

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DA PRÓPOLIS ORGÂNICA MISTA FRENTE A MICRORGANISMOS MULTIRRESISTENTES

DETERMINATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE EXTRACT OF THE PROPOLIS ORGANIC MIXED AGAINST MULTIRESSISTANT MICRORGANISMS

Caroline Corrêa Da Silva¹, Claudia Tatiane De Souza¹, Vilmair Zancanaro², Emyr Hiago Bellaver Andrade^{2*}

¹Universidade Alto Vale do Rio do Peixe – UNIARP. Caçador, Santa Catarina, Brasil

²*Universidade Alto Vale do Rio do Peixe – UNIARP, Laboratório de Físico-Química e Bioquímica experimental. Núcleo de Ciência da Saúde. Caçador, Santa Catarina, Brasil

*Autor correspondente: Rua Victor Baptista Adami, 800. Caçador- SC. CEP 89500-000
E-mail: hi.agobellaver@hotmail.com. Fone/Fax: (49)3561-6200. ORCID: 0000-0002-7169-1000

RESUMO

O uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos tem levado à seleção de microrganismos patogênicos resistentes. Os antibióticos naturais retornam como uma alternativa eficaz e econômica no tratamento de patógenos multirresistentes, incluindo a própolis como fitoterápico na prática da medicina atual. Objetivou-se, neste estudo, avaliar as propriedades bactericidas de extratos aquosos da própolis orgânica mista contra *Enterobacter cloacae* resistente à tigeiciclina e *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e suas respectivas cepas padrões. A análise da capacidade bactericida da própolis realizou-se através de Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizando-se extratos que variaram de 30% a 0,75% (p/v), pelas metodologias de macrodiluição em caldo, meios de culturas suplementados, *Spot-on-the-lawn* e disco difusão em ágar. A CIM, para ambos patógenos e cepas padrões, ficou estabelecida na técnica de macrodiluição em 7,5% enquanto que no meio suplementando o percentual de inibição foi 5%. No método *Spot-on-the-lawn*, não houve formação de halos de inibição do crescimento bacteriano. Estabeleceu-se a CIM para *E. cloacae* resistente à tigeiciclina e para sua cepa padrão em 12% no método de disco difusão; já para *S. aureus* MRSA, pelo mesmo método, a concentração de inibição estipulou-se a 7,5% tanto para a cepa patogênica quanto para seu padrão. Ao comparar o perfil de susceptibilidade à própolis pelos isolados multirresistentes e suas respectivas cepas padrões infere-se que o mecanismo de sensibilidade ao fitoterápico independe do mecanismo de resistência aos antibióticos comerciais.

Palavras-chave: Extrato aquoso, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* sp., metilina resistente, tigeiciclina resistente, fitoterápico.

ABSTRACT

The indiscriminated and long term use of antimicrobials has led to the selection of resistant pathogenic microorganisms. Natural antibiotics are an effective and economical alternative in the treatment of multiresistant pathogens including propolis as an herbal remedy in current medical practice. The purpose of this study was evaluating the bactericidal properties of aqueous extracts of mixed organic propolis against tigeicycline-resistant *Enterobacter cloacae* and resistant methicillin *Staphylococcus aureus* (MRSA) and their respective standard strains. The analysis of the bactericidal capacity of propolis was performed through Minimum Inhibitory Concentration

(MIC), using extracts ranging from 30% to 0.75% (w / v), broth macrodilution method, supplemented culture media, Spot-on -the-lawn and disc diffusion in agar. The MIC by the macrodilution method was established at 7.5% while in the medium supplementing the minimum bactericidal concentration was 5% for the multiresistant strains as well as their standards. In the Spot-on-the-lawn method, there was no formation of bacterial growth inhibition halos. The CIM for *E. cloacae* resistant to tigecycline and its standard strain was established in 12% whereas for *S. aureus* MRSA the inhibition concentration was set at 7.5% by disc diffusion method for both strains. When comparing the susceptibility profile to propolis by multiresistant isolates and their respective standard strains, it is inferred that the mechanism of sensitivity to herbalism is independent of the mechanism of resistance to commercial antibiotics.

