



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AGRESTE DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
ANIMAIS DE PRODUÇÃO**

MESTRADO ACADÊMICO

SAYONARA GERMANO BARRETO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DA PRÓPOLIS PRODUZIDA NA
MICRORREGIÃO DE GARANHUNS, PE.**

GARANHUNS

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AGRESTE DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
ANIMAIS DE PRODUÇÃO
MESTRADO ACADÊMICO

SAYONARA GERMANO BARRETO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DA PRÓPOLIS PRODUZIDA NA
MICRORREGIÃO DE GARANHUNS, PE.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção, da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção.

Orientadora: Profa. Dra. Elizabete Rodrigues da Silva

Linha de Pesquisa: Sanidade de Animais de Produção

GARANHUNS

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco Sistema Integrado de Bibliotecas (SIB-UFAPE)

Barreto, Sayonara Germano

B273c Caracterização química e avaliação da atividade antimicrobiana do extrato da própolis produzida na microrregião de Garanhuns, PE / Sayonara Germano Barreto. – Garanhuns, 2024. 54 f. : il. color.

Orientador(a): Elizabete Rodrigues da Silva.
Coorientador(a): Pedro Gregório Vieira Aquino.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, Sanidade e Reprodução de Animais de Produção, Garanhuns, BR-PE, 2024.

Inclui referências.

1. Própolis 2. Composição Química 3. Resistência microbiana às drogas I. Silva, Elizabete Rodrigues da (orient.) II. Aquino, Pedro Gregório Vieira (coorient.) III. Universidade Federal do Agreste de Pernambuco Sanidade e Reprodução de Animais de Produção IV. Título
CDD 574.192

SAYONARA GERMANO BARRETO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DA PRÓPOLIS PRODUZIDA NA
MICRORREGIÃO DE GARANHUNS, PE.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção, da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção.

Orientadora: Profa. Dra. Elizabete Rodrigues da Silva

Linha de Pesquisa: Sanidade de Animais de Produção

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Elizabete Rodrigues da Silva,
UFAPE (Orientadora)

Prof. Dr. Vanderson Barbosa Bernardo
IQB/UFAL

Prof. Dr. Pedro Gregório Vieira Aquino
UFAPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que Ele me permitiu e permite viver.

Aos meus pais que sempre priorizaram meus estudos e se fizeram presentes mesmo distante em alguns momentos.

À minha orientadora, prof^a Dra. Elizabete Rodrigues da Silva, e ao meu coorientador prof^o Dr. Pedro Gregório Vieira Aquino pela oportunidade de realizar o mestrado, por todo o ensinamento, compreensão e empatia. Serei eternamente grata por ter conhecido pessoas tão maravilhosas durante o período da pesquisa, não citarei nomes, pois esquecerei de alguém.

À CAPES pelo fomento financeiro, às instituições UFRPE e UFAPE, pela oportunidade de realizar a pesquisa e de ter uma experiência de desenvolvimento profissional e pessoal.

À equipe do laboratório de microbiologia, onde realizei grande parte do mestrado. Não sei o que seria de mim sem vocês. Obrigada por sempre me alegrarem, por me cederem os ombros para chorar, pelo incentivo, pelo companheirismo e por todo ensinamento. Levo vocês em minha memória com muito carinho e sempre que der, irei visitá-los.

Por fim, meus agradecimentos especiais para vovó Maria que está olhando e cuidando de mim no melhor lugar. Sei que ela está orgulhosa de mim como sempre foi. Agradeço à Mandy, minha primogênita, minha gata mais difícil, mas era minha companheira inseparável, me confortava, me alegrava e sempre me recebia com muito amor.

RESUMO

O uso incorreto de antimicrobianos tem levado à seleção de microrganismos resistentes, impulsionando a busca por alternativas eficazes e econômicas para o tratamento de doenças causadas por patógenos multirresistentes. Na medicina veterinária, especificamente na bovinocultura de leite, a mastite é uma das principais causas de perda econômica. O uso de antimicrobianos para tratar essa enfermidade contribui para o surgimento e disseminação de microrganismos resistentes. Vale destacar que a presença de resíduos desses fármacos no leite e derivados lácteos contribui para a seleção de cepas bacterianas resistentes e transferência de genes de resistência para diversos tipos de bactérias, incluindo patógenos humanos. Pesquisas com produtos naturais que exibem atividade antimicrobiana são uma alternativa para o combate a microrganismos multirresistentes aos agentes terapêuticos convencionais. A própolis tem sido usada como medicamento tradicional desde a antiguidade, particularmente por egípcios, gregos e romanos, que a administravam isoladamente ou combinada com outras substâncias naturais para tratar feridas e embalsamar os mortos. Essa substância é conhecida por seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anticancerígenos e antimicrobianos e surge como um antimicrobiano natural promissor. Pesquisadores continuam a investigar a complexa composição da própolis para entender seu potencial biológico, especialmente sua atividade antimicrobiana contra uma variedade de microrganismos multirresistentes. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo identificar compostos químicos, avaliar as atividades antimicrobiana e antibiofilme do extrato hidroalcolólico da própolis produzida na microrregião de Garanhuns, PE, Brasil.

Palavras-chave: composição química; produto natural; antimicrobiano.

ABSTRACT

The incorrect use of antimicrobials has led to the selection of resistant microorganisms, driving the search for effective and economical alternatives for the treatment of diseases caused by multidrug-resistant pathogens. In veterinary medicine mastitis is one of the main causes of economic loss. The use of antimicrobials to treat this disease contributes to the emergence and spread of resistant microorganisms. It is worth noting that the presence of residues of these drugs in milk and dairy products contributes to the selection of resistant bacterial strains and the transfer of resistance genes to other bacteria, including human pathogens. The search for natural products that exhibit antimicrobial activity is an alternative to control microorganisms that are multidrug-resistant to conventional therapeutic agents. Propolis has been used as a traditional medicine since ancient times, particularly by the Egyptians, Greeks, and Romans, who administered it alone or in combination with other natural substances to treat wounds and embalm the dead. This substance is known for its antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and antimicrobial effects and appears as a promising natural antimicrobial. Researchers continue to investigate the complex composition of propolis to understand its biological potential, especially its antimicrobial activity against a variety of multidrug-resistant microorganisms. In this context, the present study aimed to identify chemical compounds and evaluate the antimicrobial and antibiofilm activities of the hydroalcoholic extract of propolis produced in the microregion of Garanhuns, PE, Brazil.

Keywords: chemical composition; natural product; antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fórmula estrutural do ácido benzóico.	19
Figura 2.	Fórmula estrutural do ácido cinâmico	19
Figura 3.	Estrutura básica dos flavonoides.	20

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Médias dos teores totais de fenóis e flavonoides de extratos hidroalcoólicos da própolis produzida na microrregião de Garanhuns, PE, Brasil 39
- Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de extratos hidroalcoólicos da própolis produzida na microrregião de Garanhuns, PE, Brasil. 40
- Tabela 3 - Compostos químicos, tempo de retenção e relação massa/carga (+) do extrato hidroalcoólico de própolis produzida na microrregião de Garanhuns, PE, Brasil. 41
- Tabela 4 - Percentual de amostras de *Staphylococcus aureus* de acordo com a produção de biofilme, antes e após exposição à diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis. 43
- Tabela 5 - Porcentagem de inibição da formação de biofilme de diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis. 44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
3	CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	13
3.2	COMPOSIÇÃO DA PRÓPOLIS	16
3.3	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS	24
	REFERÊNCIAS	27
4	CAPÍTULO II – PRODUÇÃO CIENTÍFICA	36
	ARTIGO CIENTÍFICO – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DA PRÓPOLIS PRODUZIDA NA MICRORREGIÃO DE GARANHUNS, PE	36
	RESUMO	36
	ABSTRACT	37
	INTRODUÇÃO	39
	MATERIAL E MÉTODOS	
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
	CONCLUSÃO	50
	AGRADECIMENTOS	51
	DECLARAÇÃO DE INTERESSE	51
	REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

O uso contínuo de drogas antimicrobianas e a capacidade das bactérias adquirirem material genético que poderá causar diversidade no fenótipo e nos mecanismos de resistência antimicrobiana desses microrganismos, gerou uma crise mundial (Bouchelaghem, 2022). As doenças infecciosas causadas por bactérias multirresistentes é um grave problema, tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária e uma questão de saúde pública global (Silva *et al.*, 2021).

A mastite é uma das principais doenças que impacta a bovinocultura leiteira ocasionando prejuízos econômicos devido ao aumento dos custos com mão-de-obra especializada, tratamento, despesas associadas à redução da produção e descarte do leite, redução da taxa de fertilidade e descarte ou óbito do animal acometido (Piepers; Vlieghe, 2018; Amarante *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2019; Kurosowa *et al.*, 2020; Alves; Moreira, 2021). Além dos prejuízos econômicos, essa doença representa um sério risco à saúde única, uma vez que cepas multirresistentes e metabólitos bacterianos termoestáveis podem ser veiculados através do leite e derivados lácteos (Spinosa; Górnjak; Bernardi, 2017).

Segundo Lopes *et al.* (2022), mais de 130 espécies bacterianas já foram associadas à mastite bovina, porém poucas são responsáveis por 80% dos casos da doença. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é reconhecido como o principal patógeno bacteriano causador dessa enfermidade. Essa espécie produz um arsenal de produtos que, juntos, contribuem para o estabelecimento desse agente na glândula mamária, com destaque para a produção de biofilme, toxinas e mecanismos de resistência antimicrobiana (Neelam *et al.*, 2022). Além disso, o aparecimento de cepas resistentes, pelo uso incorreto de antimicrobianos, tem se tornado recorrente em casos de mastite e tem como principal característica a multirresistência aos antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos (Lucas *et al.*, 2021).

Diante do fenômeno da resistência antimicrobiana, a busca por fontes alternativas ao uso dessas drogas tem sido cada vez mais comum, com destaque para os compostos naturais de plantas e derivados (Santos *et al.*, 2019; Sousa *et al.*, 2019). Dentre estes compostos, a própolis tem sido cada vez mais estudada por apresentar atividade contra microrganismos resistentes (Santos *et al.*, 2019).

A própolis é uma substância coletada por abelhas, especialmente *Apis mellifera*, a partir das secreções balsâmicas das flores, folhas, cascas, ramos, conchas e botões de várias plantas. A função da própolis é proteger as colmeias da umidade e dos predadores, selando rachaduras

e mantendo a colmeia aquecida. É considerada um produto da organoterapia por conter secreções orgânicas das abelhas que a produzem (Bouchelaghem, 2022). Sua composição varia em função de sua origem botânica e geográfica, como também de condições climáticas (Mendonça *et al.*, 2015) e inclui 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera e 10% de pólen, metabólitos secundários, incluindo flavonoides e ácidos fenólicos, além de microelementos, tais como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas (Nunes, 2019).

A própolis é amplamente utilizada em diversas partes do mundo por apresentar várias atividades biológicas benéficas à saúde (AL-ANI *et al.*, 2018; Bouchelaghem *et al.*, 2022; Dégi *et al.*, 2022; El-Guendouz *et al.* 2018; Mendonça *et al.* 2015). As pesquisas têm relatado um número significativo de atividades apresentadas por essa substância, como antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, cicatrizante, imunomoduladora, entre outras (El-Guendouz *et al.* 2018; Mendonça *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2021; Marcucci Torres *et al.*, 2021). Por ser conhecida como um medicamento popular e tradicional, essa matriz é largamente utilizada em formulações cosméticas e produtos farmacêuticos (Nunes, 2019).

No Brasil, mais de 13 tipos de própolis já foram identificados e, dentre estes, destacam-se a própolis verde, própolis vermelha, própolis marrom, própolis preta, própolis amarela e o geoprópolis (Mendonça *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2021). De acordo com Suran *et al.* (2021), já são conhecidas mais de 500 moléculas bioativas da própolis, com destaque para os polifenóis, utilizados como parâmetro de qualidade da própolis. Os principais compostos desse grupo são os ácidos fenólicos, flavonoides, ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas (Bhargava *et al.*, 2021). Segundo Santos *et al.* (2019) a presença de compostos fenólicos justifica as propriedades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral da própolis.

Embora diversas pesquisas sobre a própolis tenham sido realizadas nos últimos anos, a padronização desse biocomposto ainda é um desafio, sendo de extrema importância estudos detalhados, principalmente em relação aos seus constituintes químicos e suas propriedades biológicas, com o objetivo de possibilitar aplicações tecnológicas da própolis e seus derivados nos mais diversos setores comerciais (Nunes, 2019).

Diante do exposto, e devido à ausência de informações sobre a própolis produzida na Microrregião de Garanhuns, o presente estudo tem como objetivo caracterizar e avaliar o extrato da própolis produzida na região.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar a composição química e avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme do extrato da própolis produzida na Microrregião de Garanhuns, Pernambuco.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar quimicamente o extrato da própolis produzida na Microrregião de Garanhuns, Pernambuco.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do extrato da própolis contra cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Avaliar a atividade antibiofilme do extrato da própolis.

3. CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Resistência antimicrobiana

Os antimicrobianos surgiram com a descoberta da penicilina pelo médico escocês Alexander Fleming, em 1928. Esse acontecimento foi um marco histórico que contribuiu de forma significativa para o controle de infecções bacterianas e, conseqüentemente, ajudou a evitar inúmeras mortes (Garcia; Comarella, 2021), tornando-se os fármacos mais utilizados em serviços de saúde para prevenção e tratamento de infecções bacterianas (Rodrigues *et al.*, 2018).

Os antimicrobianos produziram grande impacto no tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias e diminuíram mundialmente as taxas de mortalidade e morbidade relacionadas a essas infecções (Costa; Junior, 2017; Caldas; Oliveira; Silva, 2022). Entretanto, o uso incorreto e por longos períodos dessa classe de medicamentos, favorece o surgimento de cepas bacterianas resistentes a esses compostos (Costa; Junior, 2017; Rodrigues *et al.*, 2018; Caldas; Oliveira; Silva, 2022).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos torna ineficazes diversos tratamentos e traz problemas aos pacientes, médicos, órgãos públicos, indústrias farmacêuticas e cientistas, pois se tornou uma questão de saúde pública, afetando a saúde e a economia mundial (Oliveira;

Pereira; Zamberlam, 2020).

De acordo com Silva *et al.* (2020), anualmente cerca de quatro milhões de pessoas adquirem infecções associadas aos ambientes hospitalares e que cerca de 37.000 indivíduos morrem devido a infecções causadas por microrganismos resistentes. A maioria dessas mortes (67,6%) é causada por bactérias multirresistentes.

Em um estudo conduzido por um economista britânico, a resistência antimicrobiana foi apontada como a causa da morte de pelo menos 50.000 pessoas, apenas na Europa e nos EUA, com muitas centenas de milhares de mortes em outras áreas do mundo. De acordo com previsões realizadas pelo pesquisador, em 2050 a resistência antimicrobiana resultará em aproximadamente 10 milhões de mortes, o que irá causar um grande impacto na economia mundial (O'Neil, 2016).

Garcia e Comarella (2021) afirmam que para que os antimicrobianos sejam de fato eficazes, eles devem ser fármacos com composição química específica, ter um alvo restrito e ação rápida para não comprometer a saúde do paciente. De acordo com Oliveira, Pereira e Zamberlam (2020), o tratamento eficaz de doenças resultantes de infecções bacterianas depende não apenas da presença de um alvo dentro da célula bacteriana, mas também da administração do antimicrobiano na dosagem adequada para atingir esse alvo.

O uso incorreto dos antimicrobianos contribui para o surgimento de superbactérias, que podem ser multirresistentes, extensamente resistentes ou pan-resistentes. O primeiro grupo apresenta resistência a três ou mais classes distintas de antimicrobiano, enquanto o segundo são as resistentes a apenas uma ou duas classes. As pan-resistentes são resistentes a todos os antimicrobianos de todas as classes, não havendo antimicrobiano eficaz para esse grupo (Oliveira; Pereira; Zamberlam, 2020).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético que pode ser natural ou adquirido, mediado por genes localizados no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos (Madigan *et al.*, 2016). A resistência natural se caracteriza quando uma população bacteriana é naturalmente resistente a um antimicrobiano, enquanto a adquirida quando uma população sensível a um antimicrobiano se torna resistente a esse composto. A resistência adquirida ocorre por meio da aquisição do determinante de resistência através de mecanismos de recombinação genética, ou seja, transdução, conjugação e transformação (Lima; Benjamim; Santos, 2017; Trevisan *et al.*, 2022), sendo favorecida pela pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos, quando utilizados incorretamente (Silva *et al.*, 2020). Dessa forma, o uso indiscriminado e subdoses terapêuticas de antimicrobianos nos ambientes de fazenda e hospitalar é apontado

como o principal fator relacionado ao surgimento do fenômeno de resistência bacteriana aos antimicrobianos (Silva *et al.*, 2020).

Em relação ao uso de antimicrobianos na agropecuária, algumas pesquisas apontam que o consumo no Brasil e em outros países desenvolvidos, duplicará até o ano de 2030 (Oliveira; Pereira; Zamberlam, 2020). Dentre os principais grupos farmacológicos de antimicrobianos utilizados na produção animal, Repik *et al.* (2022) destacam os seguintes: penicilinas, cefalosporina, macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, quinolonas, beta-lactâmicos, sulfonamidas, ionóforos e fluorquinolonas. Esses compostos são utilizados com a finalidade de tratar e prevenir doenças infecciosas, como também para promoção de crescimento animal e, conseqüentemente, exercendo pressão seletiva sobre os microrganismos, selecionando cepas resistentes (Silva *et al.*, 2020).

Na bovinocultura leiteira a principal razão para o uso de antimicrobiano é a mastite, visto que a antibioticoterapia é amplamente empregada como método terapêutico padrão (Beloni *et al.*, 2020). Essa enfermidade é considerada a principal causa de prejuízos econômicos aos produtores de leite em todo mundo (Amaral, 2022) e estão relacionados não apenas à queda da produção e qualidade do leite, mas também ao aumento dos custos com mão de obra, tratamento, descarte do leite e do animal acometido, secagem prematura, perda de quartos mamários e até mesmo a morte do animal (Carvalho *et al.*, 2021).

Além das perdas econômicas associadas à mastite, deve ser destacado o papel dessa enfermidade para o surgimento e disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos (Beloni *et al.*, 2020) uma vez que o consumo de leite e/ou derivados contendo resíduos desses compostos pode favorecer a seleção de cepas bacterianas resistentes e a conseqüente transferência de genes de resistência para uma ampla variedade de tipos bacterianos, inclusive patógenos de interesse na medicina humana (Massote *et al.*, 2019; Alves; Moreira, 2021).

Embora mais de 140 tipos distintos de microrganismos tenham sido associados às diversas formas e tipos de mastite, as bactérias do gênero *Staphylococcus* têm se destacado como agente etiológico dessa doença (Rodrigues *et al.*, 2018; Kurosawa *et al.*, 2020). O potencial patogênico dessas bactérias está relacionado à capacidade de invadir profundamente os tecidos do hospedeiro, produzir biofilme e diversos fatores de virulência, tais como toxinas, hemolisinas, leucocidinas e superantígenos (Neelam *et al.*, 2022). Além disso, a habilidade de expressar mecanismos de resistência antimicrobiana torna algumas espécies do gênero *Staphylococcus* patógenos de preocupação mundial, tais como cepas de *Staphylococcus aureus*

resistentes à metilina (MRSA) e vancomicina (VRSA) (Massote *et al.*, 2019).

Com relação aos biofilmes destaca-se o seu papel como um importante mecanismo de defesa do microrganismo contra a ação de agentes físicos e químicos, incluindo produtos utilizados nos procedimentos de higienização, antimicrobianos e células do sistema imunológico do hospedeiro animal (Bouchelaghem *et al.*, 2022; Nader, 2018). El-Guendouz *et al.* (2018) ressaltam que bactérias patogênicas, capazes de se aderir intimamente a uma superfície, são responsáveis por infecções graves, uma vez que a matriz do biofilme favorece o estabelecimento de infecções persistentes.

Infecções persistentes, característica das bactérias do gênero *Staphylococcus*, podem ser devidas à falha da terapia antimicrobiana determinada pela presença de biofilme no sítio infeccioso. A matriz do biofilme atua como uma importante barreira física, impedindo a penetração da droga enquanto os polímeros que compõem o biofilme retardam a distribuição do antimicrobiano, regulando o transporte desses fármacos no interior da estrutura (ORSI, 2017).

O desenvolvimento de compostos que interfiram com a formação de biofilme é uma preocupação crescente. Nesse contexto, o emprego de produtos naturais, como a própolis, surge como uma das promissoras opções para enfrentar os desafios associados aos tratamentos convencionais com antimicrobianos (Bouchelaghem *et al.*, 2022)

3.2 Composição da própolis

Uma alternativa para o tratamento de doenças bacterianas são os produtos de origem vegetal de comprovada eficácia e que causem o mínimo de efeitos adversos (Filho *et al.*, 2022).

Produtos naturais são utilizados a diversos anos como fonte primária para mais de 80% das substâncias terapêuticas. Entre os anos de 1981 e 2006, mais da metade dos medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) foram produtos de origem vegetal ou derivados. Ademais, 66% de todos os medicamentos atualmente aprovados como agentes antibacterianos têm sua origem em produtos naturais (Beloni *et al.*, 2020).

O uso de plantas medicinais, fitoterápicos e produtos organoterapêuticos para o tratamento de diversas enfermidades está crescendo mundialmente, representando um mercado promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos e terapêutica de doenças complexas, tais como infecções bacterianas e fúngicas, cânceres, imunodeficiência, entre outras (Frozza, 2012; Mendonça *et al.*, 2015). Segundo Silva *et al.* (2021) a busca por novos compostos com

atividade antimicrobiana e o incentivo a pesquisas científicas sobre novas abordagens para alternativas de tratamento são uma necessidade urgente.

O Brasil abriga grande diversidade de fauna e flora, com biomas que apresentam características distintas, como o da Caatinga, exclusivo do Brasil. Cerca de 400.000 espécies de plantas superiores compõem o reino vegetal, no entanto a investigação farmacológica com plantas terrestres alcançou apenas cerca de 5 a 15% desta diversidade. Estima-se ainda que somente 25% dos fármacos existentes são de origem vegetal (Silva C., 2018).

Os produtos derivados de fontes naturais apresentam estruturas químicas complexas. O potencial terapêutico e mecanismos farmacológicos desses derivados e de alguns de seus constituintes, tais como: flavonoides, alcaloides, triterpenos, taninos, etc, já foram comprovados cientificamente. Sendo assim, muitas substâncias que são descobertas, isoladas ou caracterizadas têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser utilizadas como agentes medicinais (Frozza, 2012).

De acordo com Nader *et al.* (2018) pesquisas com produtos de origem natural e com atividade antimicrobiana podem ser uma forma de acelerar e baratear a produção de novas substâncias e gerar alternativas ao combate a microrganismos multirresistentes aos agentes terapêuticos disponíveis. Silva C. (2018) ainda acrescenta como um benefício desses produtos a baixa incidência de efeitos adversos, com toxicidade reduzida. Atrelado a isso, Dégi *et al* (2022) afirmam que os tratamentos estarão mais amplamente disponíveis, especialmente para pessoas em países menos desenvolvidos e que não possuem condições de custear tratamentos caros.

Dentre os produtos de fontes naturais que vêm sendo pesquisados, os diversos tipos de própolis têm despertado interesse científico devido às suas propriedades biológicas, usos terapêuticos e nutricionais e sua aplicação tradicional reconhecida mundialmente (Silva *et al.*, 2021). Em relação às pesquisas biomédicas, a própolis tem sido estudada em diferentes áreas, com pesquisas que avaliam principalmente os seus efeitos no controle de microrganismos patogênicos, tendo uma vasta gama de trabalhos científicos que comprovam a sua atividade antimicrobiana (El-Guendouz *et al.*, 2018; Ferreira, 2019; Silva *et al.*, 2021; Bouchelaghem *et al.*, 2022; Yazdanian *et al.*, 2022).

A própolis, do grego *pro*: para defesa ou em defesa e *polis*: cidade ou comunidade, é uma mistura complexa de resina, de textura cerosa e coloração acastanhada, coletada pelas abelhas a partir de brotos, folhas, cascas e exsudatos de plantas, que é enriquecida por saliva e secreções enzimáticas (Cunha, 2018; Farida *et al.*, 2022). As abelhas usam a própolis principalmente

como material de isolamento térmico das colmeias, revestindo os alvéolos e câmaras onde as abelhas rainhas põem ovos. Além disso, também é usada para vedar as entradas e aberturas, servindo também como emulsificante, caso a colmeia seja invadida por um inseto ou animal que as abelhas não consigam remover (Klhar *et al.*, 2019; Suran *et al.*, 2021; Farida *et al.*, 2022).

Essa substância é composta por aproximadamente 50% de resina vegetal e bálsamo, 30% de cera, 10% de óleos aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias como detritos, minerais e compostos orgânicos (El-guendouz *et al.*, 2018; Klhar *et al.*, 2019; Bouchelaghem, 2022). Estão presentes também microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês, magnésio, silício, titânio, bromo e zinco, além das vitaminas B1, B2, B6, C e E (Cunha, 2018). O perfil de moléculas bioativas da própolis bruta varia de acordo com a origem geográfica e botânica, estação do ano, genética das abelhas e fatores ambientais (Suran *et al.*, 2021). De acordo com Mendonça *et al.* (2015) as alterações climáticas podem causar mudanças nas concentrações dos compostos bioativos das plantas e, conseqüentemente, mudanças na atividade biológica dos vários tipos de própolis. Além disso, as características organolépticas da própolis, tais como a cor, odor, sabor e textura, também sofrem alterações de acordo com esses fatores (Loiola, 2020).

