS. E-mail:
11 cristina_peter@hotmail.com.

12 ^(B)Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Virologia
13 e Imunologia. Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS.

14 ^(C)Universidade Anhanguera de São Paulo, Campus Vila Guilherme, Faculdade de Farmácia, Laboratório de
15 Produtos Naturais e Quimiometria. Cx Postal 21158, CEP 02071-013, São Paulo, SP.

16
17 **Resumo** – Dentre as propriedades biológicas da própolis, a atividade antimicrobiana tem
18 merecido destacada atenção. No presente trabalho, descreve-se a atividade antimicrobiana
19 (antibacteriana, antifúngica, antiviral e virucida) de três extratos hidroalcoólicos de própolis:
20 marrom, verde e de abelhas jataí. A atividade antibacteriana da própolis foi avaliada frente à
21 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus*
22 *agalactiae* e *Escherichia coli*. Para a atividade antifúngica, os extratos foram avaliados frente
23 à *Candida lipolytica*, *Candida parapsilosis*, *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis*. E
24 para atividade antiviral e virucida, foram avaliados frente a Herpes Virus Bovino tipo-1 e
25 Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). A análise dos extratos de própolis através da
26 cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) identificou a presença de ácido fenólicos:
27 ácido cafeico e ácido p-cumárico e flavonóides: crisina, galangina e Artepillin C. A atividade
28 antibacteriana e antifúngica dos extratos foram avaliadas através de Microdiluição em caldo.
29 A atividade antiviral bem como a citotoxicidade dos extratos aos cultivos celulares foram

30 avaliadas através do MTT [3- (4,5 dimetiliazol-2yl)-2- 5-difenil-2H tetrazolato de bromo]. E
31 para atividade virucida foram utilizados diferentes diluições dos vírus, bem como
32 temperaturas e tempos distintos de incubação. Os três extratos evidenciaram atividade
33 antibacteriana e antifúngica, sobretudo a marrom. No entanto, os extratos de própolis verde e
34 jataí apresentaram melhor efeito quando testados frente ao BVDV e BoHV-1,
35 respectivamente. Em resumo, a própolis apresentou atividade antimicrobiana frente aos
36 agentes infecciosos testados o que a torna alvo para o desenvolvimento de novos compostos
37 naturais com atividade antimicrobiana.

38

39 **Palavras-chave:** Própolis. Atividade antibacteriana. Atividade antifúngica. Atividade
40 antiviral e virucida. Citotoxicidade.

41

42 **1) Introdução**

43 A busca por recursos genéticos e bioquímicos que possam ser transformados ou que
44 contenham moléculas bioativas com potencialidade terapêutica, tem sido alvo de intensas
45 investigações que contemplem produtos naturais (1). Ainda que esses estudos demonstrem
46 principalmente a atividade biológica de produtos vegetais, outras substâncias como a própolis
47 tem conquistado espaço significativo na busca por alternativas a utilização de fármacos
48 comerciais e, conseqüentemente, a formulação de novas drogas com a utilização da própolis.

49 A própolis é uma substância resinosa, produzida pelas abelhas a partir do exsudato de
50 diversas partes das plantas (2). Esses constituintes são biotransformados pela adição de cera e
51 pela ação da enzima 13-glicosidase, produzida nas glândulas salivares das abelhas (1). A
52 palavra própolis (do grego pro = “na defesa” ou “para”, e polis = “cidade”) demonstra a sua
53 importância para a as abelhas, uma vez que elas a depositam nas colmeias, onde tem função
54 importante de vedar frestas, manter a temperatura interna estável, recobrir o corpo de animais

55 mortos que venham entrar na colmeia e, conseqüentemente, proteção contra a proliferação de
56 micro-organismos (3).

57 A composição química da própolis é resultante, principalmente, das características
58 fitogeográficas existentes ao redor da colmeia (5), como as plantas fornecedoras de resina e a
59 espécie de abelha coletora. Esta característica reflete na diversidade de atividades biológicas e
60 farmacêuticas apresentadas por este produto. A composição química é derivada de uma série
61 de substâncias bioativas: ceras, resinas, bálsamos, óleos essenciais e pólen e outros compostos
62 como ácido cinâmico, compostos fenólicos e flavonoides, terpenos, ácidos aromáticos
63 derivados do ácido cafeico, ácidos graxos e aminoácidos. Destacam-se os flavonoides e
64 ácidos fenólicos, os quais conferem efeitos terapêuticos à própolis (5,6).

65 Na literatura observa-se que grande parte dos trabalhos científicos sobre as atividades
66 terapêuticas e biológicas da própolis estão associadas à espécie de abelha *Apis mellifera*,
67 pertencente à subfamília *Apidae*. No entanto, estudos utilizando a própolis de origem de
68 abelhas sem ferrão tem sido descritos, demonstrando seu potencial terapêutico, como a
69 atividade antimicrobiana (7), antioxidante (8) e antitumoral (9).

70 As abelhas sem ferrão são reunidas na superfamília *Apoidea* e são popularmente
71 conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão (10). Um exemplo desta família é a
72 *Tetragonisca angustula*, uma abelha de pequeno porte, popularmente conhecida como jataí,
73 nativa do Brasil, com ampla ocorrência no Rio Grande do Sul (11).

74 Em seus estudos Sawaya et al. (12), utilizando a própolis de *Apis mellifera* e
75 *Tetragonisca angustula* de diferentes regiões do Brasil, obtiveram resultados através da
76 cromatografia líquida de alta eficiência que a própolis de *Tetragonisca angustula* obteve
77 composição química semelhante ao de *Apis mellifera* a partir das amostras coletadas em todo
78 Brasil. No entanto, a composição da própolis de *Apis mellifera* foi distinta entre as amostras
79 coletadas desta espécie de abelha, ou seja dependente da região coletada. Ainda, os autores

80 relatam que esta característica da *Tetragonisca angustula* possivelmente seja pela sua
81 preferência a resinas de uma fonte vegetal brasileira preferida a *Schinus terebinthifolius*, de
82 ampla distribuição no Brasil, popularmente conhecida como “Aroeira vermelha”.

83 Park et al. (13) sugeriram que a própolis brasileira é classificada em 12 tipos
84 diferentes, segundo o perfil químico obtido pelas técnicas de espectrofotometria de absorção
85 na região UV-visível, Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CCDAE) e
86 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), além da avaliação das atividades
87 antimicrobiana e antioxidante. Contudo Trusheva et al. (13), caracterizaram um novo tipo de
88 própolis no estado de Alagoas, na qual dois novos isoflavonóides foram identificados
89 (pterocarpano medicarpina e isoflavana isosativana). Essa amostra de própolis demonstrou-se
90 ser distinta das 12 anteriormente tipificadas por Bankova et al. (2), sendo assim denominada
91 de própolis vermelha e sua origem botânica predominante *Dalbergia ecastophyllum*,
92 popularmente conhecida como rabo-de-bugio (14).

93 Já foram descritas várias propriedades biológicas e farmacêuticas da própolis tais
94 como, atividades imunomoduladora (15,16), antitumoral (17), anti-inflamatória (18),
95 antioxidante (19), antibacteriana (20,21), antiviral (22,23), antifúngica (24,25), antiparasitária
96 (26), dentre outras propriedades. Esse potencial biológico atribui-se a um sinergismo que
97 ocorre entre os muitos constituintes presentes na própolis (30). Entretanto, a atividade
98 biológica de maior relevância é a antimicrobiana, sendo atribuída a presença de compostos
99 flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres (2).

100 Enquanto a atividade antimicrobiana da própolis de origem europeia atribui-se a
101 presença de flavonoides e derivados do ácido cafeico, no caso de amostras de própolis de
102 origem tropical, atribui-se aos ácidos fenólicos e derivados prenilados (26).

103 Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar três extratos hidroalcoólicos diferentes
104 de própolis: marrom, verde e de abelhas sem ferrão jataí (*Tetragonisca angustula*) frente a
105 agentes microbianos infecciosos de importância em Medicina Veterinária e Humana.

106

107 **2) Materiais e Métodos**

108 Os experimentos foram conduzidos em laboratórios pertencentes ao Departamento de
109 Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Pelotas, e Laboratório de Produtos
110 Naturais, Universidade Anhanguera, Campus Vila Guilherme, São Paulo.

111

112 **2.1) Própolis**

113 Amostras da própolis marrom foram adquiridas da Cooperativa de Apicultores e
114 Fruticultores da Região Sul, localizada no Município de Pelotas, RS; a própolis verde foi
115 adquirida comercialmente (Néctar Farmacêutica[®] LTDA), Santa Catarina e a própolis de
116 abelhas sem ferrão jataí foi obtida de um meliponário localizado no município de Morro
117 Redondo/RS.

118

119 **2.2) Preparação dos extratos hidroalcoólicos**

120 Os extratos hidroalcoólicos foram preparados conforme Paulino et al., (33). As
121 amostras de própolis foram congeladas a – 70° C para posterior trituração. A extração foi
122 realizada em solução contendo álcool 96° GL, sob agitação por 24 horas, a 37° C. Após, o
123 solvente foi evaporado e a matéria seca resultante foi dissolvida em tampão fosfato (pH 6,2),
124 para obtenção da concentração final de 100 mg/ml.

125

126 **2.3) Análise dos extratos de própolis por cromatografia líquida de alta eficiência CLAE**

127 A composição química dos extratos de própolis foi determinada pela cromatografia
128 líquida de alta eficiência (CLAE), usando aparelho Merck- Hitachi cromatógrafo (Alemanha),

129 equipado com bomba de pressão G-7100 e o arranjo dedetector diodos L-7455. A separação
130 foi realizada em um Lichrochart 125-4 (Merck, Darmstadt, Alemanha) como previamente
131 descrito Marcucci et al. (2001). A detecção de componentes foi monitorizada a 280 nm e
132 compostos padrão foram utilizados para compração após a injeção dos extratos. A análise dos
133 dados foi realizada usando a D-7000 da Merck-Hitachi (Cromatografia Dados da Estação,
134 DAD Manager). A análise qualitativa dos extratos de própolis foi realizada através do
135 Software HSM[®] versão 2.0 o qual possui uma biblioteca de identificação dos compostos
136 presentes na própolis através do tempo de retenção apresentado por cada substância.

137

138 **2.4) Ensaio da Atividade Antibacteriana**

139 Os micro-organismos testados foram bactérias Gram positivas (100 isolados de
140 *Staphylococcus aureus*, 62 de *Streptococcus dysgalactiae*, 20 de *Streptococcus uberis* e 18
141 *Streptococcus agalactiae*) e Gram negativas (100 isolados de *Escherichia coli*) pertencentes à
142 bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia e Saúde Populacional da Universidade Federal
143 de Pelotas. As amostras utilizadas são oriundas de leite bovino de tanques refrigeradores de
144 municípios da região sul do Rio Grande do Sul, as quais foram isoladas e identificadas
145 previamente por QUINN et al. (33).

146 A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pela técnica de Microdiluição
147 serial em placas de 96 cavidades, com o objetivo de determinar a Concentração Inibitória
148 Mínima (CIM), segundo diretriz Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), adaptada
149 para uso de produtos naturais M7-A6 (34). Os inóculos foram preparados a uma concentração
150 de $10^{(5-6)}$ Unidade Formadora de Colônia (UFC)/mL em Caldo BHI (Brain Heart Infusion,
151 Prolab[®]/São Paulo), concentração dupla. Foram realizadas oito diluições que variam de 100 à
152 0,78 mg/mL.

153 O valor da CIM foi determinado visualmente por comparação do crescimento
154 bacteriano com controle positivo (ATCC). A CIM foi definida como a menor concentração
155 capaz de promover inibição do crescimento bacteriano. Para obtenção dos valores da
156 Concentração Bactericida Mínima (CBM), alíquotas de 10 µL de todos os poços sem
157 crescimento bacteriano foram seriadas para placas de Petri contendo Agar BHI (Prolab®/São
158 Paulo) e incubadas a 37°C por 48 horas. A CBM refere-se à menor concentração capaz de
159 provocar eliminação bacteriana. Para controle positivo do teste foram usadas cepas ATCC
160 (*Staphylococcus aureus* 12600, *Escherichia coli* 8739 e *Streptococcus agalactiae* 13813) e
161 como controle negativo os extratos de própolis associado ao caldo BHI. Todos os testes
162 experimentais foram realizados em triplicata.