Key words: Aqueous extract, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* sp., methicillin resistance, tigecycline resistance, phytotherapy.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a utilização de antibióticos para os mais diversos estágios infecciosos é costumeiramente praticada, dando-se, muitas vezes, sem os devidos exames prévios de sensibilidade aos antimicrobianos e sem o compromisso com a adesão ao tratamento por parte do paciente. Esses fatos são passíveis à seleção de microrganismos resistentes aos antimicrobianos administrados¹. Tal resistência, por parte dos microrganismos, representa a evolução das espécies que se manifesta pela capacidade de sofrer mutações ou pela troca de material genético entre as espécies bacterianas².

A fitoterapia faz parte da prática da medicina atual. A Organização Mundial da Saúde reconhece a utilização de produtos naturais como próprios e detentores de grande poder medicinal, desde que, como quaisquer outros industrializados, tenham o uso adequado e as devidas orientações. Esses produtos são de fácil acesso e de baixo custo, tornando-se atrativos para o Sistema Único de Saúde (SUS), o qual tem uma demanda elevada de pacientes e de recursos limitados de tratamento³.

O uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos tem levado à seleção de microrganismos patogênicos resistentes a tais compostos, trazendo a prestabilidade de antibióticos naturais como uma alternativa eficaz e econômica ao tratamento de patógenos bacterianos multirresistentes. A resistência microbiana é cada vez maior e a perspectiva de uso de medicamentos antimicrobianos no futuro é incerta. Portanto, intervenções por parte de

órgãos e serviços de saúde, como no controle do uso de antimicrobianos, e desenvolvimento de pesquisas a fim de melhorar a compreensão dos mecanismos genéticos de resistência paralelamente ao estudo de desenvolvimento de novos fármacos sintético como naturais, tornam-se necessárias para haver redução de custo para o tratamento⁴.

Um exemplo de fármacos fitoterápicos com atividade antimicrobiana é a própolis. Esse composto é formado por uma miscelânea de pólen, ramos e brotos de plantas. As abelhas misturam a cera e a própolis coletada juntamente com a enzima 13-glicosidase presente na sua saliva, hidrolisando os flavonoides glicosilados em flavonoides agliconas. O produto final da hidrólise constitui um material resinoso, de coloração variante de marrom a verde escuro⁵, com o objetivo proteger a colmeia e as abelhas do ataque de insetos e de microrganismos. Além disso, tem por finalidade o preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e à mumificação de insetos invasores⁶.

Suas propriedades e algumas características variam de acordo com a região, o clima, a matéria-prima encontrada e, também, as diferenças genéticas de cada abelha^{7,8}. De todos os compostos que a própolis possui, o que chama mais atenção é o grupo dos flavonoides⁹ e os ácidos fenólicos que possuem propriedades antibacterianas, antivirais e antioxidantes¹⁰.

Devido à emergência de isolados multirresistentes à ampla gama de antibióticos disponíveis comercialmente e a escassez de tratamento, este trabalho objetivou avaliar as propriedades bactericidas de extratos aquosos da própolis orgânica mista contra *Enterobacter*

cloaceae resistente à tigeiciclina e *Staphylococcus aureus* *Methicillin-resistant* (MRSA) através de metodologias distintas.

Material e Métodos

Obtenção e Preparo dos Isolados Multirresistentes

Para a condução dos experimentos, cederam-se isolados multirresistentes por um hospital de grande porte, referência em transplantes hepáticos, localizado na cidade de Curitiba-PR. As cepas *Enterobacter cloacea* resistentes à tigeiciclina e *Staphylococcus aureus* MRSA foram isoladas, respectivamente, de culturas de vigilância dos pacientes hospitalizados. Após, armazenaram-se em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) glicerinado e acondicionaram-se em caixa térmica até a chegada ao laboratório de pesquisa. No segmento dos ensaios, reativaram-se as cepas em caldo BHI 24h/37°C e, posteriormente, transferiu-se para ágar MacConkey os isolados Gram-negativos e para Ágar Sangue para Gram-positivos a fim de estabelecer a pureza dos isolados e, após confirmação da mesma, preparam-se os microrganismos a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL em solução salina estéril para utilização nos ensaios.

