



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

PÂMELA BEATRIZ DO ROSÁRIO ESTEVAM DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE
PRÓPOLIS SOBRE CEPAS CLÍNICAS DE
Pseudomonas aeruginosa E *Klebsiella pneumoniae*
MULTIRRESISTENTES**

2018

PÂMELA BEATRIZ DO ROSÁRIO ESTEVAM DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE
PRÓPOLIS SOBRE CEPAS CLÍNICAS DE
Pseudomonas aeruginosa E *Klebsiella pneumoniae*
MULTIRRESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia / Imunologia. Linha de Pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa Assoc. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Santos, Pâmela Beatriz Do Rosário Estevam

Atividade antimicrobiana de extratos de própolis sobre cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes / Pâmela Beatriz Do Rosário Estevam Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2018. 59 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientadora: Luciane Dias Oliveira.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. *Klebsiella pneumoniae*. 3. Biofilme. 4. Resistência Microbiana a Medicamentos. 5. Própolis. I. Oliveira, Luciane Dias, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa Assoc. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra Marianne Spalding

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Vivian Cristina Costa Castilho Hyodo

Universidade Paulista (Unip)

Instituto de Ciências da Saúde

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 17 de dezembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de dar mais este passo na minha carreira e de me aprimorar constantemente.

Agradeço ao meu maior exemplo: minha vó, Dona Lúcia, pessoa que eu mais amo no mundo. Obrigada por me acolher e dedicar sua vida a cuidar de mim e me ensinar todos os meus valores, sendo também a razão pela qual eu pude estudar e me dedicar ao máximo a esta tarefa sempre com todo o apoio necessário para superar os obstáculos e desafios.

Agradeço aos meus pais Nany e João que me apoiam e respeitam minhas decisões, estando sempre dispostos a me ajudar.

Agradeço ao meu melhor amigo e amado namorado Luca Lorenzini que me ajuda diariamente a ser uma pessoa melhor e divide comigo todas as alegrias, tristezas, tarefas, preocupações e celebrações, sendo sempre compreensivo, paciente e otimista quando eu mais preciso.

Agradeço à minha ex-professora, ex-colega/ex-chefe, mas sempre amiga, Janaína Mattos por todo o carinho e apoio e por me encaminhar para a profissão que tanto amo.

Agradeço à Família Vilhena: Laís, Regina, Larissa, Dado, Thaís, Milena, Guilherme, Kaio, Kauê e Natália por me acolherem tão bem nesta família, me apoiarem e torcerem tanto por mim.

Ao meu amigo Bruno César, colega de graduação e de profissão, razão pela qual me inscrevi nesta pós-graduação. Obrigada pela cobrança e pelo apoio constante.

Minha colega, mas principalmente amiga, Damara Ávila, com quem aprendi muito sobre Microbiologia e com quem tive a alegria de trabalhar durante boa parte do Mestrado, dividindo muitos momentos bons que tornaram

as dificuldades menos significativas e os dias mais leves e agradáveis.

Minha amiga Thaís Cristine que, apesar de se graduar na mesma instituição que eu, só tive a oportunidade de conhecer ao ingressar neste curso, com quem dividi momentos de alegria, aprendizado e de superação.

Ao amigo Lucas de Paula com quem também pude aprender muito, mas também pude contar durante este período para as inúmeras dúvidas e preocupações, sempre tratadas com muita gentileza e carinho.

Agradeço também aos amigos e colegas Anderson, Daphne, Keila, Hanna, Ana Maria, Thaís Rocha, Profa. Simone, Maíra, Janaína, Raquel, Amanda, Cristhian, Magno, Jéssica e Livia pelos bons momentos que dividimos no laboratório, em aulas etc. e também pela colaboração em momentos de dúvidas ou dificuldades.

Agradeço aos membros da equipe da Seção Técnica de Pós-graduação Sandra, Carolina e Bruno; do Escritório de Apoio à Pesquisa e Internacionalização Michele e Carlos Guedes, também ao técnico André e à secretária Carla por nos auxiliarem sempre que precisamos solucionando nossos problemas e tirando nossas dúvidas, sendo muito atenciosos, educados e gentis.

Às Professoras Juliana Campos Junqueira e Luana M. R. de Vasconcellos por serem extremamente atenciosas desde o meu ingresso na pós-graduação, sempre se mostrando dispostas a me ajudar.

À Professora Vivian Cristina Costa Castilho Hyodo que me ensinou muito durante a minha graduação em Ciências Biológicas e continua contribuindo com a minha formação e participando da minha jornada acadêmica sempre com muito carinho.

À Professora Marianne Spalding, com quem pude compartilhar muitos momentos de aprendizado, mas também de alegria durante a organização e desenvolvimento de projetos na Universidade e também em eventos nos quais pudemos nos dedicar à aprendizagem da função que amamos: ensinar.

À minha orientadora Professora Luciane Dias de Oliveira, que sempre me ajudou em tudo o que precisei, sendo muito amável e compreensiva. Uma pessoa que não só orienta trabalhos de excelência, mas que também se destaca pela sua gentileza, fazendo tudo o que está ao seu alcance para que seus alunos estejam sempre felizes e satisfeitos na pós-graduação, um exemplo a ser seguido.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da Bolsa de Mestrado no período de janeiro a fevereiro de 2017 e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado no período de março de 2017 a dezembro de 2018.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Atividade antimicrobiana sobre as formas planctônicas das bactérias.....	16
3.2 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes monotípicos.....	21
3.3 Análise estatística.....	23
4 RESULTADO	24
4.1 Determinação da concentração microbicida mínima (CMM).....	24
4.2 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes monotípicos.....	25
5 DISCUSSÃO.....	35
6 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

Santos PB. Atividade antimicrobiana de extratos de própolis sobre cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa e *Klebsiella pneumoniae* são enterobactérias que acometem especialmente indivíduos imunologicamente comprometidos com grande importância por sua resistência a antibióticos, dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de própolis (glicólico e aquoso) distribuídos comercialmente em cepas ATCC e clínicas multirresistentes das espécies. Inicialmente foram determinados os valores de Concentração Microbicida Mínima (CMM) sobre cultura planctônica por microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), seguido por semeadura em ágar. A concentração correspondente ao quádruplo da CMM foi utilizada para testes em biofilmes monotípicos (contato de 5 min). Foi usada como controle positivo a solução de clorexidina (0,12%) e como controle negativo caldo BHI. Após o tratamento foi verificada a viabilidade dos micro-organismos pelo teste MTT, com leitura em espectrofotômetro de microplacas. Os dados de densidade óptica foram convertidos em porcentagem de redução microbiana e foi realizada a análise estatística com 5% de significância em todos os testes. Os extratos apresentaram ação contra forma planctônica e biofilmes de cepas multirresistentes de ambas as espécies. Para culturas planctônicas, *P. aeruginosa* apresentou CMM de 6,25 e 12,5 mg/mL para o extrato glicólico e de 13,75 e 55 mg/mL para o extrato aquoso, enquanto *K. pneumoniae* apresentou CMM de 6,25 a 25 mg/mL para o extrato glicólico e de 55 mg/mL para o extrato aquoso. A redução de viabilidade em biofilmes de *P. aeruginosa* chegou a 54,42% para o extrato glicólico, e 64,66% para o extrato aquoso. *K. pneumoniae* apresentou redução máxima de 64,24% com extrato glicólico e de 65,13% com o extrato aquoso, sendo estas reduções estatisticamente significantes em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). Com isso, pode-se concluir que os extratos de própolis apresentam importante ação antibacteriana e antibiofilme sobre cepas clínicas de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* multirresistentes a antibióticos, podendo ser considerados potenciais agentes terapêuticos para o combate destes patógenos.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. *Klebsiella pneumoniae*. Biofilme. Resistência microbiana a medicamentos. Própolis.

Santos PB. Antimicrobial activity of propolis extracts on clinical strains of multiresistant Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumoniae [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumoniae are enterobacteria that especially affect immunologically compromised individuals with great importance for their resistance to antibiotics. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of propolis extracts (glycolic and aqueous) commercially distributed in ATCC and multiresistant clinical strains of these species. The values of Minimum Microbicidal Concentration (MMC) on plankton culture were determined by microdilution in broth, according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), followed by sowing in agar. The concentration corresponding to the quadruple MMC was used for monotypic biofilm tests (5-minute contact). A positive control solution of chlorhexidine (0.12%) and as a negative control BHI broth were used. After the treatment, the viability of the microorganisms was verified by the MTT test, with microplate spectrophotometer reading. Optical density data were converted to microbial reduction percentage and statistical analysis was performed with 5% significance in all tests. The extracts showed action against planktonic form and biofilms of multiresistant strains of both species. For planktonic cultures, P. aeruginosa presented MMC of 6.25 and 12.5 mg / mL for the glycolic extract and 13.75 and 55 mg / mL for the aqueous extract, while K. pneumoniae had MMC of 6.25 to 25 mg / mL for the glycolic extract and 55 mg / mL for the aqueous extract. The reduction of viability in biofilms of P. aeruginosa reached 54.42% for the glycolic extract, and 64.66% for the aqueous extract. K. pneumoniae presented a maximum reduction of 64.24% with glycolic extract and 65.13% with aqueous extract, these reductions being statistically significant in relation to the negative control ($p < 0.05$). Therefore, it can be concluded that propolis extracts present an important antibacterial action and antibiofilm on multiresistant clinical strains of K. pneumoniae and P. aeruginosa, and may be considered as potential therapeutic agents for the control of these pathogens.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa. Klebsiella pneumoniae. Biofilm. Drug resistance, microbial. Propolis.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da resistência bacteriana aos antibióticos é um problema de saúde global (Moradali et al., 2017). De acordo com a terminologia internacional padronizada criada pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) e pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), para que o micro-organismo seja considerado multirresistente é preciso que não apresente suscetibilidade adquirida a no mínimo um agente em três ou mais categorias antimicrobianas (Magiorakos et al., 2012; Basak et al., 2016). Além disso, a definição de bactérias multi-droga resistentes (MDR) evoluiu chegando a uma classificação que inclui não só os padrões de resistência, mas também a sua associação às falhas terapêuticas envolvidas (Dey et al., 2016).

Acredita-se que os principais fenótipos de bactérias multirresistentes tenham emergido por inativação enzimática, mutação em sítio alvo e também por efluxo dos fármacos utilizados, sendo que o crescimento dessa resistência ocorre em diversas espécies, com alguns casos em que não há mais fármacos disponíveis para tratamento de infecções bacterianas (Magiorakos et al., 2012; Dey et al., 2016).

As bactérias podem se organizar na forma planctônica (em suspensão) ou em biofilmes: agregados celulares com capacidade de aderência (também chamados de microcolônias), embebidos em uma matriz produzida pelas próprias bactérias constituída de substâncias poliméricas extracelulares (DNA, proteínas, polissacarídeos) que promovem proteção aos micro-organismos em relação ao seu ambiente (El-Guendouz et al., 2016; Larsen, Fiehn, 2017; Moradali et al., 2017; Sanz et al., 2017). As bactérias multidroga-resistentes também podem formar estes biofilmes, estruturas altamente e adaptativamente resistentes a antibióticos, que tornam o tratamento ainda mais difícil, sendo

que, enquanto as bactérias planctônicas podem ser erradicadas com a utilização de antimicrobianos combinados com respostas imunes, um subgrupo de bactérias tolerantes do biofilme pode, com frequência, sobreviver ao tratamento causando também a recidiva da infecção por serem mais resistentes (Lebeaux et al., 2014; de la Fuente-Núñez et al., 2015; El-Guendouz et al., 2016).

A justificativa utilizada para explicar a resistência de biofilmes à antibióticos é a saturação da matriz de exopolissacarídeos (carregada negativamente) pelos antibióticos com carga oposta, que interferem no transporte dos fármacos (Venkatesan et al., 2015). Outros fatores promotores da resistência que devem ser considerados são: a presença de componentes da membrana celular (exceto peptidoglicano) que barram os fármacos e a alta densidade de bactérias no interior do biofilme que altera o microambiente podendo comprometer a ação de antimicrobianos que são capturados e inativados por enzimas presentes nessas regiões (del Pozo, Patel, 2007; Venkatesan et al., 2015). Quanto à multirresistência, é importante considerar a facilidade de transporte e troca de genes neste tipo de ambiente, que favorece a aquisição dessa característica (del Pozo, Patel, 2007; Venkatesan et al., 2015).

Pseudomonas aeruginosa e *Klebsiella pneumoniae* são enterobactérias Gram-negativas que acometem especialmente indivíduos imunologicamente comprometidos, sendo consideradas de grande importância em relação à resistência a antibióticos (Moradali et al., 2017; Pyra et al., 2017).

P. aeruginosa é uma espécie ambiental ubíqua e oportunista cuja alta versatilidade e adaptabilidade são atribuídas a um genoma complexo e grande, que possibilita grande resistência intrínseca a antibióticos, além da expressão de outros fatores de virulência como a secreção de compostos e toxinas, além da formação de biofilme mucoso em infecções crônicas que é utilizado também como indicativo de progressão da doença e sua persistência a longo prazo (Bouillot et al., 2017; Jiang et al., 2017; López-Causapé et al., 2017; Moradali et

al., 2017; Sepahvand et al., 2017). A espécie apresenta grande relevância para a saúde pública por ser a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística em infecções crônicas, podendo ser responsável também por infecções agudas em pacientes com dispositivos médicos como ventiladores e catéteres, ou que apresentam feridas, queimaduras ou ceratite (Bouillot et al., 2017; López-Causapé et al., 2017; Moradali et al., 2017).

