

ANÁLISE DE MÉTODOS EM TESTES DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS E AROEIRA

**Juliana Caroline de Araújo¹, Letícia Luísa Mattos², Lara Morello de Paulo³,
Christian Carvalho Rodrigues da Silva⁴, Rúdo de Paiva Ferreira⁵, Maria Diana
Cerqueira Sales⁵.**

¹ Graduanda em Medicina, Faculdade de Ciências Gerenciais de Manhuaçu (FACIG),
julianna_caroline@hotmail.com.

² Graduanda em Medicina, Faculdade de Ciências Gerenciais de Manhuaçu (FACIG),
leticialuisa_mattos@hotmail.com.

³ Graduanda em Medicina, Faculdade de Ciências Gerenciais de Manhuaçu (FACIG),
laracoc2014@hotmail.com.

⁴ Graduando em Medicina, Faculdade de Ciências Gerenciais de Manhuaçu (FACIG),
christian.carvalho@hotmail.com.

⁵ Doutorado em Biologia celular e estrutural, Faculdade de Ciências Gerenciais de Manhuaçu
(FACIG), riudoferreira@sempre.facig.edu.br

⁶ Doutorado em Biotecnologia, Faculdade de Ciências Gerenciais de Manhuaçu (FACIG),
dsdianasales@sempre.facig.edu.br

Resumo: No cenário atual, as bactérias resistentes são uma preocupação crescente para a Organização Mundial da Saúde (OMS), devido à resistência adquirida pelo uso indiscriminado de antibióticos. Novas alternativas farmacológicas como, por exemplo, as plantas medicinais, são de grande interesse para a indústria farmacêutica. O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento dos métodos de avaliação da atividade antimicrobiana utilizados em bioextratos de aroeira e da própolis em publicações de revistas e jornais com fator de impacto no intervalo 1,295 à 4 e por consequência classificação no Qualis CAPES de B1 à A1 na área de avaliação Medicina II (abrange a área de infectologia), Farmácia ou Ciências Biológicas III (abrange a área de microbiologia) no período entre o ano 2000 a 2017. Como metodologia foi adotada uma pesquisa de natureza qualitativa, com uma abordagem exploratória através de uma revisão de literatura de métodos de extração da Aroeira e do Própolis. Dos métodos utilizados em ensaios com bioextratos nas publicações, destacaram-se os testes de suscetibilidade foram feitos por microdiluição, por difusão de disco (Método Disco- Difusão), por diluição em ágar e por Microdiluição em placas de 96 poços. Para a avaliação dos resultados da eficácia ou ineficácia da ação antimicrobiana das amostras de própolis analisadas foram utilizadas espécies de *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogene*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, entre outras. Os trabalhos selecionados apresentam uma prevalência do método de microdiluição em placas de 96 poços e a maceração com etanol como meio de extração preferencial dos pesquisadores, pelo seu baixo custo e por ser de fácil replicação.

Palavras-chave: Bioextratos; Aroeira; Própolis; Métodos de extração; Teste de suscetibilidade antimicrobiana.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) orientou os pesquisadores de todo o mundo ao anunciar a lista de bactérias resistentes que devem ser o foco de novas pesquisas e desenvolvimento (P&D). Este é um assunto urgente e um pedido de socorro para tratar infecções fatais decorrentes do crescente aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos de acesso atual que, segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), compreendem medicações como os carbapenêmicos e as cefalosporinas (BRASIL, 2017). Assim, com o agravante das bactérias resistentes, desperta-se o interesse nas plantas medicinais utilizadas farmacologicamente, valorizadas por serem produtos naturais e por seus compostos já serem utilizados como base para medicamentos na indústria farmacêutica (BIZZO, 2009).

Dos produtos naturais que podem ser obtidos na extração de plantas medicinais, os óleos essenciais possuem destaque no Brasil devido a sua elevada produção e disponibilidade nas regiões. Além disso, esses produtos são receptíveis pela população e são flexíveis, pois podem ser aplicados em diversos ramos da saúde. (BIZZO, 2009). Segundo Michelin *et al.* (2005) os antibióticos vegetais possuem uma estrutura química e podem regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas.