Obtenção e Preparo dos Extratos Aquosos

Um extrato da própolis orgânica mista a 30% obteve-se da empresa melífera Breyer & Cia Ltda. com sede na cidade de União da Vitória- PR. Para a condução dos ensaios, prepararam-se concentrações iguais e inferiores à obtida da empresa, sendo: 30%, 15%, 12%, 7,5%, 6%, 3,75%, 3%, 1,87%, 1,5% e 0,75% no momento do uso, diluindo-se em caldo BHI.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Macrodiluição

A determinação da CIM dos extratos mistos orgânicos frente aos microrganismos isolados e suas respectivas cepas padrões *E. cloacea* ATCC 13047 e *S. aureus* ATCC 25923 realizou-se através da técnica de macrodiluição em tubos proposto por Guzmán e Cruz (2017)¹¹.

Para cada microrganismo em teste, preparou-se uma série de tubos de ensaio contendo 800µL de caldo BHI, 200µL do microrganismo e 1000µL da própolis

nas concentrações anteriormente citadas. Reservaram-se dois tubos, sendo um para controle positivo de crescimento com 1000uL de água estéril, 800uL de caldo e 200uL do microrganismo teste, enquanto que o controle negativo de crescimento efetivou-se com Amicacina 16µg/mL para *E. cloaceae* e Cirpofloxacino 0,5 µg/mL para *S. aureus*. Ao término do preparo da técnica, incubaram-se os tubos *overnight* a 37°C.

Determinação da CIM

Ao término do prazo de 24h, os tubos que estiveram com o caldo visivelmente límpido foram semeados pela técnica de dispersão em Ágar Mueller-Hinton (MH) para contagem de colônias e determinação da CIM. Realizaram-se os testes em duplicata e considerou-se a CIM como a última concentração do extrato capaz de inibir em sua totalidade o crescimento bacteriano^{12,13}.

Meios de cultura Suplementados

Com o mesmo objetivo de analisar a atividade bactericida dos extratos da própolis mista orgânica em placas de MH e ágar sangue (AS), verteram-se meios suplementados com as concentrações pré-estabelecidas da própolis. Depois de solidificados, semeou-se, pela técnica de distensão, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL dos microrganismos em teste e após 24h realizou-se a leitura para inibição do crescimento dos microrganismos. Realizaram-se as análises em duplicata e os resultados expressaram-se a partir da concentração inibitória mínima total do crescimento de microrganismos para os meios suplementados.

Spot-On-The-Lawn

Em placas contendo MH e AS (4mm), semearam-se, por distensão, concentrações já estabelecidas dos microrganismos em testes. Conduziram-se as placas à geladeira a fim de que houvesse completa secagem do meio. Após o feito, dispensaram-se alíquotas de 15µL dos extratos da própolis, nas concentrações pré-determinadas, em espaços equidistantes na placa. As placas foram novamente conduzidas à geladeira e, após secas, foram acondicionadas em estufa bacteriológica por 37°C/24h. Efetivaram-se as análises em duplicata e os resultados só se consideraram positivos para inibição quando halos superiores a 2mm de diâmetro foram observados¹⁴.

Disco Difusão

A atividade antimicrobiana, de igual forma, foi determinada pelo teste de disco difusão em ágar¹⁵. Esse teste consiste na aplicação de 10µL dos extratos aquosos da própolis em discos de papel filtro estéril de proximamente 6mm de diâmetro sobre uma placa de MH, contendo os microrganismos em teste inoculados por distensão a uma concentração já conhecida. Incubaram-se as placas por 24h/. As análises deram-se em duplicata, aferiram-se os halos de inibição com auxílio de um paquímetro, tendo os resultados expressos em milímetros de inibição.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico deu-se através da realização da análise de variância (ANOVA), com $p < 0,05$ para grau de significância, seguida dos testes como o de comparação múltipla de Tukey desenvolvido, utilizando-se o *Software* GraphPad Prism versão 5.0.