P. aeruginosa é encontrada também na cavidade bucal, onde já se sabe que biofilmes podem causar enfermidades como doença periodontal e infecções endodônticas (Gergova et al., 2016; Larsen, Fiehn, 2017; Pinheiro et al., 2018). Vieira Colombo et al. (2016), investigaram amostras subgengivais de 270 indivíduos e verificaram que *P. aeruginosa* foi uma das espécies mais prevalentes, identificada mais em casos de periodontite crônica do que em periodontite agressiva e gengivite. Em 2018 Pinheiro et al. observaram que *P. aeruginosa* foi uma das espécies mais abundantes em tecidos de sustentação ao estudar a colonização microbiana de próteses maxilofaciais e destes tecidos em indivíduos em tratamento odontológico público (Pinheiro et al., 2018). Na endodontia, uma das principais causas de reinfecção é o fato de vários micro-organismos formadores de biofilme crescerem em condições anaeróbicas e, apesar de raros, patógenos oportunistas como *P. aeruginosa* podem ser encontrados em isolados de canais radiculares (Gergova et al., 2016).

A espécie *P. aeruginosa* apresenta um rápido aumento de resistência após a exposição a antibióticos e, dentre as espécies notoriamente resistentes a diversos fármacos, se tornou uma grande preocupação devido ao aumento de sua prevalência em infecções nosocomiais, especialmente com o aumento de cepas multirresistentes, sendo possível que a seleção dessas cepas se dê por conta do uso frequente e prolongado desses fármacos (Hill et al., 2005; Hota et al., 2009; Moradali et al., 2017; Yusuf et al., 2017).

Já a espécie *K. pneumoniae*, amplamente difundida nos últimos anos em

muitos países, causa infecções como pneumonia, broncopneumonia e bronquite, sendo que indivíduos acometidos por este patógeno tendem a apresentar também abscesso pulmonar, cavitação, empiema e aderências pleurais (Girmenia et al., 2016; Pyra et al., 2017).

Apresentando resistência a diversas classes de antibióticos, como cefalosporinas, monobactamas e inibidores de β -lactamase, *K. pneumoniae* é um dos Gram-negativos mais importantes causando preocupação mundial devido à produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e resistência aos carbapenêmicos por cepas produtoras de carbapenemases (KPCs), que além de hidrolisar os carbapenêmicos, também são frequentemente resistentes a outros antibióticos (Falagas, et al., 2007; Tumbarello et al., 2012; Girmenia et al., 2016; Thaden et al., 2017). Os antibióticos carbapenêmicos têm sido considerados o último recurso em casos de infecções por bactérias Gram-negativas resistentes à antibióticos, dessa forma, a resistência de *K. pneumoneae* (KPC) se torna de grande relevância, especialmente com as elevadas taxas de mortalidade entre os pacientes com infecções sanguíneas (Girmenia et al., 2016; McCrea et al., 2014).

Com a resistência a antibióticos já conhecida dessas espécies, se torna de grande importância a busca por novas alternativas que possam combater esse problema, sendo a Fitoterapia, definida como o uso de plantas ou seus extratos para aplicações medicinais, uma boa opção a ser considerada (Kim, 2012).

Desde a antiguidade as plantas tiveram papel importante na história da humanidade participando da busca pela melhoria da saúde e, atualmente, o foco está retornando dos agentes sintéticos para agentes naturais com um grande interesse em propriedades antioxidantes, antibacterianas e anticarcinogênicas de plantas e seus extratos (Nunes et al., 2017; Chakraborty, 2018). Os antimicrobianos baseados em plantas representam uma valiosa fonte de medicamentos não tão aproveitada por seu potencial, além disso, o interesse

público em medicina alternativa é constante e sempre se renova devido a fatores como o alto custo de drogas novas, a demora no seu desenvolvimento, o aumento de efeitos colaterais, a resistência de micro-organismos e até mesmo a falta de tratamento que cure patologias crônicas (Dénes et al., 2017; Chakraborty, 2018).

Diversos estudos já demonstraram ação antimicrobiana de fitoterápicos sobre cepas padrão e resistentes de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e outros micro-organismos, como por exemplo, *Ocimum basilicum* (Manjerição-de-folha-larga), *Gnetum africanum* (Eru), *Eucalyptus robusta* (Eucalipto) e *Harungana madagascariensis* (Harungana) (Tankeo et al., 2014, 2016; Nunes et al., 2017).

A própolis é um fitoterápico de grande importância, sendo uma substância resinosa e pegajosa preparada por abelhas a partir de sua cera e exsudatos coletados de plantas para promover proteção da colméia contra organismos estrangeiros (Andrade et al., 2017; Kasote et al., 2017; Rimbach et al., 2017; Sakai et al., 2017; Ueda et al., 2017; Zaccaria et al., 2017; Jabir et al., 2018). Dependendo da região geográfica, a própolis pode apresentar grande variação na sua coloração (verde, vermelha, marrom ou quase preta) e em suas características de acordo com as plantas das quais a resina fora retirada (Andrade et al., 2017; Rimbach et al., 2017; Ueda et al., 2017). Por ser uma mistura complexa formada por muitos componentes bioativos com diversas propriedades biológicas e farmacológicas, o interesse dos pesquisadores em relação à própolis aumentou nas últimas décadas e a sua composição química tem sido estudada em diversos países (Andrade et al., 2017; Kasote et al., 2017; Rimbach et al., 2017). Aproximadamente 50% da própolis é composta por resina de plantas, 30% por cera de abelhas, cerca de 10% por óleos essenciais, 5% por pólen e 5% é composto por outras substâncias orgânicas (Zaccaria et al., 2017).

E importante ressaltar que, embora diversos estudos tenham demonstrado a ação antibacteriana e antifúngica de extratos de própolis em diversas espécies, como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Prevotella intermedia*, *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus vulgaris*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* etc., não são encontrados na literatura estudos sobre a ação de extratos não etanólicos de própolis sobre biofilmes multirresistentes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, investigação de grande importância visto que o etanol causa danos em células que poderiam ser reduzidos com a utilização de outros tipos de extratos para tratamentos de infecções (Miorin et al., 2003; Salomão et al., 2004; Mercan et al., 2006; Campos et al., 2015; Kubina et al., 2015; Akca et al., 2016; Chang et al., 2017; Runyoro et al., 2017; Santos HF et al., 2017; Torres et al., 2018).

Considerando o crescimento da resistência a antibióticos de cepas bacterianas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, assim como as já conhecidas potencialidades terapêuticas da própolis, torna-se de grande interesse médico-odontológico investigar também a sua capacidade antimicrobiana sobre estes patógenos, especialmente a ação antibiofilme sobre cepas multirresistentes pouco explorada até o presente momento, principalmente com extratos não etanólicos de própolis.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de própolis (aquoso e glicólico) distribuídos comercialmente sobre cepas padrão e clínicas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* multirresistentes.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- a) verificar atividade microbica dos extratos aquoso e glicólico de própolis sobre as formas planctônicas de oito cepas clínicas multirresistentes e uma padrão de cada espécie (*P. aeruginosa* e de *K. pneumoniae*), determinando Concentração Microbica Mínima (CMM);
- b) analisar a ação antibiofilme dos extratos após contato de 5 min sobre biofilmes monotípicos das oito cepas clínicas multirresistentes e uma padrão de cada espécie (*P. aeruginosa* e de *K. pneumoniae*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas as atividades antimicrobianas de extratos de própolis sobre oito cepas clínicas multirresistentes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Cinco cepas de *P. aeruginosa* foram fornecidas pelo Valeclin Laboratório de Análises Clínicas S/S LTDA de São José dos Campos, e as outras três cepas clínicas de *P. aeruginosa*, assim como todas as cepas clínicas de *K. pneumoniae* foram fornecidas pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlin de São José dos Campos, estado de São Paulo (Quadros 1 e 2). Todas as cepas clínicas multirresistentes foram fornecidas com seu perfil de resistência a antibióticos, já previamente identificado por cada laboratório responsável. Testou-se também a ação dos extratos em cepas de referência (*P. aeruginosa* ATCC 15442 e *K. pneumoniae* ATCC 4352) fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT - Unesp de São José dos Campos).

Os extratos testados foram o extrato aquoso de própolis verde da empresa Apis Flora® (PROPOMAX® - Extrato de Própolis) com concentração de 110 mg/mL e o extrato glicólico de própolis da empresa Mapric® (*Propolis Wax*) com concentração de 200 mg/mL, ambos disponíveis comercialmente para o uso da população.

3.1 Atividade antimicrobiana sobre as formas planctônicas das bactérias

As cepas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* foram utilizadas para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos aquoso e glicólico de

própolis sobre a forma planctônica, em que foi definida a Concentração Microbica Mínima (CMM).

Quadro 1 - Perfil de resistência a antibióticos de cepas clínicas de *P. aeruginosa* fornecidas pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlin e pelo Valeclin Laboratório de Análises Clínicas S/S LTDA

ANTIBIÓTICO	Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
	BIOCLIN			VALECLIN				
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Amicacina	R	R	S	R	R	S	R	S
Aztreonam	R	I	R	R	R	R	R	R
Cefepime	R	R	R	S	R	S	R	R
Ceftazidima	R	R	R	S	R	S	S	R
Ciprofloxacina	R	S	R	R	S	S	R	S
Colistina	I	R	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	R	R	S	R	R	S	R	S
Imipenem	R	R	I	R	R	R	R	R
Levofloxacina	R	S	R	R	S	S	R	S
Meropenem	R	R	R	R	R	R	R	R
Norfloxacina	-	-	-	-	-	S	-	-
Piperacilina / Tazobactam	R	R	I	S	R	S	R	R
Polimixina B	-	-	-	S	S	S	S	S
Tobramicina	R	S	-	R	R	-	R	S

Legenda: S: sensível; R: Resistente; I: Intermediário; -: Teste não desenvolvido.

Fonte: Dados fornecidos pelo Valeclin Laboratório de Análises Clínicas S/S LTDA e pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlin (São José dos Campos - SP).

Quadro 2 - Perfil de resistência a antibióticos de cepas clínicas de *K. pneumoniae* fornecidas pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlin

(continua)

ANTIBIÓTICO	Cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>							
	BIOCLIN							
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
Ácido Clavulanico + Amoxi.	R	R	R	R	R	-	R	R
Amicacina	S	S	S	S	S	-	S	S
Ampicilina	R	R	R	R	R	-	R	R
Ampicilina + Sulbac.	R	R	R	R	R	-	R	-
Aztreonam	S	-	S	R	-	-	R	-
Cefepime	R	R	R	R	R	-	R	-
Cefotaxima	S	R	S	R	-	-	R	-
Cefoxitina	R	R	R	R	R	-	R	I
Ceftazidima	I	-	I	R	-	-	R	-
Ceftriaxona	-	-	-	-	-	-	-	R
Cefuroxime	R	R	R	R	R	-	R	R
Ciprofloxacina	R	R	R	R	R	R	R	R
Clindamicina	-	-	-	-	-	S	-	-
Cloranfenicol	-	-	-	-	-	S	-	-
Colistina	S	R	S	R	R	-	R	-
Daptomicina	-	-	-	-	-	S	-	-
Eritromicina	-	-	-	-	-	R	-	-
Ertapenem	R	R	R	R	R	-	R	R
Fosfomicina	R	R	R	R	R	-	-	-
Gentamicina	R	S	R	S	S	R	S	R

Quadro 2 - Perfil de resistência a antibióticos de cepas clínicas de *K. pneumoniae* fornecidas pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlin

(conclusão)

ANTIBIÓTICO	Cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>							
	BIOCLIN							
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
Imipenem	S	R	S	R	R	-	R	S
Levofloxacin	R	R	R	R	R	-	R	R
Linezolida	-	-	-	-	-	S	-	-
Meropenem	S	R	S	R	R	-	R	S
Minociclina	-	-	-	-	-	S	-	-
Oxacilina	-	-	-	-	-	R	-	-
Piperacilina + Tazobactam	R	R	R	R	R	-	R	R
Rifampicina	-	-	-	-	-	S	-	-
Tigeciclina	S	S	S	S	S	-	S	I
Tobramicina	R	S	R	R	S	-	I	-
Trimetropim/Sulfa.	R	R	R	R	R	S	R	S

Legenda: S: sensível; R: Resistente; I: Intermediário; -: Teste não desenvolvido.

Fonte: Dados fornecidos pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlin (São José dos Campos - SP).

Inicialmente utilizou-se o método da microdiluição em caldo, de acordo com as normas M07-A9 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2012). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio de cultura *Mueller Hinton* (HiMedia®, Mumbai, Índia) em cada poço e no primeiro poço de cada grupo foram adicionados também 100 µL do extrato (aquoso com 110 mg/mL de concentração ou glicólico com 200 mg/mL de concentração) e a partir deste foi feita uma série com 10 diluições em que, após homogeneização retirou-se

100 µL do primeiro poço e transferiu-se este volume para o segundo poço, sendo o procedimento repetido sucessivamente até o último poço (Quadro 3 e Figura 1A, 1B, 1C).

O micro-organismo previamente semeado em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI - HiMedia®, Mumbai, Índia) e incubado a 37 °C durante 24 h em estufa foi diluído em solução fisiológica estéril (0,9% de NaCl) para preparação de inóculos de micro-organismo padronizados com espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nanômetros (nm) e densidade óptica de 0,08 (aproximadamente 10^8 células/mL) da qual se fez diluições para obter 10^6 células/mL (Figura 1D). Foram adicionados 100 µL da solução padronizada com os micro-organismos em cada poço com as diluições seriadas e o teste foi feito em duplicata (Figura 1E).