Segundo Queiroz *et al.* (2000) o preparo dos extratos vegetais é a etapa mais complicada e com mais chances de apresentar problemas e as novas descobertas e evoluções voltadas para essa etapa possuem a finalidade de suprimir essa problemática. Diante disso, as inovações nos métodos de preparo das amostras estão voltadas, principalmente, para a automação e miniaturização e vários fabricantes têm disponibilizado sistemas automáticos de preparo de amostra, particularmente na área de extração em fase sólida, que é a técnica mais utilizada atualmente. Estas técnicas automatizadas tem um custo relativamente alto, mas são bastante úteis para o processamento de um grande volume amostras e evitam que o analista fique exposto a algum tipo de risco ao manipulá-las (QUEIROZ *et al.*, 2000). Os diferentes métodos de extração interferem na quantidade de compostos químicos encontrados na amostra e na qualidade desse extrato para o objetivo do estudo. Cada método de extração é adequado a um tipo de composto distinto como, por exemplo, a extração por membranas sólidas que é ideal para o uso em fluidos biológicos (QUEIROZ, 2000).

Os princípios ativos, encontrados em diversas partes das plantas, como as folhas, cascas, raízes, frutos, sementes e resinas (ZOGHBI *et al.*, 1998), são substâncias com propriedades farmacológicas e alto poder fitoterápico. No processo de extração de óleo essencial, podem ser aplicados diversos métodos, como a hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enfleurage, gases supercríticos e micro-ondas. Dentre esses, o método de maior aplicação é o de hidrodestilação que se divide em duas técnicas – arraste a vapor e coação (SANTOS *et al.* 1998; CRAVEIRO *et al.*, 1981).

Para obter esses extratos naturais deve-se escolher o melhor método de extração de acordo com sua simplicidade, velocidade, custo, qualidade do produto final e a precisão das análises, visto que diferentes métodos de extração podem interferir nos resultados e na análise dos compostos desejados. Deve-se buscar os extratos com menos interferência de outros fatores para que o estudo de suas ações seja fiel. Assim, o pesquisador deve avaliar as vantagens e desvantagens de cada método. (QUEIROZ *et al.* 2000).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi realizar um levantamento de publicações que contenham métodos microbiológicos de avaliação da atividade antimicrobiana de bioextratos a partir da aroeira e da própolis.

Tal análise é importante para evidenciar a necessidade de maiores estudos sobre o tema nas áreas da saúde, mais especificamente a Infectologia e a Farmácia. E assim, após avaliar a eficácia de metodologias rotineiramente utilizados em ensaios com bioextratos e seus resultados espera-se concluir a escolha do melhor método utilizado para experimentação da atividade antimicrobiana de extratos biológicos.

2. METODOLOGIA

Trata-se de uma pesquisa de natureza qualitativa, com uma abordagem exploratória, através de uma revisão de literatura de métodos de extração da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi-Aroeira e do Própolis. Foram incluídos nesta revisão de literatura publicações em revistas com fator de impacto no intervalo 1,295 à 4 e por consequência classificação no Qualis CAPES B1 à A1 na área de avaliação Medicina II (abrange a área de infectologia), Farmácia ou Ciências Biológicas III (abrange a área de microbiologia), no intervalo do ano 2000 a 2017. Foram excluídos aqueles que não se encaixavam nesses critérios. Para realização do quadro comparativo foram observadas as seguintes informações: bioextrato, o método de extração, tipo de extrato utilizado, meio de cultura utilizado, microrganismo em que foi realizado o experimento, o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, método de ensaio bacteriano, os resultados obtidos, os erros observados no estudo e a referência.

As pesquisas foram realizadas na biblioteca virtual em saúde LILACS, portal de periódicos CAPES, no banco de dados da Scielo e Google acadêmico. Através das palavras de busca: antimicrobial própolis e própolis antimicrobiano, extrato aroeira, aroeira antimicrobiana, extratos vegetais, fitoterápicos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela abaixo estão sintetizadas as informações referente a apresentação de estudos sobre a avaliação da atividade antimicrobiana, principalmente a antibacteriana, dos extratos de três tipos de própolis – o vermelho, o verde e o castanho – e da aroeira da praia (*Shinus terebinthifolius* Raddi) contra bactérias e fungos.

