

Avaliação da atividade antifúngica de formulações semi-sólidas contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha.

F. O. Bittencourt¹; F. F. Padilha²; A. L. Siqueira²; C. G. Dantas²; L. S. Mendonça²; Y. L. F. M. Araújo²; E. D. Araújo³; J. C. Cardoso²

¹Departamento de Farmácia/Farmácia, Faculdade Independente do Nordeste, 45055-030, Vitória da Conquista-BA, Brasil

²Departamento de Biomateriais/Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes, 49032-490, Aracaju-SE, Brasil

³Departamento de Biologia/Laboratório de Genética/ Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, Aracaju-SE, Brasil

juaracaju@yahoo.com.br;

(Recebido em 22 de abril de 2014; aceito em 10 de setembro de 2014)

A própolis vermelha, presente no litoral do nordeste brasileiro, representa uma nova variedade de própolis brasileira e tem sido estudada desde 2006, apresentando excelente atividade antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar o potencial antifúngico de formulações tópicas contendo este produto apícola. Os resultados da análise dos flavonóides indicaram que o conteúdo de flavonas e flavonóis no produto foi em torno de 1,8%. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente à *Candida albicans* pelo método de difusão em disco obtendo halo de inibição de 13,18 mm \pm 2,14 em 600 μ g e a concentração fungicida mínima (CFM) foi 647,5 μ g/mL. A formulação foi desenvolvida utilizando como excipientes o creme Lanette[®], creme Polawax[®], o creme-gel Hostacerin[®], o gel Aristoflex[®] e o gel Natrosol (hidroxietilcelulose). A formulação com própolis vermelha que apresentou melhor estabilidade, impressão global e atividade antifúngica (halo de inibição de 16,33 mm \pm 0,58) foi a desenvolvida com o creme Lanette[®].

Palavras-chave: Atividade Antifúngica, Formas Farmacêuticas Semi-sólidas, Própolis vermelha.

Evaluation of antifungal activity of semisolid formulations containing hydroalcoholic extract of red propolis

Red propolis, found in Brazilian Northwest coast, is a new variety of Brazilian propolis and has been studied since 2006, presenting excellent antimicrobial activity. The aim of this work was the development and evaluation of antifungal activity of topical formulations containing red propolis extract. The total of flavonoids found on red propolis extract was 1.8%. The antimicrobial activity was performed against *Candida albicans* by diffusion method and showed inhibition zone of 13.18 mm \pm 2.14 at 600 μ g and the minimum fungicidal concentration (MFC) was 647.5 μ g/mL. The formulation was developed using as excipients the Lanette[™] cream, Polawax[™] cream, Hostacerin[™] cream-gel, the Aristoflex[™] gel and Natrosol[™] gel (hydroxyethylcellulose). The formulation containing red propolis that presented the best stability and antifungal activity (inhibition zone of 16.33 mm \pm 0.58) was with Lanette[™] cream.

Keywords: Antifungal Activity, pharmaceutical semisolid dosage forms, Red Propolis.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais possuem ampla aplicação terapêutica por apresentarem atividade antimicrobiana frente a diferentes micro-organismos e por serem uma alternativa viável para o tratamento de inúmeras doenças infecciosas [1,2]. Diversos estudos têm indicado que a própolis possui um grande potencial terapêutico, destacando-se as atividades anti-inflamatória [3], antimicrobiana e antioxidante [4,5,6].

A composição da própolis é determinada especialmente pelas características fitogeográficas presentes ao redor da colmeia, porém pode variar sazonalmente em uma mesma localidade, o que proporciona uma variação em suas atividades farmacológicas [7,8]. Atualmente existem 13 diferentes tipos de própolis catalogadas no Brasil, sendo esta variação decorrente da biodiversidade e das dimensões geográficas do país [9-11]. A própolis verde é a mais estudada, porém a própolis vermelha tem despertado grande interesse, por ser uma variedade mais rara

encontrada nos estados de Alagoas e Sergipe. Estudos recentes relatam que esta variedade tem apresentado atividades antioxidante e antimicrobiana positivas em testes preliminares *in vitro*, sugerindo que este produto também apresenta potencial farmacológico e composição rica em compostos bioativos [11-16].

Vários medicamentos com ação antifúngica para o tratamento da candidíase encontram-se no mercado, dentre estes os mais utilizados são fluconazol, itraconazol e nistatina. Entretanto, o uso da própolis como medicamento contra a candidíase pode ser uma alternativa aos demais tratamentos [7, 17-20].