As placas foram incubadas durante 24 h e, após, 10 µL dos conteúdos dos poços foram semeados em ágar BHI pela técnica da gota, sendo a placa inclinada em ângulo de 90° para a gota escorrer (Figura 1F). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e foi observado se houve crescimento de colônias. A concentração microbicida mínima (CMM) foi definida como a menor concentração sem crescimento bacteriano (Figura 1G).

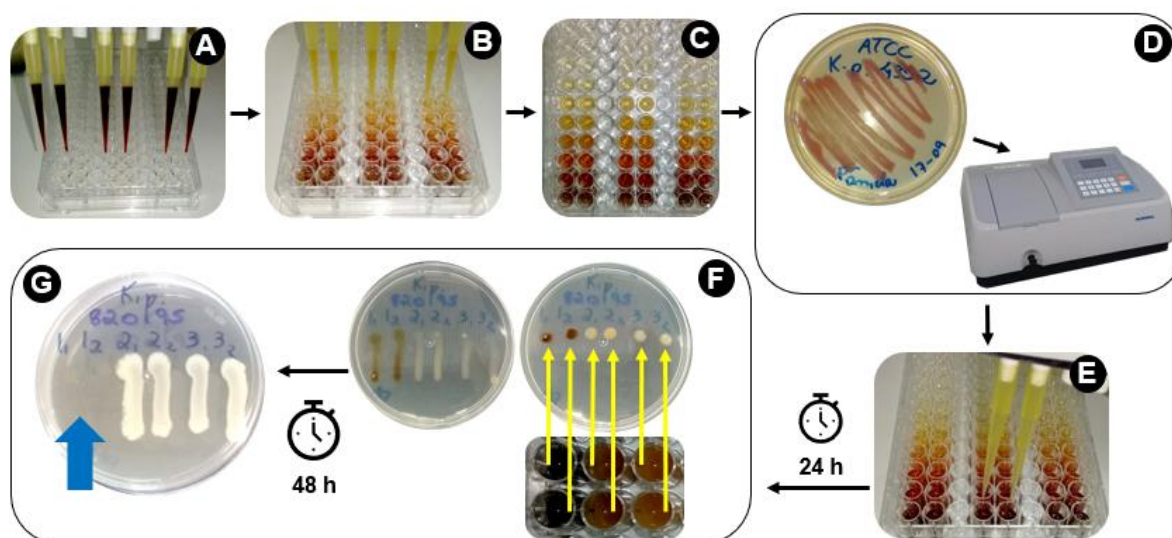
Quadro 3 – Diluições dos extratos para determinação de CMM

Concentrações dos Extratos (mg/mL) em Microdiluição										
Poço	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
EA	55	27,5	13,75	6,87	3,43	1,71	0,85	0,42	0,21	0,10
EG	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19

Legenda: EA: Extrato Aquoso; EG: Extrato Glicólico.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 1 – Metodologia para determinação de CMM



Legenda: A) Extrato sendo adicionado em poços da microplaca com meio de cultura *Mueller Hinton*; B) Procedimento de diluição seriada; C) Diluição seriada pronta; D) Exemplo de cepa semeada para padronização com espectrofotômetro; E) Inóculo padronizado sendo adicionado à diluições do extrato; F) Técnica da Gota; G) Resultado de CMM; Seta azul: indicação de CMM determinada.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.2 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes monotípicos

Para a formação dos biofilmes monotípicos foram utilizadas microplacas de 96 poços em que adicionou-se 100 μL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI - HiMedia®, Mumbai, Índia) em cada poço onde foram colocados também 100 μL de suspensão microbiana padronizada em espectrofotômetro (comprimento de onda 625 nm) com 10^7 células/mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) (Figura 2A). As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C com agitação de 75 rpm (rotações por minuto) por 24 h e, em seguida, o meio de cultura foi trocado e fez-se nova incubação nas mesmas condições por mais 24 h, totalizando um período de formação de biofilme de 48 h (Figura 2B).

Após a formação do biofilme, o meio de cultura foi removido e os testes

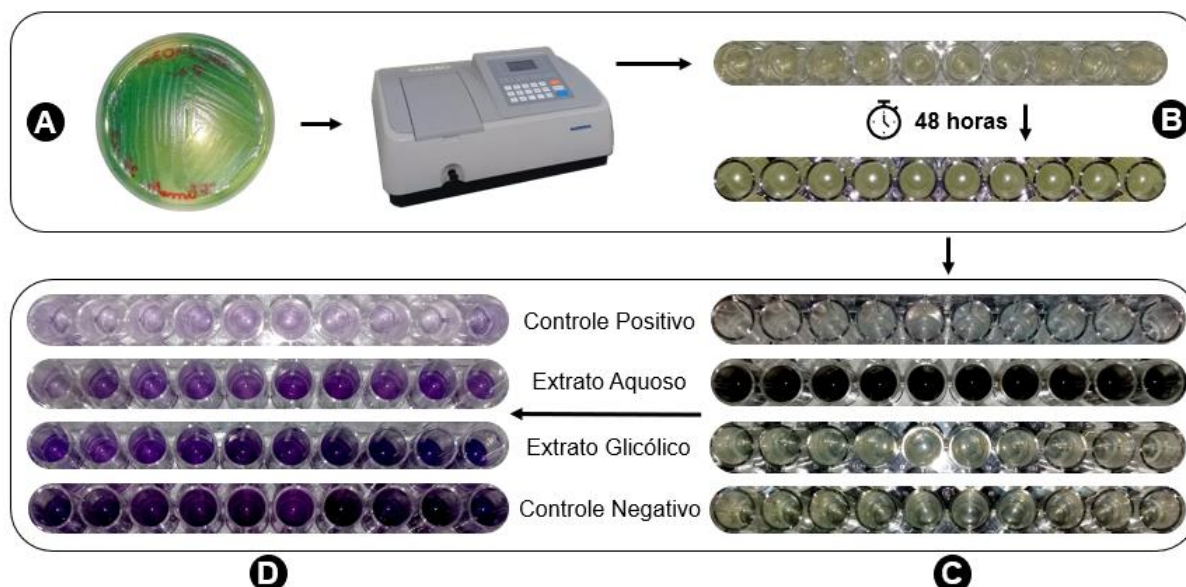
foram desenvolvidos com cada tratamento. A partir de testes piloto foi selecionada a concentração correspondente ao quádruplo do valor de CMM determinada para cada cepa nos testes para cultura planctônica com cada extrato. Foram adicionados 100 µL de extrato (na concentração adequada) em cada poço, permanecendo em contato com o biofilme durante 5 min (Figura 2C). O tratamento para o controle positivo foi feito com a solução antimicrobiana de clorexidina (0,12%) e o controle negativo foi realizado com caldo BHI, ambos ficando em contato o biofilme durante 5 min (Figura 2C). Todos os grupos foram feitos com 10 repetições (n = 10).

Após o período de 5 min em contato com o biofilme, os extratos, a solução de clorexidina (controle positivo) e o caldo BHI (controle negativo) foram removidos e foi feita lavagem dos poços com caldo BHI. Em seguida, foi realizado o teste de viabilidade celular da bactéria, pela análise da atividade metabólica, a fim de estabelecer o efeito antimicrobiano dos tratamentos. Para tanto, foram adicionados 100 µL da solução de MTT - *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (~98%, Sigma Aldrich Co.®, Alemanha) em cada poço e a placa foi incubada ao abrigo da luz a 37 °C durante 1 h. Em seguida, a solução de MTT foi removida e adicionou-se 100 µL de álcool absoluto em cada poço. Foi feita uma nova incubação ao abrigo da luz durante 10 min em *Shaker* e 10 min em estufa a 37 °C para revelar a coloração, demonstrando os micro-organismos viáveis após os tratamentos (Figura 2D).

A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nanômetros e as densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em redução de viabilidade celular (forma percentual) por meio da fórmula:

$$\% \text{ de Redução de Viabilidade} = 100 - (\text{DO Poço Tratado} \times 100 / \text{Média de DO Grupo Controle Negativo})$$

Figura 2 – Metodologia para desenvolvimento de testes em biofilmes monotípicos



Legenda: A) Cepa semeada para padronização com espectrofotômetro; B) Poços de microplaca com caldo BHI e inóculo padronizado e poços com crescimento bacteriano após 48 h, com formação de biofilme no fundo da placa; C) Tratamento de 5 min com clorexidina (Controle Positivo), Extrato Aquoso, Extrato Glicólico e Caldo BHI (Controle Negativo); D) Teste MTT revelado.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio do software *Graphpad prism* 5.0. Avaliou-se a normalidade para definir o tipo de teste adequado. O método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* foi utilizado para resultados que apresentaram curva normal e o método *Kruskall-Wallis* complementado com o Teste de Comparação Múltipla de *Dunn* foi aplicado para testes em que não houve normalidade nos dados. A significância foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADO

4.1 Determinação da concentração microbicida mínima (CMM)

Os resultados dos testes de Concentração Microbicida Mínima (CMM) de ambos os extratos para a forma planctônica das cepas de *P. aeruginosa* estão demonstrados na Tabela 1 e para as cepas de *K. pneumoniae* na Tabela 2.

Tabela 1 – CMM determinada para cepas ATCC 15442 e clínicas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*

Cepas de <i>P. aeruginosa</i>	CMM Extrato Aquoso	CMM Extrato Glicólico
ATCC 15442	13,75 mg/mL	6,25 mg/mL
P1	13,75 mg/mL	12,5 mg/mL
P2	13,75 mg/mL	12,5 mg/mL
P3	55 mg/mL	12,5 mg/mL
P4	55 mg/mL	12,5 mg/mL
P5	13,75 mg/mL	12,5 mg/mL
P6	Ausente	12,5 mg/mL
P7	Ausente	12,5 mg/mL
P8	Ausente	12,5 mg/mL

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2 – CMM determinada para cepas ATCC 4352 e clínicas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae*

Cepas de <i>K. pneumoniae</i>	CMM Extrato Aquoso	CMM Extrato Glicólico
ATCC 4352	55 mg/mL	6,25 mg/mL
K1	55 mg/mL	6,25 mg/mL
K2	55 mg/mL	6,25 mg/mL
K3	55 mg/mL	6,25 mg/mL
K4	55 mg/mL	6,25 mg/mL
K5	55 mg/mL	6,25 mg/mL
K6	Ausente	6,25 mg/mL
K7	Ausente	12,5 mg/mL
K8	Ausente	25 mg/mL

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes monotípicos

As concentrações utilizadas para os testes em biofilmes foram determinadas a partir do resultado de CMM para a forma planctônica de cada cepa. Foram utilizadas as concentrações do extrato equivalentes à quatro vezes a CMM (Quadro 4). Para as cepas que não apresentaram CMM para o extrato aquoso (P6, P7 e P8 de *P. aeruginosa* e K6, K7 e K8 de *K. pneumoniae*) ou que apresentaram CMM igual à 55 mg/mL (equivalente à metade da concentração máxima) foram feitos testes com o produto puro, ou seja, com a concentração de 110 mg/mL (Quadro 4).

Quadro 4 – Concentrações dos extratos utilizadas para tratamentos em biofilmes monotípicos de cepas ATCC e clínicas multirresistentes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*

Cepas de <i>P. aeruginosa</i>	Concentração de Extrato Aquoso	Concentração de Extrato Glicólico
ATCC 15442	55 mg/mL	25 mg/mL
P1	55 mg/mL	50 mg/mL
P2	55 mg/mL	50 mg/mL
P3	110 mg/mL	50 mg/mL
P4	110 mg/mL	50 mg/mL
P5	55 mg/mL	50 mg/mL
P6	110 mg/mL	50 mg/mL
P7	110 mg/mL	50 mg/mL
P8	110 mg/mL	50 mg/mL
Cepas de <i>K. pneumoniae</i>	Concentração de Extrato Aquoso	Concentração de Extrato Glicólico
ATCC 4352	110 mg/mL	25 mg/mL
K1	110 mg/mL	25 mg/mL
K2	110 mg/mL	25 mg/mL
K3	110 mg/mL	25 mg/mL
K4	110 mg/mL	25 mg/mL
K5	110 mg/mL	25 mg/mL
K6	110 mg/mL	25 mg/mL
K7	110 mg/mL	50 mg/mL
K8	110 mg/mL	100 mg/mL

Fonte: Elaborado pela autora.

As porcentagens de redução de viabilidade em biofilmes monotípicos para cepas de *P. aeruginosa* podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Redução de viabilidade em biofilmes de *P. aeruginosa* após tratamento de 5 min

Cepas de <i>P. aeruginosa</i>	Redução de Viabilidade Celular (%)		
	Clorexidina 0,12%	Extrato Aquoso	Extrato Glicólico
ATCC 15442	33,62%	52,43%	28,78%
P1	82,97%	54,54%	37,34%
P2	47,30%	19,95%	29,37%
P3	40,08%	64,66%	46,51%
P4	44,04%	10,42%	23,61%
P5	38,80%	20,25%	23,43%
P6	51,06%	62,35%	8%
P7	53,62%	42,02%	54,42%
P8	67,34%	24,10%	32,74%

Legenda: Médias de redução de viabilidade apresentadas pelos biofilmes monotípicos de cepa ATCC 15442 e cepas clínicas multirresistentes de *P. aeruginosa* após o tratamento de 5 min com a clorexidina 0,12% (controle positivo), extrato aquoso e extrato glicólico de própolis com concentrações previamente determinadas.

Fonte: Elaborado pela autora.

Todas as cepas de *P. aeruginosa* apresentaram distribuição normal em seus dados, sendo analisadas pelo método ANOVA com teste de *Tukey*.