A composição química dos vários tipos de própolis brasileira é bastante diversificada. Além disso, a composição dos tipos brasileiros diverge bastante da composição da própolis de países europeus em função do clima tropical. Nas regiões tropicais a diversidade vegetal é muito superior à observada nas regiões temperadas, bem como das espécies de abelhas presentes nessa região, sendo resultantes do cruzamento de espécies europeias e africanas (Menezes, 2005; Sousa *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2021). Assim, as moléculas bioativas da própolis variam de acordo com a origem geográfica e botânica de onde as abelhas coletam o material, estação do ano, genética das abelhas e fatores ambientais (Mendonça *et al.*, 2015; Fiordalisi; Honorato; Kuhnen, 2019; Klhar *et al.*, 2019; Suran *et al.*, 2021).

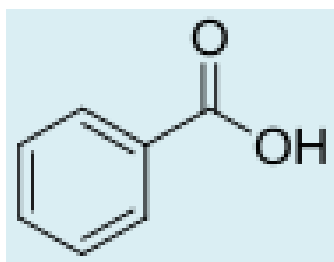
O método de extração, bem como o solvente utilizado, também são fatores que interferem na composição química da própolis. Por ser uma mistura complexa de várias substâncias não é possível extrair ou fracionar os componentes da própolis com facilidade, algo que afeta a representação química dos extratos (Silva, 2019; Suran *et al.*, 2021).

As amostras de própolis recolhidas em diversas partes do mundo revelaram 850 componentes até 2018. Os compostos que foram identificados na própolis são álcoois, alcanos, óleos voláteis, ácidos aromáticos, aminoácidos, vitaminas, açúcares e álcoois de açúcar, terpenoides, ácidos graxos, hidrocarbonetos, ésteres de cera, flavonoides, chalconas, fenóis,

glicerol derivados, aldeídos, oligoelementos, pequenas proporções de minerais e cetonas (Suran *et al.*, 2021; Bouchelaghem, 2022). Os compostos que mais têm chamado atenção são os polifenóis, destacando-se os flavonoides e ácidos fenólicos (Sousa *et al.*, 2019).

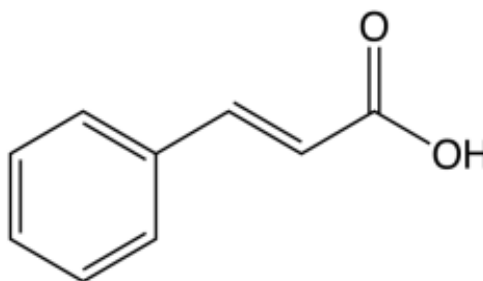
Os compostos fenólicos é o grupo com maior número de representantes dentre os metabólitos secundários sintetizados por plantas. Suas moléculas têm como característica a presença de um grupamento hidroxila (OH) que se liga a um grupo de hidrocarboneto aromático (Silva C., 2018). Os ácidos fenólicos podem ser divididos em dois grupos principais: os derivados do ácido benzóico (C6-C1) (Figura 1.) e os derivados do ácido cinâmico (C6-C3) (Figura 2.). As propriedades químicas e analíticas de ambos os compostos são semelhantes, assim como as atividades biológicas. Dentre os derivados do ácido cinâmico destacam-se os ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico. Dentre os derivados do ácido benzóico encontram-se os ácidos p-hidróxi-benzóico, salicílico, protocatéquico, vanílico, gentísico, gálicoesiríngico (Silva K., 2018).

Figura 1. Fórmula estrutural do ácido benzóico.



Fonte: Oliveira e Reis (2017)

Figura 2. Fórmula estrutural do ácido cinâmico



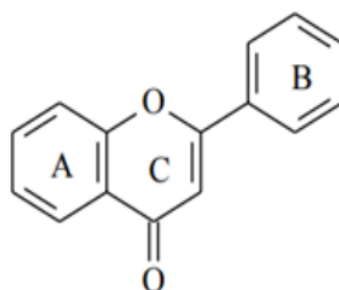
Fonte: Souza (2021)

Muitas pesquisas relacionam a atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante à presença dos flavonoides (Mendonça *et al.*, 2015; El-Guendouz *et al.* 2018; Santos *et al.*, 2019; Marcucci Torres *et al.*, 2021;) e ácidos fenólicos (Moreira; Oliveira; Rocha, 2018;

Nascimento; Veras, 2020), Cunha (2018) ainda acrescenta os compostos ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas como responsáveis pela ação anti-inflamatória. A palavra flavonoide deriva do latim *flavus*, que significa amarelo. Anteriormente o conceito de flavonoide somente incluía grupos de compostos que apresentavam coloração amarela. Recentemente esse termo passou a incluir compostos menos coloridos e incolores, como as antocianinas, que possuem cor vermelha ou azul (Silva K., 2018).

Os flavonoides representam uma grande classe de compostos fenólicos com cerca de 4500 representantes conhecidos. São encontrados em vacúolos na maioria dos tecidos vegetais, estando na forma de monômeros, dímeros ou oligômeros (Silva C., 2018). Os flavonoides são substâncias que possuem estrutura aromática com 15 átomos de carbono (C15), dispostos em uma configuração C6-C3-C6 (Silva K., 2018). Essas estruturas podem ser divididas em subclasses, de acordo com o grau de oxidação do anel heterocíclico. Em geral, apresentam-se hidroxiladas, metoxiladas e/ou glicolisadas, sendo a glicose ou a ramanose o açúcar frequentemente ligado (Frozza, 2012). O grande destaque desse grupo são as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as auronas, calconas e isoflavonas (Silva C., 2018).

Figura 3. Estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: Silva K. (2018)

A composição da própolis verde brasileira inclui as seguintes moléculas: flavonoides, compostos fenólicos, terpenoides (sesqui, di e triterpenoide) e fenilpropanoides prenilados. Estes últimos são ácidos fenólicos contendo grupo prenila, sendo formados a partir do ácido cinâmico e seus derivados, como a artepilina C (ácido 3,5 diprenil-4-hidroxicinâmico), muito conhecida por sua atividade antitumoral (Forzza, 2012). A artepilina C e o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico são usados como marcadores desse tipo de propolis (Suran *et al.*, 2021).

A própolis vermelha brasileira apresenta em sua composição substâncias como a elemicina, isoelemicina, metil isoeugenol, metil eugenol, formononetina, biochanina A, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina, homopterocarpan, quercetina e vestitol

(Mendonça *et al.*, 2015). Esse tipo de própolis é caracterizado pela presença de isoflavonas formononetina e isoliquiritigenina (Suran *et al.*, 2021) e Biochanina A, Pinocembrina e Medicarpina (Frozza, 2016).

Segundo Silva K. (2018), a própolis amarela tem sido menos estudada em relação à sua fonte vegetal. Os principais constituintes químicos desse tipo de própolis são os compostos alifáticos, como: álcoois triterpênicos e acetatos. Com relação à própolis marrom, sua origem botânica vem da Copey (*Clusia rosea*) pertencente à família *Guttiferae* (*Clusiaceae*). Ela apresenta em sua composição química benzofenonas poli-isopreniladas, tais como: 39 xanthochimol, guttiferona E, propanolona A, pluketione A e nemorosona, além de outros compostos como mucronulatol, escrobiculatona A e escrobiculatona B.

A própolis preta, obtida a partir da planta popularmente conhecida como jurema preta, apresenta em sua composição esteroides, terpenoides, flavonoides e taninos, sendo estes últimos considerados um dos responsáveis pela atividade contra bactérias, fungos, vírus e protozoários (Cunha, 2018). Em sua análise cromatográfica do extrato de própolis preta bruta esse autor detectou a presença e quantificou 14 compostos, dentre eles o ácido 3,4- dihidroxibenzoico, rutina, ácido transcimânico, miricetina, kampferol, quercetina e naringenina. Os que apresentaram maior concentração foram o ácido 3,4-dihidroxibenzoico (14,19 mg/mL), a rutina (12,71 mg/mL) e o ácido transcimânico (6,25 mg/mL), sendo esses responsáveis pela atividade antioxidante e antibacteriana.

De acordo com Silva (2019), a presença de flavonoides, principalmente a galantina, está associada à atividade anti-inflamatória da própolis. Esse composto demonstrou atividade inibitória contra a cicloxigenase e a lipoxigenase, ou seja, atua diminuindo a produção de prostaglandinas, citocinas, quimiocinas e de óxido nítrico (NO), que são importantes mediadores da resposta inflamatória. Com relação à atividade antimicrobiana exercida pela própolis, Silva *et al.* (2021) sugerem que pode ser devido aos danos à membrana citoplasmática, inibição da síntese de ácidos nucleicos e do metabolismo energético. De acordo com esses autores esses efeitos são relacionados, principalmente, aos isoflavonoides.

A atenção dos pesquisadores pela própolis aumentou nas últimas décadas devido ao conhecimento de sua composição química. Porém, a padronização dos extratos de própolis, o estabelecimento da correlação entre tipos definidos de própolis e atividades biológicas específicas, bem como seu uso no tratamento clínico, continuam sendo um desafio (Silva *et al.*, 2021; Bouchelaghem, 2022). Segundo Klhar *et al.* (2019) são necessários mais estudos sobre a ação terapêutica da própolis, especialmente porque a composição varia de acordo com a região

onde a própolis é produzida. Contudo, a própolis pode ser considerada uma alternativa na terapia antimicrobiana e anti-inflamatória.

Na produção da própolis as espécies *Apis mellifera*, raças europeias, em conjunto com as abelhas africanizadas (poli híbrido resultante do cruzamento entre raças europeias e africana), são as mais utilizadas (Ferreira, 2019). Segundo Silva (2019) as subespécies de *Apis mellifera* introduzidas no Brasil são: Abelha italiana (*Apis mellifera ligustica*); Abelha real (*Apis mellifera mellifera*); Abelha caucasiana (*Apis mellifera caucasica*); Abelha carnica (*Apis mellifera carnica*); Abelha iberiense (*Apis mellifera iberiensis*) e Abelha africanizada (*Apis mellifera scutellata*).

Um estudo realizado por Milet-Pinheiro e Schlindwein (2008), com o objetivo de conhecer a diversidade e abundância de abelhas e suas relações com plantas em Chã-Grande, no Agreste pernambucano, detectou que a família mais abundante nessa região foi a *Apidae* com 732 indivíduos (446 corbiculados), seguida por *Halictidae* (194), *Megachilidae* (47), *Colletidae* (16) e *Andrenidae* (15). *Trigona spinipes*, *Euglossa melanotricha* e *Apis mellifera* foram as espécies mais abundantes com 142, 122 e 115 indivíduos amostrados, respectivamente. Juntas, essas três espécies corresponderam a 37,75% dos indivíduos coletados, 51,8% dos *Apidae* e 85% dos *Apidae* corbiculados.

Sousa *et al.* (2019) afirmaram que a maior parte do consumo e da exportação da própolis no Brasil é produzida pelas abelhas *Apis mellifera* africanizadas (*Apis mellifera scutellata*). Esses autores explicam que devido a capacidade de adaptação a diferentes ambientes e condições, o que facilita a sua produção em diferentes biomas, essa espécie está atualmente presente em todo o território brasileiro.

Outro fato sobre a própolis é que a resina que compõe esse produto é coletada da vegetação que fica em torno da colmeia. O voo de uma abelha *Apis mellifera* abrange um raio de cerca de 3 km ao redor da colmeia, de onde as abelhas coletam pólen e néctar para alimentação, bem como a resina para a produção da própolis. Os fatores que direcionam as abelhas para as plantas propoliníferas, plantas fornecedoras de material para a produção de própolis, ainda são poucos elucidados, mas sabe-se que elas são seletivas nesta coleta (Silva K., 2018; Ferreira, 2019). Uma hipótese é que esta escolha esteja relacionada com a atividade antimicrobiana da resina, já que as abelhas utilizam a própolis como um antisséptico para proteção de toda a colmeia (Silva K., 2018).

A própolis é considerada um produto de origem animal, pois antes de ser adicionado aos compartimentos da colmeia, o material vegetal entra em contato com o sistema digestivo da

abelha, principalmente a saliva (Suran *et al.*, 2021). Embora utilizado extensivamente pela humanidade desde os tempos mais remotos (Cunha, 2018), esse produto tem atraído o interesse dos pesquisadores desde a década de 1970, que buscam um composto que possa ser uma alternativa para o controle e tratamento de doenças infecciosas, particularmente as causadas por bactérias multirresistentes (Bouchelaghem, 2022).

De acordo com Silva (2019), o termo própolis já era descrito no século XVI na França, porém somente no ano de 1908 surgiu o primeiro trabalho científico sobre suas propriedades químicas e composição, indexado no Chemical Abstracts (referência número 192). Somente no começo do século 19 a atenção pela própolis retornou, quando foi estudada por Nicolas Louis Vauquelin, um farmacêutico e químico francês. Ainda segundo Silva (2019), no Brasil a primeira publicação sobre a própolis ocorreu em 1984, em uma pesquisa comparando o efeito da própolis com a ação de antimicrobianos na inibição de *Staphylococcus aureus*, onde a própolis brasileira estudada exibiu mais atividade do que várias das drogas testadas.