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo testar a atividade antimicrobiana da própolis vermelha sergipana frente à *Candida albicans*, desenvolver formulações semi-sólidas de uso vaginal contendo este ativo e verificar o potencial antifúngico das mesmas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material

Foram utilizadas amostras de própolis vermelha, provenientes de apiário situado no município de Brejo Grande/Sergipe/Brasil (S – 10°28'25'' e W – 36°26'12''), coletadas em dezembro de 2006. O material foi armazenado em frasco âmbar previamente identificado e em seguida conservado sob refrigeração. Os excipientes utilizados para a preparação das formas farmacêuticas vaginais foram o creme Polawax[®], o creme Lanette[®], creme-gel Hostacerin SAF[®], gel de hidroxietilcelulose (Natrosol) e gel de Aristoflex[®] todos adquiridos em uma farmácia de manipulação da cidade de Aracaju/SE. Foram utilizados meios de cultura Ágar Sabouraud e Brain Heart Infusion (BHI).

2.2 Obtenção do extrato seco de própolis

Os extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha (EHPV) foram obtidos conforme descrito por Brito et al. [21]. Amostras de 2 g de própolis vermelha foram pesadas e um volume de 200 mL de uma solução etanol a 70% foi adicionado. A extração foi realizada durante um período de 24 horas em temperatura ambiente. Após este período, o solvente foi eliminado por rotaevaporação e o rendimento calculado em relação à massa inicial da própolis antes da extração e expresso em porcentagem.

2.3 Determinação da concentração de flavonóides

O teor de flavonóides no EHPV foi determinado pelo método espectrofotométrico no comprimento de onda 415 nm de acordo com a metodologia descrita por Kosalec et al [22]. O extrato diluído 1:10 (0,5 mL) foi incubado com nitrato de alumínio 10% (m/v) (0,1 mL), etanol 95% (v/v) (1,5 mL), acetato de potássio 1 mol/L (0,1 mL) e água destilada (2,8 mL) por 40 minutos em temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em equivalente de quercetina. Para obtenção da curva padrão foram utilizadas soluções de quercetina em diferentes concentrações (20, 40, 60 e 80 e 100 µg/mL) seguindo o mesmo procedimento descrito para a amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.4 Desenvolvimento da forma farmacêutica

Foram utilizadas 5 bases cosméticas para incorporação do EHPV, sendo duas emulsões (creme Lanette[®] e creme Polawax[®]), um creme-gel (Hostacerin[®]) e dois géis (Aristoflex[®] e Natrosol[®]). Foi preparada uma solução a 7,5% a partir do EHPV, usando como solvente o álcool etílico absoluto. A incorporação foi realizada por meio de diluição geométrica, gerando uma concentração final de 5 mg de própolis/g de base. Formulações com pH 4,4 também foram preparadas utilizando solução de ácido cítrico a 1% para ajuste.

As formulações obtidas foram avaliadas em relação às suas características macroscópicas, tais como separação de fases, precipitação ou turvação, ressecamento, pH, consistência e cor [23]. A determinação da viscosidade aparente das formulações foi realizada utilizando viscosímetro rotativo Visco Star-R Modelo: V 10002 (Fungilab S.A.) com “spindle” R7 ou R6, a 20°C. A velocidade de cisalhamento aplicada foi entre 0,3 a 200 RPM, com 2 minutos de intervalo entre cada medição. As determinações da viscosidade foram realizadas em triplicata [24]. As estabilidades física e térmica das formulações foram avaliadas por centrifugação (High Speed Brushless Centrifuge MPW-3505) a 2325 x g durante 10 minutos nas temperaturas de 25 e 35°C.

2.5 Avaliação da atividade antifúngica do EHPV e das formulações

A cepa de *Candida albicans* (ATCC 10231) utilizada para os testes microbiológicos foi proveniente do Laboratório de Materiais de Referência da Fundação Oswaldo Cruz – INCQS (Rio de Janeiro).

A atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de difusão em disco de acordo com o método descrito anteriormente [25, 26]. Após o revigoramento da cepa, o inóculo foi ajustado de acordo com a escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC) em solução salina. 30 μ L desta cultura foram inoculados por espalhamento em placas contendo ágar Sabouraud, nas quais foram depositados discos de papel filtro impregnados com soluções de extrato de própolis vermelha contendo 80, 200, 400 e 600 μ g e incubados por 24 horas a 37°C. A atividade inibitória foi determinada pela medição da zona de inibição.