Comparando os resultados de redução de viabilidade em biofilmes monotípicos de *P. aeruginosa*, é possível observar que o extrato glicólico apresentou redução de 28,78% para cepa ATCC 15442 enquanto entre as cepas

clínicas as reduções variaram entre 8% e 54,42% (com média de 31,92%), apresentando maior redução para cinco cepas clínicas em comparação à cepa padrão (Tabela 3). O extrato aquoso apresentou redução de 52,43% para a cepa ATCC 15442, e para as cepas clínicas as reduções variaram entre 10,42% e 64,66% (com média de redução de 37,28%), apresentando melhores resultados para três cepas clínicas multirresistentes em comparação à cepa ATCC 15442 (Tabela 3).

Ambos os extratos apresentaram redução de viabilidade de biofilme significativa para a cepa ATCC 15442, com resultados estatisticamente diferentes do controle de crescimento ($p \leq 0,05\%$) e semelhantes à clorexidina ($p > 0,05\%$) (Figura 3).

Para as cepas P1 e P2, os tratamentos com ambos os extratos de própolis apresentaram redução significativa em relação ao controle de crescimento ($p \leq 0,05\%$) (Figura 3).

O extrato aquoso de própolis apresentou redução de viabilidade maior do que o controle positivo para a cepa P3 ($p \leq 0,05\%$), no entanto, ambos extratos demonstraram significativa redução para a cepa em relação ao controle de crescimento ($p \leq 0,05\%$), sendo o resultado do extrato glicólico estatisticamente semelhante ao da clorexidina ($p > 0,05\%$) (Figura 3).

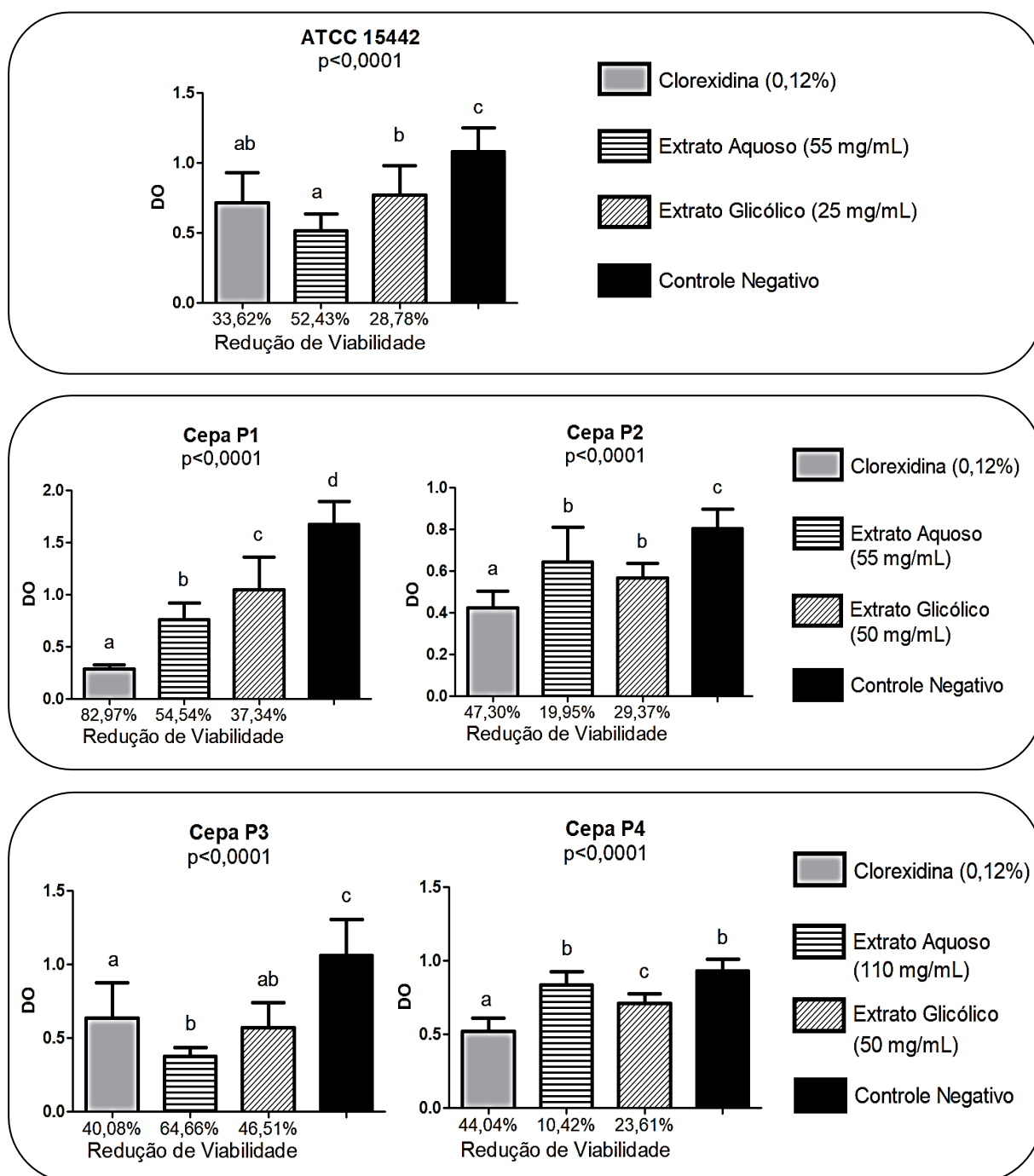
O extrato glicólico apresentou redução significativa do biofilme para as cepas P4 e P5 em comparação ao controle de crescimento ($p \leq 0,05\%$), sendo que para P5 a redução foi semelhante à da clorexidina ($p > 0,05\%$) (Figuras 3 e 4).

O extrato aquoso apresentou redução significativa na viabilidade da cepa P6, sendo estatisticamente semelhante à clorexidina ($p > 0,05\%$) (Figura 4).

Ambos os extratos reduziram significativamente a viabilidade da cepa P7 sendo semelhantes à clorexidina ($p > 0,05\%$) (Figura 4).

Os dois extratos reduziram significativamente a viabilidade do biofilme da cepa P8 ($p \leq 0,05\%$) (Figura 4).

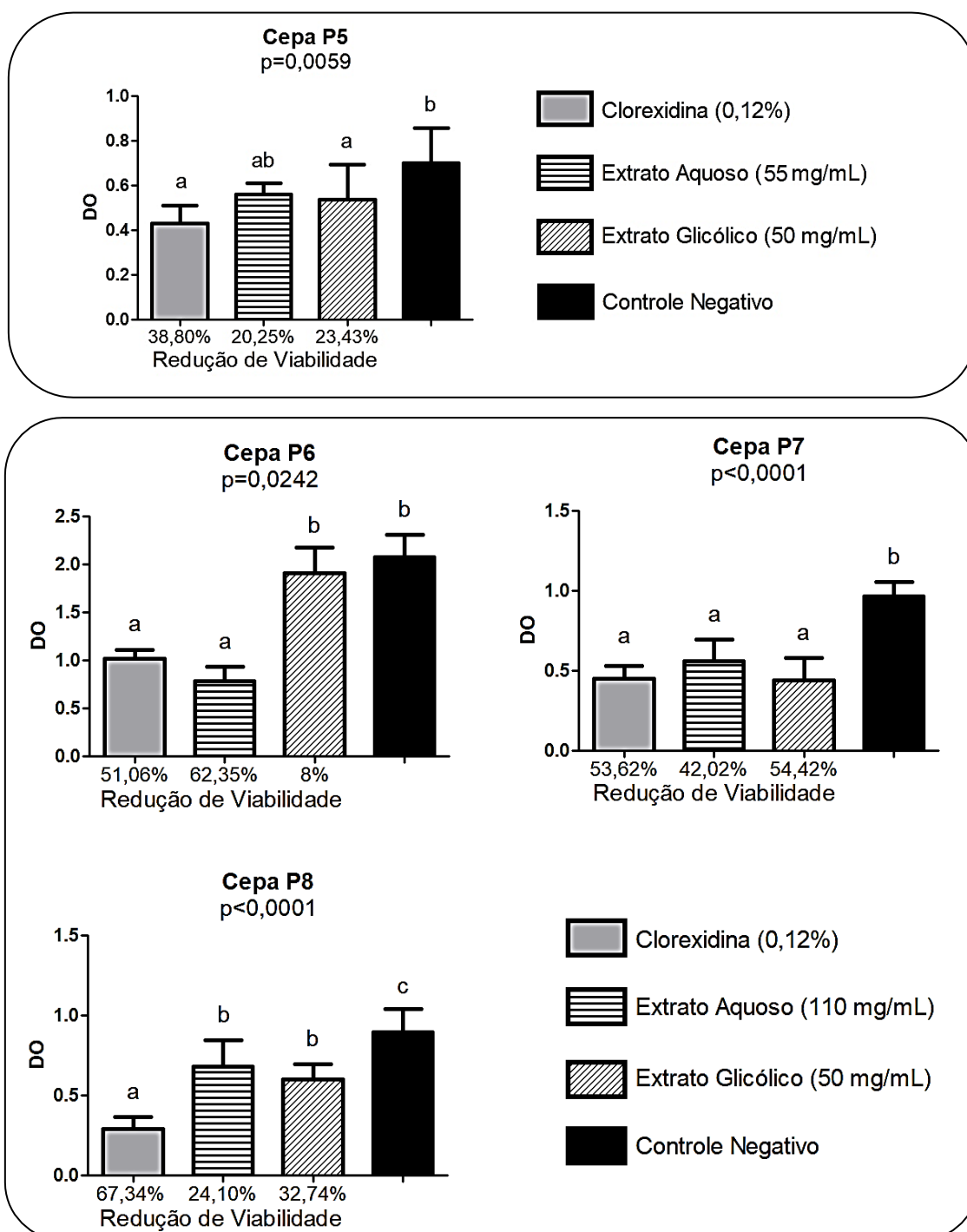
Figura 3 – Gráficos demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamentos de 5 min aplicados em biofilmes de *P. aeruginosa* (cepas ATCC 15442, P1, P2, P3 e P4)



Legenda: Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 4 – Gráficos demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamentos de 5 min aplicados em biofilmes de *P. aeruginosa* (cepas P5, P6, P7 e P8)



Legenda: Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b” e “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pela autora.

As porcentagens de redução de viabilidade em biofilmes monotípicos para cepas de *K. pneumoniae* podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Redução de viabilidade em biofilmes de *K. pneumoniae* após tratamento de 5 min

Cepas de <i>K. pneumoniae</i>	Redução de Viabilidade Celular (%)		
	Clorexidina 0,12%	Extrato Aquoso	Extrato Glicólico
ATCC 4352	48,54%	29,81%	20,56%
K1	51,84%	61,46%	35,17%
K2	41,87%	65,13%	40,36%
K3	45,96%	25,72%	35,32%
K4	36,11%	62,64%	53,66%
K5	32,29%	42,39%	28,97%
K6	82,21%	26,28%	5,38%
K7	31,05%	45,72%	27,60%
K8	81,39%	14,10%	64,24%

Legenda: Médias de redução de viabilidade apresentadas pelos biofilmes monotípos de cepa ATCC 4352 e cepas clínicas multirresistentes de *K. pneumoniae* após o tratamento de 5 min com a clorexidina 0,12% (controle positivo), extrato aquoso e extrato glicólico de própolis com concentrações previamente determinadas.

Fonte: Elaborado pela autora.

Após teste de normalidade, as cepas ATCC 4352, K1, K2, K3, K4, K5, K6 e K8 de *K. pneumoniae* apresentaram distribuição normal, portanto foram analisadas pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey*. Apenas a cepa K7 não apresentou curva normal, portanto foi analisada pelo método *Kruskall-Wallis* complementado com o Teste de Comparação Múltipla de *Dunn*.

Observando os resultados de redução de viabilidade nota-se que após aplicação do extrato glicólico em cepa ATCC 4352 a redução foi de apenas 20,56%, valor maior que apenas um resultado para as cepas multirresistentes, que apresentaram variação de redução entre 5,38% a 64,24% (com média de 36,33%) (Tabela 4). Já o extrato aquoso reduziu em 29,81% o biofilme da cepa ATCC 4352 e apresentou reduções entre 14,10% e 65,13% para cepas multirresistentes (com média de 42,93%) sendo que cinco cepas clínicas tiveram reduções maiores que a cepa padrão (Tabela 4).

Ambos os extratos apresentaram redução significativa da viabilidade dos biofilmes das cepas ATCC 4352 e K1 ($p \leq 0,05\%$), sendo que para a K1 o extrato aquoso apresentou redução semelhante à clorexidina ($p > 0,05\%$) (Figura 5).

