

Otimização da extração de própolis pela atividade antimicrobiana

Optimization of propolis extraction by antimicrobial activity

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo otimizar o processo de extração de própolis pela determinação da atividade antibacteriana, utilizando os métodos de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) com diferentes solventes orgânicos e suas misturas. A amostra de própolis foi submetida ao processo de extração com isopropanol, etanol, acetato de etila e acetona. Depois os extratos foram secos e preparadas soluções na concentração de 10 mg/mL os quais foram testados contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli*. Todos os extratos preparados com misturas de solventes apresentaram atividade antibacteriana na concentrações de 0,09 mg/mL contra o *S. mutans* no teste CIM. O extrato de própolis verde elaborado com acetona foi eficiente contra as bactérias *S. aureus*, *S. mutans* e *E. coli*, apresentando CIM de 0,89 mg/mL, 0,35 mg/mL e >5,0 mg/mL, respectivamente. Em razão da própolis ser um produto que apresenta variações em suas propriedades biológicas o processo de otimização para o preparo dos extratos deve ser melhor explorado.

PALAVRAS-CHAVE: Qualidade. Extração por solvente. Concentração inibitória mínima.

ABSTRACT

This work aimed to optimize the propolis extraction process by determining the antibacterial activity, using the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (CBM) methods with different organic solvents and their mixtures. The propolis sample was subjected to the extraction process with isopropanol, ethanol, ethyl acetate and acetone. Then the extracts were dried and solutions were prepared at a concentration of 10 mg / mL, which were tested against the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Escherichia coli*. All extracts prepared with solvent mixtures showed antibacterial activity at concentrations of 0.09 mg / mL against *S. mutans* in the CIM test. The green propolis extract made with acetone was efficient against the bacteria *S. aureus*, *S. mutans* and *E. coli*, presenting MIC of 0.89 mg / mL, 0.35 mg / mL and > 5.0 mg / mL, respectively. Because propolis is a product that presents variations in its biological properties, the optimization process for the preparation of extracts should be better explored.

KEYWORDS: Quality. Solvent extraction. Minimum inhibitory concentration.

Elizabeth Figueiredo Pires
elizabethpireselizabethpires@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Tatiana Shioji Tiunan
tatianatiunan@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Recebido: 03 set. 2020.

Aprovado: 02 out. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está
licenciado sob os termos da Licença
Creative Commons-Atribuição 4.0
Internacional.



INTRODUÇÃO

Presente entre as mais antigas sociedades a própolis vem sendo usada ao longo da história pelos humanos. Uma substância natural resinosa produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir de exsudatos de plantas, cera e suas secreções. A própolis é composta por 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias (CASTRO et al., 2007). A principal função da própolis nas colmeias é controlar a temperatura, a luz e a umidade. Além disso, protege as colmeias de patógenos e alguns invasores de colônias (LUSTOSA et al., 2008). Desde 1984 sendo estudada no Brasil, os diferentes tipos de própolis, estão presentes nos trabalhos mais recentes. Dentre elas a verde e vermelha. Estas são, em sua grande parte, exportadas para outros países como o Japão e a China, e lá são vendidas a preços elevados (SALGUEIRO, 2016). A própolis vem se destacando tanto pelas suas propriedades terapêuticas, como atividade antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica e anticariogênica, quanto pela possibilidade de aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia (PEREIRA et al., 2001). No Brasil são descritas propriedades biológicas e composição química distintas para diferentes amostras coletadas em diferentes partes do país (WOJTYCZKA et al., 2013). Essa variação é facilmente explicada pela grande biodiversidade da flora brasileira, e apesar de sofrer suas diferenças na composição química por causa dos fatores geográficos, a própolis contém inúmeras substâncias em comum nos seus compostos, dentre as quais, ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos, aldeídos aromáticos e álcoois (RAHMAN et al., 2012). A atividade antibacteriana é relacionada à presença destes compostos presentes na resina (GOMES et al., 2016).

