

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE TRÊS ESTADOS BRASILEIROS SOBRE *AEROMONAS HYDROPHILA* ISOLADAS DE PEIXES

N.P.C. Andrade¹, E.M.S da Silva¹, R.A. Mota²,
J.L.A. Veschi³, M.F. Ribeiro³, C.C. Krewer¹, M.M. da Costa¹

¹Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Zootecnia, Rodovia BR 407, km 12, Lote 543, Projeto de Irrigação Nilo Coelho, s/n C1, CEP 56300-000, Petrolina, PE, Brasil. E-mail: naraegabriel@hotmail.com

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade *in vitro* de *Aeromonas hydrophila* frente a extratos etanólicos de própolis (uma verde e duas marrons) obtidos em três estados brasileiros (Minas Gerais, Ceará e Pernambuco). Para verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis, 15 isolados de *A. hydrophila* foram testados para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos. Curvas de sobrevivência para o crescimento bacteriano foram determinadas pela incubação dos isolados em extratos etanólicos de própolis a 15% por 24 horas. As médias da CBM dos extratos de própolis foram 1,68% para a própolis verde, 2,31% para a própolis marrom do Ceará e 3,75% para a própolis marrom de Pernambuco. A curva de sobrevivência dos isolados demonstrou uma inibição parcial com até três horas de incubação. Este resultado é compatível com o efeito bacteriostático da própolis, o que pode ser de interesse para a terapia em aquicultura, como alternativa às poucas drogas antimicrobianas disponíveis.

PALAVRAS-CHAVE: Aquicultura, *A. hydrophila*, apicultura, resistência, própolis.

ABSTRACT

EVALUATION OF ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS FROM THREE BRAZILIAN STATES FOR IN-VITRO ANTIMICROBIAL ACTIVITY ON *AEROMONAS HYDROPHILA* ISOLATED FROM FISH. The present study was aimed to evaluate the in-vitro susceptibility of *Aeromonas* spp. to ethanolic extracts of propolis (one green and two brown) from three Brazilian states (Minas Gerais, Ceará and Pernambuco). In order to verify the antimicrobial activity of the propolis in vitro, 15 *Aeromonas* spp. isolates were tested to determine the minimal bactericidal concentration (MBC) of the extracts. Ethanol at 70% was used as a control. Survival curves for the bacterial growth were determined by incubation of the isolates in ethanolic extracts of propolis at 15% for 24 hours. The averages of the MBC of propolis extracts were 1.68% for the green propolis of Minas Gerais, 2.31% for the brown propolis of Ceará, and 3.75% for the brown propolis of Pernambuco. The survival curve of the isolates showed partial inhibition until three hours of incubation. This result is compatible with the bacteriostatic effect of propolis that may be useful to antibiotic therapy in aquaculture, as an alternative to few available antimicrobial drugs.

KEY WORDS: Aquaculture, *A. hydrophila*, apiculture, resistance, propolis.

INTRODUÇÃO

A aquicultura é a atividade zootécnica de grande crescimento mundial (TSUKAMOTO; TAKAHASHI, 1992). A piscicultura intensiva pode proporcionar o aumento da prevalência de enfermidades nos sistemas de produção inclusive no Brasil (COSTA, 2003). As bactérias disseminadas no ambiente aquático são patógenos oportunistas e podem infectar os

peixes quando eles se encontram em condições desfavoráveis (BARJA; ESTEVES, 1988). As bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio anguillarum* e *Edwardsiella tarda* fazem parte do ambiente aquático, da pele, brânquias e intestino dos peixes (PLUMB, 1994). *Aeromonas* spp. são consideradas bactérias patogênicas para várias espécies de peixes e sua resistência aos beta-lactâmicos é crescente (SAAVEDRA *et al.*, 2004).

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, PE, Brasil.

³Embrapa Semiárido - CPATSA, Petrolina, PE, Brasil.