163

164 **2.5) Ensaio da Atividade Antifúngica**

165 Os micro-organismos utilizados no ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM)
166 foram 15 leveduras isoladas de leite bovino (9 *Candida lipolytica*, 6 *Candida parapsilosis*) e
167 3 cepas de *Sporothrix* na fase leveduriforme isoladas de pacientes das espécies humana e
168 animal (2 *Sporothrixschenckii* 1 *Sporothrix brasiliensis*), pertencentes ao Laboratório de
169 Micologia Veterinária da Universidade Federal de Pelotas e identificados (35).

170 Os testes *in vitro* foram realizados através da técnica de Microdiluição em Caldo
171 segundo as normas do documento M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute
172 (34), adaptada para uso de produtos naturais.

173 Para controle positivo do teste foi usada *Candida albicans* (ATCC 90028) e como
174 controle negativo extrato de própolis mais meio de cultura RPMI (Meio de cultura
175 desenvolvido por Roswell Park Memorial Institute).

176 Culturas fúngicas em Ágar BHI (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) a 35°C por 48
177 horas foram realizadas, sendo uma porção da colônia fúngicas transferida para um tubo

178 contendo solução salina e ajustada à escala McFarland 1.0 e, posteriormente, em
179 espectrofotômetro (Spectrum Instruments Co., Xangai, China) em absorvância de 530 nm e
180 absorção de 60-65%, 80-82%, para gênero *Candida* e *Sporotrix*, respectivamente. As
181 suspensões foram ajustadas em solução salina (1:100) e, posteriormente, em meio RPMI-1640
182 (Sigma, Steinheim, Alemanha) com tampão (1:20) para obtenção do inóculo final à
183 concentração de $1-5 \times 10^4$ UFC/mL.

184 Os extratos de própolis foram avaliados nas concentrações seriadas de 100 a 0,78
185 mg/mL. As microplacas foram incubadas a 35°C por 72 horas e o valor da concentração
186 inibitória mínima (CIM) foi determinado visualmente por comparação do crescimento fúngico
187 com controle positivo (ATCC). A CIM foi definida como a menor concentração capaz de
188 promover inibição do crescimento fúngico. Para obtenção dos valores da concentração
189 fungicida mínima (CFM), alíquotas de 10 µL de todos os poços sem crescimento fúngico
190 foram transferidas para placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud-dextrose (Acumedia,
191 Lansing, Michigan, EUA), acrescido de cloranfenicol, e incubadas a 35°C por 72 horas. A
192 CFM refere-se à menor concentração capaz de provocar eliminação do crescimento fúngico.
193 Todos os testes experimentais foram realizados em triplicata.

194

195 **2.6) Ensaios da Atividade Antiviral**

196 **2.6.1) Células e Vírus**

197 Células da linhagem MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) foram mantidas em meio
198 essencial mínimo (E-MEM, Sigma-Aldrich[®], USA) suplementado com soro fetal bovino
199 (SFB, Gibco[®], USA), penicilina (Sigma-Aldrich[®], USA), estreptomicina (Vetec[®], Brasil),
200 enrofloxacina (Bayer[®], Brasil) e anfotericina B (Cristália[®], Brasil) em placas de poliestireno
201 de 96 cavidades (KASVI[®], Brasil) a 37°C em um ambiente com 5% de CO₂ para
202 estabelecimento da monocamada. Esta linhagem foi selecionada, pois são permissíveis aos

203 vírus utilizados neste estudo, permitindo sua replicação e, assim possibilitando a visualização
204 dos efeitos citopático ao microscópio invertido.

205 A atividade antiviral e virucida dos extratos de própolis foram avaliadas frente aos
206 Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1, cepa Los Angeles) vírus da Diarreia Viral Bovina
207 (*Bovine viral diarrhea virus*, BVDV, cepa Singer) pertencentes ao Laboratório de Virologia e
208 Imunologia UFPel.

209

210 **2.6.2) Toxicidade Celular**

211 Em monocamadas de células MDBK foram adicionadas diferentes concentrações dos
212 extratos de própolis, 1000; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,09 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$.

213 As viabilidades celulares foram avaliadas pela observação microscópica diária das alterações
214 morfológicas das células e mensuradas pelo teste de MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-
215 difenil-2H tetrazolato de bromo) após 72 h de incubação. As leituras das densidades ópticas
216 foram quantificadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 480 nm. A
217 citotoxicidade expressa como concentração citotóxica 90% (CC90%): concentração capaz de
218 inibir 90% do cultivo celular em comparação com as células não tratadas. Os testes foram
219 realizados em quadruplicata, repetidos três vezes em dias diferentes.

220

221 **2.6.3) Atividade Antiviral**

222 A atividade antiviral foi avaliada através de dois métodos distintos de tratamento das
223 células com os extratos: Método I: Após inoculação viral (extratos adicionados após a
224 inoculação viral de 1h e mantidos). Método II: Antes da inoculação viral (24 h de contato
225 célula/extrato); Células permissivas foram cultivadas e infectadas com os vírus
226 correspondentes (100 μl / poço contendo 0,1 MOI de vírus) e tratadas com duas concentrações
227 tóxicas e duas não tóxicas obtidas anteriormente nos ensaios de citotoxicidade (3,12; 1,56;

228 0,78; 0,39 e 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, própolis de abelhas jataí e marrom e verde,
229 respectivamente).

230 A avaliação da atividade viral dos extratos de própolis foi quantificada após 72 h de
231 incubação a 37 °C através da viabilidade celular pelo método MTT, através da densidade ótica
232 por leitura em espectrofotômetro = 480nm. Nessas condições, foi determinada a concentração
233 efetiva a 50% (CE50), que representa a concentração do extrato de própolis capaz de inibir o
234 efeito citopático do vírus em 50%. O ensaio foi realizado em sextuplicata.

235

236 **2.6.4) Atividade Virucida**

237 A atividade virucida foi avaliada através de diferentes diluições dos vírus e avaliação
238 sob duas temperaturas diferentes (22 e 37°C) e seis tempos de incubação (0, 1, 2, 4, 8, 24
239 horas). Foram testados os três extratos de própolis nas concentrações não tóxicas para as
240 células obtidas anteriormente nos ensaios de citotoxicidade celular, porém 10 vezes mais
241 concentradas ($3,9 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para própolis marrom e verde, e $7,8 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para própolis de
242 abelhas jataí) e como controle negativo utilizou-se Tampão fosfato-salino (PBS e extrato de
243 própolis) e como controle positivo (PBS e vírus). Para cada diluição do vírus, foram feitas
244 seis repetições.

245 Inicialmente no tempo zero foram feitas diluições dos vírus a partir da concentração
246 inicial com as respectivas concentrações de própolis estipuladas. Após diluição os *ependorfs*
247 contendo o vírus e extratos de própolis foram incubados em estufa a 37°C e outro em
248 ambiente com temperatura controlada de 22°C durante 24 horas.

249 A sequência do teste procedeu da seguinte forma: diluição 10^{-1} e posteriormente
250 100 μL desta diluição eram adicionados em 900 μL de E-MEM, e assim sucessivamente
251 obtendo sete diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}). Depois de realizada as diluições,
252 100 μL de cada diluição em sextuplicata eram dispensadas nas placas contendo monocamadas

253 de MDBK e posterior incubação em estufa a 37°C durante 72 horas. Após incubação, a
254 avaliação da atividade virucida foi realizada através da viabilidade celular, pela observação
255 microscópica das alterações morfológicas das células e quantificadas por meio do cálculo da
256 Dose Infectante 50% (40).

257

258 **2.7) Análises estatísticas**

259 Para avaliação da atividade antimicrobiana dos três extratos de própolis foi realizado a
260 Análise de Variância (ANOVA), teste de comparação entre médias pelo teste Tukey. Foi
261 usado o Software Bioestat 5.3[®].

262

263 **3) Resultados e Discussão**

264

265 **3.1) Composição química dos extratos de própolis**

266 As análises dos extratos de própolis (própolis marrom, verde e de abelhas jataí)
267 utilizados no presente estudo estão apresentadas na Tabela 1. A análise dos extratos de
268 própolis através da Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE) identificou a presença
269 de ácidos fenólicos na própolis marrom e verde, como: ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido p-
270 cumárico. Já na própolis de abelhas jataí, apresentou composição química distinta da marrom
271 e verde, e identificou-se flavonóides como: ácido gálico, apiginina e galangina.

272 Na Tabela 1, é possível visualizar a presença de compostos diferentes diferentes entre
273 as amostras de própolis marrom, verde e de jataí. Diferenças qualitativas entre as amostras
274 foram detectadas, principalmente entre os diferentes extratos de própolis marrom e verde
275 quando analisadas frente a amostra de jataí.

276

277

278 **Tabela 1-** Identificação química dos compostos dos extratos de própolis marrom, verde e de
 279 abelhas jataí por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Extrato de Própolis	TR (Min)	Correspondência (0-100%)	Absorbância (0-2,0 Au)	Compostos
Própolis marrom	2,50	98	0,51	Ácido cafeico
	4,35	96	0,90	Ácido ferúlico
	19,95	97	0,17	Composto L2
	3,60	97	0,08	Composto G1
	32,35	97	0,42	Composto E
	29,39	97	0,73	Composto D
	3,89	97	0,5	Ácido pcumárico
	19,57	97	0,09	Composto B
	10,70	96	0,11	Composto H
	21,87	95	0,18	Pinobanksina-3acet.
Própolis verde	2,50	98	0,25	Ácido cafeico
	4,35	96	0,25	Ácido ferúlico
	19,95	97	0,10	Composto L2
	3,60	97	0,12	Composto G1
	32,35	97	0,30	Composto E
	29,39	97	0,23	Composto D
	3,89	97	0,12	Ácido pcumárico
	19,57	97	0,07	Composto B
	10,70	96	0,2	Composto H
	21,87	95	0,4	Pinobanksina-3acet.
Própolis de abelhas jataí	1,29	94	0,018	Ácido gálico
	10,70	92	0,01	Composto H
	15,98	96	0,18	Apigenina
	17,63	96	0,19	Apigenina-F
	19,66	96	0,11	Kaempferol
	21,25	94	0,23	Crisina
	21,72	91	0,19	Galangina
	21,89	93	0,2	Composto C
	32,35	93	0,01	Composto E
	33,07	93	0,08	Composto F

280 RT (min): Tempo de retenção; Correspondência (0-100%): Intervalo de confiança de cada composto; Au:
 281 Unidades de absorbância.

282

283 Como pode ser observado na (Tabela 1) a própolis marrom e a própolis verde
 284 produzidas por abelhas *Apis mellifera* foram similares na composição química, diferindo
 285 apenas na quantidade dos compostos identificados, visualido através da absorbâncias dos
 286 extratos. Sabe-se que a composição da própolis de *A. Mellifera* varia conforme sua região de
 287 origem (2). As amostras de própolis marrom e verde e de abelhas jataí no presente estudo são
 288 oriundas da região sul do Brasil, regiões fitogeográficas semelhantes, no entanto a própolis de

289 jataí é produzida por abelhas de espécie diferente, *Tetragonisca angustula*, fato que justifica a
290 diferença dos perfis das própolis do presente trabalho (36).

291 A principal fonte para a produção da própolis verde é a planta *Baccharis*
292 *dracunculifolia* (37, 2), resultando em um tipo de própolis com significativa quantidade de
293 derivados do ácido p-cumárico e seus derivados prenilados. Autores descrevem que própolis
294 marrom do sul do Brasil contém flavonóides como a crisina e a pinocembrina. No entanto, no
295 perfil cromatográfico da própolis marrom, foram identificados importantes ácidos fenólicos,
296 como ácido cafeico, p-cumárico e ácido ferúlico (38).