O alto valor agregado à própolis é um incentivo para um sério controle de qualidade dos produtos apícolas produzidos no Brasil, tendo a necessidade de conhecer suas propriedades e assim tentar estabelecer um ponto ótimo de extração para que o mesmo não perca mercado para outros países produtores. O Brasil produz de 10 a 15% da produção mundial, onde 70% são oriundas de Minas Gerais, das quais 20 toneladas são de própolis verde (SALGUEIRO, 2016). Uma das fontes vegetais para a produção da própolis da região Sudeste do Brasil é a resina coletada das folhas jovens de *Baccharis dracunculifolia* L., conhecida popularmente como alecrim-do-campo ou vassourinha (LIMA et al., 2018). A própolis verde é especificamente produzida nas regiões do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais, e sua cor verde é uma característica de sua origem vegetal, em função das abelhas coletarem tecidos jovens de botões e de folhas (que contêm clorofila) de *B. dracunculifolia* (PEREIRA et al., 2015). Nos relatos existentes sobre sua composição são encontrados predominantemente, derivados prenilados do ácido para-cumárico, como por exemplo, artemillin C e drupanina, além dos ácidos clorogênico e benzoico e flavonoides (SFORCIN, 2012). A presença de artemillin C, substância fenólica de baixo peso molecular encontrado somente na própolis brasileira, é um marcador químico para este tipo de própolis, onde as principais propriedades biológicas desta substância são características, antibacterianas, antivirais, anti-inflamatórias, antitumorais e antioxidantes (KHODABAKHSI et al., 2019).

Neste trabalho foi realizado o estudo da otimização do processo de extração de própolis verde pela determinação da atividade antibacteriana, sendo obtidos extratos utilizando diferentes solventes em diferentes misturas e proporções. O

teste antibacteriano foi realizado pelo método de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra analisada foi gentilmente cedida pela empresa Apis Global Produtos Alternativos Ltda (Piracaia, SP) coletada no município de Caxambu, sul de Minas Gerais em Janeiro de 2019, encontrando 95,2% de elementos histológicos característicos de *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo). Na Tabela 1 podemos analisar as características físico químicas das própolis verde utilizada neste estudo (dados fornecidos pela empresa).

Tabela 1 - Características físico químicas da própolis verde.

Determinação de	Resultado
Umidade	5,9%
Cera	17%
Cinzas	2,3%
Impureza mecânica	26%
Compostos fenólicos	8,2%
Compostos flavonoides	2,4%
Solúveis em etanol	70,2%

Fonte: Consultoria e controle de qualidade de produtos apícolas e naturais, Dr. Esther Margarida. Técnica de análise: Japan Health Food&NutritionFoodAssociation. Determinação de origem botânica.

Com os solventes extratores em proporções de 1:1 e 1:1:1 foram obtidos os extratos, sendo eles: isopropanol, etanol, acetato de etila, acetona, etanol/isopropanol, isopropanol/acetato de etila, isopropanol/acetato de etila/etanol, acetona/etanol, acetona/isopropanol e acetona/acetato de etila. A princípio, pesou-se 1 grama de própolis verde, cortada em pequenos pedaços de modo a aumentar a superfície de contato, em erlenmeyer e adicionou-se 25 mL da mistura de solventes. Na sequência, o Erlenmeyer foi embrulhado em papel alumínio e vedado com parafilme e colocou-se em incubadora com agitação orbital (Thoth) a 200 rpm e 40 °C, durante 24 horas. Depois, filtrou-se o extrato utilizando-se funil de Buchner e bomba de vácuo (PRISMATEC modelo 151). Em seguida, a mistura filtrada foi concentrada utilizando-se evaporador rotativo (MA 120). Em seguida, adicionou-se o extrato concentrado em um balão de 10 mL e completou-se o volume com a respectiva mistura de solvente extrator. E por último, os extratos foram transferidos para frascos âmbar de 10 mL e armazenados em freezer a -18 °C até o momento das análises. As extrações foram realizadas em triplicata.