O uso indiscriminado de drogas antimicrobianas, tanto para a terapia de doenças, como para promoção de crescimento, seleciona bactérias resistentes. Além da seleção natural de bactérias resistentes após a morte das sensíveis, há também a possibilidade da transferência dos genes de resistência às outras que nunca foram expostas a tal antibiótico (VERSCHUERE *et al.*, 2000). Segundo FRANCO *et al.* (2007), estudos na elaboração de novos aditivos têm sido realizados na intenção de substituir estes promotores de crescimento.

As abelhas possuem capacidade seletora, sendo que coletam as resinas de que necessitam das plantas. Estas resinas possuem um eficiente poder protetor, uma vez que contêm produtos de elevadas qualidades antimicrobianas e imunológicas. A própolis constitui-se um exemplo de extrato de origem vegetal, elaborado de forma natural pelas abelhas (*Apis mellifera*) para vedar aberturas e controlar microorganismos em suas colônias (CUETO, 1989).

Devido à atividade biológica como substância antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antifúngica, antimicrobiana e antitumoral, a própolis vem sendo utilizada na medicina tradicional desde a antiguidade (KUJUMGIEV *et al.*, 1999; BANSKOTA *et al.*, 2000; SFORCIN *et al.*, 2000; MARCUCCI *et al.*, 2001). A própolis pode substituir ou reduzir o uso de drogas antimicrobianas na área zootécnica por ter a vantagem de ser um produto natural (GARCIA *et al.*, 2004a). Dentre as propriedades biológicas da própolis, a antimicrobiana tem sido a mais estudada. Autores afirmam que a própolis é ativa principalmente contra bactérias Gram positivas e tem atividade limitada contra bactérias Gram negativas (GARCIA *et al.*, 2004a).

Estudos com finalidade de esclarecer o efeito dos extratos de própolis contra *Aeromonas* spp. são necessários para utilizá-la como uma alternativa antibioticoterápica. Segundo AKINBOWALE *et al.* (2006) e CABELLO (2006), o uso contínuo de antibióticos tem sido associado a riscos ao meio ambiente e à saúde pública. Assim, a substituição desses por produtos naturais torna-se importante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade *in vitro* de 15 isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de peixes frente a extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

Os isolados de *A. hydrophila*, obtidos de peixes, eram pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Campus Ciências Agrárias, Petrolina, PE.

A própolis verde foi coletada em Minas Gerais (PV) e as marrons, respectivamente, nos estados do Ceará (PMCE) e Pernambuco (PMPE).

Preparo do extrato de própolis

Foram preparados extratos etanólicos da própolis verde e das própolis marrons através do padrão oficial para o extrato conforme metodologia descrita na Instrução Normativa nº 3, de 19/01/2001, do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (maceração a frio de 300 g de própolis bruta em 700 mL de etanol 70%) (BRASIL, 2001). A preparação foi estocada em temperatura ambiente e protegida da luz por um período de 45 dias. Após este período, o extrato foi filtrado com o auxílio de um funil e filtro de papel previamente autoclavados. Os extratos foram então mantidos refrigerados em frascos âmbar até sua utilização.