297 Os compostos identificados nos extratos de propolis marrom e verde são semelhantes
298 aos identificados por Cottica et al., (39) estudando uma amostra de própolis canadense de
299 abelhas *Apis mellifera* identificaram através da técnica de Espectrometria de massa (ES) os
300 compostos majoritários: Ácido cafeico, pinobanksina e Ácido Cafeico Éster Fenílico
301 (CAPE), sendo estes, ácidos fenólicos descritos por Marcucci (28) como importantes
302 substâncias na atividade antimicrobiana das amostras de própolis brasileira.

303 No entanto, a própolis de abelhas nativas jataí, apresentou compostos diferentes que
304 não presentes na própolis marrom e verde. Analisando diversas amostras de própolis
305 produzidas por *A. mellifera* e *T. Angustula*, encontraram nas amostras analisadas de todo o
306 Brasil de *T.angustula*, que essas apresentaram uma constante em sua composição química
307 (independente da região geográfica da amostra), o oposto foi encontrado nas amostras de
308 própolis de *A. mellifera* (12). Essa constante em sua composição, os autores sugerem o fato de
309 uma planta presente em todo o Brasil, seja a principal fornecedora de resina a *T. angustula*. A
310 *S. terebinthifolius* pertencente à família *Anacardiaceae*, conhecida no Brasil como “aroeira
311 vermelha” ou “aroeira mansa”, suas folhas e frutos são utilizados popularmente para fins
312 medicinais DEGÁSPARI et al. (40).

313 Na amostra de própolis de abelhas nativas, apresentou como constituintes majoritários:
314 Ácido gálico, apiginina, crisina, galangina e o Kaempferol e Artepillin-C. Este primeiro, um
315 importante ácido fenólico descrito na literatura por suas conhecidas atividades
316 antimicrobianas, e os demais flavonóides, descritos como importantes substâncias na
317 atividade anti-inflamatória (31).

318 Autores avaliaram a composição química de extratos etanólicos de várias amostras de
319 própolis de *T. angustula* e *A. mellifera* dos estados do Paraná e Minas Gerais através da
320 CLAE, e como resultados identificaram altas concentrações de ácido fenólicos: derivados do
321 ácido cinâmico e ácido p-cumárico nas própolis oriundas de *A. mellifera*, entretanto, nas
322 amostras de própolis de *T.angustula* baixas concentrações destes compostos foram
323 identificados (41).

324 Em seus estudos Marcucci e Bankova (42), apontaram que a própolis brasileira,
325 principalmente das regiões sul e sudeste são constituídos por derivados do ácido p-cumárico,
326 compostos estes possuem marcante atividade biológica, como a ação antimicrobiana e
327 antitumoral.

328

329 **3.2) Atividade antibacteriana dos extratos de própolis**

330 Os resultados obtidos da atividade antibacteriana dos extratos de própolis marrom,
331 verde e de abelhas nativas jataí estão expostos na Tabela 2. Os resultados obtidos estão
332 apresentados através das médias das concentrações da Concentração Inibitória Mínima (CIM)
333 e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de todas as bactérias testadas, totalizando 300
334 isolados.

335

336

337

338 **Tabela 2.** Atividade antibacteriana dos extratos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí
 339 frente à *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus*
 340 *dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*, através das médias das concentrações de CIM e CBM
 341 (mg/mL)

Extrato de própolis	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
	CIM CBM (mg/mL)	CIM CBM (mg/mL)	CIMCBM (mg/mL)	CIMCBM (mg/mL)	CIM CBM (mg/mL)
Própolis marrom	29,4 ^(a*) 54,3 ^(a*)	6,7 ^(a**) 13,4 ^(a**)	5,7 ^(a) 15,8 ^(a)	23,3 ^(a) 51,9 ^(a)	2,19 ^(a*) 4,92 ^(a*)
Própolis verde	41,9 ^(b) 70,3 ^(b)	11,9 ^(b) 20,7 ^(b)	4,2 ^(b**) 11,2 ^(b**)	13,9 ^(b*) 32,1 ^(b*)	2,15 ^(a*) 4,0 ^(a*)
Própolis de abelhas jataí	67,1 ^(c) 89,2 ^(c)	30,7 ^(c) 54,9 ^(c)	45,4 ^(c) 68,0 ^(c)	49,1 ^(c) 79,2 ^(c)	13,7 ^(b) 30,6 ^(b)

342 CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; (a, b, c): Letras diferentes na
 343 mesma coluna diferem estatisticamente; *: p<0,01; ** p<0,001.

344

345 Os resultados obtidos da atividade antibacteriana dos extratos de própolis marrom,
 346 verde e jataí, apresentaram CIM e CBM diferentes entre as própolis (p<0,01), exceto quando
 347 à *Streptococcus uberis* que não apresentou diferença de CIM e CBM entre as própolis marrom
 348 e verde, mas quando comparados com a própolis de abelhas jataí ambos diferiram
 349 significativamente (p <0,01).

350 Desse modo, a própolis marrom obteve valores menores de CIM e CBM, quando
 351 testados frente à *Staphylococcus aureus* tanto CIM e CBM apresentaram-se estatisticamente
 352 diferentes (p<0,001) quando comparadas as médias de obtidas da própolis verde e de abelhas
 353 jataí ou seja, menores quantidades de própolis marrom são necessárias para inibir e
 354 eliminação do agente bacteriano. Também, frente à *Escherichia coli* apresentou, valores
 355 menores e diferentes estatisticamente (p<0,01) quando analisados com os valores da própolis
 356 verde e própolis de abelhas jataí.

357 Contudo quando analisados a ação dos extratos de própolis frente à *Streptococcus*, os
 358 menores valores de CIM e CBM encontrados foram da própolis verde (p<0,01) exceto para
 359 *Streptococcus uberis*, obteve os valores das médias de concentrações de CIM e CBM baixos,

360 porém não diferiu entre a própolis marrom e verde. Contudo quando avaliados frente ao
361 extrato de própolis de abelhas jataí a própolis marrom e verde foram superiores ($p < 0,01$).

362 Os valores de CIM e CBM da própolis verde encontrado para *S. agalactiae* foi menor
363 e altamente significativo ($p < 0,001$) quando comparado a própolis marrom. Igualmente,
364 quando analisada com os valores obtidos da própolis de abelhas nativas, apresentou CIM e
365 CBM menores e altamente significativos ($p < 0,001$). E para *S. dysgalactiae*, os resultados de
366 CIM e CBM foram semelhantes aos encontrados para *S. agalactiae*. A própolis verde
367 apresentou CIM e CBM valores diferentes significativamente ($p < 0,01$) dos obtidos da
368 própolis marrom e própolis de abelhas jataí.

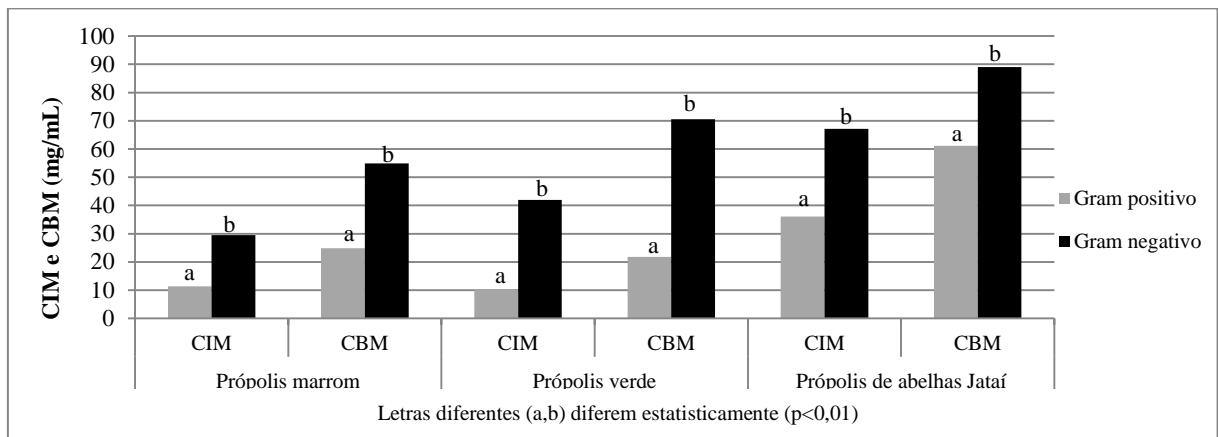
369 Os dados obtidos no presente estudo são semelhantes aos encontrados por Sawaya et
370 al. (43) em seus estudos avaliaram duas amostras de própolis brasileiras, uma do estado da
371 Bahia (própolis marrom) e outra do Rio Grande do Sul (própolis verde) frente à
372 *Staphylococcus aureus*. A identificação dos compostos foi realizada através da técnica da
373 CLAE e observaram na própolis marrom poucos picos de absorção de compostos apolares e
374 não identificaram nenhuma substância em particular. No entanto, a própolis verde apresentou
375 perfil com uma maior variedade de substâncias de diferentes polaridades (ácido cinâmico,
376 ácido ferúlico, kanferide, e Artepillin C). No entanto, o ácido ferúlico foi encontrado pelos
377 autores em quantidades significativas no extrato marrom, este um importante composto
378 fenólico, conhecido pela sua atividade antimicrobiana. Os resultados da atividade
379 antibacteriana das amostras de própolis demonstraram que a própolis marrom teve maior
380 atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* quando comparada com a própolis
381 verde. A CIM da própolis marrom variou entre (5 e 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$), enquanto a própolis verde
382 (40 e 80 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Apenas a amostra de própolis marrom mostrou atividade bactericida (CBM:
383 160 e 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

384 Sforcin et al. (48) avaliaram a atividade *in vitro* de um extrato alcoólico de própolis
385 oriundo da cidade de Santa Maria/RS, contra agentes bacterianos da mastite bovina (36
386 isolados coagulase-positivos de *Staphylococcus* sp. e 27 isolados de *Streptococcus* sp.)
387 comparando-os aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento da doença. Como
388 resultados, 94,4% dos *Staphylococcus* sp. e 85,2% dos *Streptococcus* sp. eram sensíveis ao
389 extrato de própolis. A amostra de própolis em questão demonstrou índices de atuação
390 superiores ou semelhantes aos de antimicrobianos comumente utilizados na terapia dessa
391 enfermidade (44).

392 A atividade antimicrobiana de extratos de própolis de abelhas nativas sem ferrão
393 dentre elas *T. angustula* e de abelhas africanizadas *A. mellifera* (própolis verde) do estado de
394 Minas Gerais frente a micro-organismos como o *S. aureus* e *E. coli* foi avaliada por Farnesi
395 (45). Por meio da CLAE, identificou e quantificou na própolis verde os compostos
396 majoritários: Ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido 3-prenil-p-cumárico e 3,5 diprenil-p-
397 cumárico e os compostos minoritários pertencentes à classe dos flavonóides. Na própolis de
398 abelhas jataí, foram detectados compostos com polaridades distintas, componentes
399 possivelmente derivados de ácidos fenólicos, fenilpropanóides e flavonóides. Obteve como
400 resultados, a eficácia da própolis verde frente à *S. aureus*, no entanto a própolis de abelhas *T.*
401 *angustula* (abelha jataí) não apresentou atividade antibacteriana. E quando testados frente a *E.*
402 *coli* a própolis verde apresentou melhor atividade antimicrobiana quando comparada a
403 própolis de jataí, que não apresentou atividade.

404 A ação de três extratos de própolis de regiões distintas do Brasil frente a bactérias
405 Gram positivas: *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* sp. e Gram negativas: *Escherichia*
406 *coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foi observada por Júnior (46). Encontraram perfis de
407 sensibilidades diferentes, Gram positivas foram mais sensíveis aos extratos de própolis
408 independente do local de coleta.

409 Resultados que vão ao encontro da literatura foram obtidos no presente estudo, onde se
 410 avaliou as diferenças das médias de CIM e CBM entre as bactérias Gram positivas e negativas
 411 frente à própolis marrom, verde e de abelhas jataí. Os valores encontrados estão expostos na
 412 (Figura 1).



413 **Figura 1.** Médias das Concentrações Inibitórias Mínimas e Bactericidas (CIM e CBM) das
 414 bactérias Gram positivas e Gram negativas frente aos extratos de própolis marrom, verde e de
 415 abelhas nativas jataí.