Para a determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) - maior diluição do extrato que inibe os microrganismos – foram utilizadas as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC29213), *Streptococcus mutans* (ATCC25175) e *Escherichia coli* (ATCC25922). As bactérias foram padronizadas em salina com escala 0,5 Mc Farland, (repicada 24 h antes do experimento em caldo Mueller Hinton- MH). Em seguida foi diluída em microtubos de centrifugação, adicionando 50 µL da suspensão bacteriana padronizada e 950µL de caldo MH. O extrato foi seco por 20 minutos na capela de exaustão e posteriormente com a utilização de gás nitrogênio. A solução foi preparada na concentração 10 mg/mL. Em microtubos

de centrifugação foram pesados em valores próximos de 10 mg do extrato seco, depois foi calculado volume total de solvente que seria utilizado, sendo adicionado 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de meio caldo MH e por último homogeneizado em vortex. Na microplaca de 96 poços, foi adicionado 100 µL de caldo MH em cada poço, na linha A foi colocado 100 µL dos extratos preparados em triplicata. Em seguida foi realizada as diluições seriadas (1:2) até a linha G, onde foi homogeneizado e desprezado 100 µL. Os poços da linha H foi o controle do crescimento bacteriano. Por último foi adicionado 10 µL da suspensão bacteriana em cada poço. Depois foi homogeneizado e incubado em estufa a 35°C por 24 horas, em pote fechado com algodão úmido. Os poços sem crescimento a olho nu foram plaqueados em ágar MH, incubadas em estufa 35 °C por 24 h para a determinação da concentração bactericida mínima (menor concentração que não apresentar crescimento após semeadura). Após este procedimento, na microplaca foi adicionado 10 µL por poço de uma solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) a 0,5% em água, incubado por 3 horas em estufa a 35 °C. O CTT é um corante incolor utilizado para detecção de microrganismo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação da atividade antibacteriana dos extratos demonstrou com os testes de concentração inibitória e bactericida mínima diferentes potenciais para as soluções testadas contra os três microrganismos. A maioria dos extratos não foi eficaz contra a bactéria *E. coli*, os que foram ativos apresentaram atividades apenas nas concentrações de 5,00 mg/mL.

Os microrganismos *S. mutans* e *S. aureus* mostraram-se mais sensíveis aos extratos com os diferentes solventes, em diferentes concentrações. As menores CIM encontradas para o *S. aureus* foram com os extratos utilizando os solventes acetona e isopropanol/acetato de etila apresentando média de 0,89 mg/mL e os extratos obtidos com os solventes acetato de etila e etanol/isopropanol com concentração média de 0,94 mg/mL. Já com a bactéria *S. mutans* os extratos obtidos com acetona/acetato de etila, acetona/isopropanol, acetona/etanol, isopropanol/acetato de etila/etanol, isopropanol/acetato de etila e etanol/isopropanol mostraram ser efetivos na concentração de 0,09 mg/mL, uma concentração baixa que foi eficiente na inibição do crescimento deste microrganismo. Além disso, os extratos elaborados com acetato de etila e acetona também apresentaram baixas concentrações de inibição, 0,66 mg/mL e 0,35 mg/mL respectivamente. No quadro 1 pode-se analisar estes resultados dos testes de concentração inibitória mínima. Devido a pandemia do COVID-19 os controles com os solventes ainda não foram realizados, assim como o controle com o antibiótico que seria testado. Todos os testes antimicrobianos foram realizados da triplicata dos extratos e depois obteve-se a média dos experimentos.

Pôde-se observar que os resultados da concentração inibitória mínima em cada uma das triplicatas dos extratos foram iguais ou muito parecidos para a maioria dos casos, o que significa que o processo de elaboração foi uniforme e foram extraídos os mesmos compostos, apresentando mesma atividade. Resultados da CIM que apresentaram diferença em apenas uma concentração não são considerados significativos, porém os que tiveram maiores diferenças deveriam ter sido repetidos os experimentos, mas devido à pandemia do COVID-19 não foi possível.