Teste da atividade antimicrobiana *in vitro*

A determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de própolis para bactérias aeróbicas seguiu descrições do protocolo M7-A7 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLINICAL..., 2006). Os extratos previamente preparados (300.000 µg/mL) foram diluídos em 200 µL (1:2) de caldo Muller-Hinton (MH) utilizando microplacas, nas proporções 150.000 µg/mL, 75.000 µg/mL, 37.500 µg/mL, 18.750 µg/mL, 9.375 µg/mL, 4.685,50 µg/mL, 2.343,75 µg/mL e 1.171,87 µg/mL. Para verificar o efeito antimicrobiano associado ao etanol 70% e não a própolis, esse composto foi submetido às mesmas diluições da própolis. Na preparação do inóculo, colônias bacterianas em solução salina foram utilizadas para a obtenção de uma suspensão com turvação equivalente a escala 0,5 de Mac Farland (10⁶ Unidades Formadoras de Colônia). Desta suspensão foram transferidos 100 µL para o tubo contendo 9,9 mL também de solução salina, sendo que 10 µL (10⁴ UFC) foram colocados em cada poço contendo a diluição dos extratos de própolis. As placas foram incubadas a 27° C por 24h. Após esse período, foi retirada uma alíquota de 10 µL de cada poço e semeada na superfície de ágar MH incubando-a novamente por mais 24 h a 27° C, para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), que foi considerada como a menor concentração dos extratos etanólicos em estudo capaz de causar a morte do inóculo, sendo esta determinada pelo não crescimento do inóculo no ágar. Os ensaios foram realizados em triplicata. Como controle, os isolados foram semeados em caldo MH, bem como foi utilizado caldo MH sem inóculo, conforme descrições da CLSI (2006).

Curva de sobrevivência

Para preparação dos inóculos, colônias bacterianas em solução salina foram utilizadas na obtenção de uma suspensão com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland. De cada suspensão foram transferidos 100 µL (10⁶ UFC) para os respectivos tubos contendo 9,9 mL também de solução salina, 1 mL a suspensão de cada bactéria foi inoculado em cada um de uma série de 5 tubos contendo 3 mL de *brain heart infusion* (BHI) previamente autoclavados. No 1º tubo foram adicionados 150 µL do extrato da própolis marrom do Estado de Pernambuco, no 2º a mesma quantidade do extrato do Estado do Ceará, no 3º o da própolis verde do Estado de Minas Gerais, no 4º, o etanol 70% e no 5º apenas o caldo BHI como controle. Após esse processo, retirou-se 1 mL com 3, 12 e 24 horas de incubação de cada tubo e colocados em tubos contendo 9 mL de solução salina fazendo assim uma diluição decimal até 10⁻⁵. Na sequência, foi retirado 1 mL de cada tubo e semeados em placas de Petri, em ágar padrão de contagem (PCA). As semeaduras foram realizadas em duplicata. Após incubação de 24h a 27° C, o número de UFC foi determinado.

Análise estatística

Para a curva de sobrevivência o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 15 isolados de *A. hydrophila* x cinco condições (BHI, BHI + etanol 70%, PV, PMCE e PMPE) e três repetições. Nas comparações foi utilizada análise de variância (programa Statistica, v. 5.0), sendo considerado o valor de significância de P < 0,05.

RESULTADOS

Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos diferentes extratos de própolis

Os 15 isolados de *Aeromonas* spp. foram sensíveis aos extratos etanólicos dos três tipos de própolis. As Concentrações Bactericidas Mínimas dos extratos de própolis encontram-se descritas na Tabela 1. A própolis verde foi a que apresentou maior atividade com uma CBM média de 16.935,50 µg/mL, sendo esta menor do que as apresentadas pelas própolis marrons.

Curva de sobrevivência bacteriana frente aos extratos de própolis

A análise da curva de sobrevivência das bactérias frente aos extratos de própolis demonstrou que redução nas contagens de UFC dos isolados somente foi observada nas primeiras três horas de incubação (Tabela 2).

Tabela 1 - Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis (verde, marrom do Estado do Ceará e marrom do Estado de Pernambuco) frente aos isolados de *A. hydrophila* obtidas de peixes.

Própolis	Concentração Bactericida Mínima (CBM) (µg/mL)	
	Variação	Média
PV (MG)	4,685,50 - 37.500	16.935,50
PM (CE)	9.375 - 37.500	23.288,29
PM (PE)	18.750 - 75.000	37.500

Legenda: PV: Própolis Verde do Estado de Minas Gerais, PMCE: Própolis Marrom do Estado do Ceará, PMPE: Própolis Marrom do Estado de Pernambuco.

Tabela 2 - Contagem de Unidades formadoras de colônia (UFC) por mL x 10⁶ de isolados de *A. hydrophila* em BHI, BHI + etanol 70% e extratos etanólicos de própolis (verde, marrom do Estado do Ceará e Estado de Pernambuco) em três horas.

