

Processamento e análise de extratos de própolis verde como potencial sanitizante de uso hortifrutícola

Processing and analyze of green propolis extracts as potential sanitizer for horticultural uses

DOI: 10.34188/bjaerv4n3-018

Recebimento dos originais: 04/03/2021

Aceitação para publicação: 30/06/2021

Jessica Valéria de Campos

Doutoranda em Biotecnologia

Universidade Federal de São Carlos, UFSCar

Rodovia Washington Luís, km 235, 13565-905 São Carlos - SP,

E-mail: jessicavcampos@yahoo.com.br

Odílio Benedito Garrido Assis

Doutor em Ciência dos Materiais

Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio – LNNA

Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13561-206 São Carlos, SP

E-mail: odilio.assis@embrapa.br

Rubens Bernardes Filho

Doutor em Físico-química

Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13561-206 São Carlos, SP

E-mail: Rubens.bernardes@embrapa.br

RESUMO

Extratos de própolis verde foram obtidos em proporções variadas de água/etanol (em 100/0, 70/30, 50/50, 30/70 e 0/100 % v/v). As concentrações de fenólicos e flavonoides totais foram determinadas por método colorimétrico (Folin-Ciocalteu) e os compostos identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Registrou-se pouca variação nos teores de fenólicos nos extratos com uma maior concentração retida na proporção 50/50 % v/v, indicando um equilíbrio no teor de fenólicos polares e apolares na própolis bruta. O teor de flavonóides mostrou-se fortemente dependente da proporção de etanol no extrato, ou seja, quanto maior o volume de etanol maior foi a concentração de flavonoides extraídos. Os ensaios antimicrobianos conduzidos sobre as bactérias *S. aureus* e *E. coli* como padrões Gram-positivo e Gram-negativo respectivamente, apontou uma variação de sensibilidade a própolis entre os microrganismos, com maior inibição observada para a *S. aureus*. O extrato totalmente alcoólico (0/100 % v/v) foi selecionado para testes sobre bactérias imobilizadas em superfície sólida, simulando pontos de amostragem e venda de hortifrutícolas, indicando eficiência da sanitização desse extrato via aspersão.

Palavras-chave: própolis verde, extratos aquosos, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Green propolis extracts were obtained in various proportions of water/ethanol (at 100/0, 70/30, 50/50, 30/70 and 0/100 % v/v). The concentrations of total phenolics and flavonoids were determined by colorimetric method (Folin-Ciocalteu) and compounds identification carried out by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). There was little variation in the phenolic

contents in the extracts with a higher concentration retained in the proportion 50/50 % v/v, pointing equilibrium in the quantity of polar and non-polar phenolics in crude propolis. Flavonoid content was strongly dependent on the proportion of ethanol in the extract, i.e., the greater the volume of ethanol, the higher was the concentration of flavonoids. The antimicrobial assays carried out on the bacteria *S. aureus* and *E. coli*, as Gram-positive and Gram-negative standard, showed a variation in sensitivity between microorganisms to propolis, with greater growth inhibition observed for *S. aureus*. The fully alcoholic extract (0/100 % v/v) was selected for tests on immobilized bacteria on a solid surface, simulating horticultural sampling and sale points, indicating the efficiency of this extract in spray sanitization.

Keywords: green propolis, aqueous extracts, antimicrobial activity

1 INTRODUÇÃO

A própolis é definida como uma substância natural coletada por abelhas (*Apis mellifera* L.) em diversas partes das plantas como brotos e exsudados. Ao entrar em contato com enzimas do tipo β -glicosidase, presentes na saliva das abelhas, há a formação de um composto resinoso, de composição complexa, que é utilizado como material estrutural, conferindo resistência à colmeia, além de apresentar propriedades antissépticas que auxiliam na proteção contra insetos e microrganismos invasores (Ghisalberti, 1979).

A própolis é compatível com o metabolismo humano, sendo empregada desde a antiguidade na prevenção e tratamento de enfermidades diversas, seja em uso tópico ou por ingestão oral (Castaldo & Capasso, 2002). Ao longo dos anos, diversos estudos têm confirmado suas ações antioxidante, anti-inflamatória, analgésica e anticancerígena entre outras, em análises realizadas tanto *in-vitro* quanto *in-vivo* (Marcucci, 1995; Ramos & Miranda, 2007). Em ensaios comparativos com antissépticos industrializados, foram demonstrados que extratos de própolis apresentam equivalentes ações antimicrobianas (Simões et al., 2008), associada à baixa possibilidade de reações junto aos tecidos biológicos (Swerts et al., 2005).