Para determinação da concentração fungicida mínima foram utilizados tubos contendo 5,0 mL do caldo BHI, 4 mL de solução de própolis vermelha, seguido de diluição seriada gerando concentrações entre 290 e 14.800 μ g.mL⁻¹ de própolis [27]. Foi adicionado aos tubos 1 mL de inóculo a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC) e incubado por 37°C/24 horas [28, 29]. Após este período, 100 μ L dos conteúdos dos tubos foram inoculados em superfície em placas de ágar Sabouraud e incubados a 37°C/24 horas, sendo este experimento realizado em duplicata. Após o período de incubação, foram observadas as placas que apresentaram crescimento fúngico.

A avaliação da atividade antifúngica das formulações foi realizada seguindo a metodologia descrita por Pereira e Gomez [30], com algumas modificações. Foram adicionados 0,2 mL de amostra em poços com 5 mm de diâmetro perfurados no ágar Sabouraud previamente inoculado. As amostras testadas foram Hostacerin SAF[®] base, Hostacerin SAF[®] com Nistatina 25.000 UI/g, Hostacerin SAF[®] com própolis 5mg/g pH 4,3 e Hostacerin SAF[®] com própolis 5mg/g pH 6,2, Lanette[®] base, Lanette[®] com Nistatina 25.000 UI/g, Lanette[®] com própolis 5 mg/g pH 4,3 e Lanette[®] com própolis 5 mg/g pH 6,2. As placas foram incubadas a 37° C/24 horas e a inibição foi detectada pela presença de halos ao redor dos poços. O experimento foi realizado em triplicata.

2.6 Análise Estatística

A diferença da atividade de extratos de própolis e das formulações foi analisada usando ANOVA one-way seguida por teste de Tukey (p<0,05).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparando-se os dados deste trabalho com os valores da Legislação Vigente [31], constatou-se que os resultados obtidos para teor de cinzas e umidade estão dentro dos limites estabelecidos, ou seja, apresentaram 6,47 % \pm 1,31 para umidade, onde o máximo permitido é de 8% e 4,39% \pm 0,67 para cinzas, onde o máximo permitido é de 5%.

Em relação ao rendimento, a amostra obteve resultado de 43,5%, apresentando valor acima do esperado (mínimo de 35%), mostrando-se solúvel no solvente extrator. O teor de flavonóides em amostras de extrato seco deve apresentar no mínimo de 0,25% (m/m) e na própolis no

mínimo 0,5% (m/m). O teor obtido no extrato etanólico próximo a 2%, caracteriza-o como um extrato que possui médio teor de flavonóides.

A formulação da própolis em gel Natrosol[®] e Aristoflex[®] apresentou imediata separação de fases. Durante o procedimento de incorporação, foi observada a incompatibilidade da solução de própolis vermelha com as referidas bases. No processo de espatulação, houve precipitação de própolis, gerando resíduos na formulação final. Esse evento foi ocasionado devido aos componentes do extrato seco de própolis vermelha que apresentam baixa solubilidade em água. Apesar da utilização de um co-solvente (propilenoglicol), o qual propicia a total solubilização do extrato de própolis vermelha, o alto teor de água na formulação diminui a estabilidade do sistema, facilitando a precipitação do material. Microscopicamente os géis possuem alto teor de resíduos de própolis, entretanto diferentemente do Natrosol[®], o gel Aristoflex[®] não apresentou separação de fases e sim uma baixa solubilidade da própolis da dispersão polimérica.

Na incorporação em creme-gel Hostacerin SAF[®], utilizando a solução de própolis para incorporação, foi observada boa incorporação do produto com quantidade mínima de resíduos. A formulação com Hostacerin[®] não apresentou precipitação após procedimento de incorporação. Microscopicamente a formulação em Hostacerin[®] se assemelha ao gel de Aristoflex[®], mas com uma quantidade muito inferior de resíduos, isso se deve provavelmente ao conteúdo lipofílico do creme-gel. A diminuição do conteúdo aquoso facilitou a incorporação da própolis e solubilização da mesma no meio.