Resultado E DISCUSSÃO

A própolis é composta por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% substâncias variadas, incluindo resíduos orgânicos¹⁶. Por ser um composto dependente de algumas variáveis, suas características organolépticas e atividades biológicas dependem muito de onde está implantada a colmeia¹⁷, devendo esse fato

justificar a diferença de resultados obtidos em diversos estudos.

Na Tabela 1, encontram-se os resultados das CIM nas diferentes metodologias empregadas. Observou-se na técnica da macrodiluição em tubos a ausência de crescimento bacteriano a partir da concentração de 7,5%, para as cepas multirresistentes bem como seus isolados padrões. No meio suplementado, não houve crescimento das cepas em teste a partir de 5%, contrapondo-se ao método da gota em superfície sólida (*spot-on-the-lawn*), no qual houve desenvolvimento de todas as cepas testes; por outro lado, no disco difusão em MH para as bactérias Gram-negativas, a inibição do crescimento se deu a partir de 12% ao passo que para Gram-positivas cultivadas em AS a inibição do crescimento ocorreu a partir de 7,5% (Tabela 1).

Seguindo uma análise estatística, quando se comparam as técnicas, nota-se diferença estatística ($p < 0,05$) nas metodologias de disco difusão em relação à suplementação do meio de cultura em $\pm 58,3\%$ para os isolados multirresistentes e padrões de *E. cloaceae*. No que se refere às metodologias empregadas para análise da atividade antimicrobiana da própolis aos isolados multirresistente e padrão de *S. aureus*, nota-se diferença estatística de 33,3% entre as metodologias de disco difusão e/ou macrodiluição em relação à suplementação do meio.

Tabela 1. Determinação da CIM em diferentes metodologias, utilizando extrato aquoso da própolis verde contra isolados multirresistentes.

Isolados	Metodologias Aplicadas			
	Macrodiluição	Meio MH/AS suplementado	Spot-on-the-lawn	D.D MH/AS
<i>Enterobacter cloaceae</i> *	7,5% ^b	5% ^c	N	12% ^a
<i>E. cloaceae</i> ATCC 13047	7,5% ^b	5% ^c	N	12% ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	7,5% ^b	5% ^b	N	7,5% ^a
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7,5% ^a	5% ^b	N	7,5% ^a

*Isolado resistente à Tigeciclina; MH: Ágar Mueller Hinton; AS: Ágar Sangue; N: Não houve formação ou não foi possível a visualização de halos de inibição de crescimento bacteriano; D.D: Disco Difusão.

Comparando-se as técnicas, letras iguais não diferem estatisticamente entre si $p > 0,05$, mas diferem estatisticamente das demais $p < 0,05$ pelo teste de Tukey

Nos estudos de Aguiar (2014)¹³, ao avaliar a CIM da própolis verde, proveniente da região sudeste do Brasil, sobre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* MRSA, comparando com seu isolado padrão, estipulou-se a CIM para os microrganismos em 0,17%

em caldo BHI, diferindo do presente estudo e dos achados de Endler et al. (2003)¹⁴, que relata atividade inibitória do crescimento de cepas de *Pseudomonas* sp e *S. aureus*, variando de concentração entre 15 a 30% da própolis.

Da Silva et al. (2017)⁸ encontraram resultados, em seu estudo, que confirmam que o extrato alcoólico de própolis 12%, à solução de própolis a 70% diluída em água e à própolis a 50% apresentam atividades antimicrobianas. Em relação à não inibição dos *S. mutans* pelas outras soluções testadas, isso se pode justificar devido à quantidade de própolis extraída, que em grandes quantidades carrega impurezas e podem diminuir a concentração de flavonoides, responsáveis pela atividade antimicrobiana da própolis.

A atividade antimicrobiana dos flavonoides reside na inibição da síntese de DNA e na síntese de proteínas e lipídios em algumas bactérias Gram-negativas. Os terpenos estabelecem sua atividade a partir da difusão na membrana citoplasmática, alterando sua permeabilidade e a fluidez de íons^{17,18,22}, levando à precipitação de proteínas no citoplasma celular. Tais compostos, igualmente, interferem na síntese de poliaminas, moléculas básicas para o crescimento de microrganismos. Acredita-se que o mecanismo de ação da própolis está ligado à diminuição da atividade da ornitina descarboxilase, enzima essencial à síntese de poliaminas¹⁹.