Essas características bioativas além da fácil obtenção da própolis, considerando que o Brasil é o terceiro maior produtor do mundo (Machado et al., 2012) e o que apresenta a maior diversidade de composições em função de sua variedade de flora (Berretta et al., 2017), tem apontado a possibilidade do emprego da extratos de própolis como sanitizantes de potencial uso em setores hortifrutícolas (Feás et al., 2014; Alvarez et al., 2016).

No presente trabalho extratos de própolis verde foram preparados em diferentes proporções de água e etanol e suas composições caracterizadas. A ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa *Escherichia coli*, (selecionados como microrganismos padrões), foi definida pela medida da Mínima Concentração Inibitória (MIC) em ensaios de diluição sequencial. Bactérias immobilizadas sobre superfície sólida foram submetidas ao

contato com os extratos por meio de pulverização, simulando condições de sanitização de pontos de amostragem e venda de hortifrutícolas.

2 MÉTODOS

PRODUÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS

Própolis verde de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) colhida na região de Barbacena, MG, foi gentilmente fornecida pela empresa Wenzel Indústria e Comércio de Produtos Apícolas LTDA.

Cinco diferentes tipos de extratos foram produzidos a partir da amostra recebida, os quais diferem nas concentrações dos solventes álcool etílico absoluto (99,3%) e água destilada. Na elaboração dos extratos empregou-se as seguintes proporções em volume água/álcool de 100/0, 70/30, 50/50, 30/70 e 0/100 (% v/v), sendo identificados segundo a nomenclatura: EAP (extrato aquoso de própolis), EHP30 (extrato hidroetanólico de própolis 30% etanol), EHP50 (extrato hidroetanólico de própolis 50% etanol), EHP70 (extrato hidroetanólico de própolis 70% etanol) e EEP (extrato etanólico absoluto de própolis, 100%).

Todos os extratos foram obtidos seguindo procedimento descrito em processo patentado (EMBRAPA, 2013), que tem por princípio a trituração inicial da amostra de própolis bruta em almofariz, seguido pela maceração de 13,75 g em erlenmeyer protegido com papel alumínio, adicionando 100 mL da solução solvente sob agitação magnética moderada e constante ao longo de 15 dias. Posteriormente as soluções permaneceram em repouso por 24 h na temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, permitindo a decantação espontânea e retirada dos sobrenadantes e, em sequência, filtradas em membranas de PVDF com diâmetro de poros de $0,2 \mu\text{m}$.

ANÁLISE DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS

O teor de compostos fenólicos totais nos extratos foi determinado pelo método colorimétrico adaptado de Folin-Ciocalteu (Funari & Ferro, 2006). A base das análises consiste na separação de uma alíquota de cada extrato (150 μL), seguido de diluição em 2,4 mL de água ultrapura (mili-Q, resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$), e adição de 150 μL da solução de Folin-Ciocalteu a 0,25 N. Esta solução foi incubada ao abrigo da luz durante 3 min na temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, a reação foi interrompida pela da adição de 300 μL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e novamente incubada durante 25 min. As leituras de absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro da marca SHIMADZU (Shimadzu Scientific Instruments, modelo UV-1600), no comprimento de onda de 725 nm. O teor de compostos fenólicos totais de cada amostra foi determinado após o levantamento de curva analítica construída a partir de diferentes concentrações de ácido gálico.