416
 417 Os valores de CIM e CBM das três própolis apresentaram concentrações menores e
 418 diferiram das concentrações obtidas para Gram negativas ($p < 0,01$). Deste modo, através da
 419 (Figura 1) observa-se que as bactérias Gram positivas apresentaram maior sensibilidade aos
 420 extratos de própolis do que as Gram negativas.

421
 422 Pesquisadores (47) explicam a diferença de sensibilidade encontrada entre as bactérias
 423 Gram positivas e Gram negativas, propondo que bactérias positivas mostram-se mais
 424 suscetíveis à própolis pela ação dos compostos sobre a parede celular destas. Quanto às
 425 bactérias Gram negativas, apesar de sua parede celular não ser tão rígida quanto das positivas,
 426 são quimicamente complexas e possui maior teor lipídico.

427

428

429

430 3.3) Atividade antifúngica dos extratos de própolis

431 Os resultados alcançados da atividade antifúngica dos extratos de própolis frente aos
432 micro-organismos do gênero *Candida* sp. e *Sporotrix* sp. estão expostos na Tabela 3. Os
433 resultados estão apresentados sob a forma de média das concentrações obtidas da
434 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).

435 Conforme pode ser visualizado na Tabela 3, os extratos de própolis marrom, verde e
436 de abelhas jataí apresentaram eficácia significativa frente aos fungos *Candida* sp. e *Sporotrix*
437 sp. O extrato de própolis marrom obteve melhores resultados para o gênero *Candida*, e
438 conseguinte o extrato de própolis verde e de abelhas jataí. Para o gênero *Sporotrix*, os extratos
439 de própolis marrom e verde apresentaram resultados idênticos, porém superiores ao extrato de
440 jataí.

441 **Tabela 3.** Atividade antifúngica dos extratos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí
442 através das médias das concentrações de CIM e CFM (mg/mL) obtidas de cada agente
443 fúngico.

Extrato de própolis	<i>Candida</i> sp.		<i>Sporotrix</i> sp.	
	CIM	CFM	CIM	CFM
Própolis marrom	28,9 ^(a**)	38,0 ^(a*)	≤0,78 ^(a**)	≤0,78 ^(a**)
Própolis verde	43,4 ^(b)	≥43,4 ^(b)	≤0,78 ^(a)	≤0,78 ^(a)
Própolis de abelhas jataí	54,9 ^(b)	54,9 ^(b)	0,78 ^(b)	8,0 ^(b)

444
445 CIM: Concentração Inibitória Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima; ^(a, b): Letras diferentes na mesma
446 coluna diferem estatisticamente; *: p<0,05; ** p<0,01.

447
448 A atividade antifúngica da própolis brasileira já tem sido relatada (48). Por meio da
449 (Tabela 3), pode-se visualizar os valores obtidos de CIM e CFM de cada própolis frente aos
450 dois gêneros fúngicos testados. Para o gênero *Cândida* sp., o extrato de própolis marrom
451 obteve os menores valores de CIM e CFM e diferiu dos valores de CIM e CFM da própolis
452 verde (p<0,05; p<0,01). Da mesma forma, o extrato de própolis marrom diferiu

453 significativamente dos valores de CIM e CFM da própolis de abelhas jataí ($p < 0,05$; $p < 0,01$),
454 respectivamente. No entanto a própolis verde, obteve valores menores de CIM e CFM quando
455 relacionado ao extrato de jataí, porém não diferiram estatisticamente.

456 Avaliou-se a atividade antifúngica de uma amostra de própolis de abelhas *Apis*
457 *mellifera* de um apiário situado na cidade de (Maringá/PR), frente a várias espécies de fungos
458 do gênero *Candida* (49). Como resultados obtiveram a alta sensibilidade das espécies frente
459 aos extratos da própolis, sendo que o extrato apresentou atividade antifúngica nas menores
460 concentrações testadas. Observaram a inibição de uma das leveduras testadas até a diluição
461 1:256 (cerca de 0,04 mg/mL) e a própolis demonstrou ser dose dependente, ou seja, quanto
462 maior a concentração da própolis, maior sua eficácia em inibição e eliminação dos micro-
463 organismos. Resultados semelhantes foram alcançados por Aguero et al. (50), obtiveram
464 94,4% do efeito fungistático de uma amostra de própolis de abelhas *Apis mellifera* frente à
465 *Candida albicans*.

466 Quintero-Mora (51) avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* de uma amostra de
467 própolis argentina frente a espécies fúngicas de importância em Saúde humana e animal,
468 como fungos do gênero *Candida*. Por meio da CLAE obtiveram o perfil químico e como
469 composto isolaram: Ácido Nordihydroguaiaretic (NDGA), crisina, pinocembrina e galangina.
470 Os autores testaram os compostos individualmente frente ao micro-organismo, e obtiveram
471 bons resultados do NDGA frente ao gênero *Cândida*. Quando testados frente aos flavonóides,
472 a galangina apresentou melhor atividade frente aos micro-organismos (CIM = 31,2 µg/ mL),
473 ao passo que a pinocembrina apresentou moderada atividade (CIM = 31,2-250 µg/ mL). Por
474 fim, a crisina demonstrou baixa atividade antimicrobiana (CIM = 250 mg/mL). Estes
475 resultados vão ao encontro aos encontrados no presente estudo, onde se obteve na própolis de
476 abelhas jataí compostos majoritários: crisina e galangina, no extrato de jataí e este também

477 apresentou baixa ação antifúngica frente ao gênero *Candida* quando comparados com a
478 própolis marrom e verde.

479 Para o gênero *Sporotrix* sp., todos os extratos da própolis apresentaram eficácia frente
480 ao micro-organismo. A própolis marrom e verde demonstraram eficácia para o gênero,
481 obtiveram numericamente valores iguais de CIM e CFM e quando comparados com os
482 valores de CIM e CFM de própolis jataí, apresentaram valores estatisticamente significantes
483 ($p < 0,01$).

484 A atividade antimicrobiana de extratos de própolis brasileiras foi avaliada por
485 Salomão et al. (52), frente a *Trypanosoma cruzi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*
486 *pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii* e *Paracoccidioides*
487 *brasiliensis*. A composição química dos extratos foi determinada por CLAE e de acordo como
488 perfil químico obtido, os autores separaram os extratos em três grupos: A (*B. dracunculifolia*;
489 *Araucária* spp), B (*B. dracunculifolia*) e C (*Araucária* spp). Como resultados encontraram
490 por meio da análise de regressão múltipla de todos os extratos, uma correlação positiva para
491 concentrações mais elevadas que levam a um maior efeito biológico. Todos os extratos de
492 própolis apresentaram atividades similares frente aos fungos *Candida albicans* e *Sporotrix*
493 *schenckii*. Ainda, os autores reforçaram a importância do Ácido p-cumárico e seus derivados,
494 principalmente os prenilados, e também o Ácido cafeico, sobre a atividade biológica da
495 própolis brasileira.

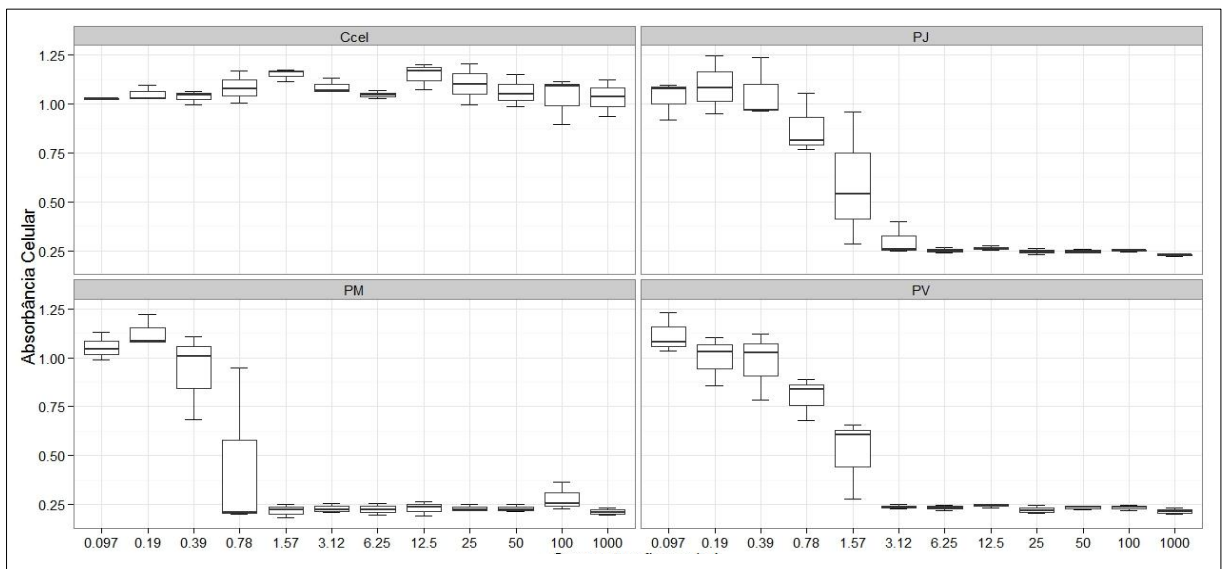
496

497 **3.4) Toxicidade celular dos extratos de própolis**

498 Os resultados do efeito citotóxico dos extratos de própolis marrom, verde e de jataí
499 utilizados no presente estudo vão de encontro com os dados encontrados na literatura. Ainda
500 que a própolis seja considerada um produto natural e a possível ausência de toxicidade para o
501 homem e animais sejam relatados como seus benefícios, os resultados apresentados na (Figura

502 2), demonstram que os extratos de própolis apresentaram toxicidade. A própolis de abelhas
 503 jataí demonstrou ser menos tóxica, em sequência a própolis verde e a marrom. O extrato da
 504 própolis marrom apresentou ser altamente tóxica às células utilizadas no presente trabalho.

505 O efeito citotóxico das amostras de própolis em diferentes cultivos celulares tem sido
 506 descrito desde moderado até altamente tóxico (53,54). Os valores obtidos da toxicidade celular
 507 estão expostos através das medianas das concentrações utilizadas no presente estudo. Esses
 508 valores são distintos entre os extratos, sendo que a própolis marrom foi quem apresentou
 509 maiores valores de toxicidade quando comparados ao extrato de própolis verde e de jataí,
 510 respectivamente.



511
 512 **Figura 2.** Citotoxicidade dos extratos de própolis marrom (PM), própolis verde (PV) e de
 513 abelhas jataí (PJ) frente a células MDBK (Ccel).

514

515 Em trabalho semelhante e Bankova et al.(24), avaliaram a atividade antiviral de uma
 516 amostra de própolis canadense, alcançaram em seus estudos de citotoxicidade da própolis que
 517 a concentração não citotóxica máxima tolerada da própolis em células MDBK foi de 0,032
 518 mg/mL. Resultados estes que inferiores aos obtidos no presente estudo, o qual para própolis
 519 marrom e verde a dose não citotóxica foi de 0,097 $\mu\text{g/mL}$ quando comparados com a mediana
 520 do controle de células, enquanto para a de abelhas jataí foi de 0,39 $\mu\text{g/mL}$.

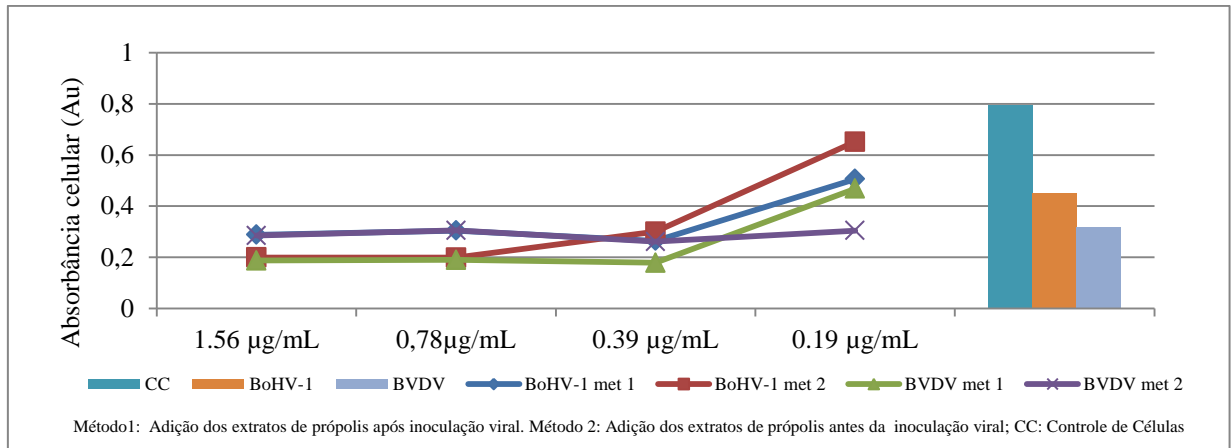
521 Essa maior toxicidade apresentada pelos extratos de própolis do presente trabalho
522 pode ser justificada pela forma de extração dos compostos da própolis utilizada neste estudo
523 conforme (31). Segundo estes autores, esta forma de extração, remove uma maior quantidade
524 de substâncias bioativas presentes na própolis.