Quadro 1 - Resultados dos testes CIM, concentração inibitória mínima em (mg/mL) dos extratos de própolis verde com diferentes solventes.

Solventes dos Extratos	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>			<i>S. mutans</i>		
	Média			Média			Média		
	1.1	1.2	1.3	1.1	1.2	1.3	1.1	1.2	1.3
Isopropanol	>5,00	0,63	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	2,54	>5,0
Etanol	0,94	1,88	3,12	>5,00	>5,00	>5,00	2,54	2,54	0,66
Acetato de etila	0,94	0,94	0,94	>5,00	>5,00	>5,00	0,66	0,66	0,66
Acetona	1,56	0,63	0,47	>5,00	>5,00	>5,00	0,35	0,35	0,35
Acetona/Acetato de etila	5,00	5,00	5,00	>5,00	>5,00	>5,00	0,09	0,09	0,09
Acetona/Isopropanol	5,00	5,00	5,00	>5,00	>5,00	>5,00	0,09	0,09	0,09
Acetona/Etanol	2,50	3,75	1,88	>5,00	>5,00	>5,00	0,09	0,09	0,09
Isopropanol/Acetato de etila/Etanol	1,25	1,25	1,25	>5,00	>5,00	>5,00	0,09	0,09	0,09
Isopropanol/Acetato de etila	0,78	0,94	0,94	>5,00	>5,00	>5,00	0,09	0,09	0,09
Etanol/Isopropanol	0,94	0,94	0,94	>5,00	>5,00	>5,00	0,09	0,09	0,09

Fonte: Autoria própria (2020).

A concentração bactericida mínima (CBM) apresentou resultados distintos ao teste CIM. O extrato com acetato de etila como solvente teve atividade na concentração de 3,13 mg/mL e os solventes acetona/acetato de etila e isopropanol/acetato de etila/etanol apresentaram atividade bactericida em 3,75 mg/mL contra *S. mutans* em uma das triplicatas. Para as demais bactérias não houve ação bactericida nas concentrações testadas. Quando foram realizados os testes com os extratos utilizando os solventes acetona e isopropanol, em uma das repetições foi observado crescimento de uma ou duas colônias pequenas isoladas na concentração de 5,00 mg/mL contra o microrganismo *S. aureus*. Os resultados da CBM estão demonstrados no quadro 2.

Muitos fatores influenciam a atividade antibacteriana da própolis, como a origem, as espécies das abelhas, a preparação do extrato e as plantas coletadas para a sua produção (PARK et al., 1998). *Baccharis dracunculifolia*, uma planta que demonstra atividades antimicrobianas e antiocariogênicas (SEIBERT et al., 2019), vem sendo a principal fonte botânica da própolis verde no estado de Minas Gerais e o mecanismo da atividade antimicrobiana da própolis é complexo e pode ser atribuído à atividade sinérgica entre seus vários ingredientes biológicos potentes (OLIVEIRA; ANDOLFATTO, 2014). A mistura de solventes é utilizada visando melhorar a solubilidade dos compostos de interesse presentes na amostra. Porém, cada material apresenta características químicas distintas e isto faz com que seja necessária uma avaliação sobre a influência da concentração destes solventes nos processos de extração (SFORCIN, 2012).

Quadro 2 - Resultados dos testes CBM, concentração bactericida mínima em (mg/mL) dos extratos de própolis verde com diferentes

Solvente do Extrato	<i>S. aureus</i> Média			<i>E. coli</i> Média			<i>S. mutans</i> Média		
	1.1	1.2	1.3	1.1	1.2	1.3	1.1	1.2	1.3
Isopropanol	>5,00	ND	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	ND	ND
Etanol	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	ND	ND	ND
Acetato de etila	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	ND	>5,00	3,13
Acetona	ND	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	ND	ND	ND
Acetona/Acetato de etila	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	3,75	>5,00	ND
Acetona/Isopropanol	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00
Acetona/Etanol	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	ND	ND	ND
Isopropanol/Acetato de etila/Etanol	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	3,75
Isopropanol/Acetato de etila	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	ND	>5,00
Etanol/Isopropanol	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	ND	ND	ND

ND: Não possível de ser determinado, pois em um dos experimentos o resultado da CBM foi igual à maior concentração testada e em outro experimento, o resultado foi maior do que está concentração. Fonte: Autoria própria (2020).