Durante a incorporação nos cremes Polawax[®] e Lanette[®] foi observada uma boa interação das bases com o extrato de própolis. Não existiu separação de fases e precipitação, apenas uma pequena quantidade de resíduos na formulação final. Microscopicamente foi observada uma pequena quantidade de própolis não solubilizada na formulação com o Polawax[®].

O odor antes e após a incorporação da própolis nas bases não foi alterado e a alteração da cor foi devido à característica intrínseca do extrato incorporado. As formulações de própolis com creme Lanette[®], creme-gel Hostacerin SAF[®] e creme Polawax[®] foram as que apresentaram melhor impressão global, sendo as mesmas selecionadas para avaliação da atividade antimicrobiana.

O pH das bases Lanette[®], Hostacerin[®] e Polawax[®], foram 6,3, 6,3 e 6,1, respectivamente. Após incorporação da própolis nas três bases, foi observado que não existiu variação no pH. Quando o pH das formulações foi diminuído para cerca de 4,3, foram observadas mudanças na coloração sem comprometimento da aparência do produto final.

Em relação à estabilidade física do produto, foi observado que os cremes Lanette[®] e Hostacerin[®] apresentaram estabilidade superior ao creme Polawax[®] quando submetidos a condições de estresse térmico e mecânico. O creme Polawax[®] apresentou separação de fases após 10 minutos de centrifugação na temperatura de 33°C. As demais bases testadas não apresentaram separação de fases até a temperatura de 35°C.

Para todas as bases e formulações testadas, os resultados do perfil reológico evidenciaram fluxo não newtoniano, com variação da viscosidade com o grau de cisalhamento aplicado, sendo que a tensão e o gradiente de cisalhamento não foram diretamente proporcionais, originando diferentes valores de viscosidade. Assim, as bases gel Aristoflex[®], gel Natrosol e creme-gel Hostacerin[®] apresentaram fluxo não newtoniano do tipo pseudoplástico tempo independente, com diminuição da viscosidade com o aumento do grau de cisalhamento. Os cremes Lanette[®] e Polawax[®] também apresentaram fluxo não newtoniano do tipo pseudoplástico, porém apresentaram área de histerese, demonstrando um comportamento tempo dependente. Os cremes possuem uma viscosidade menor que as dos géis e uma menor capacidade de retornar a forma original no tempo do experimento. São classificados como tixotrópicos. Os géis apresentaram melhor desempenho reológico, e devido a essa característica são amplamente utilizados como veículos [32].

As formulações semi-sólidas possuem propriedades adequadas para o uso tópico, pois se deformam facilmente quando aplicados. No caso das formulações testadas, uma pequena tensão é capaz de diminuir acentuadamente a viscosidade. Desta forma, o material flui com facilidade. No momento que a tensão é retirada, rapidamente o material se reestrutura e retorna a viscosidades maiores. Neste momento o material já foi aplicado e deve permanecer no ambiente vaginal, sem escorrer.

O creme Lanette[®] apresentou menor viscosidade após incorporação da própolis, porém o ajuste de pH não alterou significativamente a viscosidade aparente (Figura 1).

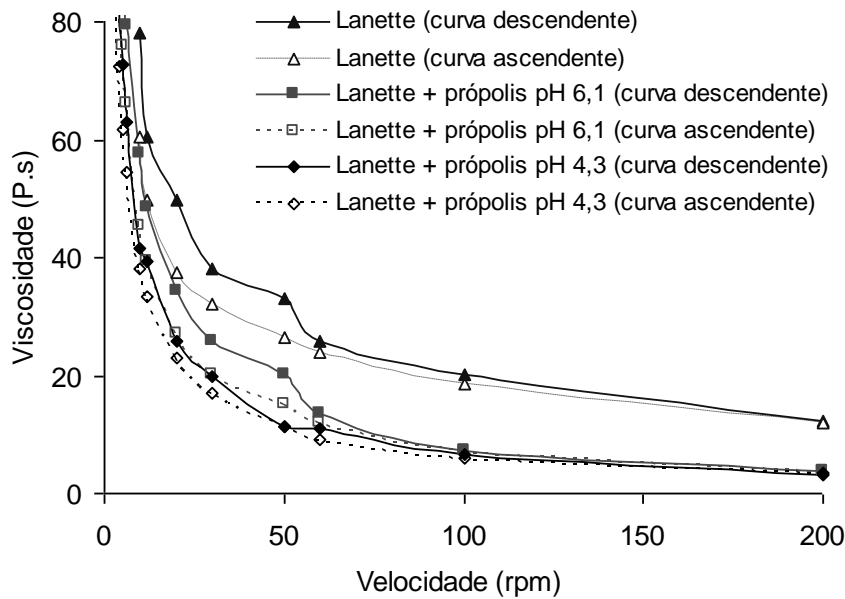


Figura 1: Viscosidade do creme Lanette[®], creme Lanette[®] após incorporação do extrato de própolis e creme Lanette[®] contendo própolis e com pH ajustado em 4,3.