Desde a antiguidade, a própolis é utilizada como medicamento tradicional popular, sendo administrada isoladamente ou em combinação com outras substâncias naturais, no tratamento de feridas (Bouchelaghem, 2022). Segundo Cunha (2018) a própolis era conhecida como cera preta por vários povos, dentre eles gregos, romanos e egípcios. O autor relata que os egípcios utilizavam a própolis para embalsamar os mortos devido à sua propriedade antiputrefativa, já os médicos gregos e romanos a utilizavam como antisséptico e agente cicatrizante.

De acordo com Amarante *et al.* (2019) os compostos ativos mais importantes da própolis são os flavonoides, terpenóides, fenilpropanóides, ácidos aromáticos e os compostos fenólicos. O teor de flavonoides pode ser utilizado como parâmetro de qualidade, uma vez que os flavonoides possuem a capacidade de capturar radicais livres e inibir a peroxidação lipídica, sendo a atividade biológica da própolis frequentemente associada à presença desses compostos (Farida *et al.*, 2022). Apesar da padronização terapêutica da própolis ser um desafio e ser difícil estabelecer a relação entre tipos definidos de própolis e atividades biológicas específicas, a presença de uma quantidade significativa de um composto específico pode levar à expectativa de que o extrato tenha o potencial para mostrar bioatividades ligadas a este componente (Silva *et al.*, 2021).

A aplicação da própolis bruta não é apropriada em tecnologia de alimentos, indústria farmacêutica ou cosmética devido ao alto teor de impurezas que devem ser removidas. Para isso, os compostos bioativos da própolis são extraídos por meio da utilização de solventes orgânicos. Com esse processo é esperada a eliminação de materiais inertes e a preservação das

frações polifenólicas. A extração com etanol é especialmente apropriada na obtenção de extratos desparafinados ricos em componentes polifenólicos. Por outro lado, a extração utilizando água pura é adequada para a aquisição de extratos contendo ácidos fenólicos solúveis em água (Pobiega *et al.*, 2019)

No Brasil são relatados 13 tipos diferentes de própolis, de acordo com suas características físico-químicas, além da aparência, coloração dos extratos e propriedades biológicas: grupos 1, 2, 3, 4 e 5 - própolis da região sul; grupos 6, 7, 8, 9 10 e 11 – própolis da região Nordeste e o grupo 12 de própolis da região sudeste. O último tipo, recentemente relatado, grupo 13, pertence à região Nordeste do Brasil, a própolis vermelha (Ferreira, 2019; Silva, *et al.*, 2021).

As própolis brasileiras dos tipos verde e vermelha de mangue são as que mais se destacam em comparação com os tipos mais recentes, como própolis amarela e marrom, que ainda precisam ser melhor caracterizadas (Ferreira, 2019; Bouchelaghem, 2022). A própolis verde é obtida a partir do alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) e é produzida por abelhas localizadas no sul de Minas Gerais e no norte de São Paulo (Cunha, 2018), enquanto a própolis vermelha obtida de exsudatos resinosos da rabo-de-bugio ou marmelo-do-mangue (*Dalbergia ecastophyllum*) (Ferreira, 2019). A própolis preta é obtida da planta jurema preta (*Mimosa tenuiflora*), planta nativa da caatinga (Cunha, 2018).

3.3 Propriedades biológicas da própolis

Várias pesquisas evidenciaram que a própolis possui diversas propriedades biológicas, incluindo atividades antibacteriana, antiviral, antifúngica, anticancerígena, antioxidante, antisséptica, imunomoduladora e anti-inflamatória.

Com relação à atividade antibacteriana, Pobiega *et al.* (2019), avaliando extratos da própolis de Bałtów, parte sul do centro da Polônia, obtidos por três técnicas de extração distintas, demonstrou que todos os extratos apresentaram atividade antibacteriana porém, tal atividade, variou com o método de extração e com as espécies de bactérias testadas, com *S. aureus* apresentando as maiores taxas de inibição.

Fujimoto (2016) demonstrou que o extrato etanólico de própolis verde inibiu o crescimento de bactérias Gram-positivas em processos infecciosos. Comprovou ainda que a combinação de certos compostos fenólicos predominantes, como galangina, crisina e pinocembrina, em amostras de própolis, foi eficaz no combate à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Barreiras *et al.* (2020) avaliaram a eficácia do extrato da própolis de abelha Jataí contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*). As concentrações testadas demonstraram ser efetivas contra os microrganismos avaliados, com *K. pneumoniae* a mais sensível entre as cepas Gram-negativas, sendo inibida a uma concentração de 62,5 µg/mL. Essa mesma concentração inibiu o crescimento de todas as espécies de bactérias Gram-positivas avaliadas.

Extratos de própolis de diversas origens geográficas (Alemanha, Irlanda e República Tcheca) foram avaliados quanto a composição química, atividades biológicas e propriedades sinérgicas com antimicrobianos (Al-ANI *et al.*, 2018). Esses autores relataram que todas as amostras testadas apresentaram efeito antibacteriano moderado contra bactérias patogênicas Gram-positivas, com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 0,08 mg/mL a 2,5 mg/mL. Além disso, os extratos avaliados demonstraram atividade moderada contra cepas de referência e isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e enterococos resistentes à vancomicina (VRE), com CIM entre 0,3 mg/mL e 2,5 mg/mL.

Al-ANI *et al.* (2018) também avaliaram os extratos de própolis contra bactérias Gram-negativas. Segundo esses autores a maioria dos extratos etanólicos apresentou eficácia moderada, com CIM entre 0,6 mg/mL e 5 mg/mL. Por outro lado, o extrato aquoso mostrou baixa atividade contra bactérias Gram-negativas, com CIM variando de 1,2 mg/mL e 5 mg/mL. O estudo também mostrou que além da eficácia antibacteriana, os extratos tiveram atividade antifúngica contra cepas de referência e isolados clínicos. Nesse mesmo estudo, os extratos de própolis apresentaram atividade sinérgica com os antimicrobianos testados contra microrganismos resistentes, especialmente com compostos que inibem a síntese da parede celular.

Xavier e colaboradores (2023), avaliando a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da própolis vermelha brasileira contra isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* com fenótipo de resistência ESBL e/ou KPC, relataram CIM de 2,05 e 0,13 mg/mL e concentração bactericida mínima (CBM) de 15,63 e 3,91 mg/mL, para esses microrganismos, respectivamente.

Com relação à atividade da própolis em células cancerígenas, Mendonça *et al.* (2015) detectaram atividade citotóxica do extrato etanólico da própolis vermelha em linhagens tumorais humanas SF-295 (glioblastoma), OVCAR -8 (ovário) e HCT-116 (cólon), demonstrando que a própolis tem potencial de compor fórmulas medicamentosas dirigidas ao

tratamento de doenças cancerígenas. Os autores relataram que na concentração de 50 µg/mL o extrato etanólico exerceu atividade citotóxica significativa contra todas as três linhagens celulares testadas.

A atividade antibiofilme da própolis foi relatada por vários pesquisadores. Santos *et al.* (2019) observaram que as frações etanólica e hexânica foram capazes de interferir nos primeiros estágios de formação do biofilme, com o extrato etanólico demonstrando melhor desempenho no tempo zero ($P < 0,05$), o que lhe confere a possibilidade de atuar como agente terapêutico no início das infecções. El-Guendouz *et al.* (2018) também relataram a inibição da formação de biofilme por diversas cepas MRSA na presença de própolis. Os autores associaram essa atividade à presença de diterpenos e fenóis, principais grupos de compostos na própolis marroquina utilizada no estudo.

Silva *et al.* (2021) relataram a atividade *in vitro* exibida pelas benzofenonas polipreniladas, gutiferona E, xantoquimol e oblongifolina, contidas no extrato de própolis vermelha, contra a formação de biofilmes produzidos por duas cepas multirresistentes frequentemente adquiridas em hospitais. Os autores afirmaram que esses metabólitos, em baixas concentrações, foram capazes de inibir a formação de 50% dos biofilmes produzidos por cepas de referência e isolados clínicos de *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

As propriedades anti-inflamatórias da própolis foram estudadas por Sahlan *et al.* (2021). Para essa análise foram observadas as concentrações de TNF- α (Fator de Necrose Tumoral), iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e NO (óxido nítrico), importantes marcadores da resposta inflamatória. O extrato de própolis, na concentração de 120 µg/mL, reduziu a produção de NO.

Silveira *et al.* (2021) conduziram estudo com um produto padronizado de própolis (Extrato Padronizado de Própolis Verde Brasileiro - Apis Flora), em pacientes adultos hospitalizados com COVID-19. Os pacientes receberam tratamento padrão mais o extrato de própolis na dose oral de 400 mg/dia (n=40) ou 800 mg/dia (n=42) por sete dias, ou apenas tratamento padrão (n=42). Foi constatado que o tempo de internação hospitalar após a intervenção foi significativamente reduzido em ambos os grupos que receberam própolis em comparação ao controle. Porém, com a dose mais elevada, um número significativamente menor de pacientes desenvolveu lesão renal aguda, quando comparado ao grupo controle. Os autores sugeriram que a própolis seja utilizada como tratamento coadjuvante da COVID-19, por ser segura e reduzir o tempo de internação.

A ação antioxidante da própolis também tem sido estudada e têm-se obtido resultados positivos, comprovando o potencial desse produto em capturar radicais livres (Mendonça *et al.*,

2015; El-Guendouz *et al.*, 2018; Farida *et al.*, 2022). De acordo com Farida *et al.* (2022), o potencial redutor das amostras provavelmente se deve aos compostos fitoquímicos dos extratos de própolis. El-Guendouz *et al.* (2018) identificaram uma forte correlação entre as quantidades de fenóis e flavonoides com as atividades antioxidantes das amostras de própolis avaliadas.

REFERÊNCIAS

- AL-ANI, I. *et al.* Antimicrobial activities of European propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. **Medicines**, v. 5, n. 1, p. 1-16, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5874567/>. Acesso em: 11 maio 2023.
- ALVES, T.; MOREIRA, M. A. Mastite bovina: tratamento convencional e ação de compostos extraídos de plantas: bovine mastitis: conventional treatment and action of compounds extracted from plants. **Uniciências**, [S.l.], v. 25, n. 1, p. 20-25, 14 jun. 2021.
- AMARAL, J. B. do. “Doenças da produção” como evidências nas perícias de bem-estar em bovinos leiteiros: revisão. **Pubvet**, v. 16, n. 3, a1067, p. 1-14, mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v16n03a1067.1-14>.
- AMARANTE, J. F. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of two extracts of propolis against isolates of Staphylococcus spp. and multiresistant bacterials. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.l.], v. 39, n. 9, p. 734-743, set. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5984>.
- BARREIRAS, D. G. *et al.* Eficácia da ação antimicrobiana do extrato de própolis de abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Caderno de Ciências Agrárias**, [S.l.], v. 12, p. 1-5, 2 fev. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.35699/2447-6218.2020.15939>.
- BELONI, M. V. *et al.* Atividade antibacteriana dos óleos essenciais frente a agentes causadores da mastite bovina. In: **Tópicos Especiais em Ciência Animal IX**. 1. ed. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2020. cap. 15, p. 262-281.

BHARGAVA, P. *et al.* Experimental evidence for therapeutic potentials of propolis. **Nutrients**, [S.l.], v. 13, n. 8, p. 1-23, 24 jul. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/nu13082528>.

BOUCHELACHEM, S. *et al.* Evaluation of total phenolic and flavonoid contents, antibacterial and antibiofilm activities of Hungarian propolis ethanolic extract against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, [S.l.], v. 27, n. 2, p. 574, 17 jan. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27020574>.

BOUCHELACHEM, S. Propolis characterization and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: a review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S.l.], v. 29, n. 4, p. 1936-1946, abr. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.063>.

CALDAS, A. F.; OLIVEIRA, C. S. de; SILVA, D. P. da. Resistência bacteriana decorrente do uso indiscriminado de antibióticos. **Scire Salutis**, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 1-7, 28 set. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.6008/cbpc2236-9600.2022.001.0001>.

CARVALHO, A. S. S. *et al.* Estudo e caracterização de microrganismos causadores de mastite bovina no DF e entorno, sua resistência aos antimicrobianos e os fatores de risco para a ocorrência da doença. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 9, p. 86772-86797, set. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n9-032>.

COSTA, A. L. P. da; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e saúde pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (Unifap)**, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 45, 23 ago. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18468/estcien.2017v7n2.p45-57>.

CUNHA, M. H. da. Composição química e atividade biológica do extrato hidroalcoólico de própolis preta. 2018. 49 f. Dissertação (Mestrado Profissional) - Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2018.

DÉGI, J. *et al.* Antibacterial activity of Romanian propolis against *Staphylococcus aureus*

isolated from dogs with superficial pyoderma: in vitro test. **Veterinary Sciences**, [S.l.], v. 9, n. 6, p. 299, 16 jun. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/vetsci9060299>.

EL-GUENDOZ, S. *et al.* Moroccan propolis: a natural antioxidant, antibacterial, and antibiofilm against *Staphylococcus aureus* with no induction of resistance after continuous exposure. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S.l.], v. 2018, p. 1-19, 12 nov. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2018/9759240>.