Isolado	3 horas				
	PMCE	PMPE	PV	Al	BHI
P4	0,231Aab	0,024Dab	0Eb	0,061Bab	0,029Ca
P8	0,188Aabc	0,083Bab	0,017Bab	0,189Aab	0,028Ca
P18	0,020Abcd	0,013Cab	0,011Dbc	0,018A,Bab	0,017Ba
P19	0,030Abcd	0,038Aab	0,004Bbc	0,048Aab	0,149Aa
P22	0,559Ba	0,022Dab	0,469Ca	0,620Aab	0,523Ba
P25	0,023Bbcd	0,099Aa	0,003Cbc	0,024Bab	0,082Aa
P34	0,019ABcd	0,035ABab	0,003Bc	0,009ABb	13,402Aa
P37	0,012b	0,028ab	0,002bc	277,773a	0,014a
P38	0,030ABbcd	0,052Aab	0,008Bbc	0,013ABb	0,030ABa
P47	0,018cd	0,025ab	0,006bc	0,010b	0,034a
P78	0,007Bd	0,043ABab	0,005Bbc	0,010Bb	0,103Aa
P79	0,005d	0,021b	0,006b	0,043ab	0,046a
P80	0,028bcd	0,016ab	0,023ab	0,025ab	0,029a
P82	0,095ABbcd	0,020Aa	0,003Bbc	0,004ABb	0,016ABa
P83	0,017cd	0,023ab	0,009c	0,015b	0,030a

Tabela 3 - Contagem de Unidades formadoras de colônia (UFC) por mL x 10⁶ de isolados de *A. hydrophila* em BHI, BHI + etanol 70% e extratos etanólicos de própolis (verde, marrom do Estado do Ceará e Estado de Pernambuco) em 12 horas.

Isolado	12 horas				
	PMCE	PMPE	PV	AI	BHI
P4	916,667Cab	1111,200Aa	2,216Eabc	5,675Da	977,133Ba
P8	104,100Ecd	820,633Aa	150,933Dab	425Ca	664Ba
P18	307,800Cbc	804,833Aa	5,230Eabc	59,040Da	405,800Ba
P19	490,333Bb	964,333Aa	52,650Dab	86,163Ca	988,100Aa
P22	0,517Ce	0,018Ec	0,405Dbc	5,825Aa	5,29Bb
P25	1954,000Aa	736,833Da	302,733Ea	968,500Ca	1551,633Ba
P34	630,600Aab	871,000Aa	127,771Babc	220,200Aa	1054,133Aa
P37	0,738e	22,180b	0,228c	628,335a	158,367ab
P38	576,767ab	653,867a	158,729 ab	244,557a	323,300a
P47	589,300ab	805,433a	147,128abc	68,542a	584,933ab
P78	84,543ABd	922,000Aa	23,716Bab	7,801Ba	1752,567Aa
P79	1013,467ab	988,200a	631,067a	192,733a	1842,673a
P80	72,097d	364,027a	33,119abc	19,493a	763,167a
P82	853,500ABab	1507,067Aa	279,067Ba	119,633Ba	1776,433Aa
P83	973,900Bab	1810,100ABa	580,367Ba	675,967Ba	2550,300Aa

Tabela 4 - Contagem de Unidades formadoras de colônia (UFC) por mL x 10⁶ de isolados de *A. hydrophila* em BHI, BHI + etanol 70% e extratos etanólicos de própolis (verde, marrom do Estado do Ceará e Estado de Pernambuco) em 24 horas.