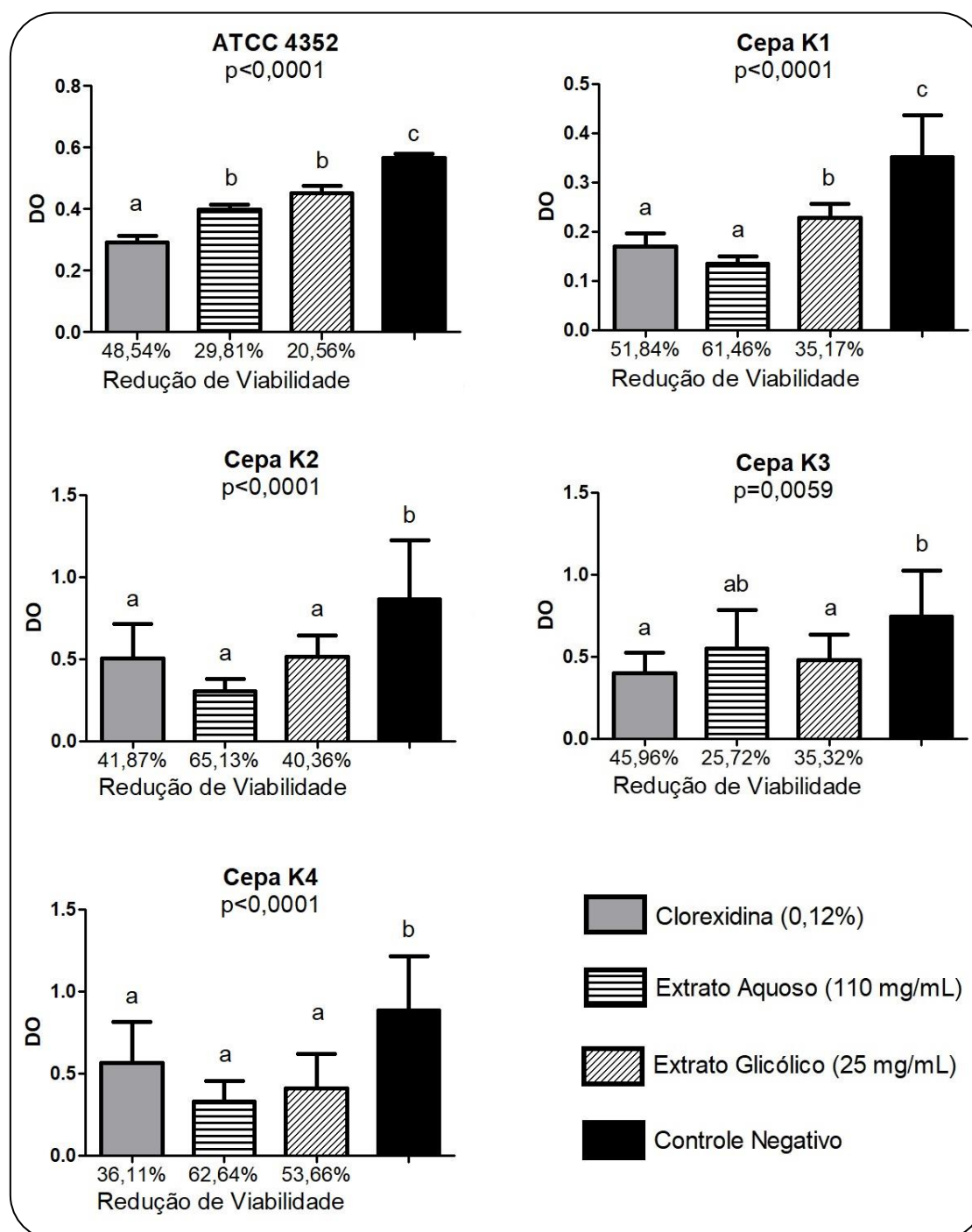
Os dois extratos também apresentaram redução significativa do biofilme para as cepas K2, K4, K5 e K7 em relação aos seus controles de crescimento ($p \leq 0,05\%$) com resultados estatisticamente semelhantes à clorexidina ($p > 0,05\%$) (Figuras 5 e 6).

O extrato glicólico apresentou redução significativa no biofilme da cepa K3 em comparação ao controle negativo ($p \leq 0,05\%$), sendo semelhantes estatisticamente à clorexidina ($p > 0,05\%$) (Figura 5).

O extrato aquoso produziu redução significativa em relação ao controle de crescimento para a cepa K6 ($p \leq 0,05\%$) (Figura 6).

Ambos os extratos apresentaram reduções significativas para a cepa K8 ($p \leq 0,05\%$), com maiores valores de redução para o extrato glicólico em comparação ao extrato aquoso (Figura 6).

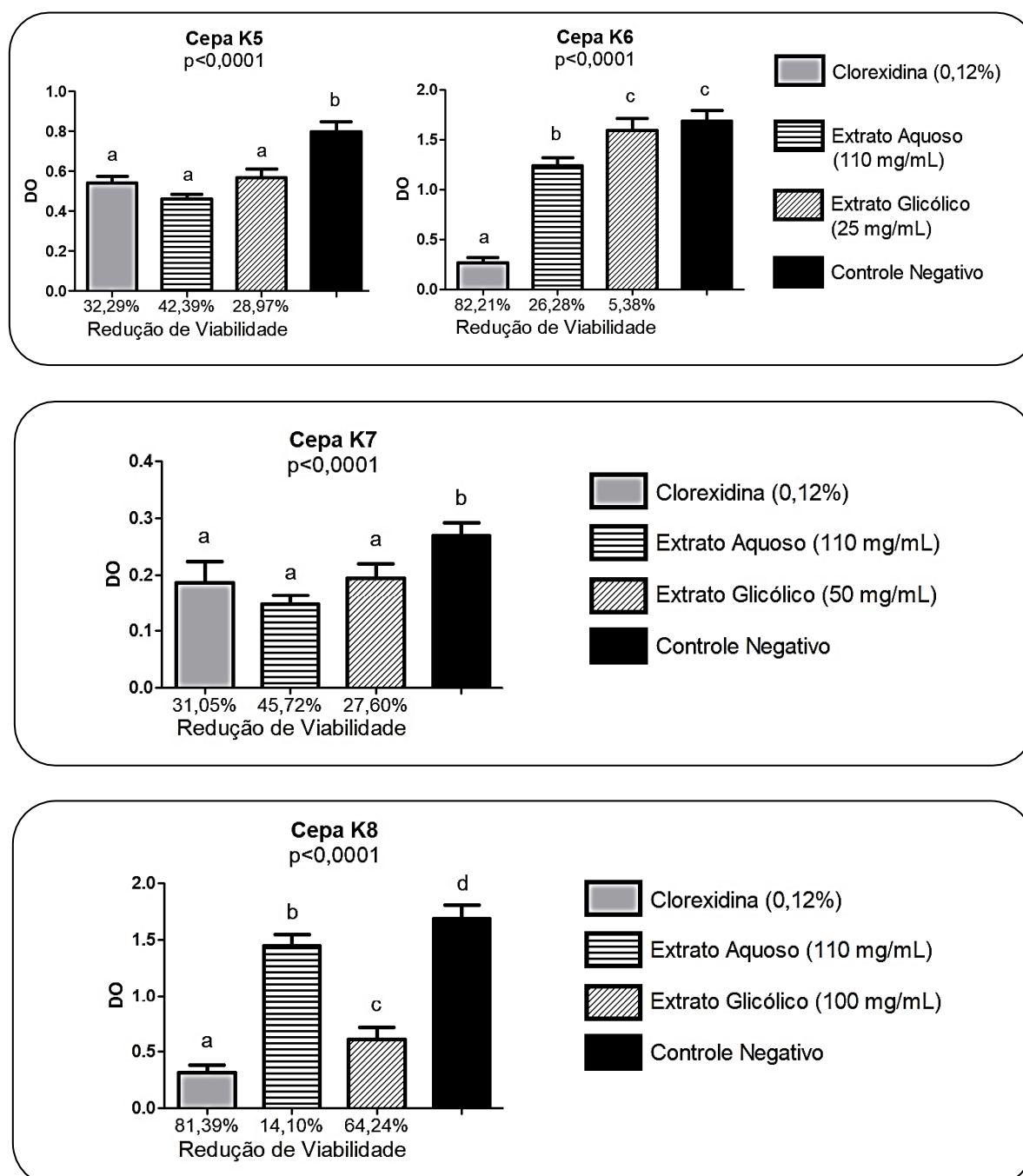
Figura 5 – Gráficos demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamentos de 5 min aplicados em biofilmes de *K. pneumoniae* (cepas ATCC 4352, K1, K2, K3 e K4)



Legenda: Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b” e “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 6 – Gráficos demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamentos de 5 min aplicados em biofilmes de *K. pneumoniae* (cepas K5, K6, K7 e K8)



Legenda: Os testes para as cepas K5, K6 e K8 apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). O teste para a cepa K7 não apresentou distribuição normal e foi analisado por meio do método *Kruskal-Wallis* complementado com Teste de Comparação Múltipla de *Dunn* ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

É importante destacar, inicialmente, que não foram identificados na literatura estudos investigando a ação antibiofilme de extratos de própolis não etanólicos sobre cepas clínicas multirresistentes das espécies *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Dessa forma, é possível discutir os resultados obtidos com pesquisas que apresentam algumas semelhanças específicas com o presente estudo.

Alguns estudos utilizam metodologias de microdiluição com semeadura em ágar, assim como feito neste trabalho, para verificar a ação antimicrobiana de extrato de própolis em cultura planctônica de *P. aeruginosa*. No entanto, a maioria das pesquisas utiliza extratos com etanol, como Kubina et al. (2015), que estudaram a ação de extrato de própolis polonês demonstrando a atividade antimicrobiana com CMM de 6,25 mg/mL para cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa*, mesmo valor de CMM apresentado pelo extrato glicólico do presente trabalho, demonstrando ação semelhante à de extrato alcoólico para cepa padrão de *P. aeruginosa*.

Em algumas pesquisas os autores não especificaram o valor exato de CMM, como Tiveron et al. (2016), que ao testar extrato alcoólico de amostras de própolis orgânica produzida em ambiente de conservação e reflorestamento (Brasil) observaram CMM > 1,600 µg/mL para cepa ATCC 25619 de *P. aeruginosa*. Já Santos TL et al. (2017) utilizaram extrato etanólico de geoprópolis de *Melipona mondury* (amostras da Bahia, Brasil) e suas frações, e verificaram ação variada contra cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa* com CMM de 250 µg/mL a > 1000 µg/mL. Chen et al. (2017) testaram extratos etanólicos de própolis verde Taiwanês adquirido comercialmente em cepas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Indústria de Alimentos (Taiwan) e

determinaram CMM > 640 µg/mL para *P. aeruginosa*. Apesar dos valores de CMM demonstrados pelos autores serem significativamente mais baixos do que os deste estudo, nas três pesquisas diversos valores foram indeterminados, com CMM definidas acima das concentrações testadas, sem precisão para a maioria dos resultados (Tiveron et al., 2016; Chen et al., 2017; Santos TL et al., 2017), o que não ocorreu neste estudo com os extratos aquoso e glicólico para as cepas padrão, em que foi determinada CMM para *P. aeruginosa* e também para *K. pneumoniae*.

Existem ainda estudos que indicaram apenas os valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) para demonstrar atividade da própolis, como da Cruz Almeida et al. (2017), que investigaram a ação de produtos com própolis vermelha (de Alagoas, Brasil): extratos clorofórmicos e também tinturas e microcápsulas com extrato etanólico. Foi observada ação inibitória das microcápsulas contra *P. aeruginosa* com concentrações bastante reduzidas de 271,74 a 1086,96 µg/mL e halos de inibição de 8 a 20 mm de diâmetro para concentrações de 50 a 2000 µg/mL; para a tintura e os extratos clorofórmicos os halos foram superiores a 10 mm (concentrações de 100 µg/mL a 2000 µg/mL).

Em relação ao combate de *K. pneumoniae*, Torres et al. (2018), estudaram a ação de extrato etanólico de amostras brasileiras de própolis por meio de microdiluição com coloração por resazurina em que os extratos de própolis produzidos por *Melipona quadrifasciata* apresentaram as concentrações mais baixas de CIM, sendo aproximadamente 5 mg/mL para a cepa ATCC 23883, enquanto os extratos de *Tetragonisca angustula* apresentaram CIM de aproximadamente 6,5 mg/mL, valores de inibição semelhantes aos da maioria das concentrações de extrato glicólico de própolis com ação microbicide (6,25 mg/mL) apresentadas neste estudo para cepas de *K. pneumoniae*, tanto padrão, quanto multirresistentes.

A disco difusão em ágar também é uma metodologia utilizada por diversos pesquisadores para determinação de atividade antimicrobiana. No entanto, há trabalhos que não apresentam dados numéricos para os resultados com essa metodologia, como Farnesi et al. (2009), que indicaram apenas que o extrato etanólico de própolis de *M. quadrifasciata* (“Mandaçaia” de São Paulo) apresentou maior atividade contra *P. aeruginosa* que o de *Apis mellifera* (de Minas Gerais) e de *Scaptotrigona* sp (“Tubi” do Maranhão). Já Siripatrawan e Vitchayakitti (2016) desenvolveram filmes de quitosana com extrato de própolis da Tailândia extraído com solução aquosa de etanol (30%) com o objetivo de desenvolver embalagens de alimentos. No teste antimicrobiano observaram que com o extrato de própolis, a atividade antimicrobiana foi evidente para todas bactérias testadas, incluindo *P. aeruginosa*, e que sem o extrato não houve inibição das bactérias, demonstrando função essencial deste componente para o combate dos micro-organismos.

Com resultados mais específicos, Mercan et al. (2006) demonstraram ação de extratos etanólicos de amostras de própolis de diferentes regiões da Turquia, com resultados bastante significativos em que para *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi observado halo de inibição de ≤ 8 a < 12 mm enquanto *K. pneumoniae* ATCC 27736 apresentou suscetibilidade para todas as amostras com ≤ 8 mm de inibição, demonstrando que a ação para *P. aeruginosa* foi igual ou maior que para *K. pneumoniae*. Shawky e Ibrahim (2018) testaram a ação de extrato etanólico de amostras de própolis provenientes do Egito e apresentaram o resultado de 2 mm de zona de inibição para cepa ATCC 9027 de *P. aeruginosa*.