Tabela 1: A análise das publicações (N=12) referente à atividade antimicrobiana de extratos de própolis (N=8) e de aroeira (N=4).

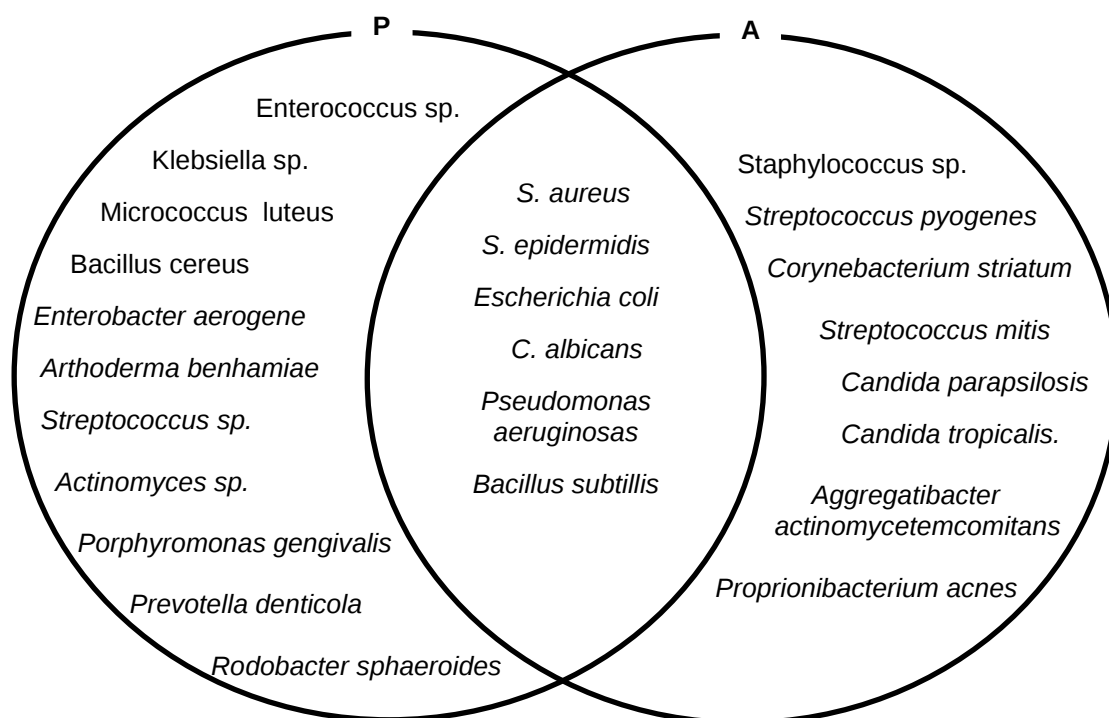
Tipo	Modelo	Métodos de suscetibilidade	Referências
Própolis vermelho	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i> .	Microdiluição em placas de 96 poços.	SILVA et al., 2017;
Própolis verde	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterobacter aerogene</i> e <i>Arthoderma benhamiae</i> .	Microdiluição em placas de 96 poços, crescimento in vitro e diluição em ágar, Método disco-difusão	SILVA et al., 2017; BITTERCOURT et al. 2015;
Própolis marrom/castanho	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> <i>Micrococcus luteus</i> e <i>Streptococcus mutans</i> .	Microdiluição em placas de 96 poços,	SILVA et al., 2017; BITTERCOURT et al. 2015; ASAWAHAME et al., 2014.
Outros tipos de própolis	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Streptococcus cricetus</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Actinomyces viscosus</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella denticola</i> e <i>Rodobacter sphaeroides</i> .	Microdiluição com uso de corante, Difusão em ágar anaeróbico exigente e Semeadura.	SILICI; KUTLUCA, 2005; AGA et al, 1994; WOJTYCZKA et al., 2013; KOO et al., 2000; MIRZOEVA et al., 1997.