Isolado	24 horas				
	PMCE	PMPE	PV	AI	BHI
P4	652,733Cc	2890,700Babcd	683,600Cabc	866,000Dab	3665,200Aabc
P8	219,933Ed	3288,500Aabc	18,820Dd	817,800Cab	1264,433Bcde
P18	3015,633Aab	920,400CEe	479,300Eabc	1545,200Bab	716,333De
P19	2701,400Bab	6722,033Aa	60,733Dcd	2755,200Aab	826,133Bde
P22	55,373Be	14,613Cf	0,240De	66,863Ac	59,163Bf
P25	1793,833Cab	6018,000Ba	465,700Eabc	1478,233Dab	9221,000Aa
P34	1566,333abc	1543,200cde	1512,850a	695,500abc	3148,800bcde
P37	2349,166ab	2785,733abcd	1145,933ab	1301,500ab	2035,000bcde
P38	1269,200bc	1299,966de	476,476bcd	721,219bc	1988,000bcde
P47	1735,933abc	1474,866cde	743,100abc	1343,200abc	2712,000abcd
P78	3458,400ABa	4560,400Aab	2167,899Ba	3119,500ABab	4710,000Aab
P79	4693,133a	2740,767bde	3559,933a	4308,300a	3935,600abc
P80	1692,667AB-Cabc	1840,800ABbde	1188,500BCa	1030,400Cab	1969,267Abcde
P82	3463,367ab	2595,833bde	1719,367ab	1390,200ab	3952,933abc
P83	2197,967ab	2007,033bde	1838,100a	2417,900ab	2044,650bcde

No tempo de três horas, foram observadas diferenças significativas estatisticamente entre os controles BHI e BHI + etanol 70% e os tratamentos PV em seis isolados (40%), PMCE em quatro isolados (26,67%) e PMPE em quatro isolados (26,67%). No tempo de 12 horas as diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os controles e as própolis em seis isolados (40%) para as PV e PMCE e quatro isolados (26,67%) para a PMPE (Tabela 3). Após 24 horas de incubação, diferenças estatísticas foram observadas nas contagens de UFC em seis isolados (40%) para PV e quatro (26,67%) isolados para PMCE e PMPE (Tabela 4).

Também foram observadas diferenças significativas no número de UFC obtidas após incubação com as diferentes própolis. A própolis verde apresentou

as menores contagens na maioria dos tempos de avaliação, bem como nos diferentes isolados de *A. hydrophila* (80% em 3h, 60% em 12h e 66,67% em 24h). Além disso, a atividade antimicrobiana também variou entre os isolados de *A. hydrophila* analisados.

DISCUSSÃO

Todos os isolados de *A. hydrophila* testados foram sensíveis a diferentes concentrações de própolis. Variações são descritas no poder antimicrobiano da própolis frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas (VARGAS *et al.*, 2004; LOGUERCIO *et al.*, 2006). As diferenças de sensibilidade podem estar associadas à composição da parede celular, sendo que as

bactérias Gram positivas possuem várias camadas de peptidoglicano, enquanto que as Gram-negativas possuem uma camada fina e interna. Além desta camada, as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa de lipopolissacarídeos e proteínas, o que dificulta a lise destas bactérias (MIRZOEVA *et al.*, 1997).

As CBMs obtidas nesse estudo foram maiores que a concentração de 80 µg/mL descrita por AZZA; ABD-EL-RHMAN (2009) com própolis do Egito frente a um isolado de *Aeromonas* spp. Como é bem conhecido, própolis de diferentes origens geográficas, em especial no Brasil e Europa, apresentam diferentes compostos químicos responsáveis pela atividade antimicrobiana (DE VECCHI; DRAGO, 2007). Esses resultados divergentes podem estar relacionados à diferença da flora e clima entre Brasil (tropical ou subtropical) e Egito (temperado) (ORSI *et al.*, 2007; KUJUMGIEV *et al.*, 1999). As diferenças de sensibilidade à própolis, nos relatos da literatura, podem ser justificadas pelas variações na composição observadas das própolis de diferentes regiões, tipo de diluente e concentrações de teste (PARK *et al.*, 2002; GARCIA *et al.*, 2004b). Outros autores trabalhando com bactérias de interesse à saúde humana, animal e vegetal com diferentes concentrações de própolis obtiveram resultados diversos. BIANCHINI; BEDENDO (1998), ao verificar o efeito antimicrobiano de extrato aquoso de própolis a 10%, observaram elevado percentual de sensibilidade de isolados de *Erwinia chrysanthemi*, enquanto que a *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci* mostrou-se resistente. VARGAS *et al.* (2004) encontraram sensibilidade em 42,5% das bactérias Gram-negativas testadas ao extrato alcoólico a 50% de própolis. MIRZOEVA *et al.* (1997), utilizando a própolis para observar a sensibilidade de bactérias Gram negativas, concluíram que a própolis apresentou efeito antimicrobiano contra *Rhodobacter sphaeroides* e, portanto, seus resultados foram semelhantes aos obtidos neste estudo.