FARIDA, S. *et al.* In-vitro antioxidant, in-vivo anti-inflammatory, and acute toxicity study of Indonesian propolis capsule from *Tetragonula sapiens*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S.l.], v. 29, n. 4, p. 2489-2500, abr. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.12.034>.

FERREIRA, J. M. Própolis e geoprópolis verde do semiárido do Brasil: caracterização química, origem botânica e atividade antioxidante. 2019. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 2019.

FIORDALISI, S. de A. L.; HONORATO, L. A.; KUHNEN, S. Seasonal variation of propolis from southern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [S.l.], v. 56, n. 1, p. 1-11, 5 jul. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2019.149146>.

FILHO, P. T. A. *et al.* Atividade antimicrobiana de *Melaleuca* spp. (Myrtaceae) frente a isolados bacterianos causadoras da mastite bovina: uma análise cienciométrica. **Conjecturas**, [S.l.], v. 2022, n. 18, p. 1012-1024, 28 dez. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.53660/conj-2240-2w83>.

FROZZA, C. O. da S. Caracterização química e avaliação da atividade biológica da própolis vermelha em células tumorais e não tumorais. 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Caxias do Sul, 2012.

GARCIA, J. V dos A. dos S.; COMARELLA, L. O uso indiscriminado de antibióticos e as resistências bacterianas. **Caderno Saúde e Desenvolvimento**, Curitiba, v. 10, n. 18, p. 78-87,

2021.

FUJIMOTO, A. *et al.* Antibacterial activity of Brazilian red propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from patients with skin diseases. **Molecules**, [S.l.], v. 28, n. 2, p. 584, 13 jan. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28020584>.

KLHAR, G. T. *et al.* Antimicrobial activity of the ethanolic extract of propolis against bacteria that cause mastitis in cattle. **Biotemas**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 1-10, 25 fev. 2019. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). <http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2019v32n1p1>.

KUROSAWA, L.S. *et al.* Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. associados a mastite bovina. **PUBVET** v.14, n.5, a563, p.1-6, Maio, 2020. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n5a563.1-6>.

LIMA, C. C.; BENJAMIM, S. C. C.; SANTOS, R. F. S. dos. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **CuidArte Enfermagem**. 2017.

LOIOLA, N. dos S. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS DA ABELHA NATIVA TUBI, *Scaptotrigona aff. postica* (LATREILLE, 1807) FRENTE ÀS BACTÉRIAS *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ambiente e Desenvolvimento, da Universidade do Vale do Taquari – Univates. Lajeado/ RS, novembro de 2020.

LOPES, T. S. *et al.* Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria associated with cow mastitis in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 42, p. 1-8, 2022. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6958>.

LUCAS, A. P. *et al.* Detection of β -lactamase, *blaZ* and *mecA* in penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Garanhuns, Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 15, p. 140-145, 2021

MARCUCCI TORRES, M.L. *et al.* Uso de pomada de própolis brasileira tipificada e dimetilsulfóxido para tratamento de feridas cirúrgicas. *Braz. J. Nat. Sci* [Internet]. 29º de julho de 2021.

MADIGAN, M. T. *et al.* ***Microbiologia de Brock***. 14º ed. - Rio de Janeiro: Saraiva, 2016.

MASSOTE, V. P. *et al.* DIAGNÓSTICO E CONTROLE DE MASTITE BOVINA: uma revisão de literatura. **Revista Agroveterinária do Sul de Minas - ISSN: 2674-9661**, v. 1, n. 1, p. 41 - 54, 8 out. 2019.

MENDONÇA, I. C. G. De *et al.* Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *Bmc Complementary And Alternative Medicine*, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-12, 14 out. 2015. **Springer Science and Business Media LLC**.

MENEZES, H. PRÓPOLIS: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 405-411, jul. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657v72p4052005>.

MILET-PINHEIRO, P.; SCHLINDWEIN, C. Comunidade de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e plantas em uma área do Agreste pernambucano, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, [S.L.], v. 52, n. 4, p. 625-636, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0085-56262008000400014>.

MOREIRA, R. T.; OLIVEIRA, B. S. de; ROCHA, A. A. da. PRÓPOLIS: UMA ALTERNATIVA NO TRATAMENTO DE FERIDAS CIRÚRGICAS EM BOVINOS. **Revista Eixo**, Brasília, DF, v. 7, n. 1, p. 3-9, jan. 2018. Disponível em: revistaeixo.ifb.edu.br. Acesso em: 20 maio 2022.

NADER, T. T. *et al.* Atividade antibiofilme de substâncias de Croton urucurana em *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 38, n. 9, p. 1713-1719, set. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5034>.

NEELAM *et al.* Virulence and antimicrobial resistance gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with clinical mastitis in cattle. **Plos One**, [S.L.], v. 17, n. 5, p. 1-8, 3 maio 2022. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0264762>.

NASCIMENTO, G. P. V. do; VERAS, T. de F. Atividade antimicrobiana e antifúngica de amostras comerciais de extrato alcoólico de própolis verde e própolis vermelho contra cepas causadoras de lesões cutâneas. **Revista Ibero-Americana de Podologia**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 182-189, 29 ago. 2020. Iberian American Journal of Podiatry. <http://dx.doi.org/10.36271/iajp.v2i2.33>.

NUNES, D. D. G. composição química e atividade biológica antimicrobiana e leishmanicida de extratos de própolis obtidos pelo método convencional ou por extração supercrítica - Dissertação de mestrado. Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana Universidade Federal da Bahia -Faculdade de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz Instituto Gonçalo Moniz. Salvador – Bahia 2019

O'Neill J. The Review on Antimicrobial Resistance. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. London: AMR;2016.

OLIVEIRA, M.; PEREIRA, K. D. S.; ZAMBERLAM, C.R. Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado de antibióticos: uma questão de saúde pública. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação - REASE**. Criciúma, v. 6.n.11, nov 2020. ISSN -2675 – 3337.

OLIVEIRA, P. H. R. de; REIS, R. da R. Ácido Benzóico (CAS 65-85-0). **Rev. Virtual Quim.**, 2017, 9 (6), no prelo.

ORSI, A. M. Capacidade de formação de biofilme e resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* causadores de mastite bovina. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10135/tde-02052017-123925/en.php>> Acesso em: 14 de abr. de 2022.

PIEPERS, S.; VLIEGHER, S. de. Alternative approach to mastitis management – How to prevent and control mastitis without antibiotics? **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science**, [S.L.], v. 55, n. 3, p. 1-22, 7 nov. 2018. Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA).
<http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2018.137149>.

POBIEGA, K. *et al.* Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. **Journal of Food and Science Technology**, 56, p. 5386–5395, dez. 2019.

REPIK, C. F. *et al.* A resistência antimicrobiana na produção animal: alerta no contexto da saúde única. **Pubvet**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 1-6, abr. 2022. Editora MV Valero.
<http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v16n04a1084.1-6>.

RODRIGUES, T. P. *et al.* Mastite Bovina – Influência na Produção, Composição e Rendimento Industrial do Leite e Derivados. **Arquivos de Pesquisa Animal**, v.1, n.1, p.14 - 36, 2018. ISSN: 2238-9970

SAHLAN, M. *et al.* The cytotoxic and anti-inflammatory potential of Tetragonula sapiens propolis from Sulawesi on raw 264.7 cell lines. **Journal Of King Saud University - Science**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 101314, mar. 2021. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101314>.

SANTOS, H. C. Dos *et al.* Atividade antimicrobiana de frações do extrato de própolis frente à Staphylococcus spp. isolados de mastite caprina. **Pesquisa Veterinária Brasileira** [online]. 2019, v. 39, n. 12 [Acessado 19 Maio 2022] , pp. 954-960. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5940>>. Epub 10 Jan 2020. ISSN 1678-5150.
<https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5940>.

SILVA, C. H. da. Avaliação do potencial biotecnológico de compostos bioativos de *Libidibia ferrea* var *ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz e de *Cratylia mollis* (Mart. ex.) Benth sobre *Leishmania* spp. 2018. 136 f. (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

SILVA, K. C. M. da. Os diferentes tipos de própolis e suas indicações: uma revisão de literatura. 2018. 53 f. (Mestrado em Sistema Agroindustriais) – Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2018.

SILVA, P. P. da. Avaliação da correlação dos teores de fenólicos de própolis utilizando espectroscopia UV-Vis. 2019. 51 f. (Monografia) – Escola de Farmácia, Universidade de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019.

SILVA, R. A. *et al.* Antimicrobial Resistance: formulation of the response in the global health context. **Saúde Debate**, v. 44, n. 126, p. 607-623, 2020. Disponível em: < DOI: 10.1590/0103-1104202012602I

SILVA, T. S. *et al.* Green and Red Brazilian Propolis: antimicrobial potential and anti-virulence against atcc and clinically isolated multidrug-resistant bacteria. **Chemistry & Biodiversity**, [S.L.], v. 18, n. 8, p. 1-18, 22 jun. 2021. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.202100307>.

SILVEIRA, M. A. D. *et al.* Efficacy of propolis as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: a randomized, controlled clinical trial. **Medrxiv**, [S.L.], 9 jan. 2021. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/2021.01.08.20248932>.

SOUSA, J. P. Leme de Mello *et al.* Chemical and Antimicrobial Potential Study of Brazilian Propolis Produced by Different Species of Bees. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 1480-1497, 2019. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).
<http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20190103>.

SOUZA, J. S. de. Esterificação do ácido cinâmico usando catálise enzimática. Trabalho de conclusão de curso (Superior). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, Campus Apodi - Curso Superior de Licenciatura Plena em Química, Apodi, 2021.

SPINOSA, H. de S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à**

medicina veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2017.

SURAN, J. *et al.* Propolis Extract and Its Bioactive Compounds—From Traditional to Modern Extraction Technologies. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 10, p. 2930, 14 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26102930>

TREVISAN, C. M. de O. *et al.* Resistência bacteriana e o uso de bacteriófagos como uma possível solução- Revisão de literatura. **VIII Fórum Rondoniense de Pesquisa**, v.8, n.1, 2022

YAZDANIAN, M. *et al.* Chemical Characterization and Cytotoxic/Antibacterial Effects of Nine Iranian Propolis Extracts on Human Fibroblast Cells and Oral Bacteria. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2022, p. 1-14, 6 abr. 2022. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/6574997>.

XAVIER, A. de L. *et al.* Atividade antibacteriana do extrato etanólico da própolis vermelha brasileira contra bactérias produtoras de β -lactamase e carbapenemase de espectro estendido multidroga-resistentes. **Scientia Plena**, 19(4), 2023.

4. CAPÍTULO II – PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

ARTIGO CIENTÍFICO – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DA PRÓPOLIS PRODUZIDA NA MICRORREGIÃO DE GARANHUNS, PE.

RESUMO

O uso incorreto de antimicrobianos tem levado à seleção de microrganismos resistentes, impulsionando a busca por alternativas eficazes e econômicas para o tratamento de doenças causadas por patógenos multirresistentes. A própolis, conhecida por seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anticancerígenos e antimicrobianos, surge como um antimicrobiano natural promissor. Pesquisadores continuam a investigar a complexa composição da própolis para desvendar seu potencial biológico, especialmente sua atividade antimicrobiana contra uma variedade de microrganismos multirresistentes. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo identificar compostos químicos e avaliar as atividades antimicrobiana e antibiofilme do extrato hidroalcoólico da própolis produzida na microrregião de Garanhuns, PE, Brasil. Os resultados da prospecção fitoquímica indicaram que os extratos da própolis apresentavam fenóis, taninos condensados, chalcona/auronas, flavononóis, catequinas, flavanonas/flavonóis/xantonas, triterpenóides, saponinas, alcalóides e antrons. O teor total de compostos fenólicos variou de 280,99 a 783,64 mgEAG/g, enquanto o de flavonoides de 224,17 a 815,64 mgEQ/g. Contra cepas de *Staphylococcus aureus* o extrato testado demonstrou concentração inibitória mínima (CIM) de 31,25 e 62,5 µg/mL, e concentração bactericida mínima (CBM) de 125 e 250 µg/mL. No teste de inibição da formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina, não foi observado efeito significativo ($p > 0,05$) entre as três concentrações testadas do extrato de própolis, embora a produção de biofilme por 80% dos isolados tenha sido inibida a percentuais variando de 3,9 a 97,6%. A avaliação da capacidade do extrato de própolis em desagregar biofilmes formados demonstrou uma baixa eficácia desse produto natural nas concentrações avaliadas e nenhuma capacidade de erradicar essa estrutura. Os resultados do presente estudo demonstraram que o extrato da própolis avaliado apresenta atividade antimicrobiana e antibiofilme, sugerindo que o produto tem potencial para compor formulações farmacêuticas.

Palavras-chave: composição química; produto natural; antimicrobiano.