O tipo de solvente escolhido para extrair os compostos da matéria prima é de extrema importância, uma vez que a solubilidade, tanto dos constituintes desejáveis, quanto dos indesejáveis, é função da constante dielétrica do solvente (KONISHI et al., 2017). O desafio é encontrar um solvente, ou uma mistura de solventes, capaz de extrair, do modo mais seletivo possível, os constituintes de interesse. Nas extrações sólido-líquido, a preferência pelas misturas etanol-água deve-se às vantagens de que dependendo da concentração alcoólica da mistura, podem-se extrair constituintes de maior ou menor polaridade (PINTO et al., 2012). Atualmente muitos trabalhos estudam o melhor solvente para os extratos, normalmente são usados os extratos etanólicos para a própolis. Entretanto, não há como apontar qual é a melhor metodologia a ser aplicada, pois a extração pode ser influenciada por diversos fatores, já que cada amostra apresenta composição química distinta e possibilidade de sofrer diferentes interações dependendo das condições aplicadas no processo (PEREIRA et al., 2015).

A própolis, entretanto, bem como os outros produtos originários das abelhas a composição é variável de acordo com a flora e as condições sazonais de uma dada área, o tempo da coleta e contaminantes (SALGUEIRO, 2016). Embora a padronização seja possível, em princípio, testes químicos exatos ainda não foram aplicados na prática como controle de qualidade (OLIVEIRA; ANDOLFATTO, 2014). No processo de otimização dos extratos utilizando solventes orgânicos e suas misturas pela sua determinação da atividade antibacteriana realizado nesse trabalho, com os testes CIM e CBM foi possível observar a princípio que os extratos de própolis verde com os solventes acetona, acetato de etila, isopropanol e etanol sempre apresentaram atividades antibacterianas sozinhos, ou nas misturas, em diferentes concentrações. Todas as misturas dos solventes apresentaram atividades antibacterianas em baixas concentrações contra o *S. mutans* e foi observado que no teste de determinação da CIM foi uma bactéria muito suscetível aos testes antibacterianos com própolis.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, conclui-se que o extrato de própolis verde elaborado com acetona foi o mais eficiente contra as bactérias *S. aureus*, *S. mutans* e *E. coli*, apresentando CIM de 0,89 mg/mL, 0,35 mg/mL e >5,0 mg/mL, respectivamente. Na avaliação da CBM houve atividade apenas contra o *S. mutans* em uma das triplicatas do extrato elaborado com acetato de etila na concentração de 3,13 mg/mL.

A própolis verde apresentou atividade antibacteriana em diferentes concentrações de acordo com o solvente utilizado na preparação dos extratos. Devido a própolis ser um agente natural com tantas variações de suas propriedades biológicas e composição química, seu processo de otimização para preparo dos extratos deve ser melhor explorado para se obter um controle maior na qualidade do produto.

REFERÊNCIAS

- CASTRO, M; CURY, J; ROSALEN, P; ALENCAR, S; IKEGAKI, M; DUARTE, S; KOO, H.; Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química nova**, v. 30, No. 7, 29 ago. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000700003>. Acesso em: 1 jun. 2020.
- GOMES, M; ÍTAVO, C; LEAL, C; ÍTAVO, L; LUNAS, R. Atividade antibacteriana in vitro da própolis marrom. **Pesq. Vet. Bras.** 1 abr. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2016000400005>. Acesso em: 4 jun. 2020.
- KHODABAKHSHI, D; ESKANDARINIA, A; KEFAYATB, A; RAFIENIA, M; NAVID, S; KARBASI, S; MOSHTAGHIAN, J. In vitro and in vivo performance of a propolis-coated polyurethane wound dressing with high porosity and antibacterial efficacy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178 No. 177-184, 6 mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.010>. Acesso em: 11 jun. 2020.
- KONISHI, S; SAWAYA, A; CUSTÓDIO, A; CUNHA, I; SHIMIZU, M. Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. **Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, USF/ Bragança Paulista**. 12 abr. 2017. Disponível em: <https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/75/artigo.htm>. Acesso em: 20 jul. 2020.
- LIMA, A; FERREIRA, R; SOTTE, D; SALES, M. Avaliação do potencial antimicrobiano da própolis contra bactérias potencialmente patogênicas. **IV Seminário Científico da FACIG**, 9 jul. 2018. Disponível em: <http://www.pensaracademico.facig.edu.br/index.php/seminariocientifico/article/view/742>. Acesso em: 9 jun. 2020.