Quando analisados em conjunto, os resultados dos testes de CBM e da curva de sobrevivência podemos observar que a própolis verde apresentou maior potencial antimicrobiano diferindo das própolis marrons na maioria dos isolados avaliados. Estudos têm demonstrado que a própolis verde possui maior atividade antimicrobiana quando comparada com a marrom (SALANTINO *et al.*, 2005; FARNESI *et al.*, 2009).

O efeito antimicrobiano das própolis foi acentuado apenas nas três primeiras horas de incubação, indicando um efeito bacteriostático como recomendado por Cos *et al.* (2006) e pelo CLSI (2006). Além disso, a própolis verde apresentou maior redução nas contagens de UFC comparada com as própolis marrons. Estes resultados diferem de outros descritos na literatura, nos quais a própolis apresentou inibição

total (efeito bactericida) de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* numa concentração de 3,0 e 2,0 mg/mL (PINTO, 2000) e *Salmonella* spp. em uma concentração de 8,54% (ORSI *et al.*, 2007). Resultados semelhantes aos deste trabalho foram descritos em *Staphylococcus aureus* por LU *et al.* (2005), sendo que estes relacionaram a atividade da própolis com a fase de crescimento microbiano, maior na midi-log. Outra possibilidade seria a ocorrência de heteroresistência nos isolados, contudo requer confirmação. Ainda, houve diferenças entre os perfis de sobrevivência dos isolados, para um mesmo tratamento. Estes resultados indicam a importância do uso de várias amostras em particular de micro-organismos patogênicos para estudos desta natureza.

As diferenças entre os testes de atividade antimicrobiana realizados nesse estudo (CBM e curva de sobrevivência) são evidentes e podem estar associados ao volume de inóculo utilizado na cultura bacteriana após incubação. A escolha dos testes para busca da atividade antimicrobiana é muito importante, uma vez que dos seus resultados dependem a validação de um composto como antimicrobiano (Cos *et al.*, 2006). Segundo HADACEK; GREGER (2000), os resultados de um teste de atividade antimicrobiana podem variar de acordo com o método escolhido, uma vez que a precisão de cada técnica é diferente.

Nas condições do presente estudo, conclui-se que os extratos etanólicos das três própolis avaliadas mostraram efeito bacteriostático contra os isolados de *A. hydrophila*.

AGRADECIMENTOS

À Associação dos Criadores de Abelha do Município de Petrolina (ASCAMP) pela doação das própolis brutas.

REFERÊNCIAS

- AKINBOWALE, O.L.; PENG, H.; BARTON, M.D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, v.100, n.5, p.1103-1113, 2006.
- AZZA, M.M.; ABD-EL-RHMAN. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, v.27, n.3, p.454-459, 2009.
- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I.K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.G.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, v.72, n.1/2, p.239-246, 2000.