O creme Polawax[®] apresentou perfil reológico muito semelhante, com ligeiro aumento de viscosidade após incorporação do extrato de própolis e ajuste de pH (Figura 2).

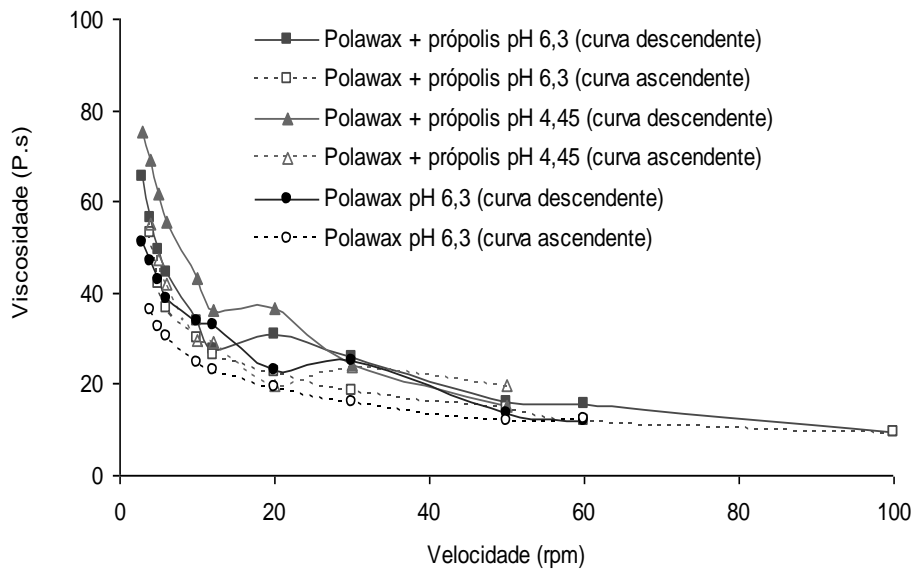


Figura 2: Viscosidade do creme Polawax[®], creme Polawax[®] após incorporação do extrato de própolis e creme Polawax[®] contendo própolis e com pH ajustado em 4,45.

O creme gel Hostacerin SAF[®] apresentou comportamento semelhante ao dos géis, sendo que após incorporação da própolis e alteração de pH não houve alteração no perfil reológico (Figura 3).

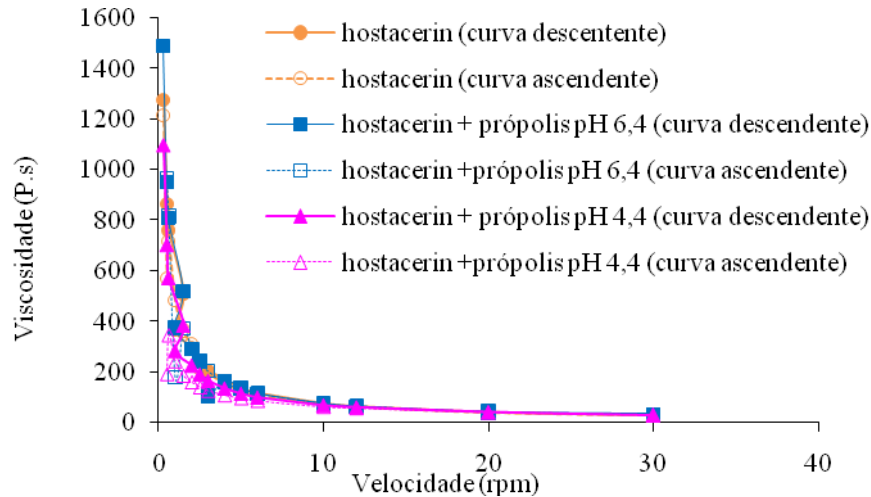


Figura 3: Viscosidade do creme-gel Hostacerin[®], creme-gel Hostacerin[®] após incorporação do extrato de própolis e creme-gel Hostacerin[®] contendo própolis e com pH ajustado em 4,4.