Aroeira (<i>Shinuus terebinthifolius raddi</i>)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus wameri</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Corynebacterium striatum</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> e <i>Candida tropicalis</i> .	Método NCCL padrão em placa de 96 poços, Difusão em ágar e Microdiluição.	MUHS et al., 2017; ULIANA et al, 2016; PEREIRA, 2011; MOURA-COSTA et al., 2012.
---	---	---	---

Os métodos de extração dos analitos da própolis mais utilizados nos estudos escolhidos para análise foram a maceração com etanol e a maceração simples, o método supercrítico e o etanólico, a extração etanólica e com acetato de etila, formando extratos supercrítico, etanólico e hidroalcoólico. Já os analitos de aroeira utilizados nos estudos foram adquiridos a partir dos frutos, caule e folhas da planta, e extraídos dos demais componentes de constituição da aroeira por meio da maceração e extração auxiliar com ultrassom, por decocção e turboextração, e por extração líquido-líquido, formando extratos etanólicos, butanólicos, óleos essenciais e extrato etanólicos. As amostras utilizadas nos experimentos foram analisadas a fim de avaliar a inibição bacteriana ou fúngica.

Para a avaliação dos resultados da eficácia ou ineficácia da ação antimicrobiana das amostras de própolis analisadas nos estudos os autores utilizaram espécies de *Staphylococcus aureus* e outras espécies de estafilococos, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogene*, *Arthoderma benhamiae*, *Corynebacterium sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* *Actinomyces sp.*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella denticola*, *Rodobacter sphaeroides* e *Candida albicans*. Por outro lado, os microrganismos teste no estudo da ação antimicrobiana da aroeira foram: *Staphylococcus aureus* e outras espécies de estafilococos, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium striatum*, *Propionibacterium acnes*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida albicans*.

Figura 1: Diagrama destacando os microrganismos testados para avaliação antimicrobiana, sendo P os submetidos ao extrato de própolis e A ao extrato de aroeira. A interseção demonstra os microrganismos testados por ambos os extratos em análise.



Em 8,33% das publicações foram analisados a atividade antimicrobiana da própolis vermelha, 16,66% dos artigos analisaram as propriedades da própolis verde, sendo uma a brasileira, e 24,99% dos artigos a própolis marrom (castanha), sendo uma a tailandesa. Os outros 33,32% tiveram como objeto de estudo outros tipos de própolis não definidas no estudo.

Para os meios de cultura dos micro-organismos utilizados para medir a atividade antimicrobiana da própolis, foram utilizados o ágar HIB por 12,5% dos estudos, o ágar Mueller-Hilton por 25% deles e 25% utilizaram ágar bacteriológico e caldo nutritivo, enquanto os outros 37,5% artigos não expuseram o tipo de meio utilizado.

Os testes de suscetibilidade foram feitos por microdiluição em 12,5% dos estudos, e na mesma porcentagem por difusão de disco (Método Disco-Difusão) e difusão em ágar anaeróbico exigente e semeadura. A diluição em ágar foi utilizada em um quarto dos artigos e a microdiluição em placas de 96 poços em 50% deles.

Para a avaliação da eficácia ou ineficácia da ação antimicrobiana das amostras de própolis analisadas, foram utilizadas espécies de *Staphylococcus aureus*, outras espécies de estafilococos, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogene*, *Arthoderma benhamiae*, *Corynebacterium sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinomyces sp.*, *Porphyromonas gengivalis*, *Prevotella denticola*, *Rodobacter sphaeroides* e *Candida albicans*.

Os analitos de aroeira utilizados foram adquiridos a partir dos frutos, caule e folhas da planta, e extraídos dos demais componentes de constituição da aroeira por meio da maceração e extração auxiliar com ultrassom, por decocção e turboextração, e por extração líquido-líquido. As amostras preparadas formaram extratos etanólicos, butanólicos, óleo essencial e extrato etanólicos, que foram utilizadas nos experimentos, a fim de avaliar a inibição bacteriana ou fúngica. Os meios de cultura utilizados foram Tryptic Soy Agar (TSA), Tryptic Soy Broth (TSB), ágar Mueller-Hinton, ágar sangue e ágar de bacitracina para as espécies de bactérias testadas e ágar Sabouraud dextrose para as espécies fúngicas.