525

526 **3.5) Atividade Antiviral**

527 Em estudos que avaliam a atividade antiviral utilizando cultivos celulares, deve-se
528 estimar a toxicidade dos compostos em relação às células. Uma vez que, as concentrações de
529 própolis utilizadas em ensaios virais variam bastante nos experimentos descritos, desde 5%
530 (53) até 0,0003% (54). Estas concentrações equivalem à maior concentração que não promove
531 alterações morfológicas nas células (55). Como descritos anteriormente, os valores de
532 toxicidade dos extratos de própolis apresentaram concentrações diferentes entre eles, assim
533 sendo na avaliação da atividade antiviral, utilizou-se duas concentrações tóxicas e duas não
534 tóxicas de acordo com o obtido.

535 Os extratos de própolis foram adicionados após inoculação viral (extratos adicionados
536 após a inoculação viral de 1h e mantidos – método I) ou antes da inoculação viral (método II).
537 Os resultados apresentados nas Figuras 3,4 e 5 evidenciam melhor atividade antiviral quando
538 os extratos são acrescentados no pré-tratamento (Método II); O extrato de própolis marrom e
539 verde apresentaram uma melhor atividade frente ao BoHV-1 no método II, enquanto o
540 própolis de abelhas jataí apresentou melhor atividade frente ao Vírus da Diarréia Viral Bovina
541 (BVDV) no (Método II).



542 **Figura 3.** Atividade antiviral do extrato de própolis marrom frente ao Herpes Vírus Bovino
 543 tipo 1 (BoHV-1) e ao Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), sob dois métodos distintos de
 544 tratamento das células (Método I: Tratamento após inoculação viral e Método II: Tratamento
 545 antes da inoculação viral).
 546

547

548 De acordo com a Figura 3, a atividade antiviral da própolis marrom frente ao BoHV-1
 549 (Método I), nas quatro concentrações utilizadas, não apresentou efetividade. Porém no
 550 Método II a concentração não tóxica (0,19 µg/mL), mostrou-se melhor que o controle de
 551 células e vírus e próximo ao controle de células ($p < 0,01$). Já para o vírus BVDV, (Método I e
 552 Método II), o extrato de própolis marrom não apresentou resultados significativos quanto sua
 553 ação quando comparado ao controle de células.

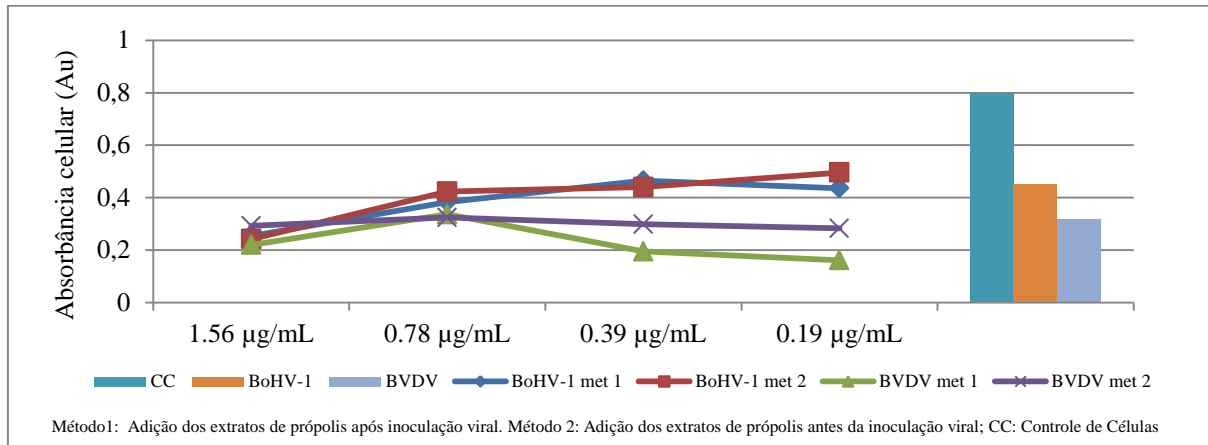
554

555 Os dados obtidos da atividade antiviral do extrato de própolis verde frente ao BoHV1
 556 e BVDV estão expostos na (Figura 4). Conforme a figura, o extrato quando avaliado frente ao
 557 BoHV-1 (Método I e II), apresentou nas duas últimas concentrações (0,39 e 0,19 µg/mL)
 558 atividade significativa frente ao vírus ($p < 0,01$). Entretanto, quando testado frente ao BVDV, o
 extrato não apresentou significativa ação em ambos os métodos (I e II).

559

560 Resultados semelhantes foram obtidos por Fischer et al., (56), que avaliaram efeito da
 561 atividade antiviral de uma amostra de própolis verde brasileira frente ao Herpesvírus bovino
 562 tipo 1 e BVDV. Os pesquisadores utilizaram duas suspensões de uma amostra de BoHV-1 e
 563 de uma amostra de BVDV, que foram incubadas com 1000 µg da própolis. O tempo de
 incubação foi de zero e seis horas para a suspensão 1 do BoHV-1 e BVDV, e duas e oito

564 horas para a suspensão 2 do BoHV-1 e BVDV. Como resultados, os autores obtiveram a
 565 inativação do BoHV-1 nas duas suspensões, quando incubadas à seis e oito horas, no entanto
 566 frente ao BVDV, não obtiveram resultados significativos.



567

568 **Figura 4.** Atividade antiviral do extrato de própolis verde frente ao Herpes Vírus Bovino tipo
 569 1 (BoHV-1) e ao Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), sob dois métodos distintos de
 570 tratamento das células (Método I: Tratamento após inoculação viral e Método II: Tratamento
 571 antes da inoculação viral).

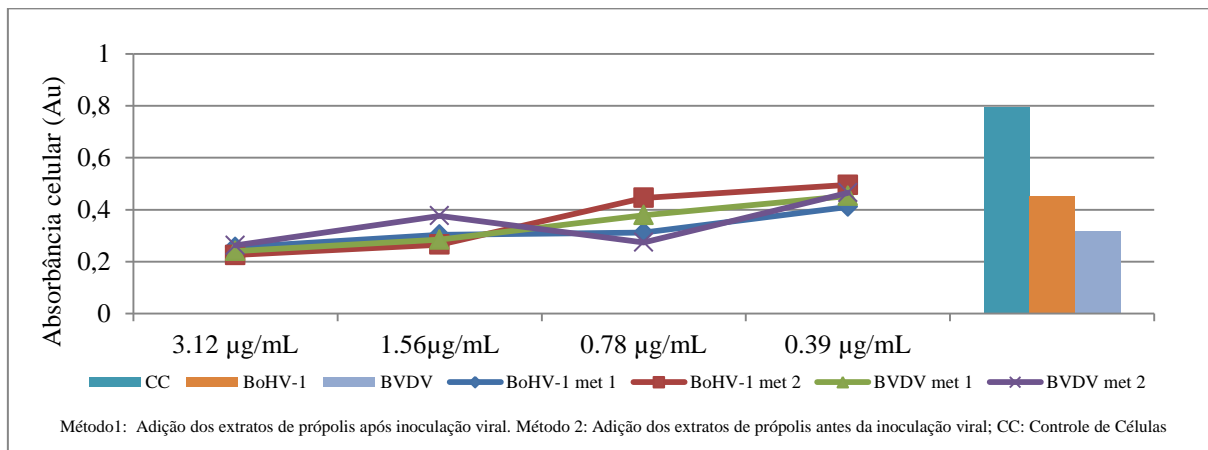
572

573 A atividade antiviral do extrato de própolis jataí frente ao BoHV-1 e ao BVDV sob os
 574 métodos de tratamento das células estão demonstrados na (Figura 5). Na figura, observa-se os
 575 valores da absorbância celular que os Método (II) apresentou melhor atividade antiviral frente
 576 ao BoHV-1 e BVD ($p < 0,01$). Enquanto no método (I), para ambos os vírus, o extrato não
 577 demonstrou significância quando comparado ao controle de células.

578

579 O mecanismo de ação da própolis sobre os vírus ainda não está elucidado. Avaliou-se
 580 uma amostra de extrato alcoólico de própolis frente ao Herpes simples tipo 2 (HSV2) antes
 581 com do contato com a célula, sugerindo que a ação da própolis seria na estrutura do envelope
 582 ou modificação na estrutura dos componentes necessários para adsorção ou entrada do vírus
 583 na célula. Os mesmo autores, quando avaliaram o mesmo extrato frente a Herpes simples tipo
 584 1 (HSV1), os resultados foram semelhantes aos obtidos anteriormente, sugerindo que o vírus
 livre apresenta maior sensibilidade, o que levou a indicar que a administração da própolis

585 antes ou no momento da infecção promoveria um maior efeito de inibição do vírus (57).
 586 Resultados esses análogos aos encontrados no presente estudo, já que as três amostradas
 587 avaliadas da própolis apresentaram resultados mais expressivos no Método (II): tratamento
 588 das células antes da inoculação do BoHV-1 e BVDV.



589 **Figura 5.** Atividade antiviral do extrato de própolis de abelhas jataí frente ao Herpes Vírus
 590 Bovino tipo 1 (BoHV-1) e ao Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), sob dois métodos
 591 distintos de tratamento das células (Método I: Tratamento após inoculação viral e Método II:
 592 Tratamento antes da inoculação viral).
 593

594
 595 Cueto et al. (23) descreveram a atividade antiviral de dois extratos etanólicos de
 596 própolis (EP1 e EP2) frente aos vírus: *Calicivírus felino* (FCV), *Adenovírus* canino tipo 2
 597 (CAV-2) e Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). Obtiveram o perfil químico das amostras
 598 por meio da CLAE e identificaram a presença de flavonóides como: rutina, quercetina e ácido
 599 gálico. E como resultados do estudo, ambos os extratos evidenciaram atividade antiviral
 600 frente ao BVDV e CAV-2 quando acrescidos ao cultivo celular anteriormente à inoculação
 601 viral. Resultado semelhante foi encontrado para o extrato de jataí no atual trabalho,
 602 apresentou perfil químico semelhante ao dos autores, e atividade antiviral significativa frente
 603 ao BVDV quando avaliado no método (II): tratamento antes da inoculação viral.

604 A atividade *in vitro* um extrato de própolis purificado a partir de uma região
 605 Canadense rica em árvores de álamo, frente ao Herpes Vírus Simplex (1 e 2) foi determinada

606 por Bankova et al. (24) e através da Espectrometria de massa (GC-MS) obtiveram a
607 cromatografia química do extrato. Avaliaram a atividade antiviral em culturas de células
608 MDBK por tratamento das células com o extrato no momento da adsorção do vírus e por
609 incubação do vírus com o extrato (antes do ensaio). Os resultados da análise de GC-MS
610 revelaram uma origem vegetal dupla no extrato, com componentes de resinas derivadas de
611 duas espécies diferentes de álamo e os ensaios da atividade antiviral apontaram efeito
612 pronunciado contra o Herpes Vírus Simplex 1 e 2, demonstrando que o extrato interferiu na
613 adsorção do vírus.