A concentração de flavonoides totais foi determinada através da reação de formação de complexos estáveis entre o cátion alumínio e os flavonoides em meio metanólico (Funari & Ferro, 2006). O procedimento consistiu em transferir 1 mL de cada extrato para um balão volumétrico de 25 mL contendo 1 mL de solução etanólica de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 2% (m/v). Posteriormente o volume final de cada balão foi ajustado com álcool etílico e incubada durante 30 min ao abrigo da luz na temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. As análises das absorbâncias foram realizadas em comprimento de onda de 425 nm. O teor de flavonoides foi definido a partir da curva analítica padrão tendo a quercetina (2-12 mg/L) como referencia. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As análises no CLAE foram realizadas de acordo com o método descrito por Sousa et al. (2007), em equipamento VARIAN detector ultravioleta-visível Pro-Star 325. As soluções dos extratos e dos padrões foram injetadas no cromatógrafo, utilizando a coluna C18 RP Agilent (2,5 x 25 mm x 5 μm). A fase móvel utilizada foi constituída pelos solventes ácido acético/acetato de amônia/metanol/água deionizada em acetonitrila na proporção inicial de 75:25 (% v/v), que foi linearmente alterada para 0:100 durante a corrida de 60 min em fluxo de admissão de eluente em 1 mL/min.

Para cada extrato foram realizadas duas análises utilizando os comprimentos de onda de 310 e 290nm. Inicialmente foram obtidos os perfis de seis diferentes padrões de referência: ácido cafeico, ácido p-cumárico, crisina, kaempferol, quercetina e sakuranetina. Cada solução padrão foi produzida na concentração de 100 ppm em metanol. Para a análise dos extratos, estes foram diluídos na relação de cinco por um em metanol.

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

As bactérias analisadas, a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC25923 e a Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC25922, foram inicialmente inoculadas “overnight” em tubos falcon em meio de cultura Müller-Hinton na temperatura de $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Posteriormente, com base na escala McFarland 0.5, a concentração de células foi ajustada por diluições sequenciais até 10⁶ UFC/mL.

A capacidade de inibição bacteriana dos extratos foi determinada pela medida da MIC em diluição seriada em microplaca, a partir de alíquota inicial de 100 μL de cada extrato em 100 μL de caldo Müller-Hinton, seguido da adição de 10 μL do inóculo em cada poço da microplaca. As microplacas foram incubadas em estufa a $35,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante um período de 24 h. A análise foi

conduzida após 2 h da adição de 50 µL de solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio 0,1%, indicando por coloração avermelhada a presença de crescimento bacteriano. O valor da MIC foi considerada como a primeira diluição que não apresentou coloração.

Considerando os resultados obtidos pelas medidas da atividade antibacteriana frente à *S. aureus* e *E. coli*, elegeu-se o extrato com melhor ação inibitória (EEP), para simulação de sanitização em superfície sólida. Para tanto as bactérias em teste foram imobilizadas separadamente sob lâminas vítreas, segundo adaptação do método descrito por Santana et al. (2012), cujos detalhes podem ser encontrados em Campos (2017). Aproximadamente 150 µL de extrato foi pulverizado sobre as lâminas e após 2 h amostras microbianas foram coletadas com auxílio de “swabs” e inoculados em meio ágar por 24 h a $37 \pm 0,5$ °C. As coletas foram realizadas em triplicata.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores referentes à concentração dos compostos fenólicos e flavonoides foram comparados por análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey com nível de significância $p < 0,05$ utilizando o programa Microcal OriginLab v.9.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS

A própolis bruta contém substâncias solúveis em água e em compostos apolares como óleos e álcoois, o que faz com que diferentes proporções água/etanol na preparação dos extratos de própolis resultem em soluções com diferentes composições. Com base nas análises espectrofotométricas, os teores de compostos fenólicos totais determinados em cada extrato, estão dispostos na Figura 1(A), sendo possível afirmar que todos os extratos obtidos neste estudo atendem ao requisito mínimo do teor de fenólicos totais, segundo a exigência do Ministério da Agricultura, que defini o mínimo como 5% (BRASIL, 2001).

Nota-se que a maior presença dos fenólicos foi registrada para o extrato EHP50, composto pela mesma proporção de água e etanol. Tal resultado sugere um equilíbrio de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos na amostra de própolis utilizada. Fica evidenciado pela tendência de redução das concentrações de fenólicos medidos para os extratos com maiores frações etanólicas (EHP70 e EEP), que a própolis empregada contém uma menor concentração de fenólicos apolares.