Além da disco difusão, Ramanauskiene et al. (2009) utilizaram outra metodologia para os testes antimicrobianos: a difusão em ágar por meio da técnica do poço, em que testaram sistemas de emulsões com extrato etanólico de própolis, óleo com 30% de própolis diluído com azeite e extrato semisólido de

própolis (amostras da Lituânia). *P. aeruginosa* ATCC 27853 apresentou valores de CIM de 0,076 e 0,043 mg/mL para emulsões com extrato etanólico e óleo, respectivamente, enquanto *K. pneumoniae* ATCC 33499 obteve CIM de 0,059 e 0,055 mg/mL. Com a forma semisólida não houve inibição das bactérias, enquanto com o extrato de própolis houve maior ação contra *K. pneumoniae* e com o óleo com própolis e azeite contra *P. aeruginosa*.

Comparando estes resultados para cepas ATCC, é possível observar que no estudo de Mercan et al. (2006) *P. aeruginosa* apresentou suscetibilidade maior ou igual aos extratos em comparação a *K. pneumoniae*, enquanto Ramanauskiene et al. (2009) demonstram que com o óleo com 30% de própolis diluído com azeite houve maior ação contra *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* do que com extrato etanólico. Já na presente pesquisa, com extratos não alcoólicos de própolis, foi observada maior ação do extrato glicólico para ambas as cepas ATCC e também as multirresistentes das duas espécies na forma planctônica, sendo os valores mais baixos para *K. pneumoniae*, de maneira geral, concordando com os resultados para extrato de própolis de Ramanauskiene et al. (2009). Com o extrato aquoso de própolis houve grande variação de ação entre as cepas ATCC, sendo a CMM igual a 13,75 mg/mL para *P. aeruginosa* e 55 mg/mL para *K. pneumoniae*, concordando com Mercan et al. (2006), que demonstraram maior atividade de extratos contra *P. aeruginosa*. Ainda assim, fica clara a grande variação de atividade para as espécies entre as diferentes amostras e/ou tipos de produtos à base de própolis.

São encontrados poucos estudos investigando a ação do extrato de própolis em cepas clínicas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* apresentando valores de CMM. Uma pesquisa interessante que pode ser discutida foi desenvolvida por Campos et al. (2015), que investigaram ação de extrato etanólico de própolis do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (amostras de abelhas *Tetragonisca fiebrigi*) em cepas ATCC incluindo as cepas de *P.*

aeruginosa e *K. pneumoniae* utilizadas no presente estudo, mas também em isolados clínicos do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Bragança (Portugal) com diversas espécies. Por meio de microdiluição seriada e semeadura, foi demonstrado que, entre as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* apresentou as maiores CMM: a cepa clínica apresentou a CMM igual a 15,50 mg/mL e a ATCC 14,42 mg/mL. *K. pneumoniae* foi a segunda mais resistente com CMM da cepa clínica igual a 13,08 mg/mL e ATCC igual a 11,58 mg/mL. Nesta pesquisa foram apresentados valores maiores de CMM com o extrato etanólico de própolis na maioria dos casos em comparação ao presente estudo: para as cepas ATCC de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* os resultados apresentaram valor próximo ou maior que o dobro da CMM demonstrada pelo extrato glicólico deste trabalho, enquanto para as cepas clínicas de ambas as espécies, os valores foram mais próximos, sendo um pouco mais elevados do que nossos resultados para cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* e sete cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* (Campos et al., 2015). É interessante ressaltar que as cepas utilizadas por Campos et al. (2015) não apresentavam multirresistência a antibióticos e seus extratos etanólicos apresentaram ação menos efetiva que o extrato glicólico para cepas multirresistentes.

Estudos com testes antimicrobianos de extratos de própolis em cepas resistentes ou multirresistentes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* também são escassos na literatura, sendo possível discutir apenas algumas pesquisas com extratos etanólicos, como a de Zeighampour et al. (2014) que testaram própolis de diferentes regiões do Irã verificando CMM de 1500 mg/mL para as cepas multirresistente e ATCC 1074 de *P. aeruginosa*. Santos HF et al. (2017) estudaram a ação do extrato hidroalcoólico de geoprópolis proveniente do Mato Grosso do Sul (Brasil) sobre as cepas clínicas resistentes a imipenem de *P. aeruginosa* obtidas do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária

de Bragança (Portugal) que apresentaram CMM entre 17 e 17,7 mg/mL e cepa ATCC 15442™ que apresentou CMM de 16,5 mg/mL.

O extrato glicólico do presente estudo apresentou ação consideravelmente mais efetiva para cepas ATCC e clínicas multirresistentes de ambas as espécies (CMM de 6,25 a 25 mg/mL) em comparação aos valores demonstrados por Zeighampour et al. (2014) para cepas ATCC e multirresistente de *P. aeruginosa*, com CMM de 1500 mg/mL, concentração bastante elevada, especialmente para cepa padrão. Já em comparação a Santos HF et al. (2017), o extrato glicólico desta pesquisa também foi mais efetivo para as cepas ATCC e todas as multirresistentes de *P. aeruginosa* e para cepa ATCC e sete cepas resistentes de *K. pneumoniae* (valores de CMM iguais a 6,25 e 12,5 mg/mL). Este estudo concorda com os autores que demonstraram resultados semelhantes entre a cepa padrão e a resistente a imipenem de *P. aeruginosa*, como foi observado para o extrato glicólico com a maioria das cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* (Santos HF et al., 2017).

Já o extrato aquoso desta pesquisa apresentou resultados melhores para cepa ATCC de *P. aeruginosa* em comparação aos três estudos (Zeighampour et al., 2014; Campos et al., 2015; Santos HF et al., 2017). Em relação a cepas multirresistentes, sua ação foi mais efetiva contra três cepas de *P. aeruginosa* do que o demonstrado pelos autores, com ação de destaque apresentando atividade maior para cepas multirresistentes do que extratos com etanol.

Alguns trabalhos sobre a ação em cepas clínicas e ambientais (inclusive multirresistentes) não apresentam valores de CMM: Ophori e Wemabu (2010) demonstraram que, entre as espécies isoladas de pacientes com infecção respiratória, *K. pneumoniae* (2º micro-organismo mais prevalente) foi uma das mais sensíveis ao extrato etanólico de própolis (amostras de mercado da Nigéria), com CIM igual a 2 µg/mL. Balata et al. (2014) demonstraram a ação do extrato de própolis da Arábia Saudita com CIM de 250 mg/L para isolados

congelados ou ambientais de *P. aeruginosa* e >32 mg/L para *Klebsiella* sp. verificando também que organogel com própolis apresentou a melhor ação antibacteriana do que base de organogel sem própolis para a maioria dos micro-organismos. Em 2015, no Iraque, Taher estudou a ação de extrato etanólico de própolis sobre *K. pneumoniae* multirresistente demonstrando suscetibilidade do patógeno com concentração de 100 mg/mL e sinergismo do extrato com antibióticos. Sarhan e Azzazy (2017) observaram ação de nanofibras com própolis contra *P. aeruginosa* multirresistente, mas não muito significativa, de acordo com os autores. Estes estudos indicaram, de maneira geral, suscetibilidade maior de *K. pneumoniae* em comparação a *P. aeruginosa* (Ophori, Wemabu, 2010; Balata et al., 2014; Taher, 2015; Sarhan, Azzazy, 2017) no entanto, ao tratar as cepas multirresistentes com os extratos aquoso e glicólico de própolis neste estudo, foi observado que *K. pneumoniae* apresentou mais valores de CMM elevados para o extrato aquoso, com grande diferença também da cepa ATCC 4352 com cepa ATCC 15442 de *P. aeruginosa*.

Após levantamento bibliográfico foi possível observar que, além da escassez de estudos investigando atividade antibacteriana de extratos glicólicos e aquosos de própolis sobre cepas clínicas multirresistentes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, estudos com cepas padrão também são pouco desenvolvidos. Uma pesquisa interessante é a de Berretta et al. (2012), com 3 extratos da empresa Apis Flora (11,15% e 11,20%, 11,24%), que demonstraram CMM de 13,93 a 14,05 mg/mL para *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *K. pneumoniae* ATCC 10031, valores maiores do que o dobro da CMM encontrada no presente estudo para teste com extrato glicólico contra a cepas ATCC de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (6,25 mg/mL) e maior também que todas as CMM encontradas para as cepas clínicas multirresistentes testadas de *P. aeruginosa* (CMM igual a 12,5 mg/mL) e sete de *K. pneumoniae* (CMMs de 6,25 e 12,5 mg/mL), demonstrando melhor ação do extrato glicólico de própolis (Mapric® com concentração de 200

mg/mL) que foi capaz de combater não só cepas ATCC, mas também as clínicas multirresistentes em baixas concentrações.

Com relação a extratos aquosos, Carrillo et al. (2011) desenvolveram estudo comparando-os com extratos etanólicos (todos de amostras do México), em que foi observado que apenas um de quatro extratos aquosos teve ação microbida para *K. pneumoniae* (com concentração de 30 mg/mL) enquanto três extratos etanólicos apresentaram concentrações microbidas de 10 a 20 mg/mL, com apenas um dos extratos sem ação. Apesar de demonstrarem melhores resultados com extratos etanólicos (10 a 20 mg/mL), a ação do extrato aquoso contra *K. pneumoniae* (30 mg/mL) ultrapassa a ação a demonstrada no presente estudo para a mesma espécie (CMM de 55 mg/mL ou >55 mg/mL), no entanto, é importante destacar que estes testes foram desenvolvidos com cepas multirresistentes a antibióticos, o que não foi encontrado na literatura para que se fizesse comparação mais precisa de resultados.

Kubiliene et al. (2015) testaram diferentes extratos de própolis de amostra da Lituânia e por difusão em ágar com técnica do poço e observaram que para cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *K. pneumoniae* ATCC 33499, extrato aquoso de própolis com polietilenoglicol (PEG) apresentou 18,3 mm e 19,4 mm de zona de inibição, respectivamente, e para o extrato com PEG, azeite e água 17,3 mm e 20,5 mm, resultados melhores do que os dos respectivos controles de Ceftazidina (para *P. aeruginosa*) e Cefuroxima (*K. pneumoniae*). O extrato etanólico apresentou menos atividade, com 15,2 mm (*P. aeruginosa*) e 15,4 mm (*K. pneumoniae*) de inibição e os extratos aquoso e com azeite não tiveram ação contra nenhum micro-organismo testado (Kubiliene et al., 2015).

AL-Ani et al. (2018) também demonstraram atividade antibacteriana significativa comparando extrato aquoso de própolis produzido de amostra da Alemanha com extratos etanólicos de amostras da Alemanha, Irlanda e República Checa. Com microdiluição em caldo e semeadura, observou-se que as

cepas ATCC de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* apresentaram CMM >5 mg/mL para os extratos etanólicos e que o extrato aquoso apresentou CMM igual a 5 mg/mL para *P. aeruginosa* ATCC 27853 e 2,5 mg/mL para *K. pneumoniae* ATCC 700603. Para isolados clínicos de *K. pneumoniae*, a CMM para o extrato aquoso foi de 2,5 mg/mL (com CMM de 2,5 mg/mL e 1,2 mg/mL para extratos etanólicos) demonstrando ação efetiva da própolis por meio da extração aquosa, com resultados melhores que os apresentados pelos extratos etanólicos para cepas ATCC.

Apesar de diversos estudos demonstrarem ação da própolis em *P. aeruginosa* e/ou em *K. pneumoniae*, muitos dos descritos anteriormente também indicaram ações iguais ou até melhores em outros micro-organismos como, por exemplo, *S. aureus*, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *E. coli*, *E. faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Paenibacillus larvae*, *Proteus mirabilis* etc. demonstrando ampla ação da própolis como agente antimicrobiano com potencial para combater inúmeros patógenos (Farnesi et al., 2009; Carrillo et al., 2011; Berretta et al., 2012; Campos, et al., 2015; Kubina et al., 2015; Chen et al., 2017; AL-Ani et al., 2018; Torres et al., 2018).

No entanto, é preciso considerar também que, mesmo aplicando metodologias variadas (disco difusão em ágar, microdiluição com coloração por resazurina e diluição em caldo com semeadura em ágar) em alguns estudos os extratos etanólicos e metanólicos de própolis verde de diferentes países (Turquia, Brasil, Austrália, Sérvia e Suíça) e também o óleo essencial de própolis marrom do Mato Grosso do Sul (Brasil) não demonstraram ação sobre cepas padrão de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (Kartal et al., 2003; da Cunha et al., 2013; Fernandes et al., 2015; Massaro et al., 2015; Ristivojević et al., 2016; Fraile et

al., 2017), indicando também variabilidade de suscetibilidade dos patógenos para diferentes amostras e tipos de produtos.

A investigação da ação antibiofilme de extratos de própolis também é pouco abordada por pesquisadores, especialmente com as espécies desta pesquisa e suas cepas multirresistentes. Com *P. aeruginosa* é possível discutir o trabalho de De Marco et al. (2017), que utilizaram própolis da Itália para produção de extrato etanólico testado em cepas ATCC 15692 e P1242 (geneticamente modificada), para as quais determinaram valores iguais de CIM ($125 \mu\text{g/mL}$) e CMM ($> 2000 \mu\text{g/mL}$) por meio de microdiluição em caldo com semeadura em ágar. Na análise de biofilme por meio de quantificação de biomassa com cristal violeta os tratamentos foram feitos com contato de 24 h e observou-se reduções de biomassa de aproximadamente 25%, 45% e 65% para as concentrações de 10, 50 e $100 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Apesar de utilizar extrato etanólico e não desenvolver testes em cepas multirresistentes, o presente trabalho concorda com De Marco et al. (2017) que também demonstraram as potencialidades de extratos de própolis contra biofilme de *P. aeruginosa*, concluindo que estes extratos poderiam ser utilizados como adjuvante na terapia contra as infecções crônicas causadas por este patógeno.