614

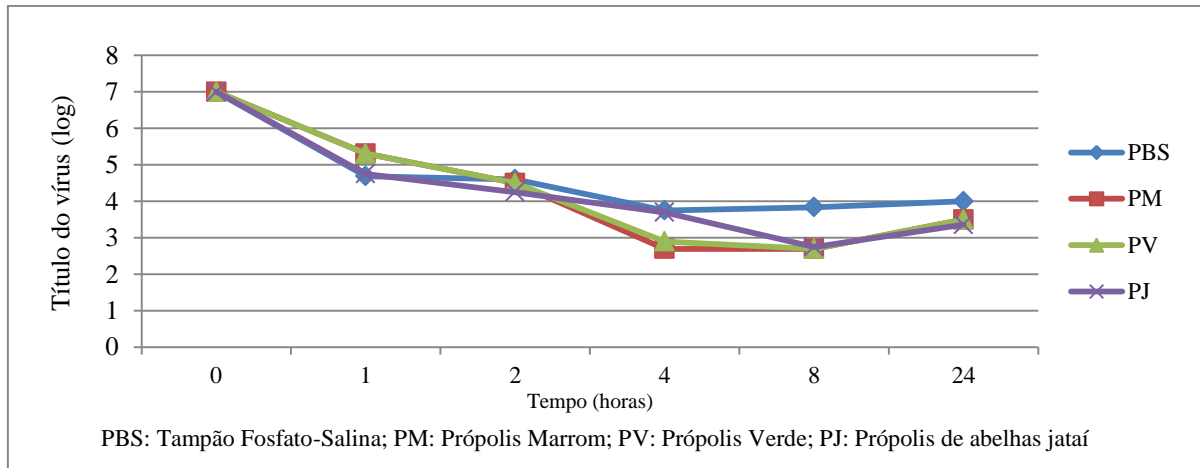
615 **3.6) Atividade Virucida**

616 Atividades biológicas extremamente importantes são conferidas à própolis brasileira,
617 como por exemplo, a atividade virucida de extratos etanólicos desse tipo de própolis pode ser
618 atribuída principalmente à presença de ácidos fenólicos como Ácido p-cumárico, Artepillin C
619 e derivados do ácido cinâmico (58).

620 A atividade virucida dos extratos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí frente
621 ao vírus BoHV-1 e BVDV sob duas temperaturas distintas (22 e 37°C) e diferentes tempos de
622 incubação está demonstrada nas Figuras 6, 7, 8 e 9. Através das figuras pode-se observar o
623 decréscimo no logaritmo de cada vírus conforme decorrer do tempo.

624 Através da Figura 6 pode-se visualizar a ação da própolis marrom, verde e a de
625 abelhas jataí frente ao BoHV-1 sob a temperatura de 22°C, todas as própolis apresentaram
626 resultados semelhantes ao final do período de incubação de 24 h.

627



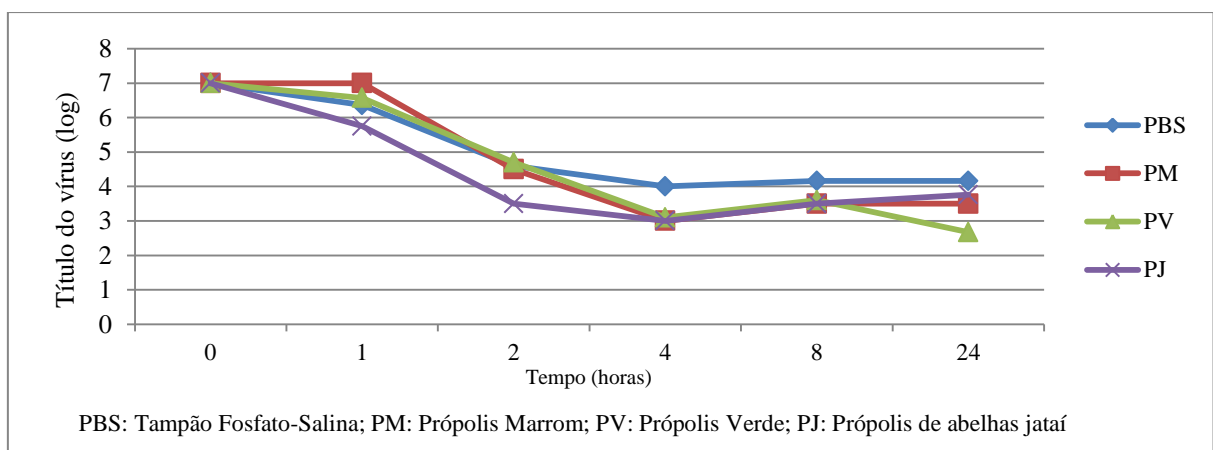
628

629 **Figura 6.** Atividade virucida do extrato de própolis marrom, verde e de própolis de abelhas
 630 jataí frente ao Herpes Vírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) sob a temperatura de incubação de 22°C
 631 durante 24 horas.

632

633 A atividade virucida dos extratos de própolis frente ao vírus BoHV-1 sob a
 634 temperatura de incubação de 37°C está exposta na (Figura 7), podendo-se observar que a
 635 própolis verde alcançou valores diferentes e menores ao final do período de incubação, (log =
 636 2,67) em relação ao obtido pela própolis marrom (log = 3,5), jataí (log = 3,76) e também
 637 quando comparado ao controle PBS (log = 4,16).

638



639

640 **Figura 7.** Atividade virucida do extrato de própolis marrom, verde e de própolis de abelhas
 641 jataí frente ao Herpes Vírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) sob a temperatura de incubação de 37°C
 642 durante 24 horas.

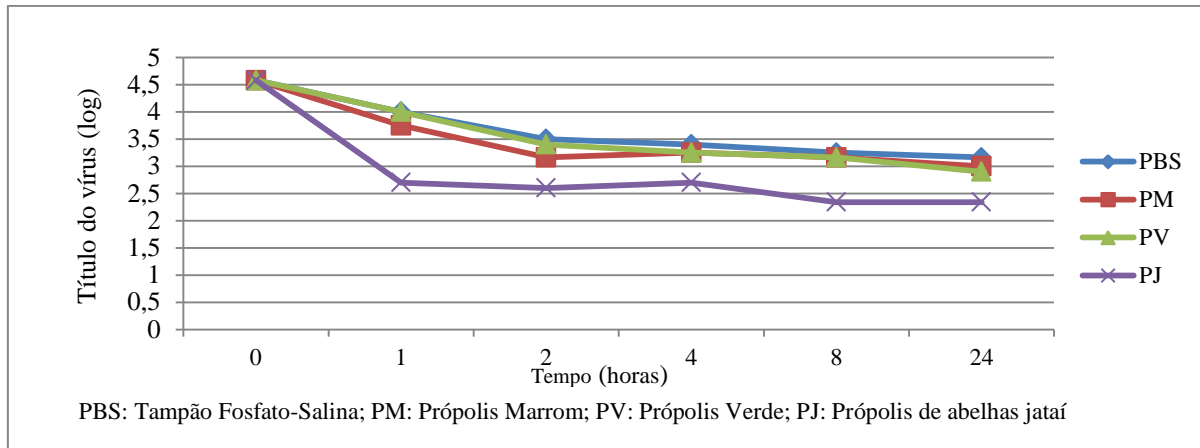
643 Amoros et al. (59) avaliando a atividade virucida da própolis, demonstraram a eficácia
644 da ação de amostras distintas de própolis sobre Herpes Vírus tipo1 resistente a aciclovir,
645 Herpes Vírus tipo 2, Vírus da Estomatite Vesicular, Adenovírus e “Newcastle vírus”. Ainda
646 os autores verificaram que o 3-Metil-2-butenil cafeato apresentou eficácia frente aos Herpes
647 Vírus.

648 A atividade virucida de uma amostra de própolis foi avaliada por Vynograd et al.(60),
649 comparando-a ao Aciclovir® para o tratamento de Herpes genital. Na análise química da
650 própolis identificaram como compostos majoritários: galangina e crisina. Como resultados,
651 encontrou a maior eficácia da própolis quando comparado ao antimicrobiano comercial em
652 reduzir as lesões e sintomas locais. No entanto, os valores encontrados no presente estudo, são
653 distintos, onde para o Herpes Vírus, o extrato que apresentou melhor eficácia foi à amostra
654 verde. No entanto como pode ser visualizado nas Figuras 8 e 9, o extrato de própolis de
655 abelhas jataí apresentou atividade virucida ao BVDV nas duas temperaturas quando
656 comparado aos controle negativo (PBS) e aos extratos de marrom e verde. Os compostos
657 majoritários descritos anteriormente como virucidas: Galangina e crisina, da mesma forma
658 foram encontrados na amostra de abelhas jataí, embora os autores tenham avaliado frente a
659 Herpes, no presente estudo houve expressiva atividade frente ao BVDV.

660

661

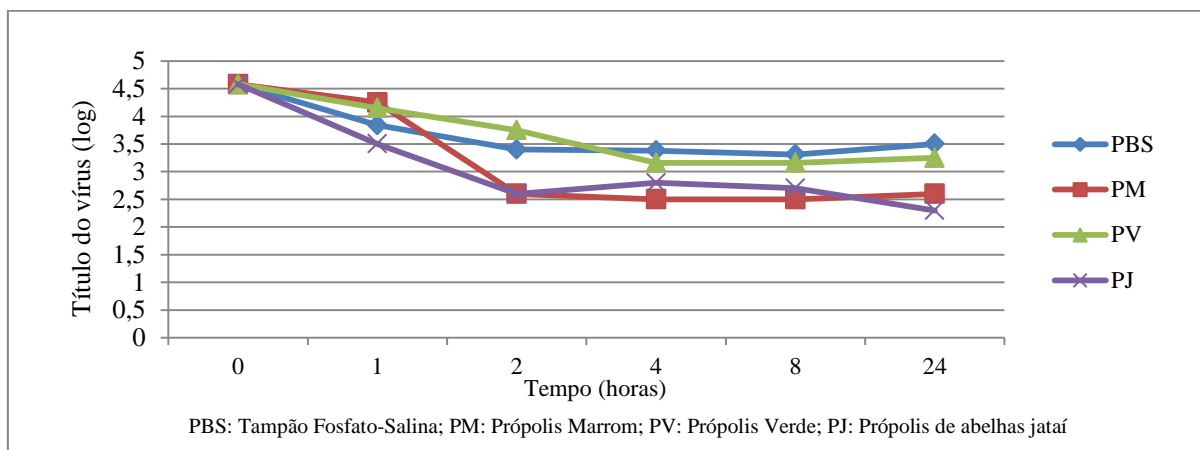
662



663

664 **Figura 8.** Atividade virucida do extrato de própolis marrom, verde e de própolis de abelhas
 665 jataí frente ao Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) sob a temperatura de incubação de
 666 22°C durante 24 horas.

667



668

669 **Figura 9.** Atividade virucida do extrato de própolis marrom, verde e de própolis de abelhas
 670 jataí frente ao Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) sob a temperatura de incubação de
 671 37°C durante 24 horas.

672

673 Através das figuras 8 e 9, pode se observar que a própolis de abelhas jataí demonstrou
 674 atividade virucida sobre BVDV quando comparado ao controle ao final de período de
 675 incubação em ambas as temperaturas de 37 °C (log 2,3), PBS (3,5) e 22 °C (log 2,3), PBS
 676 (3,16).

677

678 O genoma do BVDV consiste uma fita simples de RNA, possui um envelope lipídico
 envolvendo o nucleocapsídeo, o que se constitui numa diferença estrutural em relação ao

679 BoHV-1, fato que pode ter determinado a maior sensibilidade deste vírus à ação virucida dos
680 extratos (CUETO et al., 2011).

681

682 **4) Conclusões**

683 Os três extratos de própolis utilizados no presente estudo quando avaliados frente aos
684 importantes agentes infecciosos testados, apresentaram significativa atividade antimicrobiana.
685 A análise química dos extratos de própolis apresentou semelhança entre as amostras de
686 própolis marrom e verde, e a própolis de abelhas jataí apresentou-se distinta. Estes dados
687 justificam os resultados da maior eficiência dos extratos marrom e verde, encontrados na ação
688 antibacteriana, antifúngica, antiviral e virucida, uma vez que os compostos identificados nas
689 amostras de marrom e verde são descritos na literatura como os principais responsáveis pela
690 atividade antimicrobiana.