Das publicações selecionadas, 33,32% avaliaram a ação antimicrobiana da aroeira (*Shinus terebinthifolius raddi*). Desses, 25% utilizou ágar soja (TSA) como meio cultura para os micro-organismos teste, e a mesma porcentagem utilizou ágar sangue, 50% utilizou o ágar BHI (infusão cérebro-coração), 75% utilizou ágar Mueller-Hilton e 50% ágar Sabourad dextrose, sabendo que em um mesmo trabalho foram utilizados mais de um meio para cultura.

O teste de diluição em caldo foi utilizado em 25% dos estudos, assim como o teste com biofilme (biofilm test strain). O método de diluição em placas de 96 poços em 75% dos estudos e a difusão em ágar em 25% deles, sabendo que um mesmo artigo utilizou mais de um teste.

Os métodos de extração interferem na quantidade de substâncias principais no caso de extração de óleos essenciais e sua composição. Segundo Charles e Simon (1990) há uma vantagem da destilação à vapor em detrimento a hidrodestilação mesmo que mais rápida e simples. Em tais métodos pode ocorrer perda do produto durante a evaporação exagerada ou interferência em seus resultados por sua evaporação inacabada. A construção de aparelhos de microversão como citado por M.Godefroot, P.Sandra e M.Verzele (1981) garante ser desnecessário enriquecer, tentando suprir as desvantagens do método de destilação a vapor, porém o questionamento sobre o custo do que foi apresentado inicia a discussão da escolha do método ideal.

Em análise aos testes de susceptibilidade, o teste de difusão em ágar consiste na aferição da concentração mínima inibitória (CMI) que o produto do experimento, no caso apresentado os extratos biológicos, registra em meio sólido ao interagir com o microrganismo testado. Esse halo de inibição formado é comparado com o halo de inibição que foi analisado quando submetido ao padrão ouro de tratamento, normalmente antibióticos de controle positivo, para determinar se a inibição foi efetiva ou não, ou seja, se o microrganismo é susceptível ao extrato bem como é susceptível aos medicamentos convencionais. (PINTO *et al.*, 2003; KARAMAN *et al.*, 2003; SPRINGFIELD *et al.*, 2003).

Já para analisar interferências dos solventes de preparação e extração é utilizado um controle denominado controle negativo, onde coloca-se para essa mesma interação, no lugar do extrato, o solvente utilizado para analisar respostas de inibição ou não para determinar as interferências. (PINTO *et al.*, 2003; KARAMAN *et al.*, 2003; SPRINGFIELD *et al.*, 2003).

Normalmente esse método é melhor empregado para bactérias de desenvolvimento acelerado e em aerobiose estrita ou não. Sendo o teste de difusão em disco é considerado o teste de susceptibilidade modelo pela National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), é um método que garante a homogeneidade e menor pressão na aplicação, permitindo melhor passagem da substância para o meio, porém os discos podem ser obstruídos e necessita um maior cuidado na realização de suas etapas, sendo considerado um método detalhista. (PINTO *et al.*, 2003; KARAMAN *et al.*, 2003; SPRINGFIELD *et al.*, 2003).

O método de microdiluição em caldo utiliza como comparação a análise da turbidez da suspensão bacteriana, em um padrão pré-determinado, antes e depois da combinação com determinada quantidade do extrato que quer ser experimentado. Esse método utiliza placas de Eliza estéreis, com 96 poços, com fundo em formato de U, a fim de identificar o crescimento bacteriano. Quanto mais turvo o meio, maior a concentração de bactérias e vice-versa, ou seja, se a suspensão diminuiu sua turbidez após a colocação do extrato, em comparação com o controle positivo, pode-se determinar inibição do crescimento bacteriano. Assim esse método não depende da agilidade do crescimento do microrganismo e pode testar, ao mesmo tempo, um número variável de antimicrobianos. (PINTO *et al.*, 2003; ANVISA, 2008)