ABSTRACT

The incorrect use of antimicrobials has led to the selection of resistant microorganisms, driving the search for effective and economical alternatives for the treatment of diseases caused by multidrug-resistant pathogens. Propolis is known for its antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and antimicrobial effects, therefore appears as a promising natural antimicrobial. Researchers continue to investigate the complex composition of propolis to uncover its biological potential, especially its antimicrobial activity against a variety of multidrug-resistant microorganisms. In this context, the present study aimed to identify chemical composition, evaluate the antimicrobial and antibiofilm activities, as well as the ability to reverse the antimicrobial resistance phenotype of the hydroalcoholic extract of propolis produced in the microregion of Garanhuns, PE, Brazil. The results of the phytochemical prospecting indicated that the propolis extracts presented phenols, condensed tannins, chalcone/aurons, flavonols, catechins, flavanones/flavonols/xanthones, triterpenoids, saponins, alkaloids and anthrones. The total content of phenolic compounds ranged from 280.99 to 783.64 mgEAG/g, while that of flavonoids from 224.17 to 815.64 mgEQ/g. Against strains of *Staphylococcus aureus*, the tested extracts demonstrated minimum inhibitory concentration (MIC) of 31.25 and 62.5 µg/mL, and minimum bactericidal concentration (MBC) of 125 and 250 µg/mL. In the test to inhibit biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis, no significant effect ($p > 0.05$) was observed among the three propolis extract concentrations tested, although biofilm production by 80% of the isolates was inhibited at percentages ranging from 3.9 to 97.6%. The evaluation of the capacity of propolis extract to disaggregate formed biofilms demonstrated low efficacy of this natural product at the concentrations evaluated and no capacity to eradicate this structure. The results of the present study demonstrated that extract of propolis evaluated has antimicrobial and antibiofilm activity, suggesting that the product has the potential to form part of pharmaceutical formulations.

Keywords: chemical composition; natural product; antimicrobial.

INTRODUÇÃO

A descoberta dos antimicrobianos foi um marco na medicina do século XX, possibilitando que inúmeras vidas fossem salvas. Esses compostos químicos são capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de microrganismos. Porém, o uso incorreto desses fármacos é o principal fator que contribui para o surgimento e disseminação de cepas bacterianas resistentes (Amarante *et al.*, 2019; Silva; Ortega, 2022; Bouchelaghem, 2022).

A Resistência Antimicrobiana (RAM) tem tornado diversos tratamentos ineficazes, causando diversos problemas aos pacientes, como também aos profissionais da área de saúde, órgãos públicos, indústrias farmacêuticas e pesquisadores (Oliveira; Pereira; Zamberlam, 2020). Vale ressaltar que a RAM também é uma questão importante de saúde pública global (Silva *et al.*, 2021).

Segundo Silva e colaboradores (2020), anualmente, aproximadamente quatro milhões de pessoas adquirem infecções relacionadas a ambientes hospitalares, resultando em cerca de 37.000 óbitos devido a infecções causadas por microrganismos. A maioria dessas mortes (67,6%) é causada por bactérias multirresistentes. Estudos conduzidos por O'Neil (2016), indicam que a RAM causará cerca de 10 milhões de mortes até 2050, tornando-se mais letal do que o câncer.

Com relação ao uso de antimicrobianos na agropecuária, e de acordo com Oliveira, Pereira e Zamberlam (2020), o consumo desses insumos duplicará até o ano de 2030, tanto no Brasil quanto em outros países, inclusive desenvolvidos. No estudo realizado por Oliveira *et al.* (2019) com o objetivo de caracterizar o descarte de Resíduos de Serviços de Saúde Animal (RSAS) em um município da região Sul do Brasil, principalmente os fármacos de uso veterinário, concluiu-se que a classe de medicamentos mais utilizada foi a dos antimicrobianos. Além disso, os autores constataram que o descarte desses compostos químicos era inadequado, podendo causar efeitos adversos à saúde humana, animal e ambiental.

A antibioticoterapia é uma das medidas recomendadas para o tratamento das mastites clínicas e como terapia no período seco das fêmeas e, nesse contexto, é a enfermidade responsável pelas maiores quantidades de antimicrobianos utilizados em rebanhos leiteiros (Beloni *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2023). Embora diversos trabalhos discutam amplamente o uso racional de antimicrobianos na produção animal e, particularmente, no tratamento de mastites (Cades *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2021), a utilização incorreta (dosagem, tempo de tratamento, uso abusivo) ainda é uma realidade, haja vista a grande quantidade de estudos que demonstram frequência elevada de cepas bacterianas

resistentes e multirresistentes, isoladas de casos de mastite (Kurosawa *et al.*, 2020; Lucas *et al.*, 2021; Lopes *et al.*, 2022).

Dentre os diversos agentes bacterianos causadores de mastite bovina, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) continua sendo o mais importante (Amarante *et al.*, 2019; Kurosawa *et al.*, 2020), seja devido aos danos à glândula mamária da fêmea acometida, seja pelos prejuízos econômicos gerados pela queda da produção e qualidade do leite, aumento da mão de obra, tratamento, descarte do leite, descarte e secagem prematura, perda de quartos mamários e até mesmo a morte de animais (Carvalho *et al.*, 2021).

A mastite por *S. aureus* também deve ser considerada como um importante risco à saúde pública, visto que cepas multirresistentes desse patógeno poderão ser veiculadas para a população através do consumo de produtos lácteos não pasteurizados (Souza *et al.*, 2020; Neelam *et al.*, 2022).

Diante disso, surge a necessidade de buscar, por meio de pesquisa científica, novos compostos que representem alternativas terapêuticas viáveis. Nesse contexto, a própolis tem se mostrado promissora, pela facilidade de obtenção e por suas inúmeras propriedades farmacológicas demonstradas nos últimos anos (Monteil *et al.*, 2022; Sobreira *et al.*, 2020; Sahlan *et al.*, 2021; Bouchelaghem *et al.*, 2022). Contudo, a padronização e uso desse produto em tratamentos clínicos é um desafio devido à diversidade da sua composição química, o que torna necessária a realização de novas pesquisas (Amarante *et al.*, 2019; Bouchelaghem, 2022).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi quantificar o teor total de fenóis e flavonoides, avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do extrato hidroalcolólico da própolis produzida na microrregião de Garanhuns, PE,

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e coleta das amostras de própolis

As amostras de própolis foram obtidas do apiário pertencente à Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, localizada no município de Garanhuns, o qual faz parte da Microrregião de Garanhuns, Pernambuco, situado a 08° 53' 25" de latitude sul e 36° 29' 34" de longitude oeste. Para a coleta da própolis utilizou-se coletor específico adaptado a cada colmeia, coletando-se nove amostras (designadas de 01 a 09) de três colmeias distintas e com intervalo de 2 meses (tabela 01). O projeto de pesquisa foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do

Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob o cadastro de número A5A0F0E.

Extração da própolis

O extrato hidroalcolólico de própolis foi obtido de acordo com a metodologia de Mendonça *et al.* (2015), com adaptações. Após a solubilização da amostra em álcool 70% na proporção de 1:10, a substância foi filtrada e reduzida em rota evaporador. As amostras foram então liofilizadas e armazenadas em freezer a -20 °C. Para as análises preparou-se solução estoque utilizando dimetilsulfóxido (DSMSO) a 5% como solvente. A solução foi armazenada em frasco âmbar e mantida sob refrigeração até o uso. Antes de cada análise uma alíquota desta solução (100 µL) foi submetida a teste de esterilidade utilizando-se placas de ágar sangue ovino 5%.

Prospecção fitoquímica

Realizou-se ensaio qualitativo de prospecção fitoquímica utilizando-se metodologia de referência (Matos, 1997). Para a identificação de fenóis e taninos utilizou-se reação com cloreto de ferro (FeCl₃) a 2%. O teste para detectar flavonoides, antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavanóis e xantonas, chalconas e auronas, leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas foi realizado com ácido clorídrico (HCl) a um pH 3 e hidróxido de sódio (NaOH) a um pH 8,5 e 11. Para esteróides e triterpenóides realizou-se extração com clorofórmio (CHCl₃), anidrido acético (Ac₂O) e ácido sulfúrico (H₂SO₄), enquanto para saponinas realizou-se teste de agitação para formação de espuma. Para os alcaloides antraquinonas, antronas e cumarinas o teste de cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizado e para alcalóides o reagente de Dragendorff.

Determinação do conteúdo de fenóis e flavonoides totais

Para a determinação do conteúdo de fenólicos totais dos extratos, foram realizados testes quantitativos pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Slinkard; Singleton, 1977), com modificações, utilizando ácido gálico como composto fenólico padrão. A absorbância foi estimada a 760 nm. A curva padrão foi construída utilizando-se solução de

ácido gálico a 0,5 mg/mL, água destilada, Folin-Ciocalteu e solução de Na₂CO₃ à 15%. A curva teve equação de reta $y = 0,0904x - 0,0233$ e coeficiente angular de $R^2 = 0,9894$. Os resultados foram expressos em miligrama equivalentes de ácido gálico (mgEAG)/g de extrato. Os flavonoides totais foram estimados pelo método de Woisky e Salatino (1998), com adaptações, utilizando quercetina como flavonoide padrão. A absorbância foi medida a 420 nm. Para a curva padrão utilizou-se quercetina a 0,5mg/ml, metanol e cloreto de alumínio (AlCl₃) a 5%. A curva teve equação de reta $y = 0,0736x - 0,0194$ e coeficiente angular de $R^2 = 0,9805$. Os resultados foram expressos em miligrama equivalentes de quercetina (mgEQ)/g de extrato.

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Para os testes foram utilizadas três cepas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*): ATCC 25923, cepa MRSA 86PE (isolado clínico de origem humana) e amostra 128P (isolado de mastite bovina). Para a determinação da CIM foi utilizada a técnica da microdiluição, de acordo com técnica padrão (CLSI, 2018) e com as adaptações sugeridas por Santos *et al.* (2019). Dessa forma, placas estéreis de microcultivo de 96 poços de fundo em “U” foram preparadas com caldo Mueller Hinton, extrato bruto da própolis (concentração variando de 1000 µg/mL a 7,81 µg/mL) e inóculo bacteriano na concentração final de 5×10^5 UFC/mL. Em todas as placas foram preparados poços com caldo Mueller Hinton+extrato, caldo Mueller Hinton+inóculo, caldo Mueller Hinton+DMSO 5%+inóculo e poços com cloranfenicol+inóculo, representando controles de qualidade da técnica. As placas foram incubadas a 37°C/24h e a CIM determinada como a menor concentração do extrato da própolis que inibiu o crescimento bacteriano aparente. As amostras bacterianas foram avaliadas em triplicata e o experimento realizado em duplicata. Para a determinação da CBM, alíquotas de cada poço do experimento acima descrito foram distribuídas na superfície de placas de ágar TSA (Tryptic Soy Agar, Kasvi, Brasil). As placas foram incubadas a 37°C/24h e a CBM determinada como a menor concentração do extrato da própolis onde não houve crescimento bacteriano (Silva *et al.*, 2021). O teste foi realizado em triplicata e o experimento em duplicata.

Atividade inibitória de biofilme

Para avaliar a capacidade do extrato de própolis de inibir a produção de biofilme foram avaliadas 20 amostras de *S. aureus* previamente isoladas de casos de mastite bovina (Vieira *et al.*, 2024). A cepa *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo nos experimentos. Os isolados bacterianos foram previamente investigados quanto à habilidade de produzir biofilme, de acordo com a metodologia e critérios de interpretação sugeridos por Darwish e Asfour (2013), com modificações. Para o experimento de inibição da produção de biofilme os isolados bacterianos foram cultivados em 10 mL de TSB glicosado a 1% e incubados a 37°C overnight. Após isso, os inóculos foram diluídos a 1:40 (aproximadamente 2×10^7 UFC/mL) e 100 µL transferidos para placa de microtitulação de fundo chato, previamente preparadas com 100 µL do extrato da própolis (concentração final em cada poço correspondente a 50, 25 e 12,5% da CIM, de acordo com Nostro *et al.*, 2007). Poços com TSB e com TSB+*S. aureus* ATCC 25923, representaram controle negativo e positivo, respectivamente. As placas foram incubadas a 37°C/24h e, posteriormente, seguiram-se as etapas de lavagem, fixação, coloração e leitura a 570nm (Darwish; Asfour, 2013). O teste foi realizado em triplicata e o experimento em duplicata. A eficácia do extrato em inibir a produção de biofilme foi definida a partir do percentual de inibição calculado a partir da seguinte fórmula: % inibição = $(1 - (OD_T/OD_I)) \times 100$, onde: OD_T = média das ODs da amostra após a exposição ao extrato de própolis; e OD_I = média das ODs da amostra antes da exposição ao extrato de própolis.

Atividade desagregadora de biofilmes formados

A desagregação de biofilmes formados foi avaliada através da metodologia de produção de biofilme, como descrita anteriormente, com modificações. Após a etapa de lavagem das placas, foram adicionados a cada poço 200 µL de extrato de própolis nas seguintes concentrações: 2x e 4x a da CIM; concentração igual à da CBM e 2x a da CBM. As placas foram lidas a 570 nm, registrando-se a OD imediatamente após a adição do extrato (0h) e após 24 horas de incubação (24h). A capacidade do extrato em desagregar biofilme foi determinada como a menor concentração que não causou aumento na densidade ótica após 24h (OD_{24h}) em comparação à leitura inicial (OD_{0h}) (Nostro *et al.*, 2007). Para as amostras que apresentaram OD_{24h} inferior a OD_{0h} foi avaliada a erradicação do biofilme por meio da transferência de amostra do biofilme (retirado do fundo de cada poço por escarificação) para placa de TSA que

foi incubar a 37°C por até 72 horas, quando foi confirmada a erradicação através da ausência de colônias bacterianas na superfície da placa (Nostro *et al.*, 2007).