691 Atividade inibitória dos extratos de própolis marrom, verde e jataí contra os agentes
692 infecciosos testados sugere a utilização destes como alternativas naturais ao uso de
693 antimicrobianos comerciais, no combate a infecções por estes micro-organismos de
694 importância em Saúde Pública.

695

696 **5) Referências bibliográficas**

697 (1) BASTOS E.M.A.F., GALBIATI C., LOUREIRE.M., SCOARIS D.O. Indicadores físico-
698 químicos e atividade antibacteriana de própolismarrom frente à *Escherichia coli*. Arquivo
699 Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia. **2011**. v.63, n.5, p.1255-1259.

700

701 (2) BANKOVA V., DE CASTRO S.L., MARCUCCI M.C. Standardization of propolis:
702 present status and perspectives, Apidologie. **2000**.v.31, p.3–15.

703

704 (3) SIMONE-FINSTROM, M.D., SPIVAK M.Increased resin collection after parasite
705 challenge: A case of self-medication in honey bees? PLoSOne.**2012**. v.7,n.3.

706

- 707 (4) KUMAZAWA S., GOTO H., HAMASAKA T., FUKUMOTO S., FUJIMOTO T.,
708 NAKAYAMA T. A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa,
709 Japan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **2004** . v.68, n. 1, p. 260-262.
710
- 711 (5) BANKOVA V.S., CHRISTOV R., MARCUCCI M.C., POPOV S. Constituents of
712 Brazilian geopropolis. *Z Naturforsch.* **1998**.v. 53, p. 402-406.
713
- 714 (6) UZEL A., SORKUN K., ÖNÇAG Ö., ÇOGULO D., GENÇAY Ö., SALIH B. Chemical
715 compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples.
716 *Microbiology Research.* **2005**. v. 160, p.189-195.
717
- 718 (7) CHOUDHARI M.K., PUNEKAR S.A., RANADE R.V., PAKNIKAR K.M. Antimicrobial
719 activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of Western
720 Maharashtra, India. *Journal Ethnopharmacology.* **2012**.v.14, n.1, p.363-367.
721
- 722 (8) SAWAYA A.C.H.F., CALADO J.C.P., SANTOS L.C., MARCUCCI M.C., AKATSU
723 I.P., SOARES A.E.E., ABDELNUR P.V., CUNHA I.B.S.C., EBERLIN M.N. Composition
724 and antioxidant activity of propolis from three species of *Scaptotrigona* stingless bees. *J*
725 *Apiprod. Journal of ApiProduct and ApiMedicalScience.* **2009**. v.1, p.37-42.
726
- 727 (9) GILBERTO C., FRANCHI J.R., CLEBER S. ,MORAES V.C., TORETI A., DAUGSCH
728 A., NOWILL A.E., PARK Y.K. Comparison of Effects of the Ethanolic Extracts of Brazilian
729 Propolis on Human Leukemic Cells As Assessed with the MTT Assay. *Evidence-Based*
730 *Complementary and Alternative Medicine.* **2012**.p. 303-309.
731
- 732 (10) NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo:
733 Nogueirapis, **1997**.
734
- 735 (11) FIANCO A.L.B., FALCÃO, M.A., CASSEL, E., MILÃO, D. Determinação da atividade
736 antimicrobiana e teor de polifenóis totais de extratos etanólicos de própolis das abelhas sem
737 ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna). *Revista*
738 *Liberato.***2013**.Novo Hamburgo, v. 14, n. 21, p. 01-112, jan./jun.
739

- 740 (12) SAWAYA A.C.H.F., TOMAZELA D.M., CUNHA I.B.S., BANKOVA V.S.,
741 MARCUCCI M.C., CUSTODIO A.R., EBERLIN M.N. Electrospray ionization mass
742 spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst*. **2004**. v.129, p. 739-744.
743
- 744 (13) PARK Y.K., IKEGAKI M., ALENCAR S.M., WANG SH.K., BASTOW K.,
745 COSENTINO M., LEE K.H. Determinação das atividades citotóxica e anti-HIV dos extratos
746 etanólicos de própolis coletados em diferentes regiões do Brasil. *Mensagem Doce*. **2000**.
747 v.56, p.2-5.
748
- 749 (14) TRUSHEVA B., MARCUCCI M.C., POPOLVA M., BANKOVA V., SIMOVA V.,
750 MIORIN P. L., PASIN F. R., TSVETKOVA I. Bioactive Constituents of Brazilian Red
751 Propolis. *Evidence Based Complementary And Alternative Medicine*. **2006**.v. 3, n. 2, p.
752 249-254.
753
- 754 (15) ALENCAR S.M.de, AGUIAR C.L. de, PAREDES-GUZMÁN J., PARK, Y.K.
755 Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de
756 São Paulo e Minas Gerais. *Ciência Rural*. **2005**. v. 35. n.4, p.909-915.
757
- 758 (16) FISCHER G., HÜBNER S.O., VARGAS G.D.,VIDOR T. Imunomodulação pela
759 própolis. *Arquivo do Instituto Biológico*. **2008**. São Paulo, v.75, n.2, p.247-253, abr./jun.
760
- 761 (17) BATISTA L.L, CAMPESATTO E.A, ASSIS M.L, BARBOSA A.P, GRILLO L.A,
762 DORNELAS C.B. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of
763 wounds induced in rats. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. **2012**. Dec. v. 39, n.6, p.
764 515-20.
765
- 766 (18) ARAÚJO M. A. R., LIBÉRIO S. A., GUERRA R. N. M., RIBEIRO M. N. S.,
767 NASCIMENTO R. F. R. Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and
768 immunomodulatory effects of propolis: a brief review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.
769 **2012**.v. 22, n. 1, p. 208-219,
770
- 771 (19) MARCUCCI M.C, FERRERES F, GARCÍA-VIGUERA C., BANKOVA V.S, DE
772 CASTRO S.L, DANTAS A.P, VALENTE P.H.M., PAULINO N. Phenolic compounds from

- 773 Brazilian propolis with pharmacological activities. J Ethnopharmacology .**2001**.v.74, p.105-
774 112.
775
- 776 (20) CABRAL I.S.R., OLDONI T.L.C., PRADO A.,NEVES R.M.,BEZERRA
777 R.M.N.,ALENCAR S de M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da
778 própolis vermelha Brasileira. Química Nova. **2009**, v. 32, n.6, p.1523-1527.
779
- 780 (21) ORTEGA N.S., CAMPO N.B., CABEZAS-FAJARDO F.A. Actividad antibacteriana y
781 composición cualitativa de propoleos provenientes de zonas climáticas del Departamento del
782 Cauca. Artículos de Investigación Científica y Tecnológica. **2011**. v.9, n. 1, p. 8-16, julho.
783
- 784 (22) SANTANA H.F., BARBOSA A.A.T., FERREIRA S.O., MANTOVANI H.C.
785 Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated
786 from mastitic cows. World Journal Microbiology Biotechnology. **2012**. v.28, p.485–491.
787
- 788 (23) CUETO A. P., ALVES S. H., PILAU M. Atividade antiviral do extrato de própolis
789 contra o Calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da Diarréia viral bovina. Ciência
790 Rural. **2011**.v. 41, n. 10, p. 1800-1806.
791
- 792 (24) BANKOVA V., GALABOV A.S., ANTONOVA D., VILHELMOVAN., DI PERRIC.
793 B. Chemical composition of Propolis Extract ACF[®] and activity against herpes simplex virus.
794 Phytomedicine.**2014** v.21, p.1432–1438.
795
- 796 (25) JUG M., KONCIC M.Z., KOSALEC I. Modulation of antioxidant, chelating and
797 antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. LWT - Food
798 Science and Technology.**2014**. v. 57 p.530-537.
799
- 800 (26) BÚFALO M.C., FIGUEIREDO A.S., DE SOUSA, J.P.B., CANDEIAS J.M., BASTOS,
801 J.K., SFORCIN J.M. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by
802 cell viability determination and real-time PCR. Journal of Applied Microbiology.**2009**. v.10
803 n.7, p.1669-1680.
804
- 805 (27) GRESSLER L.T., DA SILVA,A.S., MACHADO G., ROSA L.D., DORNELES
806 F.,GRESSLER L.T., OLIVEIRA M.S., ZANETTE R.A., DE VARGAS A.C., MONTEIRO

- 807 S.G. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract *in vitro* and in experimentally
808 infected rats. *Research in Veterinary Science*. **2012**. v. 93, p. 1314-1317.
- 809
- 810 (28) MARCUCCI M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da
811 própolis. *Química.Nova*. **1996**. v.19, p.529-536.
- 812
- 813 (29) MARCUCCI M.C Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic
814 activity. *Apidologie* .**1995**. v.26, p.83-99.
- 815
- 816 (30) PINTO M.S, FARIA J.E, MESSAGE D, CASSINI S.T.A, PEREIRA C.S, GIOSO M.M..
817 Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas de leite de vacas
818 com mastite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*.**2001**. v.38, p.278-
819 283.
- 820
- 821 (31) PAULINO P., SCRIMIM F.M. RAICHASKI L.B., MARCUCCI M.C. SCREMIM A.C.,
822 CALIXTO J.B. Mechanisms involved in the relaxant action of the ethanolic extract of
823 propolis in the guinea-pig trachea in-vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.**2002**.
824 v.54, p.845-852.
- 825
- 826 (32) MARCUCCI M. C., DE CAMARGO F. A.; LOPES C. M. A. Phenolic compounds from
827 Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal Ethnopharmacol, Limerick*. **2001**.
828 v.74, n.2, p.105–112.
- 829
- 830 (33) QUINN P.J, MARKEY B.K., LEONARD F.C., FITZPATRICK E.S., FANNING S.,
831 HARTIGAN P.J., *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. **2011**. 2^a ed. Iowa: Wiley-
832 blackwell, 1231 p.
- 833
- 834 (34) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Reference Method For
835 Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Of Yeasts; Approved Standard. **1997**.
836 Villanova, NCCLS, v.17, p. 28. M27- A.
- 837
- 838 (35) REED R.H., MUENCH H. A single method of estimating fifty percent end points.
839 *American Journal Hygiene*. **1938**. v.27, p.493-497.
- 840

- 841 (36) PEREIRA A.S., SEIXAS F.R.M.S., AQUINO NETO F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa
842 e suas perspectivas futuras. *Química Nova*. **2002**.v.25: 321-326.
- 843
- 844 (37) BURDOCK G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food*
845 *and Chemical Toxicology*. **1998**. Oxford, v.36, n.4, p.347-363.
- 846
- 847 (38) SAWAYA A.C.H.F, TOMAZELA D.M, CUNHA I.B.S, BANKOVA V.S, MARCUCCI
848 M.C, CUSTÓDIO A.R, EBERLIN M.N. Electrospray ionization mass spectrometry
849 fingerprinting of propolis. *Analyst*. **2004**. 129:739-744.
- 850
- 851 (39) COTTICA S.M., SABIK H., ANTOINE C., FORTIN J., GRAVELINE N.,
852 VISENTAINER J.V., BRITTEN M. Characterization of Canadian propolis fractions obtained
853 from two-step sequential extraction. *Food Science and Technology*. **2015**. v. 60, p. 609- 614.
- 854
- 855 (40) DEGÁSPARI C. H., WASZCZYNSKYJ N., PRADO M. R. M. Atividade
856 antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius Raddi*. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*. **2005**. v.
857 29, n. 3, p. 617-622,.
- 858
- 859 (41) MIORIN P.L., LEVY N.C. JR., CUSTODIO A.R., BRETZ W.A., MARCUCCI M.C.
860 Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*
861 against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. **2003**. 95, 913–920.
- 862
- 863 (42) MARCUCCI M. C, BANKOVA V. Chemical composition, plant origin and biological
864 activity of Brazilian propolis. *Current Topics in Phytochemistry*. **1999**. v. 2: p. 115-123.
- 865
- 866 (43) SAWAYA C.H.F. A., CUNHA I.B. S, MARCUCCIC M.C., RODRIGUES R.F.de,
867 EBERLIN M.N. Brazilian Propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. *Apidologie*.
868 **2006**.v.37, p. 398–407.
- 869
- 870 (44) LOGUERCIO A. P., GROFF A. C. M, PEDROZZO A. F. et al. Atividade “in vitro” do
871 extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. *Pesquisa agropecuária*
872 *brasileira*. **2006**.v. 41, n. 2, p. 347-349.
- 873