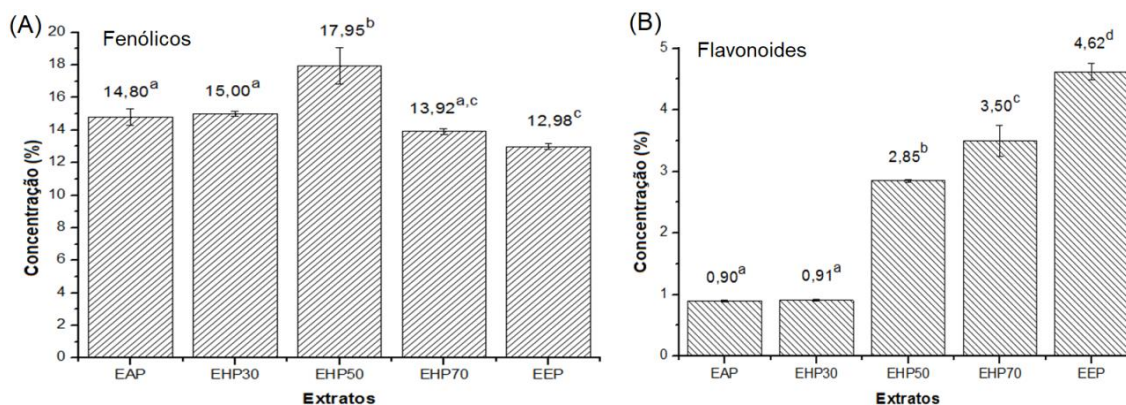


Figura 1. Valores do teor de compostos fenólicos totais (A) e flavonoides (B) presentes em cada extrato. Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$).

Os teores de flavonoides presentes nos extratos, obtidos a partir de curva analítica, tendo quercetina como padrão, permitiu obter os valores em porcentagem detalhados na Figura 1(B), indicando igualmente a presença acima de teores superiores ao mínimo exigido pelo Ministério da Agricultura (de 0,25%), (BRASIL, 2001).

Pode-se afirmar que a extração dos flavonoides é fortemente dependente da concentração alcoólica (o teor de flavonoides extraído é maior à medida que a concentração de etanol utilizada como solvente extrator aumenta), cujo resultado já é de consenso na literatura (Buriol et al., 2009; Mello et al., 2010).

Das análises realizadas por cromatografia (CLAE) foi possível identificar alguns compostos presentes nos extratos. Os cromatogramas exibidos na Figura 2 apresentam os tempos de retenção dos diversos compostos confirmando a influência do solvente. Com base nos padrões utilizados, seis compostos puderam ser identificados: o ácido cafeico, ácido p-cumárico, crisina, kaempferol, quercetina e sakuranetina. Conforme os picos identificados na Figura 2, os flavonoides sakuranetina (3) e crisina (4) estão praticamente ausentes no extrato aquoso (EAP) e no extrato com baixo teor de etanol (EHP30), indicando que esses não são solúveis em soluções polares. Com o aumento da fração de etanol, esses compostos são identificados no extrato, assim como, o aumento na concentração do ácido cafeico (1) e ácido p-cumárico (2).

No cromatograma correspondente ao extrato EHP30, nota-se que a intensidade correspondente à presença de ácido cafeico é maior que as observadas para os demais extratos e que o teor de ácido p-cumárico aumenta com o teor de etanol no extrato em concordância com as análises espectroscópicas, indicando composições similares para os extratos etanólicos (EHP50, EHP70 e EEP). Análises também foram conduzidas no comprimento de onda de 380nm que confirmam a presença de quercetina e kaempferol (não apresentados).