Análise estatística

Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva. Posteriormente, o teste de Lilliefors foi utilizado para verificar a normalidade dos dados e o teste de Kruskal-Wallis para comparar a produção de biofilme entre as amostras bacterianas expostas às diferentes concentrações de própolis, bem como, entre as concentrações de própolis. O nível de significância foi de 5%. O software utilizado foi o BioEstat 5.3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como demonstrado na tabela 1, foram coletadas nove amostras de própolis no período de setembro de 2018 a fevereiro de 2019, com rendimento médio de 32,4% de extrato, após o processo de liofilização.

Tabela 1 – Coleta, peso e rendimento de amostras de própolis produzida na microrregião de Garanhuns, PE, Brasil.

Amostra	Data da coleta	Peso da amostra (g)	Peso do extrato bruto (g)	Peso após liofilização (g)	Rendimento do extrato (%)
01	25/09/2018	18,22g	12,69g	5,59g	30,7%
02	25/09/2018	30g	17,01g	10,43g	34,8%
03	25/09/2018	54g	26,98g	16,71g	30,9%
04	20/11/2018	39,6g	13,30g	8,67g	21,9%
05	20/11/2018	18g	9,39g	6,76g	37,6%
06	20/11/2018	6,52g	3,42g	2,79g	42,8%
07	15/02/2019	46g	16,73g	11,15g	24,2%
08	15/02/2019	84g	31,11g	24,86g	29,6%
09	15/02/2019	65g	35,60g	26,26g	40,4%

A prospecção fitoquímica das amostras dos extratos de própolis mostrou variação de constituintes entre as amostras (tabela 2). De forma geral, as amostras de própolis apresentaram em sua composição: fenóis, taninos condensados, chalcona/auronas, flavononois, catequinas, flavanonas/flavonois/xantonas, triterpenóides, saponinas, alcalóides e antronas.

Tabela 2 - Constituintes químicos de extratos de própolis produzida na Microrregião de Garanhuns, PE.

Constituintes químicos*	Extrato									
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	
Fenóis	-	+	+	-	+	-	+	+	-	
Taninos Hidrolisáveis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Taninos condensados	-	++	++	-	-	+	-	+	-	
Antocianinas/antocianidinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Flavanonas/flavonois/xantonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Chalconas/auronas	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Flavononois	-	+	-	+	-	+	-	-	+	
Leucoantocinidinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Catequinas	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
Flavanonas/flavonois/xantonas	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
Flavonois/flavanonas/flavononois/xant	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Esteróides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Triterpenóides	+	+	++	-	+	+	-	-	-	
Saponinas	+	+	++	++	++	-	+	+	+	
Alcalóides	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Antraquiononas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Antronas	-	-	++	-	-	-	-	+	+	
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

* + coloração clara; ++ coloração intensa; - sem alteração

Mohiuddin *et al.* (2022) identificou a presença de alcaloides, saponinas, taninos e resinas, através de técnicas de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), da própolis da região da Caxemira. Mendonça *et al.* (2015), investigando a própolis vermelha brasileira, realizou uma triagem fitoquímica por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com transformada de Fourier (LC-Orbitrap-FTMS), detectou a presença de compostos fenólicos, flavonoides e triterpenoides pentacíclicos. É importante destacar que as técnicas utilizadas pelos autores citados são mais precisas que a utilizada no presente estudo, porém os compostos detectados foram semelhantes.

Os resultados da determinação dos teores totais de fenóis e flavonoides estão resumidos na tabela 3. O presente estudo revelou valores superiores desses compostos quando comparados aos encontrados em estudos anteriores. Amarante *et al.* (2019), avaliando dois extratos comerciais de própolis verde, encontraram valores de 17,45 e 126,22 mgCAE/g (miligrama equivalente a catequina) para flavonoides totais e de 51,06 e 73,12 mgEAG/g (miligrama equivalente a ácido gálico) para fenóis totais. Bouchelaghem *et al.* (2022) identificaram concentrações entre 10,4 e 71,1 mgEAG/g para fenóis totais e entre 33,8 e 273,2 mgCAE/g para flavonoides totais em extratos de própolis húngara. Por sua vez, as concentrações encontradas por Yazdanian *et al.* (2022), para extratos de própolis iraniana, variaram de 5,5 a 35,5 mg/g para fenóis e de 2,2 a 63,3 mg/g para flavonoides.

A alta variabilidade nos teores totais de fenol e flavonoides observada entre os estudos é atribuída às diversas fontes de exsudato vegetal e à localização específica dos apiários (Amarante *et al.*, 2019). Além disso, a variação nos teores fenólicos dos extratos de própolis pode ser influenciada ainda pelo tipo de solvente e padrão utilizados, bem como pela proporção de solventes e pelos métodos de extração (Suran *et al.*, 2021; Yazdanian *et al.*, 2022).

Para avaliar a atividade antimicrobiana foi selecionada a amostra EH03, por apresentar a maior concentração de compostos fenólicos totais. Dessa forma, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) desse extrato foi de 31,5 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente, para os isolados clínicos (*S. aureus* isolado de mastite bovina e MRSA de origem humana) e de 62,5 µg/mL e 125 µg/mL, nesta ordem, para a cepa de referência.

Tabela 3 - Médias dos teores totais de fenóis e flavonoides de extratos hidroalcoólicos da própolis produzida na microrregião de Garanhuns, PE, Brasil.

Amostra	Fenóis (mgEAG*/g)	Flavonoides (mgEQ**/g)
	Média ± DP	Média ± DP
EH01	519,63 ± 7,01	284,86 ± 1,88
EH02	588,95 ± 5,79	815,65 ± 6,37
EH03	783,64 ± 4,17	475,62 ± 1,55
EH04	326,27 ± 2,86	412,66 ± 0,91
EH05	380,55 ± 3,06	396,00 ± 2,18
EH06	614,03 ± 2,56	342,37 ± 0,64
EH07	448,98 ± 5,04	267,16 ± 0,77
EH08	280,99 ± 7,75	224,17 ± 5,73
EH09	338,51 ± 3,27	316,01 ± 1,24

*mgEAG = miligrama equivalente a ácido gálico; **mgEQ = miligrama equivalente a quercetina

Em estudos conduzidos por outros investigadores a CIM de extratos de própolis para cepas de *S. aureus* foram superiores aos do presente estudo. El-Guendouz *et al.* (2018) relataram CIM de 360 µg/mL, enquanto CIM de 800 a 1200 µg/mL, 700 µg/mL e superiores a 500 µg/mL foram observadas por Al-ANI *et al.* (2018), Cruz *et al.* (2019) e Silva *et al.* (2021), respectivamente. No entanto, na literatura também encontram-se resultados de CIM para *S. aureus* e outras bactérias Gram-positivas que foram bem inferiores aos do presente estudo, como os de Yazdanian *et al.* (2022), que observaram CIM de 7 µg/mL.

Em relação à CBM os resultados obtidos por outros autores variaram de 7 a 468 µg/mL (Yazdanian *et al.*, 2022); 34,3 a 134,5 µg/mL para isolados clínicos e cepas de referência de *S. aureus* (Amarante *et al.*, 2019) e de 370 a 50.000 µg/mL para *S. aureus* e bactérias Gram-negativas (Cruz *et al.*, 2019).

No presente estudo a eficácia elevada da amostra EH03, demonstrada por baixas concentrações inibitória e bactericida mínimas contra as três cepas avaliadas, pode estar relacionada ao teor elevado de fenólicos totais, como também ao teor de flavonoides, observados no extrato. Em estudo conduzido por Amarante *et al.* (2019) foi observada uma maior atividade do extrato que continha o maior teor de compostos fenólicos. De acordo com estes e outros autores (Farida *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2021) os compostos fenólicos e,

destacadamente, os flavonoides, são um dos mais importantes grupos químicos presentes na própolis associados a atividade antimicrobiana demonstrada por esse produto natural. Segundo Silva *et al.* (2021), apesar da padronização terapêutica da própolis ser um desafio e ser difícil estabelecer a relação entre tipos definidos de própolis e atividades biológicas específicas, a presença de uma quantidade significativa de um composto pode levar à expectativa de que o extrato tenha o potencial para mostrar bioatividades ligadas a este componente.

Para avaliar atividade inibitória e desagregadora de biofilmes foram utilizadas a CIM e a CBM estabelecidas para os isolados clínicos, ou seja, 31,25 e 250 µg/mL, respectivamente. Nos ensaios de inibição da produção de biofilme todas as amostras bacterianas avaliadas foram positivas para a produção de biofilme com 52,4% (11/21) classificadas como fortes produtoras, 23,8% (5/21) moderadas produtoras e 23,8% (5/21) fracas produtoras de biofilme. A exposição desses isolados às diferentes concentrações do extrato de própolis alterou o percentual de amostras em cada uma dessas categorias, como demonstrado na tabela 4.

O teste de Kruskal-Wallis mostrou que não houve diferença estatística ($p > 0,5$) entre as diferentes concentrações do extrato de própolis sobre a inibição de biofilme produzido pelas amostras avaliadas (tabela 5). Este resultado impossibilitou a determinação da concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB) da amostra do extrato de própolis testada no presente estudo.

Embora sem efeito significativo, todas as concentrações inibiram biofilme em percentuais suficientes para reduzir o número de amostras da categoria “forte produtora”, aumentando o número de amostras nas categorias “fraca produtora” e “moderada produtora”. Nenhuma das concentrações testadas foi capaz de inibir biofilme em percentuais suficientes para permitir o agrupamento de um maior número de amostras na categoria de “não produtora”. Destaca-se que a cepa ATCC 25923 passou da categoria “moderada produtora” para a de “fraca produtora”, em todas as concentrações testadas.

O teste de Kruskal-Wallis indicou diferença ($p < 0,05$) da formação de biofilme entre os diferentes isolados bacterianos (tabela 5). Nesse sentido, do total de amostras de campo avaliadas, em 16 (80%) a produção de biofilme foi afetada por todas as concentrações testadas, com percentuais de inibição variando de 3,9 a 97,6%. Em um isolado foi observada resposta diferenciada, com o biofilme não sendo inibido por nenhuma das concentrações testadas, enquanto o biofilme de três isolados foi inibido apenas por uma ou três das concentrações testadas, mas a níveis baixos de inibição. O biofilme formado pela cepa de referência foi afetado por todas as concentrações, com percentuais de inibição variando de 25,2 a 32,3%.

Tabela 4. Percentual de amostras de *Staphylococcus aureus* de acordo com a produção de biofilme, antes e após exposição à diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis.

Categoria	Antes (n/%)	Após (n/%)		
		3,9 µg/mL (12,5% da CIM)	7,8 µg/mL (25% da CIM)	15,62 µg/mL (50% da CIM)
não produtora	-	-	2/9,5	1/4,8
fraco produtora	5/23,8	16/76,2	11/52,4	11/52,4
moderado produtora	5/23,8	5/23,8	7/33,3	8/38
forte produtora	11/52,4	-	1/4,8	1/4,8
TOTAL	21/100	21/100	21/100	21/100

Os resultados do presente estudo apontam para um provável papel da própolis sobre a inibição de biofilmes produzidos por isolados de *S. aureus* de mastite bovina. Uma vez que essa estrutura favorece a persistência de um patógeno bacteriano no sítio de infecção, bem como dificulta o tratamento a base de antimicrobianos (Pedersen *et al.*, 2021), um composto natural que reduza sua produção tem potencial de compor formulações terapêuticas eficazes.

No estudo conduzido por Bouchelaghem *et al.* (2022), a CIMB variou de 50 µg/mL a 200 µg/mL para diferentes cepas de *S. aureus*, de referência e isolados clínicos. Por outro lado, El-Guendouz *et al.* (2018), testando a concentração de 360 µg/mL de extrato de própolis marroquina, observaram que a produção de biofilme por *S. aureus* ATCC 6538 não foi afetada, enquanto a das cepas MRSA foi significativamente prejudicada.

Segundo El-Guendouz *et al.* (2018) a formação de biofilme bacteriano está ligada ao sistema de detecção de *quorum sensing* (QS) da célula bacteriana. Nos estafilococos, esse mecanismo compreende o locus regulador do gene acessório (*agr*) que controla a produção de um peptídeo sinal autoindutor (AIP). Para estes autores, provavelmente o processo pelo qual a própolis prejudica a formação de biofilme está relacionado à interrupção do sistema QS, algo que ainda necessita ser entendido e esclarecido.

Tabela 5. Percentual de inibição de biofilme de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina por diferentes concentrações de extrato hidroalcolóico de própolis.