No entanto a presente pesquisa discorda do estudo de Oliveira Dembogurski et al. (2018) feito com extratos etanólico, hidroetanólico e de frações de própolis marrom (amostras de diferentes regiões do Brasil adquiridas comercialmente) em que os testes de quantificação de biomassa por cristal violeta e de viabilidade celular com MTT (mesma metodologia utilizada nesta pesquisa) não demonstraram ação antibiofilme contra *P. aeruginosa* ATCC 27853, apesar da ação significativa contra biofilme de *S. aureus* ATCC 2590.

Para interpretar a divergência de resultados entre os estudos com biofilmes de *P. aeruginosa* é preciso considerar a diferença de cepas utilizadas para cada pesquisa e também a variação das diferentes amostras de própolis que

podem ser encontradas em diversos países e regiões. É interessante observar que os extratos do presente estudo não apresentaram suas maiores reduções de viabilidade de biofilmes para as cepas padrão, no entanto, apresentaram reduções de até 54,42% (glicólico) e 64,66% (aquoso) da viabilidade para cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*, enquanto extrato etanólico testado por de Oliveira Dembogurski et al. (2018) não demonstrou ação significativa nem mesmo em cepa padrão.

Não foram encontrados estudos com biofilmes de *K. pneumoniae*, porém, na presente pesquisa foram demonstradas reduções de viabilidade de até 64,24% para o extrato glicólico de própolis e de 65,13% para o extrato aquoso de própolis sobre suas cepas multirresistentes, apresentando reduções maiores que para cepa ATCC, o que indica que os extratos de própolis também apresentam ação efetiva contra biofilmes de *K. pneumoniae* multirresistente, informação inovadora ainda não apresentada na literatura.

Existem ainda algumas pesquisas que demonstram a ação antibiofilme de extrato etanólico de própolis para outras espécies microbianas, como o de Joy Sinha et al. (2015), que demonstrou que extrato alcoólico comercial de própolis diluído à concentração de 11% e transformado em gel apresentou melhor ação antibiofilme que extratos aquoso e alcoólico de *Azadirachta indica*, hidróxido de cálcio e etanol absoluto para desinfecção de túbulos dentinários com biofilmes de *C. albicans* (ATCC 10231), com inibição microbiana de 98,5%, menos efetivo apenas que a clorexidina (gel a 2%), mas sem diferença estatística. Estudos mencionados anteriormente (Akca et al., 2016; Tiveron et al., 2016) apresentaram resultados interessantes sobre a ação de extratos etanólicos em biofilmes de espécies de importância para a odontologia. Akca et al. (2016) observaram que tanto o extrato etanólico de própolis da Turquia quanto a clorexidina não apresentaram ação tão efetiva em biofilmes quanto contra a forma planctônica, porém, ambos foram bactericidas para a maioria dos micro-

organismos, como cepas ATCC de *L. acidophilus*, *L. salivarius* subsp. *salivarius*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *C. albicans*, mas não para *S. mutans*, *S. sobrinus*, e *A. israelii*, (os pioneiros do biofilme microbiano). Em alguns casos, o extrato apresentou ação mais efetiva que a clorexidina, como para *L. acidophilus*, *L. salivarius* subsp. *salivarius* e *P. intermedia*.

Já no estudo de Tiveron et al. (2016), demonstrou-se a ação de sete amostras de extrato alcoólico de própolis orgânica (amostras do Brasil) com inibição de aproximadamente 90% do biofilme de *S. mutans* nas concentrações de 400 e 800 µg/mL, resultado diferente do apresentado por Akca et al., 2016, no qual o extrato não foi bactericida para *S. mutans*. Jaiswal et al. (2017) estudaram a ação antibiofilme de extrato alcoólico de própolis (11%), quitosana, clorexidina e hipoclorito de sódio (NaOCl) em cepa ATCC de *E. faecalis* com o objetivo de explorar novas possibilidades para irrigantes endodônticos mais efetivos e menos irritantes que NaOCl. Foi observado que após irrigação de 10 min, própolis, quitosana com clorexidina e clorexidina foram tão eficazes quanto NaOCl.

Desta forma, ficam claras as potencialidades da própolis para a medicina e odontologia, com atividade antibacteriana contra diversos patógenos (bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos) e possibilidade de aplicação em inúmeras situações. É importante também que mais estudos sejam desenvolvidos para que as propriedades de amostras de cada região tenham seus efeitos terapêuticos identificados para que possam ser aproveitadas da melhor forma possível, visto que, como demonstrado por diversos autores, há diferença de ação entre extratos e outros produtos de acordo com a região de obtenção, extração, combinação com outras substâncias e também de acordo com o micro-organismo alvo.

Além deste estudo ser inovador por estudar a ação de extratos de própolis não alcoólicos sobre biofilmes de cepas bacterianas multirresistentes, a investigação de propriedades antibacterianas de produtos que já estão disponíveis comercialmente para a população é um fator que deve ser destacado na pesquisa. Ao descobrir e evidenciar características benéficas com potencialidades terapêuticas de produtos de fácil acesso se torna possível beneficiar comunidades externas ao ambiente acadêmico, proporcionando melhorias de qualidade de vida a curto prazo, ao contrário dos estudos que, mesmo apresentando excelentes resultados, investigam amostras indisponíveis para a maioria da população. Dessa forma é possível contribuir para o combate de bactérias multirresistentes à antibióticos de uso comum, problema de saúde pública de grande relevância no mundo todo.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que os extratos aquoso e glicólico de própolis apresentam importante ação antibacteriana e antibiofilme (com contato por apenas 5 min) sobre cepas padrão e clínicas multirresistentes a antibióticos de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, podendo ser considerados potenciais agentes terapêuticos para o combate destes patógenos.

REFERÊNCIAS*

Akca AE, Akca G, Topçu FT, Macit E, Pıkdöken L, Özgen IF. The Comparative Evaluation of the antimicrobial effect of propolis with chlorhexidine against oral pathogens: an in vitro study. *Biomed Res Int* [Internet]. 2016 [acesso em 2018 Jul 13];2016: [aproximadamente 9 páginas]. doi: 10.1155/2016/3627463. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3627463>

Al-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Antimicrobial activities of european propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. *Medicines (Basel)* [Internet]. 2018 Jan 3 [acesso em 2018 Ago 10];5(1): [aproximadamente 17 páginas]. doi: 10.3390/medicines5010002. pii: E2. PMID: 29301368. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5874567/>

Andrade JK, Denadai M, de Oliveira CS, Nunes ML, Narain N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from brazilian northeast region. *Food Res Int*. 2017 Nov;101:129-38. doi: 10.1016/j.foodres.2017.08.066. PMID: 28941675.

Balata G, El Nahas HM, Radwan S. Propolis organogel as a novel topical delivery system for treating wounds. *Drug Deliv*. 2014 Feb;21(1):55-61. doi: 10.3109/10717544.2013.847032. PMID: 24295500.

Berretta AA, Nascimento AP, Bueno PC, Vaz MM, Marchetti JM. Propolis standardized extract (EPP-AF ®), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. *Int J Biol Sci*. 2012;8(4): 512–21. doi: 10.7150/ijbs.3641. PMID: 22457606.

Bouillot S, Munro P, Gallet B, Reboud E, Cretin F, Golovkine G, et al. *Pseudomonas aeruginosa* exolysin promotes bacterial growth in lungs, alveolar damage and bacterial dissemination. *Sci Rep* [Internet]. 2017 May 18 [acesso em 2018 Ago 3];7(1): [aproximadamente 11 páginas]. doi: 10.1038/s41598-017-02349-0. PMID: 28522850; Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5437091/>

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Campos JF, Santos UP, Rocha PS, Damião MJ, Balestieri JB, Cardoso CA, et al. Cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). Evid Based Complement Alternat Med [Internet]. 2015 [acesso em 2018 Jun 1];2015: [aproximadamente 11 páginas]. doi: 10.1155/2015/296186. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/296186>

Carrillo ML, Castillo LN, Mauricio R. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (México). Información Tecnológica. 2011;22(5):21–8. Espanhol.

Chakraborty P. Herbal genomics as tools for dissecting new metabolic pathways of unexplored medicinal plants and drug discovery. Biochimie Open. 2018;6:9–16. doi:10.1016/j.biopen.2017.12.003.

Chang W, Bai J, Tian S, Ma M, Li W, Yin W, et al. Autophagy protects gastric mucosal epithelial cells from ethanol-induced oxidative damage via mTOR signaling pathway. Exp Biol Med (Maywood). 2017;242(10): 1025–33. doi:10.1177/1535370216686221

Chen Y, Ye S, Ting C, Yu Y. Antibacterial activity of propolins from Taiwanese green propolis. J Food Drug Anal. 2017;26(2):761–8. doi: 10.1016/j.jfda.2017.10.002.

Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically [Internet]. Wayne; 2012 [acesso em 2018 Fev 17]. Disponível em: <https://clsi.org/>

da Cunha MG, Franchin M, de Carvalho Galvão LC, de Ruiz AL, de Carvalho JE, Ikegaki M, et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. BMC Complement Altern Med [Internet]. 2013 Jan 28 [acesso em 2018 Ago 9];13: [aproximadamente 9 páginas]. doi: 10.1186/1472-6882-13-23. PMID: 23356696. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3568042/>

de Cruz Almeida ET, da Silva MC, Oliveira JM, Kamiya RU, Arruda RE, Vieira DA, et al. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. J Pharm Anal. 2017 Oct;7(5):280–7. doi: 10.1016/j.jpha.2017.03.004. PMID: 29404050.

da la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Mansour SC, Reckseidler-Zenteno SL, Hernández D, Brackman G, et al. D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Chem Biol*. 2015 Feb 19;22(2):196-205. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.01.002.

De Marco S, Piccioni M, Pagiotti R, Pietrella D. Antibiofilm and antioxidant activity of propolis and bud poplar resins versus *Pseudomonas aeruginosa*. *Evid Based Complement Alternat Med* [Internet]. 2017 [acesso em 2018 Jun 12];2017: [aproximadamente 11 páginas]. doi: 10.1155/2017/5163575. PMID: 28127379. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5239991/>

de Oliveira Dembogurski DS, Silva Trentin D, Boaretto AG, Rigo GV, da Silva RC, Tasca T, et al. Brown propolis-metabolomic innovative approach to determine compounds capable of killing *Staphylococcus aureus* biofilm and *Trichomonas vaginalis*. *Food Res Int*. 2018 Sep;111:661-73. doi: 10.1016/j.foodres.2018.05.033. PMID: 30007730.

del Pozo JL, Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 Aug;82(2):204-9. PMID: 17538551.

Dénes T, Bartha SG, Kerényi M, Varga E, Balázs VL, Csepregi R, et al. Histological and antimicrobial study of *Ononis arvensis* L. *Acta Biol Hung*. 2017 Sep;68(3):321-33. doi: 10.1556/018.68.2017.3.9. PMID: 28901804.

Dey D, Ghosh S, Ray R, Hazra B. Polyphenolic secondary metabolites synergize the activity of commercial antibiotics against clinical isolates of β -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Phytother Res*. 2016 Feb;30(2):272-82. doi: 10.1002/ptr.5527. PMID: 26668123.

El-Guendouz S, Aazza S, Lyoussi B, Bankova V, Lourenço JP, Costa AM, et al. Impact of biohybrid magnetite nanoparticles and moroccan propolis on adherence of methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Molecules* [Internet]. 2016 Sep 9 [acesso em 2018 Ago 22];21(9): [aproximadamente 18 páginas]. doi: 10.3390/molecules21091208. pii: E1208. PMID: 27618006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27618006>

Falagas ME, Rafailidis PI, Kofteridis D, Vrtzili S, Chelvatzoglu FC, Papaioannou V, Maraki S, Samonis G, Michalopoulos A. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case control study. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Nov;60(5):1124-30. PMID: 17884829.

Farnesi AP, Aquino-Ferreira R, De Jong D, Bastos JK, Soares AE. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genet Mol Res*. 2009 Jun 2;8(2):635-40. PMID: 19554760.

Fernandes FH, Guterres ZR, Violante IM, Lopes TF, Garcez WS, Garcez FR. Evaluation of mutagenic and antimicrobial properties of brown propolis essential oil from the Brazilian Cerrado biome. *Toxicology Reports*. 2015;2:1482–8. doi: 10.1016/j.toxrep.2015.11.007. PMID: 28962491.

Fraile B, Alcover J, Royuela M, Rodríguez D, Chaves C, Palacios R, et al. Xyloglucan, hibiscus and propolis for the prevention of urinary tract infections: results of in vitro studies. *Future Microbiol*. 2017 Jun;12(8):721-31. doi:10.2217/fmb-2017-0015. PMID: 28345957.

Gergova RT, Gueorgieva T, Dencheva-Garova MS, Krasteva-Panova AZ, Kalchinov V, Mitov I, et al. Antimicrobial activity of different disinfection methods against biofilms in root canals. *J Investig Clin Dent*. 2016;7(3):254–62. doi: 10.1111/jicd.12147.

Girmenia C, Serrao A, Canichella M. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in mediterranean countries. *Mediterr J Hematol Infect Dis* [Internet]. 2016 Jul 1 [acesso em 2018 Set 3];8(1): [aproximadamente 9 páginas]. doi: 10.4084/MJHID.2016.032. PMID: 27441063. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4943068/>

Hill D, Rose B, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, et al. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol*. 2005 Oct;43(10):5085-90. PMID: 16207967.

Hota S, Hirji Z, Stockton K, Lemieux C, Dedier H, Wolfaardt G, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009 Jan;30(1):25-33. doi: 10.1086/592700. PMID: 19046054.

Jabir MS, Sulaiman GM, Taqi ZJ, Li D. Iraqi propolis increases degradation of IL-1 β and NLRC4 by autophagy following *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect*. 2018 Feb;20(2):89-100. doi: 10.1016/j.micinf.2017.10.007. PMID: 29104144.