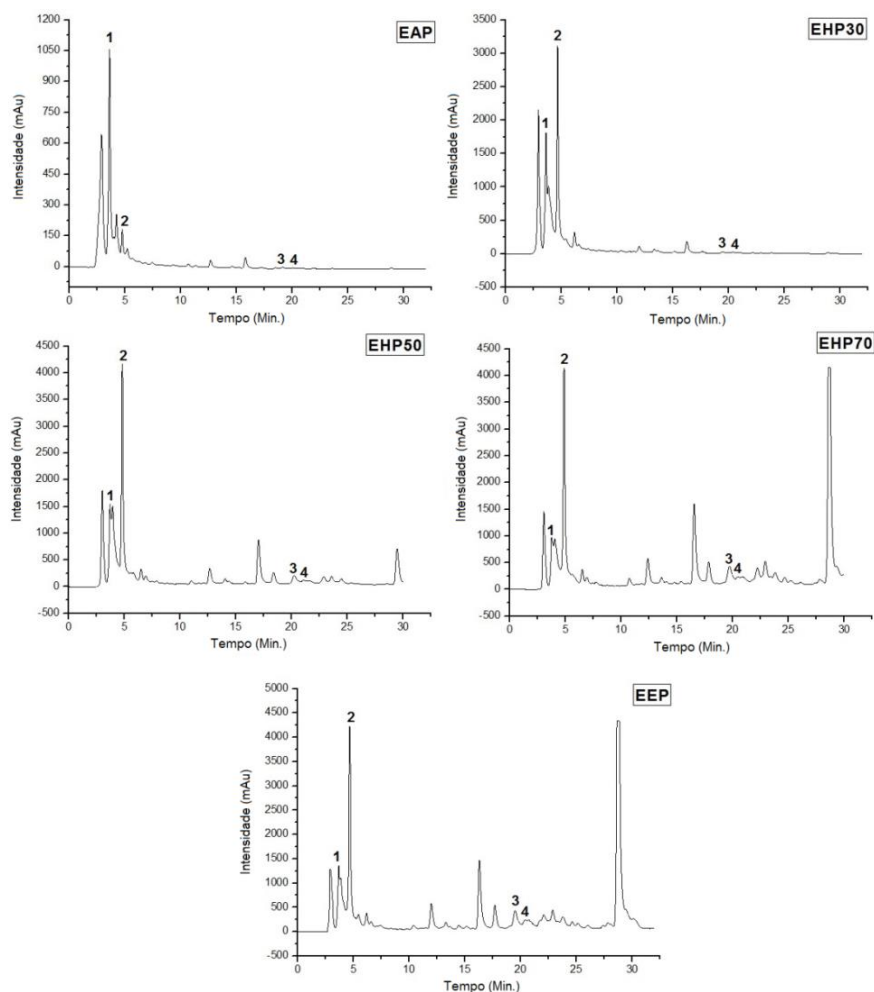


Figura 2. Cromatogramas em CLAE dos extratos de própolis (realizados em 290nm). Os picos foram identificados como: (1) Ácido cafeico, (2) ácido p-cumárico, (3) sakuranetina, e (4) crisina.

Os valores obtidos estão em concordância com os dados disponíveis na literatura (Park & Ikegaki, 1998), corroborando para a afirmação de que o aumento da concentração de etanol aumenta a presença de compostos flavonoides. Em análise por CLAE realizada por Sun et al. (2015), além de evidenciar a influência da polaridade dos solventes ficou demonstrado também que nos extratos contendo concentrações de etanol igual ou acima de 50%, além dos ácidos fenólicos apolares, há a presença de fenóis fraco-polares como os flavonoides.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As atividades antibacterianas dos extratos de própolis verde, testadas contra as bactérias *S. aureus* (Gram-positiva) e *E. coli* (Gram-negativa), resultaram nos MICs apresentados na Tabela 1, com os valores obtidos pela análise do etanol absoluto para efeito de interpretação de ação antimicrobiana.

Tabela 1. Concentrações inibitórias mínimas (MIC) dos extratos para *S. aureus* e *E. coli*.

Bactéria	Concentração inibitória mínima MIC (mg/ml)					
	EAP	EHP30	EHP50	EHP70	EEP	Etanol absoluto
<i>S. aureus</i>	I.N.O.*	34,38	2,15	0,54	0,13	4,30
<i>E. coli</i>	I.N.O.*	68,75	43,38	8,59	4,30	8,59

* I.N.O.: Inibição não observada.

Os dados de MIC indicam a forte influencia da presença de etanol, seja na extração de compostos ativos (como identificados nas análises precedentes), seja na direta ação antimicrobiana. Temos que o etanol *per si* atua como inibidor do crescimento de ambas as bactérias testadas, com eficiência superior ao extrato aquoso (EAP) e aqueles com proporção de 30 e 50% (EHP30 e EHP50), para testes contra a bactéria *E. coli*. Esses resultados indicam que os teores de fenólicos e flavonoides nestes compostos (Fig. 1) não apresentam ação antimicrobiana sinérgica sobre a *E. coli*. O que foi observado para os extratos EHP70 e EEP, nos quais os teores de fenólicos são consideravelmente maiores que nos demais, confirmando a bioatividade desses compostos em bactérias gram-negativas.