LUSTOSA, S; GALINDO, A; NUNES, L; RANDAU, K; NETO, P. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, No. 8 set. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300020>. Acesso em: 13 jun. 2020.

OLIVEIRA, Sheila; ANDOLFATTO, Suelen. Otimização do processo de extração de compostos bioativos da própolis produzida por abelhas geneticamente modificadas. **Universidade tecnológica federal do Paraná**, 2014. Disponível em: <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/2199>. Acesso em: 21 jul. 2020.

PARK, Y; IKEGAKI, M; ABREU, J; ALCICI, N. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos**, 26 fev. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20611998000300011>. Acesso em: 23 jun. 2020.

PEREIRA, A; SEIXAS, R; NETO, F. PRÓPOLIS: 100 ANOS DE PESQUISA E SUAS PERSPECTIVAS FUTURAS. **Química nova**, v. 25, No. 2, 25 jul. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000200021>. Acesso em: 1 jun. 2020

PEREIRA, D; FREITAS, C; FREITAS, M; MARACAJA, P; SILVA, J; SILVA, R; SILVEIRA, D. History and main uses of bee propolis. **Universidade Federal de Campina Grande. Centro de Saúde e Tecnologia Rural – CSTR. Campus de Patos**, junho 2015. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1022907/1/Historico.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2020.

PINTO, A; BOLZANI, D; LOPES, N; EPIFANIO, R. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 20, maio 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000800009>. Acesso em: 1 jul. 2020.

RAHMAN, M; RICHARDSON, A; AZIRUN, S. Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **African Journal of Microbiology Research**, 6 ago. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/AJMR.9000050>. Acesso em: 4 jun. 2020.

SALGUEIRO, Fernanda. Caracterização da própolis verde brasileira: substâncias fenólicas, atividades biológicas e análises quimiométrica. **Tese (Pós graduação - Química) - Universidade Federal Rural Do Rio De Janeiro Instituto De Ciências Exatas Programa De Pós-Graduação Em Química**, 2016. Disponível em: <https://tede.ufrj.br/jspui/handle/jspui/1469>. Acesso em: 15 jul. 2020.

SEIBERT, J; SILVA, J; AMPARO, T; PETIT, A; PERVIER, P; ALMEIDA, J; AZEVEDO, M; SILVEIRA, B; BRANDÃO, G; SOUZA, G; TEXEIRA, L; SANTOS, O. Development of própolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. **FoodChemistry**, v. 287, No. 61-67, 23 fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.078>. Acesso em: 11 jun. 2020.

SFORCIN, José. *Baccharis dracunculifolia* uma das principais fontes da própolis brasileira. **Editora Unesp**, 2012. Disponível em:
<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/113675/ISBN9788539303762.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 20 jul. 2020.

WOJTYCZKA, R; DZIEDZIC, A; IDZIK, D; KĘPA, M; KUBINA, R; KABAŁA-DZIK, A; SMOLEŃ-DZIRBA, J; STOJKO, J; SAJEWICZ, Mieczysław; WĄSIK, T. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates to Propolis Extract Alone or in Combination with Antimicrobial Drugs. **Molecules**, v. 18, 12 ago. 2013. Disponível em:
<https://doi.org/10.3390/molecules18089623>. Acesso em: 2 jun. 2020.