Isolado	3,9 µg/mL (12,5% da CIM)	7,8 µg/mL (25% da CIM)	15,62 µg/mL (50% da CIM)
01	97.3 ^a	97.6 ^a	97.6 ^a
02	82.5 ^b	82.6 ^b	85.4 ^b
03	9.8 ^c	10.9 ^c	11.3 ^c
04	82.6 ^b	85.1 ^b	79.3 ^b
05	35.7 ^d	46.5 ^d	53.3 ^d
06	14.1 ^c	25.4 ^c	15.8 ^c
07	79.0 ^b	84.5 ^b	83.0 ^b
08	15.2 ^c	15.6 ^c	11.7 ^c
09	95.4 ^e	96.1 ^a	95.5 ^{af}
10	80.9 ^b	80.4 ^b	82.6 ^b
11	3.9 ^{cf}	16.0 ^c	19.9 ^c
12	0.0 ^f	0.0 ^e	0.0 ^e
13	42.0 ^d	53.4 ^d	48.6 ^{dg}
14	0.4 ^f	0.0 ^e	0.0 ^e
15	0.0 ^f	6.3 ^e	1.1 ^e
16	75.0 ^b	77.7 ^b	69.3 ^d
17	83.3 ^b	82.6 ^b	84.5 ^b
18	94.7 ^e	93.5 ^b	94.7 ^f
19	95.2 ^e	91.1 ^b	89.3 ^b
20	85.0 ^b	88.5 ^b	88.5 ^b
ATCC	25.2 ^c	32.3 ^d	30.2 ^g
	H= 58.7155 p= 0.0000*	H= 58.1504 p= 0.0000*	H=58.6800 p= 0.0000*

*Diferença significativa ao nível de 5,0%

Obs: Em cada concentração, letras distintas demonstram diferenças significativas entre as amostras correspondentes.

A avaliação da capacidade do extrato de própolis desagregar biofilmes formados demonstrou uma baixa eficácia desse produto natural nas concentrações avaliadas. O extrato EH03 na concentração de 62,5 µg/mL (2xCIM) não foi capaz de desagregar o biofilme formado por nenhum dos isolados bacterianos avaliados, inclusive a cepa de referência. Nas concentrações de 125 µg/mL (4xCIM), 250 µg/mL (CBM) e 500 µg/mL (2xCBM) os biofilmes formados por oito, 17 e 16 isolados, respectivamente, foram desagregados quando expostos por 24h ao extrato, porém à taxas extremamente baixas, com médias de 0,80, 2,60 e 3,47% para as concentrações de 4xCIM, CBM e 2xCBM, respectivamente. Interessante destacar que o biofilme formado pela cepa de referência ATCC 25923 sofreu uma leve desagregação (percentuais abaixo de 6%) quando exposto às concentrações mais elevadas do extrato de

própolis.

Os resultados da presente investigação apontam para uma resistência da estrutura do biofilme ao extrato da própolis testado, pelo menos às concentrações utilizadas. Ressalta-se que todas as amostras que demonstraram qualquer percentual de desdagração foram submetidas ao teste de erradicação de biofilme, porém em todas as amostras observou-se crescimento bacterianos após 24, 48 ou 72 horas, sugerindo que a desagregação de um biofilme, seguida por sua erradicação, não é fácil de ser obtido utilizando compostos químicos.

A desagregação de biofilmes por diferentes concentrações de própolis foi observada por outros investigadores, com percentuais mais elevados do que os observados no presente estudo. Avaliando extratos de própolis de diferentes regiões do Irã, Yazdaniam *et al.* (2022) obtiveram percentuais de desagregação de biofilme formado por *S. aureus* entre 4 a 60%. Bouchelaghem *et al.* (2022) expuseram por 16 horas biofilmes formados por *S. aureus* a diferentes concentrações de extrato de própolis e constataram aumento significativo da desagregação do biofilme na maioria das cepas expostas às concentrações de 15, 18, 48 e 52 µg/mL. No entanto, duas cepas apresentaram maior resistência, demonstrando percentuais de desagregação de 47% e 87% apenas quando expostas à concentração de 200 µg/mL. Vale ressaltar que as condições dos experimentos relatados no presente estudo e aquelas dos estudos conduzidos por Yazdaniam *et al.* (2022) e Bouchelaghem *et al.* (2022) foram diferentes.

De acordo com Wojtyczka *et al.* (2013) o extrato de própolis pode afetar as formas planctônicas de bactérias com capacidade de formar biofilme, mas não a arquitetura do biofilme. De toda forma, essa estrutura poderá ser degradada, desde que seja padronizado o tempo de exposição ao extrato de própolis (Bouchelaghem *et al.*, 2022). Para estes autores, além do tempo de exposição, a erradicação de biofilmes formados é afetada pelo solvente utilizado na extração, cepas bacterianas avaliadas e origem das amostras de própolis. Assim, essas ponderações de Bouchelaghem e colaboradores apontam para a necessidade da padronização de métodos para avaliar o efeito do extrato de própolis sobre a desagregação de biofilmes formados.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados do presente estudo a própolis produzida na microrregião de Garanhuns apresenta teores médios a elevados de compostos fenólicos e flavonoides, sugerindo atividade biológica daquele composto natural. A amostra do extrato avaliado

demonstrou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e inibitória de biofilmes produzidos por *S. aureus* causadores de mastite bovina, indicando o potencial uso farmacêutico da própolis produzida na região. No entanto, trabalhos adicionais são necessários para identificar compostos ativos e relacionados às atividades observadas, além de avaliar um número maior de amostras de campo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de pós-graduação.

DECLARAÇÃO DE INTERESSE CONCORRENTE

Os autores declaram que não têm interesses financeiros concorrentes ou relações pessoais conhecidas que possam ter influenciado o estudo relatado neste artigo.

REFERÊNCIAS

AL-ANI, I. et al. Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. **Medicines**, v. 5, n. 1, p. 1-16, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5874567/>. Acesso em: 11 de maio de 2023.

ALVES, B. *et al.* Sensibilidad de Staphylococcus aureus a los antimicrobianos utilizados para tratar la mastitis bovina: revisión. **Pubvet**, [S.L.], v. 14, n. 04, p. 1-6, 25 maio 2020. Editora MV Valero. <http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v14n4a557.1-6>.

AMARANTE, J. F. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of two extract of propolis against isolates of Staphylococcus spp. and multiresistant bacterials. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 39, n. 9, p. 734-743, set. 2019. FapUNIFESP (SciELO).

BELONI, M. V. *et al.* Atividade antibacteriana dos óleos essenciais frente a agentes causadores da mastite bovina. **Tópicos Especiais em Ciência Animal IX**. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo - CCAE-UFES. 1ª edição. capt 15. p 262-281. 2020

BOUCHELACHEM, S. Propolis characterization and antimicrobial activities against Staphylococcus aureus and Candida albicans: a review. Saudi Journal Of Biological Sciences, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 1936-1946, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.063>.

BOUCHELACHEM, S. *et al.* Evaluation of Total Phenolic and Flavonoid Contents,

Antibacterial and Antibiofilm Activities of Hungarian Propolis Ethanolic Extract against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 574, 17 jan. 2022b. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27020574>.

CADES, M. *et al.* PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE MASTITE BOVINA EM PROPRIEDADE LEITEIRA NO MUNICÍPIO DE MONTE NEGRO/RO. **RBCA**, v. 6, n. 1, p. 1 – 62, jan. – abr. 2017.

CARVALHO, A. S. S. *et al.* Estudo e caracterização de microrganismos causadores de mastite bovina no DF e entorno, sua resistência aos antimicrobianos e os fatores de risco para a ocorrência da doença. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.9, p. 86772-86797 sep. 2021. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n9-032>.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **CLSI Approved Standard M100-S15**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2018.

CRUZ A. I. C. *et al.* ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS VERDE FRENTE A BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS COMERCIAIS. **Qualidade de produtos de origem animal 2** [recurso eletrônico] / Organizador Flávio Ferreira Silva. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, v. 2, p. 90-98, 2019.

DARWISH S.F.; ASFOUR H.A. Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. **Scientific World Journal**, nov 2, 2013. doi: 10.1155/2013/378492. PMID: 24298212; PMCID: PMC3835882

EL-GUENDOZ, S. *et al.* Moroccan Propolis: a natural antioxidant, antibacterial, and antibiofilm against *Staphylococcus aureus* with no induction of resistance after continuous exposure. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2018, p. 1-19, 12 nov. 2018. Hindawi Limited.

KUROSAWA, L. S. *et al.* Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. associados a mastite bovina. **Pubvet**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 1-6, maio 2020. Editora MV Valero. <http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v14n5a563.1-6>.

LOPES, T. S. *et al.* Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria associated with cow mastitis in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 42, p. 1-8, 2022. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6958>.

LUCAS, A.P. *et al.* Detection of β -lactamase, blaZ and mecA in penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Garanhuns, Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 15, p. 140-145, 2021.

MATOS, F. J. A. Introdução `fitoqímica experimental. 2ª ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MONTEIL, J. *et al.* Method to prepare aqueous propolis dispersions based on phase separation. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 389, p. 133072, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133072>.

NEELAM *et al.* Virulence and antimicrobial resistance gene profiles of *Staphylococcus aureus*

associated with clinical mastitis in cattle. **Plos One**, [S.L.], v. 17, n. 5, p. 1-8, 3 maio 2022. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0264762>

NOSTRO, A. *et al.* Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal Of Medical Microbiology*, [S.L.], v. 56, n. 4, p. 519-523, 1 abr. 2007. **Microbiology Society**. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46804-0>.

OLIVEIRA, K. S. de *et al.* Disposal of animal healthcare services waste in southern Brazil: one health at risk. **Saúde em Debate**, [S.L.], v. 43, p. 78-93, dez. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-11042019s306>

OLIVEIRA, M.; PEREIRA, K. D. S.; ZAMBERLAM, C. R. Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado de antibióticos: uma questão de saúde pública. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação - REASE**. Criciúma, v. 6.n.11, nov 2020. ISSN -2675 – 3337.

PEDERSEN R.R. *et al.* Research in Bovine Mastitis. **Front Vet Sci**. 2021 May 7;8:656810. doi: 10.3389/fvets.2021.656810. PMID: 34026893; PMCID: PMC8138050.

SAHLAN, M. *et al.* The cytotoxic and anti-inflammatory potential of *Tetragonula sapiens* propolis from Sulawesi on raw 264.7 cell lines. **Journal Of King Saud University - Science**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 101314, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101314>.

SANTOS, H. C. Dos *et al.* Atividade antimicrobiana de frações do extrato de própolis frente à *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. **Pesquisa Veterinária Brasileira** [online]. 2019, v. 39, n. 12 [Acessado 19 Maio 2022] , pp. 954-960. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5940>>. Epub 10 Jan 2020. ISSN 1678-5150. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5940>.

SILVA, R. A. *et al.* Antimicrobial Resistance: formulation of the response in the global health context. **Saúde Debate**, v. 44, n. 126, p. 607-623, 2020. Disponível em: < DOI: 10.1590/0103-1104202012602I

SILVA, T. S. *et al.* Green and Red Brazilian Propolis: antimicrobial potential and anti-virulence against atcc and clinically isolated multidrug-resistant bacteria. **Chemistry & Biodiversity**, [S.L.], v. 18, n. 8, p. 1-18, 22 jun. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.202100307>.

SILVA, T. de O.a; ORTEGA, L. do N. A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E CUSTOS DE CUIDADO DE SAÚDE: uma revisão sistemática. **Colloquium Vitae**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 25-39, 14 jan. 2022. Associação Prudentina de Educação e Cultura (APEC). <http://dx.doi.org/10.5747/cv.2021.v13.n2.v328>.

SILVA, V. dos S. *et al.* Uso de beta-glucano subcutâneo no controle da mastite bovina. **Peer Review**, [S.L.], v. 5, n. 17, p. 393-415, 26 jul. 2023. União Atlântica de Pesquisadores. <http://dx.doi.org/10.53660/818.prw2251>.

SOBREIRA, A. L. de C. *et al.* Atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis vermelha contra isolados patogênicos de *Candida* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 429-433, 1 out. 2020. Grupo Verde de

Agroecologia e Abelhas. <http://dx.doi.org/10.18378/rvads.v15i4.7969>.

SOUZA, G. A. A. D. *et al.* Staphylococcus aureus resistentes a metilina e meropenem em leite de vacas com mastite subclínica/ methicillin and meropenem resistant staphylococcus aureus in milk of cows with subclinical mastitis. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 6, n. 12, p. 98067-98081, 2020. Brazilian Journal of Development. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n12-340>.

SURAN, J. *et al.* Propolis Extract and Its Bioactive Compounds—From Traditional to Modern Extraction Technologies. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 10, p. 2930, 14 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26102930>

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 28, p. 49-55, 1977.

VIEIRA, J.C.S. *et al.* Prevalência de mastite e caracterização de agentes bacterianos isolados de rebanhos leiteiros da microrregião de Garanhuns, estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, 18(1): 44-53, 2024

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

WOJTYCZKA, R. D. *et al.* In Vitro Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of Polish Propolis against Biofilm Forming Staphylococcus epidermidis Strains. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2013, p. 1-11, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/590703>.

YAZDANIAN, M. *et al.* Chemical Characterization and Cytotoxic/Antibacterial Effects of Nine Iranian Propolis Extracts on Human Fibroblast Cells and Oral Bacteria. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2022, p. 1-14, 6 abr. 2022. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/6574997>.