A própolis vermelha apresentou halos com tamanho entre 9,65 a 13,18 mm contra *C. albicans* (Figura 4). Não foi evidenciada a existência da relação dose-resposta utilizando o método de difusão em discos, uma vez que massas entre 80 e 600 μg foram aplicadas, apresentando resultados estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$).

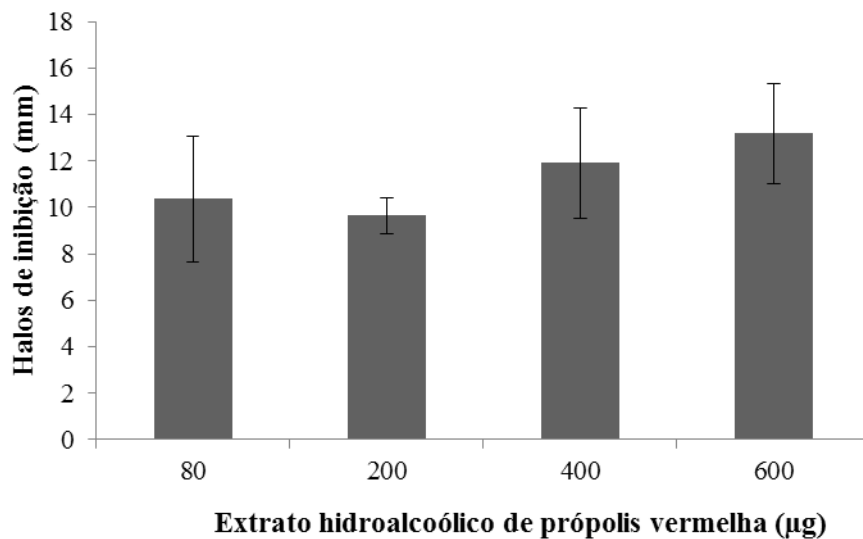


Figura 4: Diâmetros dos halos de inibição em mm de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em *Candida albicans*. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

Comparando o maior halo de inibição da própolis vermelha do estado de Sergipe ($13,18 \pm 2,14$ mm para 600 μg) com o menor obtido por Salomão et al. [33] que testou amostras de própolis vermelha oriundas de Alagoas para inibição de *Candida albicans* (halo de 21 mm para 400 μg) observou-se importante diferença no halo de inibição. Isto pode ter ocorrido devido ao procedimento de extração diferente, protegendo seu extrato da luz. Desta forma, pode-se aumentar a estabilidade dos constituintes presentes na amostra. Além disso, apesar dos estados em questão (Alagoas e Sergipe) serem muito próximos, a biodiversidade é fator fundamental e que afeta a qualidade dos constituintes presentes no produto. Segundo Pereira et al. [34] e Castro et al. [35] a composição química da própolis varia de acordo com a flora regional, a sazonalidade, o manejo e espécie de abelha no apiário. No caso da própolis vermelha, sua

origem botânica não está totalmente elucidada, apesar de já estar correlacionada com espécies presentes no mangue [36].

Outro ponto que diferencia o presente trabalho do autor citado é a metodologia do ensaio microbiológico. Salomão et al. [33] realizou o ensaio utilizando poços contendo 200 μL de solução de própolis, enquanto que na técnica utilizada neste trabalho, o material foi aplicado em um disco de papel de filtro, e portanto apresentou-se na forma sólida. Sabe-se que a forma de apresentação do material pode interferir no perfil de resposta, pois a transferência de massa no meio líquido é favorecida em relação ao meio sólido. Farias, Buffon e Cini [37] testaram a nistatina a 100.000 UI/ mL (150.000 UI) utilizando método do poço. O halo de inibição apresentado foi de 17 mm para *Candida albicans*. A nistatina é um fármaco comumente utilizado para candidíase.

Em relação à concentração fungicida mínima (CFM), foi observado que a partir da concentração 647,5 $\mu\text{g/mL}$ não houve crescimento fúngico após o período de incubação de cinco dias. Ota et al. [38] estudaram extratos etanólicos de própolis verde de doze diferentes regiões do Brasil obtendo as concentrações mínimas fungicidas de 3800 $\mu\text{g/mL}$ em *C. albicans* e 9000 $\mu\text{g/mL}$ em *Candida* sp respectivamente, podendo-se considerar significativo o resultado obtido neste trabalho.