Ao analisar os resultados da CIM pela técnica de disco difusão em ágar e por macrodiluição, nota-se diferença da concentração de inibição entre cepas Gram-positivas em Gram-negativas. Saeki e colaboradores (2011)²¹, em seu estudo, relataram que o extrato alcoólico de própolis a 30% foi eficaz na inibição do crescimento de *S. aureus* proveniente de animais portadores de mastite, apresentando halos de inibição entre 6 e 18mm pela metodologia de disco difusão em ágar, sugerindo o uso de extratos naturais como alternativa ao uso dos antibióticos comerciais. O presente estudo difere ao do autor²¹ em relação à concentração, halos de inibição, em que, para os isolados de *S. aureus*, aferiram-se halos entre 12±0,3 a 13,5±0,5 mm para MRSA e cepa padrão, respectivamente, e materiais utilizados. O álcool exerce atividade bactericida, podendo a concentração de 30% estar mais relacionada à atividade do álcool do que à própria ação da própolis.

Ao analisarem a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato alcoólico de própolis contra 161 isolados bacterianos, dentre eles *S. aureus* e enterobactérias, Vargas et al. (2004)²² relatam que o meio suplementado com extrato alcoólico 50% de própolis mostrou-se efetivo na inibição de 92,6% dos

isolados Gram-positivos; por outro lado, 57,5% dos isolados Gram-negativos mostraram-se resistentes ao extrato no método proposto. De um modo geral, a metodologia utilizada pelos autores mostrou-se efetiva na inibição de 67,7% das bactérias testadas, utilizando uma concentração mínima de suplementação de 5% indo ao encontro do presente estudo na concentração utilizada.

A semelhança dos métodos *Spot-on-the-lawn* e a difusão em ágar têm como princípio básico a difusão de compostos solúveis, principalmente em água, sobre o meio sólido. É necessário levar em consideração algumas limitações, dentre as quais a incapacidade de fornecer parâmetros igualitários para se comparar substâncias com solubilidade e difusibilidade distintas²³. Pela própolis se tratar de um material resinoso, sua solubilidade fica comprometida em água, o que pode justificar o insucesso obtido no ensaio.

Segundo De Vargas et al. (2004), é notória a maior atividade antibacteriana da própolis em isolados Gram-positivos devido aos compostos flavonoides, ácidos e ésteres aromáticos presentes na resina, que atuam sobre a parede celular²². Em relação à resistência de bactérias Gram-negativas aos compostos naturais, essa pode estar relacionada à estrutura complexa da membrana de tais bactérias uma vez que as mesmas possuem uma maior quantidade de lipídios e também a lipopolissacarídeos na parede externa da célula²⁰.

CONCLUSÕES

Devido à variação de região, clima e estação do ano em que a própolis é produzida, não há estudos padrões das concentrações de matérias-primas especificadas para cada tipo de própolis, o que leva à variação dos resultados, usando uma mesma metodologia.

Ao se analisar o perfil de sensibilidade de isolados clínicos multirresistentes e suas respectivas cepas padrões, pode-se inferir que os mecanismos de resistências aos fármacos não estão relacionados à sensibilidade das cepas ao extrato orgânico utilizado neste estudo, o que é de suma importância para a indústria farmacêutica diante da escassez farmacológica para tratamento de bactérias multirresistentes.

Um aspecto relevante é a utilização de própolis veiculadas em substâncias como etanol em concentrações variadas. A opção pelo extrato

aquoso justificou-se pelo interesse em estudar suas propriedades de forma isolada e sem interferentes na atividade deste.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à empresa melífera Breyer & Cia LTDA, pela doação dos extratos utilizados neste ensaio, e também à Dr^a Mayara C. Onishi, pela colaboração com os isolados multirresistentes.