Dentre os fatores supracitados, outras razões interferem na análise dos autores sobre a susceptibilidade bacteriana ao extrato testado como por exemplo o meio de cultura utilizada para o crescimento bacteriano, sua espessura, uniformidade do meio, o pH do sistema, a disponibilidade do oxigênio, quantidade do inóculo e as condições da incubação (OSTROSKY *et al.*, 2008). O pesquisador deve avaliar o meio de cultura a ser utilizado a partir do microrganismo a ser testado considerando que algumas substâncias podem influenciar e gerar viés na análise dos resultados. O meio de cultura deve proporcionar o crescimento mais abundante e seletivo possível sem interferir negativamente sobre eles. No geral, o ágar mais utilizado para bactérias é o Ágar Müller-Hinton, também citando o Ágar HIB (PINTO *et al.*, 2003). Esses aspectos foram comprovados na análise realizada no Quadro 1.

4. CONCLUSÃO

Nos trabalhos de pesquisa em experimentação com extratos biológicos houve criteriosa seleção para escolha de seus métodos e materiais, deixando clara a importância da cautela e da avaliação de tais métodos para um resultado fiel.

Neste trabalho observa-se grande utilização da diluição em 96 poços em detrimento aos demais, além disso o método de extração mais utilizado foi o de maceração com etanol e os meios de cultura selecionados a partir do microrganismo em que seria submetido. Entretanto, estudos (OSTROSKY *et al.*, 2008) demonstraram que o método mais utilizado para avaliação de susceptibilidade seria o método de diluição em ágar por ser simples e barato em comparação aos demais.

A revisão aponta evidencia a necessidade de maiores estudos sobre o tema nas áreas da saúde, mais especificamente a Infectologia e a Farmácia. E assim, após avaliar a eficácia de metodologias rotineiramente utilizados em ensaios com bioextratos e seus resultados espera-se concluir a escolha do melhor método utilizado para experimentação da atividade antimicrobiana de extratos biológicos.

5. REFERÊNCIAS

ANVISA. **Interpretação de dados microbiológicos.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos2.htm. Acesso em: 06 out. 2017.

BITTERCOURT, M. L. F. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Rev. Food Research**, v. 76, P. 449-457, 2015.

BIZZO, H. R. **Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas.** 2009. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol32No3_588_04-QN09038.pdf. Acesso em: 04 out. 2017.

CHARLES D. J.; SIMON J. E. CHARLES, Denys J.; SIMON, James E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 115, n. 3, p. 458-462, 1990.

CRAVEIRO, A. A. et al. Microwave oven extraction of an essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 4, n. 1, p. 43-44, 1989.

GODEFROOT, M.; SANDRA, P.; VERZELE M. New method for quantitative essential oil analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 203, p. 325-335, 1981.

KARAMAN I. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacol**, v.85, n. 2, p. 231-235, 2003.

KOO, H. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Archives Of Oral Biology**, v. 45, n. 2, p.141-148, 2000.

MARCUCCI, M. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p.105-112, 2001.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research**, v. 152, n. 3, p.239-246, 1997.

MOURA-COSTA G. F. et al. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 631-638, 2012.

MUHS, A. et al. Virulence Inhibitors from Brazilian Peppertree Block Quorum Sensing and Abate Dermonecrosis in Skin Infection Models. **Scientific Reports**, v. 7, p.42275-42275, 2017.

BRASIL. **OMS publica lista inédita de bactérias resistentes a antibióticos.** 2017. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/oms-publica-lista-inedita-de-bacterias-resistentes-a-antibioticos/>. Acesso em: 04 out. 2017.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PEREIRA E. M. et al. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. **Planta medica**, v. 77, n. 04, p. 401-404, 2011.

PINTO T.J.A., KANEKO T.M., OHARA M.T. 2003. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

QUEIROZ S. C. N., COLLINS C.H. e JARDIM I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, 2001.

SANTOS A. S. et al. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. **Embrapa Amazônia Oriental-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2004.

SILVA, R. P. D. et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **Rev. Plos one**, v. 12, n. 3, p. e0172585, 2017.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 69-73, 2005.

SPRINGFIELD, E. P. et al. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v. 10, n. 5, p. 434-439, 2003.

ULIANA M. P. et al. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 235-240, 2016.