A concentração de flavonóides nas amostras é o que atribui à própolis sua atividade antimicrobiana [22, 39, 40]. Considerando o resultado do teor de flavonóides obtido na amostra estudada ($1,87\% \pm 0,26$), conclui-se que a CFM em relação aos flavonóides foi de 12,10 $\mu\text{g/mL}$. Batista, Birman e Cury [40] em seus estudos concluíram que a CFM dos medicamentos fungicidas de referência no mercado para o tratamento de *C. albicans*, foram 0,15 $\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$ e 64 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B, cetoconazol e miconazol, respectivamente. Desta forma, observa-se que o EHPV estudado apresenta potencial fungicida comparável a outras substâncias já utilizadas.

Após a realização dos ensaios microbiológicos nas formulações, foi observado que o creme-gel Hostacerin SAF[®] com própolis vermelha em diferentes pHs apresentou halos de inibição muito pequenos para *C. albicans* (Figura 5). Porém, a base sem incorporação de ativos apresentou halo de aproximadamente 10 mm, inibição esta, provavelmente resultante do conservante existente na base.

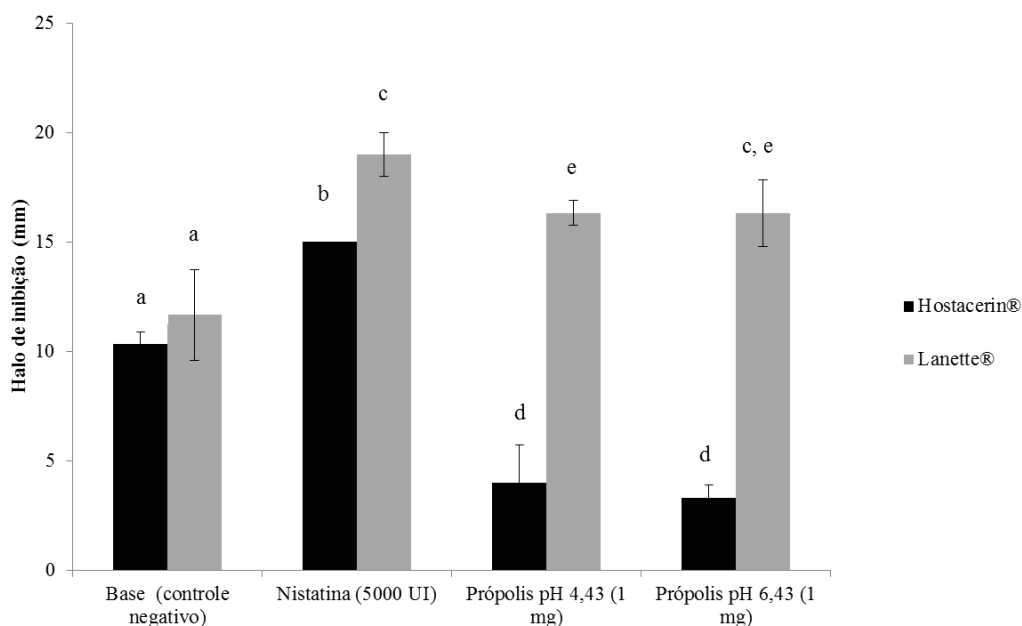


Figura 5: Diâmetros dos halos de inibição da Nistatina (controle positivo) e das formulações com própolis vermelha em *Candida albicans* em Hostacerin® e Lanette® em diferentes pHs. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes representam valores estatisticamente significativos $p > 0,05$.

Os resultados sugerem uma forte interação entre a base Hostacerin SAF® e a própolis, o que pode ter ocasionado a inativação das substâncias com atividade antimicrobiana (Figura 5). A incorporação do extrato nesta base apresentou-se inefetiva frente a *C. albicans*, demonstrando que uma base inerte pode interagir com os ativos, alterando sua capacidade farmacológica. É imprescindível a seleção dos veículos farmacotécnicos ideais para cada substância, não somente do ponto de vista da estabilidade, custo e aparência, mas principalmente em relação a sua efetividade.