REFERÊNCIAS

01. Pina E, Ferreira E, Marques A, Matos B. Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*. 2010;10(1):27-39.
02. De Oliveira KR, Munaretto P. Uso racional de antibióticos: responsabilidade de prescritores, usuários e dispensadores. *Revista Contexto & Saúde*. 2013;10(18):43-51.
03. Ribeiro Bruning MC, Bittencourt Gonzalez Mosegui G, Manso de Melo Vianna C. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2012;17(10).
04. Cavalari RI. Atividade antioxidante de extratos de própolis verde em sistemas lipídicos emulsionados. (Tese de Doutorado) São Paulo: Universidade de São Paulo. 2017.
05. Dos Santos FHP, Reis AS, da Silva JF, da Silva Junior BR, da Silva SB, Andre ACGM, et al. Avaliação antibacteriana dos extratos hexânico e metanólico de própolis vermelha encontrada no município barra de Santo Antônio/AL. *Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-ALAGOAS*. 2015;2(3):33-44.
06. Abreu BVdB. Bioprospecção de pólen de *Melipona fasciculata* Smith. (Tese de Doutorado) São Luiz - MA: Universidade Federal do Maranhão; 2016.
07. Neto R, Martins E. Desenvolvimento, avaliação clínica e microbiológica de um verniz dentário de própolis sobre redução de *Streptococcus mutans* em crianças. (Tese de Doutorado) Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. 2017.
08. Da Silva A, Ferreira FdCA, Capel LMM. Avaliação in vitro da Atividade Antimicrobiana de Extrato Alcoólico de Própolis Comparado à Solução de Clorexidina 0,12%. *Journal of Health Sciences*. 2017;19(2):95-7.
09. De Moura Oliveira KA, de Oliveira GV, Batalini C, Rosalem JA, Ribeiro LS. Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 2013;33(2):211-22.
10. Lustosa SR, Galindo BA, Nunes CCL, Randau PK, Neto RJP. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008; 18(3):447-454.
11. Guzmán EL, Cruz FJM. Combinations of Extracts of Propolis and Other Compounds Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants: InTech*; 2017.
12. Junior WB, Miranda EO, Alvino V, Araujo B, Silva DW, Porfírio Z. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 2012;33(1):3-10.
13. Aguiar CG, Lima LG, Athayde LA. Efeito antimicrobiano da própolis verde frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina (MRSA). *Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde*. 2015;1(1):14-8.
14. Endler AL, Oliveira SC, Amorim CA, Carvalho MP, Pileggi M. Test of the efficiency of propolis in combating pathogenic bacteria of the respiratory system. *Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde*. 2003;9(2).
15. Magalhães TV, Lot RFE, Del Carratori CR. Análise da ação antibacteriana da própolis e padronização de volumes através de antibiograma. 2016;25(1-2):38-44.
16. Vargas-Sánchez R, Torrescano-Urrutia G, Mendoza-Wilson A, Vallejo-Galland B, Acedo-Félix E, SánchezEscalante J, et al. Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleos. *Biotecnica*. 2014;16(1):32-7.
17. Kalia P, Kumar NR, Harjai K. Phytochemical screening and antibacterial activity of different extracts of propolis. *Int J Pharma Biol Res*. 2013;3(6):219-22.
18. Luján-Hidalgo MC, Gutiérrez-Miceli FA, Ventura-Canseco LMC, Dendooven L, Mendoza-López MR, Cruz-Sánchez S, et al. Composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de hojas de *Bursera graveolens* y *Taxodium mucronatum* de Chiapas, México. *Gayana Bot*. 2012; 69:7-14.
19. Soto Vásquez MR, Soto Vásquez K, Santos Mendoza AA, Moncayo Vargas NK. Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus* L. *Química Viva*. 2015;14(3).
20. Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VdS, Lopes NP, Epifanio RdA. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química nova*. 2002:45-61.
21. Saeki EK, de Mello Peixoto ECT, Matsumoto LS, Marcusso PF, Monteiro RM. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas

antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. Acta Veterinaria Brasilica. 2011;5(3):284-90.

22. De Vargas AC, et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. Ciência Rural. 2004;34(1).

23. Só MVR, Wagner MH, Rosa RAd, Telles L, Colpani F, Henz S, et al. Atividade antimicrobiana in vitro de uma suspensão de própolis frente ao *Enterococcus faecalis*. RFO UPF. 2011;16(3):277-81.