- BARJA, J.L.; ESTEVES, A.T. Enfermidades bacterianas. In: *Patologia acucultura*. Espanha: Caicyt, 1988. 550p.
- BIANCHINI, L.; BEDENDO, I.P. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Scientia Agricola*, v.55, n.1, 1998.
- BRASIL. Instrução Normativa n.3 de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis.
- CABELLO, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, v.8, n.7, p.1137-1144, 2006.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing*. Approved standard M100-S17, 17th.ed. Wayne, Pa.: CLSI, 2006. Disponível em: <<http://www.clsi.org/>>.
- COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, v.106, n.3, p.290-302, 2006.
- COSTA, A.B. *Caracterização de bactérias do complexo Aeromonas isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica*. 2003. 54f. Tese (Doutorado em Agronomia - Área de Concentração Ciência Animal e Pastagens) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- CUETO, D.J. Experiência clínica de los medicamentos elaborados com propoleo. In: ASIS, M. (Ed.). *Investigaciones cubanas sobre el propoleo*. Memórias del 1º Simpósio sobre los efectos del propoleo em la salud humana y animal. 1988. Varadero. Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinária, Cuba, 1989.
- DE VECCHI, E.; DRAGO, L. Attività antimicrobica della propoli: casa c'è di nuovo. *Le Infezioni in Medicina*, n.1, p.7-15, 2007.
- FARNESI, A.P.; AQUINO-FERREIRA, R.; DE JONG, D.; BASTOS, J.K.; SOARES, A.E.E. Effects of stingless bee and honey bee própolis on four species of bacteria. *Genetics and Molecular Research*, v.8, n.2, p.635-640, 2009.
- FRANCO, S.S.; ROSA, A.P.; LENGELER, S.; UTPATEL, R.; ZANELLA, I.; GRESSLER, C.; SOUZA, H.M. Índices produtivos e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de extrato etanólico de própolis ou promotores de crescimento convencionais. *Ciência Rural*, v.37, n.6, p.1765-1771, 2007.
- GARCIA, R.C.; SÁ, M.E.P.; LANGONI, H.; FUNARI, S.R.C. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida* in vitro e em coelhos. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v.26, n.1, p.69-77, 2004a.
- GARCIA, R.C.; SÁ, M.E.P.; LANGONI, H.; FUNARI, S.R.C. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre o perfil bioquímico e o desempenho de coelhos jovens. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v.26, n.1, p.57-67, 2004b.
- HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay of choice. *Phytochemical Analysis*, v.11, n.3, p.137-147, 2000.
- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, v.64, n.3, p.235-240, 1999.
- LOGUERCIO, A.P.; GROFF, A.C.M.; PEDROZZO, A.F.; WITT, N.M.; SILVA, M.S.; VARGAS, A.C. Atividade in vitro do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.2, p.347-349, 2006.
- LU, L.; CHEN, Y.; CHOU, C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, v.102, p.213-220, 2005.
- MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.de; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. 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.
- ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C.; FERNANDES-JUNIOR, A.; RODRIGUES, P.; BANKOVA, V. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on *Salmonella* serovars. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v.13, n.4, p.748-757, 2007.
- PARK, Y.K.; ALENKAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.
- PINTO, M.S. *Efeito antimicrobiano de própolis verde do estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite*. 2000. 104f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.
- PLUMB, J.A. *Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes*. New York: CRC, 1994. 254p.
- SAAVEDRA, M.J.; GUEDES-NOVAIS, S.; ALVES, A.; REMA, P.; TACÃO, M.; CORREIA, A.; MARTINEZ-MURCIA, A. Resistance to beta-lactam antibiotics in

Aeromonas hydrophila isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Microbiology*, v.7, n.3, p.207-211, 2004.

SALANTINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v.2, n.1, p.33-38, 2005.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES-JUNIOR, A.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect of Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.73, n.1/2, p.234-249, 2000.

TSUKAMOTO, R.Y.; TAKAHASHI, N.S. Falta de proteína para ração: estrangulamento da aquicultura no Brasil. *Panorama da Aquicultura*, p.8-9, 1992.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural*, v.34, p.159-163, 2004.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, n.4, p.655-671, 2000.

ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. 4.ed. 1999. 663p.

Recebido em 9/9/10

Aceito em 19/11/11