Pode-se afirmar que a bactéria gram-positiva *S. aureus* é consideravelmente mais sensível à ação do etanol, com uma crescente diminuição da MIC para maiores teores do solvente. Neste caso fica igualmente evidente a ação dos compostos flavonoides na redução do crescimento bacteriano em meio de cultura. A ação mais efetiva de flavonoides e compostos não-polares contra bactérias gram-positivas do que em gram-negativas já foram discutidas por Silici & Kutluca, (2005) e Uzel et al., (2005).

No geral os resultados revelam a dependência da espécie microbiana e da formulação dos extratos para que a ação sanitizante se dê de forma satisfatória. Assim, neste estudo tornam-se evidente, com base nas análises microbianas, que o extrato EHP70 apresenta-se eficiente na inibição de ambas as bactérias testadas, contudo o extrato EEP apresenta os menores valores de MIC indicando uma eficiência superior ao EHP70, tornando-o indicado ao emprego como sanitizante líquido.

Os testes de coleta e inoculação dos resíduos bacterianos obtidos da superfície vítrea, após 2h da pulverização do extrato, não resultou em crescimento de nenhuma das bactérias previamente imobilizadas, indicando uma ação eficiente na redução do crescimento microbial.

Estudos complementares, previamente realizados nestas mesmas condições indicaram por observações microscópicas que os microrganismos sofrem alterações morfológicas, resultando em estruturas disformes e rupturas decorrentes de bacteriólise (Campos et al., 2020). Adicionalmente medidas volumétricas comparativas confirmaram a ocorrência de vazamentos de fluidos intracelulares em razão de rupturas no envelope celular (Campos 2017; Campos et al., 2020).

CONSIDERAÇÕES SOBRE A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS

Segundo revisão apresentada por De Castro (2001), os flavonoides e derivados são os principais agentes associados às atividades antibacterianas de extratos de própolis de diferentes origens. Compostos como quercetina, naringerina, ácido cafeico e ácido cafeico feniletil éster, atuam diretamente sobre o envelope celular alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática desestabilizando o gradiente eletroquímico, o que leva à interferência sobre os processos essenciais para a manutenção do microrganismo. Os flavonoides seriam responsáveis por danos irreversíveis à membrana, por meio de lise osmótica que leva a perda de potássio e demais nutrientes do interior celular (Cushnie & Lamb, 2005), além de atuarem na redução da motilidade bacteriana (Mirzoeva et al., 1997). Essas características são confirmadas no presente estudo no qual os extratos identificados como EHP70 e EEP foram os que apresentaram maiores teores de compostos fenólicos e consequentemente maiores atividades antimicrobianas (menores MICs).

Com respeito ao comportamento da ação do extrato de própolis aos diferentes tipos de bactérias, a intensidade da atividade antimicrobiana é atribuída às diferenças nas estruturas e composição da membrana bacteriana (Grange & Davey, 1990; Mirzoeva et al., 1997)

4 CONCLUSÕES

Extratos de própolis verde a base de água e etanol apresentaram atividades antimicrobianas quando avaliadas contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em análises *in vitro*. As melhores atividades foram encontradas nos extratos com altos teores de etanol empregado como solvente na proporção de água etanol de 30:70 e 0:100 % (v/v), identificados como EHP7 e EEP, respectivamente. O extrato totalmente etanólico (EEP) foi o que apresentou maior teor de compostos flavonoides sendo o mais eficiente na inibição de ambas as bactérias, o que resultou em um menor valor de Mínima Concentração Inibitória. Em testes conduzidos por aplicação na forma de spray sobre os microrganismos imobilizados sobre superfície sólida, simulando pontos de exposição e vendas de hortifrutícolas, este extrato foi capaz de anular o crescimento dos microrganismos, conforme medidas realizadas após 2 horas de interação.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao CNPq e à Rede AgroNano (Embrapa) por suporte financeiro. Expressam também sua gratidão ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (UFSCar) e à CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, M. V.; PONCE A. G.; GOYENECHÉ R.; MOREIRA M. R. Physical treatments and propolis extract to enhance quality attributes of fresh-cut mixed vegetables. **Journal of Food Processing and Preservation**, 41: e13127, 2016.