- 874 (45) FARNESI A.P. Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em micro-
875 organismos. Dissertação de mestrado. **2007**.Área em Ciências- Genética, Universidade de São
876 Paulo.
- 877
- 878 (46) JÚNIOR A.F., LOPES M.M.R., COLOMBARI V., MONTEIRO A.C.M.,
879 VIEIRAE.P.Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do
880 Brasil. Ciência Rural. **2006**. v.36, n.1, p.294-297, jan-fev.
- 881
- 882 (47) VARGAS A. C., LOGUERCIO A. P., WITT N. M. Atividade antimicrobiana “in vitro”
883 de extrato alcóolico de própolis. Ciência Rural. **2004**. v. 34, n. 1, p. 159-163.
- 884
- 885 (48) SFORCIN J. M., FERNANDES J. R. A., LOPES C. A. M. Seasonal effecton Brazilian
886 propolis antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology. **2000**.v. 73, p. 243-249.
- 887
- 888 (49) LONGHINI R., SHEILA M. RAKSA S.M., OLIVEIRA A.C.P. O, SVIDZINSKI,T. I.
889 E., FRANCO, S.L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de
890 sua atividade antifúngica. Brazilian Journal of Pharmacognosy. **2007**.17(3): 388-395, Jul./Set
891
- 892 (50) AGÜERO M.B., SVETAZ L., SÁNCHEZ M., LUNA L., LIMA B., MARÍA LIZA
893 LÓPEZ M.L., ZACCHINO S., PALERMO S.J., WUNDERLIN D., FERESIN, G.E., TAPI
894 A.Argentine na Andean propolis associated with the medicinal plant Larreanitida Cav.
895 (*Zygophyllaceae*). HPLC–MS and GC–MS characterization and antifungal activity.Food and
896 Chemical Toxicology.**2011**.v.49, p.1970–1978.
- 897
- 898 (51) QUINTERO-MORA. Effect of Mexican propolis extract from *Apis mellifera* on
899 *Cândida albicans in vitro*. Revista Iberoamericana de Micologia. **2008**. V.25, n.1, março,
900 p.22-26.
- 901
- 902 (52) SALOMÃO K., PEREIRA P.,R.S., CAMPOS L.C., BORBA C.M., CABELLO P.H.,
903 MARCUCCI M.C., CASTRO S.L. de. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical
904 Composition and Antimicrobial Activity. eCAM.**2008**. v. 5 (3).
- 905
- 906 (53) HULEIHEL M. e ISANU V. Anti-herpes simplex vírus effect of an aqueous extract of
907 própolis. Israel Medical Association Journal.**2002**. v.4, n.11, p.923-927.

- 908 (54) SCHINITZLER P. Antiviral Activity and made of action of propolis extract and solveted
909 compounds. *Phytoterapy Research*. **2009**. v.24, n.1,p. 20-28.
910
- 911 (55) CUETO A.P.S. Avaliação da citotoxicidade e atividade antiviral da própolis frente ao
912 Calicivírus Felino (FVC), Adenovírus Canino 2 (CAV-2) e BVDV. Dissertação de mestrado.
913 **2010**. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. Universidade Federal de Santa Maria.
914
- 915 (56) FISCHER G., DUMMER L. A., VIDOR T. Avaliação da ação antiviral de uma solução
916 de própolis sobre o Herpesvírus Bovino e o Vírus da Diarréia Viral dos Bovinos. In: EnPos -
917 Encontro de Pós-Graduação, 7.**2005**. Pelotas. Anais.
918
- 919 (57) NEWMAN D.J.eCRAGG G.M. Natural products as sources of new drugs over thelast 25
920 years. *Journal Natural Products*. **2007**., v.70, n.3, p.461-477.
921
- 922 (58) AKAO Y., MARUYAMA H., MATSUMOTO K., OHGUCHI K., NISHIZAWA K.,
923 SAKAMOTO T., ARAKI Y.,MISHIMA S., NOZAWA Y. Cell growth inhibitory effect of
924 cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines.*Biol Pharm Bull*.**2003**.26:
925 1057-1059.
926
- 927 (59) AMOROS M., SAUVAGER F., GIRRE L. *In vitro* antiviral activity of
928 propolis.*Apidologie*. **1992**. v. 23, p. 231-240.
929
- 930 (60) VYNOGRAD N., VYNOGRAD I., SOSNOWSKI Z. A comparative multi-centrestudy
931 of efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes
932 (HSV).*Phytomedicine*. **2001**.v. 7, n. 1, p. 1-6.

4 Considerações Finais

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- Os extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas nativas jataí apresentaram atividade antimicrobiana frente aos agentes infecciosos avaliados.
- A própolis marrom apresentou melhor atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Enquanto para *Streptococcus* sp., a verde demonstrou melhor ação.
- Bactérias Gram positivas apresentaram maior sensibilidade aos extratos de própolis do que as Gram negativas.
- A própolis marrom apresentou melhor ação frente aos fungos *Cândida* sp. e *Sporotrix* sp., quando comparados aos própolis verde e própolis de abelhas jataí, respectivamente.
- O extrato de própolis de abelhas jataí demonstrou ser menos citotóxica à MDBK, quando comparados aos extratos verde e marrom, respectivamente.
- Houve atividade antiviral da própolis marrom frente ao BoHV-1 no (Método pré-infecção: quando extratos adicionados antes da inoculação), porém não houve significativa ação frente ao BVDV.
- A própolis verde demonstrou atividade antiviral significativa nos dois métodos de tratamentos das células (pós e pré) frente ao BoHV-1. Já a de jataí apresentou atividade antiviral frente ao BoHV-1 e BVDV no método pré-infecção, enquanto no método pós-infecção, não houve ação significativa.
- Os extratos de própolis apresentaram atividade virucida. A p. verde demonstrou ação virucida frente ao BoHV-1 sob a temperatura de incubação de 37°C. Enquanto a p. própolis jataí demonstrou ação frente ao BVDV ambas às temperaturas.
- Os resultados obtidos indicam a própolis como um potencial antimicrobiano, logo a sequência de novos estudos para testar sua ação frente a outros agentes infecciosos importantes em Medicina Veterinária e Humana.

Referências

ADELMANN, Juliana. **Própolis: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Dissertação de mestrado, área: Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y. K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.909-915, 2005.

ANDRADE, Uriel Vinicius Cotarelli. **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**. Tese de Doutorado, área: Tecnologia de alimentos, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2010.

ARAÚJO, M. A. R.; LIBÉRIO S. A.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, R. F. R. Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 208-219, 2012.

BANKOVA, Vassya. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. **Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal of Biosciences, Tubingen**, v.54, p.401-405, 1999.

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

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1/2, p. 114–117, 2005.

BANKOVA, V.; GALABOV, A.S.; ANTONOVA, D.; VILHELMOVA, N.; DI PERRIC, B. Chemical composition of Propolis Extract ACF[®] and activity against herpes simplex virus. **Phytomedicine**, v.21, n.6, p.1432–1438, 2014.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Research Phytotherapy**, v. 15, n.7, p. 561-571, 2001.

BASTOS, E.M.A.F.; GALBIATI, C.; LOUREIRO, E.M.; SCOARIS, D.O. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.63, n.5, p.1255-1259, 2011.

BATISTA, L.L.; CAMPESATTO, E.A.; ASSIS, M.L.; BARBOSA, A.P.; GRILLO, L.A.; DORNELAS, C.B. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.39, n.6, p. 515-520, 2012.

BÚFALO, M.C.; FIGUEIREDO, A. S.; DE SOUSA, J. P. B.; CANDEIAS, J. M.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, n.5, p.1669-1680, 2009.

BUSATO, A.; TRACHSEL, P.; SCHALLIBAUM, M.; BLUM, J.W. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 44, p. 205-220, 2000.

CAMPOS, J.F.; SANTOS, U.P. dos; MACORINI, L.F.B.; MELO, A.M.M.F.de; BALESTIERI, J.B.P.; PAREDES-GAMERO, E.J.; CARDOSO, C.A.L.; SOUZA, K.de P.; SANTOS, E.L. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**. v. 65 p.374–380, 2014.

COSTA, G.M.da.; BARROS, R.A.; CUSTÓDIO, D.A.da.; PEREIRA, U.de P.; FIGUEIREDO, D.J.; SILVA, N.da S. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo, v.80, n.3, p. 297-302, 2013.

CUETO, A. P.; ALVES, S. H.; PILAU, M. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o Calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da Diarréia viral bovina. **Ciência Rural**, v.41, n. 10, p. 1800-1806, 2011.

DRAGO, L.; DE VECCHI, E.; NICOLA, L.; GISMONDO, M.R. *In vitro* antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelated propolis). **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n.5, p.1914-21, 2007.

FARNESI, Ana Paula. **Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em micro-organismos.** Dissertação de mestrado, Área em Ciências-Genética, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

FREITAS, M.F.L.; JUNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico.** São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

FISCHER, G.; HÜBNER, S.O.; VARGAS, G.D.; VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. **Arquivo do Instituto Biológico,** São Paulo, v.75, n.2, p.247-253, abr./jun,2008.

GRESSLER, L.T.; DA SILVA, A.S.; MACHADO, G.; ROSA, L.D.; DORNELES, F.; OLIVEIRA, M.S.; ZANETTE, R.A.; DE VARGAS, A.C.; MONTEIRO, S.G. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract *in vitro* and in experimentally infected rats. **Research in Veterinary Science,** v. 93, p. 1314-1317, 2012.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal Ethnopharmacology,** v.74,p.105-112, 2001.

MIDORIKAWA, K.; BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; NAGAOKA, T.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D; HUERTAS, A.A.G.; KADOTA, S. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Propolis. **Phytochemical Analysis,** v.12, n.6, p. 366-373, 2001.

MIORIN, P.L.; LEVY, N.C.JR.; CUSTODIO, A.R.; BRETZ, W.A.; MARCUCCI, M.C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology,** v.95,p. 913–920, 2003.

ORTEGA, N.S.; CAMPO, N.B.; CABEZAS-FAJARDO, F.A. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propoleos provenientes de zonas climáticas del Departamento del Cauca. **Artículos de Investigación Científica y Tecnológica.** v.9, n. 1, p. 8-16, julho, 2011.

PARK, Yong. Evaluation of brazilian propolis by both physic chemical methods and biological activity. **Honeybe Science,** Tamagawa, v.21, n.2, p.85-90, 2000.

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

PINTO, M.S.; FARIA, J.E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.; PEREIRA, C.S.; GIOSSO, M.M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v.38, n.6, p.278-283, 2001.

QUINN P.J, MARKEY B.K., LEONARD F.C., FITZPATRICK E.S., FANNING S., HARTIGAN P.J. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2a ed. Iowa: Wiley-blacwell, 2011. 1231 p.

REED R.H., MUENCH H. A single method of estimating fifty percent end points. **American Journal Hygiene**. v.27, p.493-497. 1938.

SANTANA, H. F.; BARBOSA, A.A.T.; FERREIRA, S.O.; MANTOVANI, H.C. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.485–491, 2012.

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P.R.S.; CAMPOS, L.C.; BORBA, C.M.; CABELLO, P.H.; MARCUCCI, M.C.; CASTRO, S.L. de. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. **eCAM**, v. 5, n.3, p. 317-324, 2008.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; NAYDENSKI, H.; TSVETKOVA, I.; RODRIGEZ, J.G.; BANKOVA, V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. **Fitoterapia**, v.75, p. 683 – 689, 2004.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ÖNÇAG, Ö.; ÇOGULO, D.; GENÇAY, Ö.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiology Research**, v.160, p.189-195, 2005.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

ZANETTE, E.; SCAPIN, D. e ROSSI E.M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc & Ciência –ACBS**. v.1, n.1, p.65-70, 2010.