Jaiswal N, Sinha DJ, Singh UP, Singh K, Jandial UA, Goel S. Evaluation of antibacterial efficacy of chitosan, chlorhexidine, propolis and sodium hypochlorite on *Enterococcus faecalis* biofilm: An *in vitro* study. J Clin Exp Dent. 2017 Sep 1;9(9):e1066-e74. doi: 10.4317/jced.53777. PMID: 29075407.

Jiang H, Cao L, Shen Q, Qu L, Jiang Y, Qu T, et al. Whole-genome analysis of an extensive drug-resistant *Acinetobacter Baumannii* ST195 isolate from a recipient after DCD renal transplantation in China. Kidney Blood Press Res. 2017 Dec 14;42(6):1247-57. doi: 10.1159/000485928. PMID: 29248914.

Joy Sinha D, Garg P, Verma A, Malik V, Maccune ER, Vasudeva A. Dentinal tubule disinfection with propolis & two extracts of *Azadirachta indica* against *Candida albicans* biofilm formed on tooth substrate. Open Dent J. 2015 Nov 12;9:369-74. doi: 10.2174/1874210601509010369. PMID: 26962368.

Kartal M, Yildiz S, Kaya S, Kurucu S, Topçu G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. J Ethnopharmacol. 2003 May;86(1):69-73. PMID: 12686444.

Kasote DM, Pawar MV, Bhatia RS, Nandre VS, Gundu SS, Jagtap SD, et al. HPLC, NMR based chemical profiling and biological characterisation of Indian propolis. Fitoterapia. 2017 Oct;122:52-60. doi: 10.1016/j.fitote.2017.08.011. PMID: 28842358.

Kim SW. Phytotherapy: emerging therapeutic option in urologic disease. Translational Andrology and Urology. 2012;1(3):181-91. doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2012.05.10.

Kubiliene L, Laugaliene V, Pavilonis A, Maruska A, Majiene D, Barauskaite K, et al. Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. BMC Complement Altern Med [Internet]. 2015 May 27 [acesso em 2018 Set 1];15: [aproximadamente 7 páginas]. doi: 10.1186/s12906-015-0677-5. PMID: 26012348. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4443635/pdf/12906_2015_Article_677.pdf

Kubina R, Kabała-Dzik A, Dziedzic A, Bielec B, Wojtyczka RD, Bułdak RJ, et al. The ethanol extract of polish propolis exhibits anti-proliferative and/or pro-apoptotic effect on HCT 116 colon cancer and Me45 malignant melanoma cells *In Vitro* conditions. Adv Clin Exp Med. 2015 Mar-Apr;24(2):203-12. doi: 10.17219/acem/31792. PMID:25931350.

Larsen T, Fiehn NE. Dental biofilm infections – an update. APMIS. 2017;125(4):376–84. doi: 10.1111/apm.12688.

Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. Microbiol Mol Biol Rev: MMBR. 2014;78(3):510-43. doi:10.1128/MMBR.00013-14.

López-Causapé C, Sommer LM, Cabot G, Rubio R, Ocampo-Sosa AA, Johansen HK, et al. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international Cystic Fibrosis clone. Sci Rep [Internet]. 2017 Jul 17 [acesso em 2018 Set 1];7(1): [aproximadamente 15 páginas]. doi: 10.1038/s41598-017-05621-5. PMID: 28717172. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5514035/>

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012 Mar;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. PMID: 21793988.

Massaro CF, Simpson JB, Powell D, Brooks P. Chemical composition and antimicrobial activity of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) propolis from subtropical eastern Australia. Sci Nat [Internet]. 2015 Oct 31 [acesso em 2018 Set 1];102(11-12): [aproximadamente 11 páginas]. doi: 10.1007/s00114-015-1318-z. PMID: 26521267. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00114-015-1318-z>

McCrea K, Ward R, LaRosa SP. Removal of carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE) from blood by heparin-functional hemoperfusion media. Nguyen MH, ed. PLoS ONE [Internet]. 2014 [acesso em 2018 Set 1];9(12): [aproximadamente 6 páginas]. doi:10.1371/journal.pone.0114242. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4254995/>

Mercan N, Kivrak I, Duru ME, Katircioglu H, Gulcan S, Malci S, et al. Chemical composition effects onto antimicrobial and antioxidant activities of propolis collected from different regions of Turkey. Ann. Microbiol. 2006;56(4):373–8.

Miorin PL, Levy Junior NC, Custodio AR, Bretz WA, Marcucci MC. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. J Appl Microbiol. 2003;95(5):913-20. PMID: 14633019.

Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2017 Feb 15 [acesso em 2018 Set 1];7: [aproximadamente 29 páginas]. doi: 10.3389/fcimb.2017.00039. PMID: 28261568. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5310132/>

Nunes R, Pasko P, Tyszka-Czochara M, Szewczyk A, Szlosarczyk M, Carvalho IS. Antibacterial, antioxidant and anti-proliferative properties and zinc content of five south Portugal herbs. Pharm Biol. 2017 Dec;55(1):114-23. doi: 10.1080/13880209.2016.1230636. PMID: 27925492.

Ophori EA, Wemabu EC. Antimicrobial activity of propolis extract on bacteria isolated from nasopharynx of patients with upper respiratory tract infection admitted to Central Hospital, Benin City, Nigeria. Afr J Microbiol Res. 2010 Aug 18;4(16):1719–23.

Pinheiro JB, Vomero MP, do Nascimento C, Watanabe E, Paranhos H de FO, Coto NP, et al. Genomic identification of microbial species adhering to maxillofacial prostheses and susceptibility to different hygiene protocols. Biofouling. Taylor & Francis; 2018;34(1):15–25. doi: 10.1080/08927014.2017.1403591

Pyra A, Brzozowska E, Pawlik K, Gamian A, Dauter M, Dauter Z. Tail tubular protein A: a dual-function tail protein of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage KP32. Sci Rep [Internet]. 2017 May 22 [acesso em 2018 Set 2];7(1): [aproximadamente 9 páginas]. doi: 10.1038/s41598-017-02451-3. PMID: 28533535. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5440376/>

Ramanauskienė K, Inkenienė AM, Savickas A, Masteikova R, Brusokas V. Analysis of the antimicrobial activity of propolis and lysozyme in semisolid emulsion systems. Acta Pol Pharm. 2009 Nov-Dec;66(6):681-8. PMID: 20050532.

Rimbach G, Fischer A, Schloesser A, Jerz G, Ikuta N, Ishida Y, et al. Anti-inflammatory properties of Brazilian green propolis encapsulated in a γ -cyclodextrin complex in mice fed a western-type diet. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 May 26 [acesso em 2018 Set 1];18(6): [aproximadamente 14 páginas]. doi: 10.3390/ijms18061141. pii: E1141. PMID: 28587122. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5485965/>

Ristivojević P, Dimkić I, Trifković J, Berić T, Vovk I, Milojković-Opsenica D, et al. Antimicrobial activity of serbian propolis evaluated by means of MIC, HPTLC, bioautography and chemometrics. *PLoS ONE* [Internet]. 2016 [acesso em 2018 Ago 23];11(6): [aproximadamente 15 páginas]. doi:10.1371/journal.pone.0157097. PMID: 27272728. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4896501/>

Runyoro DK, Ngassapa OD, Kamugisha A. Antimicrobial activity of propolis from Tabora and Iringa regions, Tanzania and synergism with gentamicin. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2017 Jan;7(01):171-6.

Sakai T, Ohhata M, Fujii M, Oda S, Kusaka Y, Matsumoto M, et al. Brazilian green propolis promotes weight loss and reduces fat accumulation in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *Biol Pharm Bull*. 2017;40(4):391-5. doi: 10.1248/bpb.b16-00577. PMID: 28381793.

Salomão K, Dantas AP, Borba CM, Campos LC, Machado DG, Aquino Neto FR, et al. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Lett Appl Microbiol*. 2004;38(2):87-92. PMID: 14746537.

Santos HF, Campos JF, Santos CM, Balestieri JB, Silva DB, Carollo CA, et al. Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 May 3 [acesso em 2018 Set 2];18(5): [aproximadamente 18 páginas]. doi: 10.3390/ijms18050953. pii: E953. PMID: 28467350. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5454866/>

Santos TL, Queiroz RF, Sawaya AC, Lopez BG, Soares MB, Bezerra DP, et al. *Melipona mondury* produces a geopropolis with antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities. *An Acad Bras Cienc*. 2017;89(3 Suppl):2247-59. doi: 10.1590/0001-3765201720160725. PMID: 28746550.

Sanz M, Beighton D, Curtis MA, Cury J, Dige I, Dommisch H, et al. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2017; 44 Suppl 18:S5–S11. doi: 10.1111/jcpe.12682.

Sarhan WA, Azzazy HM. Apitherapeutics and phage-loaded nanofibers as wound dressings with enhanced wound healing and antibacterial activity. *Nanomedicine (Lond)*. 2017 Sep;12(17):2055-67. doi: 10.2217/nnm-2017-0151. PMID: 28805554.

Sepahvand S, Davarpanah MA, Roudgari A, Bahador A, Karbasizade V, Kargar Jahromi Z. Molecular evaluation of colistin-resistant gene expression changes in *Acinetobacter baumannii* with real-time polymerase chain reaction. *Infect Drug Resist*. 2017 Nov 27;10:455-62. doi: 10.2147/IDR.S141196. PMID: 29225477.

Shawky E, Ibrahim RS. Bioprofiling for the quality control of Egyptian propolis using an integrated NIR-HPTLC-image analysis strategy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2018 Sep 15;1095:75-86. doi: 10.1016/j.jchromb.2018.07.029. Epub 2018 Jul 23. PubMed PMID: 30055379.

Siripatrawan U, Vitchayakitti W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocoll*. 2016;61:695–702.

Taher NM. Synergistic effect of propolis extract and antibiotics on multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from wound. *J Nat Sci Res*. 2015;5(17):98–104.

Tankeo SB, Damen F, Sandjo LP, Celik I, Tane P, Kuete V. Antibacterial activities of the methanol extracts, fractions and compounds from *Harungana madagascariensis* am. ex Poir. (Hypericaceae). *J Ethnopharmacol*. 2016 Aug 22;190:100-5. doi: 10.1016/j.jep.2016.06.005. PMID: 27267830.

Tankeo SB, Lacmata ST, Noumedem JA, Dzoyem JP, Kuiate JR, Kuete V. Antibacterial and antibiotic-potential activities of some Cameroonian food plants against multi-drug resistant gram-negative bacteria. *Chin J Integr Med*. 2014 Jul;20(7):546-54. doi: 10.1007/s11655-014-1866-7. PMID: 24972582.

Thaden JT, Pogue JM, Kaye KS. Role of newer and re-emerging older agents in the treatment of infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Virulence*. 2017 May 19;8(4):403-16. doi: 10.1080/21505594.2016.1207834. PMID: 27384881.

Tiveron AP, Rosalen PL, Franchin M, Lacerda RC, Bueno-Silva B, Benso B, et al. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of south Brazilian organic propolis. *PLoS One* [Internet]. 2016 Nov 1 [acesso em 2018 Ago 21];11(11): [aproximadamente 18 páginas]. doi: 10.1371/journal.pone.0165588. PMID: 27802316. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5089781/>

Torres AR, Sandjo LP, Friedemann MT, Tomazzoli MM, Maraschin M, Mello CF, et al. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. 2018 [acesso em Ago 2];51(6): [aproximadamente 10 páginas]. doi: 10.1590/1414-431x20187118. PMID: 29791598. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6002130/>

Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trecarichi EM, Tumietto F, Marchese A, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis*. 2012 Oct;55(7):943-50. doi: 10.1093/cid/cis588. PMID: 22752516.

Ueda T, Inden M, Shirai K, Sekine SI, Masaki Y, Kurita H, et al. The effects of Brazilian green propolis that contains flavonols against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Jun 6 [acesso em 2018 Set 1];7(1): [aproximadamente 11 páginas]. doi: 10.1038/s41598-017-03115-y. PMID: 28588226. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5460160/>

Venkatesan N, Perumal G, Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiol*. 2015;10(11):1743-50. doi: 10.2217/fmb.15.69. PMID: 26517598.

Vieira Colombo AP, Magalhães CB, Hartenbach FA, Martins do Souto R, Maciel da Silva-Boghossian C. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog*. 2016;94:27–34. doi: 10.1016/j.micpath.2015.09.009.

Yusuf E, Van Herendael B, Verbrugghe W, Ieven M, Goovaerts E, Bergs K, et al. Emergence of antimicrobial resistance to *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit: association with the duration of antibiotic exposure and mode of administration. *Ann Intensive Care* [Internet]. 2017 Dec [acesso em 2018 Set 2];7(1): [aproximadamente 7 páginas]. doi: 10.1186/s13613-017-0296-z. PMID: 28664350. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5491427/>

Zaccaria V, Curti V, Di Lorenzo A, Baldi A, Maccario C, Sommatitis S, et al. Effect of green and brown propolis extracts on the expression levels of microRNAs, mRNAs and proteins, related to oxidative stress and inflammation. *Nutrients* [Internet]. 2017 Oct 1 [acesso em 2018 Ago 26];9(10): [aproximadamente 17 páginas]. doi: 10.3390/nu9101090. pii: E1090. PMID: 28974022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5691707/>

Zeighampour F, Mohammadi-Sichani M, Shams E, Naghavi NS. Antibacterial activity of propolis ethanol extract against antibiotic resistance bacteria isolated from burn wound infections. *ZJRMS*. 2014 Mar; 16(3): 25-30.