BERRETTA, A. A.; ARRUDA, C.; MIGUEL, F. G. et al., Functional properties of Brazilian propolis: from chemical composition until the market. In *Superfood and functional food: an overview of their processing and utilization* (Waisundara, V. and Shiomi, N. Eds.), Croatia: InTech, pp. 55-98, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2001.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E. M.; DOS SANTOS, J. M. T.; DA ROSA, M. R., QUINÁIA, S. P.; TORRES, Y. R. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, 32: 296-302, 2009.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, 73: S1-S6, 2002.

CAMPOS, J. V. **Avaliação da atividade antimicrobiana e análise morfológica por microscopia de força atômica (AFM) da ação de extratos de própolis verde sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal de São Carlos, 2017.

CAMPOS, J. V.; ASSIS, O. B. G.; BERNARDES-FILHO, R. Atomic force microscopy evidences of bacterial cell damage caused by propolis extracts on *E. coli* and *S. aureus*. **Food Science and Technology**, 40: 55-61, 2020

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. **Journal of Ethnopharmacology**, 101: 243–248, 2005.

DE CASTRO, S. L. Propolis: Biological and pharmacological activities, therapeutic uses of this bee-product. **Annual Review of Biomedical Science**, 3: 49-83, 2001.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Brandão; H. M. **Compositions based on propolis nanocapsules which can be used as carriers for substances of interest, methods for producing same and use thereof**. US Patent 2013/0295181 A1, 2013.

FEÁS, X.; PACHECO, L.; IGLESIAS, A.; ESTEVINHO, L. M. Use of propolis in the sanitization of lettuce. **International Journal of Molecular Sciences**, 15:12243-12257, 2014.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, 26: 171-178, 2006.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee World**. 60: 59-84, 1978.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, 83: 159-160, 1990.

KAMEYAMA, O.; JÚNIOR, J. A.; TEIXEIRA, J. M. A.; DE ANDRADE, N. J.; MININ, V. P. R.; SOARES, L. S. Extrato de própolis na sanitização e conservação de cenoura minimamente processada. **Revista Ceres**, 55: 218-223, 2008.

MACHADO, B. A. S.; CRUZ, L. S.; NUNES, S. B.; GUEZ, M. A. U.; PADILHA, F. F. Prospective study of propolis and related technologies in focus in patent documents deposited in Brazil. **Revista Geintec**, 3: 221-235, 2012.

MARCUCCI, M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, 26: 83-99, 1995.

MELLO, B. C. B. S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30: 166-172, 2010.

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**, 152: 239-246, 1997.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of Preparations. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 62: 2230-2232, 1998.

PEREIRA, A.; SEIXAS, F.; NETO, F. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, 25: 321-326, 2002.

RAMOS, S. F. N.; MIRANDA, J. L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 13: 697-710, 2007.

SANTANA, H. F.; BARBOSA, A. A. T.; MANTOVANI, H. C. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28: 485-491, 2012.

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**, 99: 69-73, 2005.

SIMÕES, C. C.; DE ARAÚJO, D. B.; DE ARAÚJO, R. P. C. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18: 84-89, 2008.

SOUSA, J. P. B.; BUENO, P. C. P.; GREGÓRIO, L. E.; DA SILVA-FILHO, A. A.; FURTADO, N. A. J. C.; DE SOUSA, M. L.; BASTOS, J. K. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, 30: 2656-2665, 2007.

SUN, C.; WU, Z.; WANG, Z.; ZHANG, H. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**. 2015:595393, 9 p, 2015.

SWERTS, M. S. O.; COSTA, A. M. D. D.; FIRINI, J. E. Associação de clorexidina e própolis atuando na inibição da aderência de *Streptococcus spp.* **Revista Internacional de Periodontia Clínica**, 2: 10-16, 2005.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ONÇAĞ, O.; ÇOĞULU, D.; GENÇAY, Ö.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, 160: 189-195, 2005.