Nesta mesma base, foi observado halo de inibição significativo para a nistatina (15 mm) compatível com os obtidos por Farias, Buffon e Cini [37]. Este resultado aponta que a referida base é compatível com o antimicrobiano, apesar de na base Lanette®, o mesmo ter apresentado halo de inibição superior ($p < 0,05$). A escolha da base ideal deve ponderar os parâmetros acima relacionados (custo, aparência, estabilidade) com os dados da atividade do produto.

As formulações com o creme Lanette® e a própolis vermelha apresentaram halo de inibição em torno de 16 mm resultado que demonstra perfeita compatibilidade da base com o ativo. O resultado da formulação contendo própolis foi significativo quando comparado ao da formulação com nistatina, pois a concentração de flavonóides presentes no extrato foi de 0,019 mg/mL, suficiente para apresentar a ação fungicida, sendo aproximadamente sessenta vezes inferior a de nistatina (4400 UI – 1 mg) que foi de 1,14 mg/mL ($p < 0,001$).

No que diz respeito à influência do pH na formulação, a sua manutenção em torno de 4,5 é uma característica importante para as fórmulas vaginais, pois preserva o pH vaginal minimizando a proliferação de patógenos. Para as formulações de Lanette®, como pode-se verificar na figura 5, em testes *in vitro*, a alteração do pH não influenciou no resultado final de inibição do crescimento de *C. albicans*.

4. CONCLUSÃO

Após observação dos resultados deste trabalho, concluiu-se que o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha do litoral norte do estado de Sergipe inibiu o crescimento *Candida albicans* ATCC – 10231 *in vitro* e apresentou ação fungicida mínima de 647,5 µg/mL. Também foi observado que, dentre as bases estudadas, a que possui melhor característica físico-química para a incorporação e veiculação do ativo, sendo o melhor excipiente na ação antifúngica da própolis vermelha foi o creme Lanette® (16,33 ± 0,58).

1. Butler MS, Newman DJ. Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholesteremics and anticancer drug discovery. *Progress in Drug Research*. 2008; 65(1): 3-44. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18084912>
2. Schmitt EK, Moore CM, Krastel P, Petersen F. Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2011; 15(4): 497-504. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684800>
3. Ledón N, Casacó A, González R, Merino N, González A, Tolón Z. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. *Acta Pharmacologia Sinica*. 1997; 18(3): 274-6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10072950>
4. Cabral ISR, Oldoni TLC, Prado A; Bezerra RMN, Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*. 2009; 32(6): 1523-7. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422009000600031&script=sci_arttext
5. Righi AA, Alves TR, Negri G, Marques LM, Breyer H, Salatino A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011; 91(13): 2363-2370. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21590778>
6. Frozza COS, Garcia CSC, Gambato G, Souza MDO, Salvador M, Moura S, Padilha FF, Seixas FK, Collares T, Borsuk S, Dellagostin OA, Henriques JAP, Roesch-Ely M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 52: 137-142. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512008204>
7. Sforcin JM, Fernandes A Jr, Lopes CA, Bankova V, Funari SR. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 73(1-2): 243-49, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874100003202>
8. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. 2004; 84(3): 329-39. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814603002164>
9. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50(9):2502-6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11958612>
10. Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2005; 2(1): 33-8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1062153/>
11. Dausch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2008; 5(4): 435-41. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2586321/>
12. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA, Rosalen PL, Ikegaki M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 113(2): 278-83. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17656055>
13. Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, Pasin FR, Tsvetkova I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2006; 3(2): 249-54. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1475931/>
14. Ayres DC, Marcucci MN, Giorgio S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007; 102(2): 215-20. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426888>
15. Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, Alencar SM. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. *Evidence-*

- Based Complementary and Alternative Medicine. 2007; 5(3): 313-16. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2529384/>
16. Awale S, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tezuka Y, Kadota S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorganic& Medicinal Chemistry*. 2008; 16(1): 181-89. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17950610>
 17. Souza ET, Neto BA, Lilenbaum W, Santos CS, Silva LCS. Ação da própolis perante *Candida albicans*. *Ciências Médicas*. 1989; 8: 39-42.
 18. Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, Costa MM, Silva MS, Viana LR. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcoólico e própolis. *Ciência Rural*. 2003; 34(1): 159-63.
 19. Fernandes Jr. A, Lopes MMR, Colombari V, Monteiro ACM, Vieira EP. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria. 2006; 36(1): 294-97. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v36n1/a47v36n1.pdf>
 20. Stepanovic S, Antic N, Dakic I, Vlahovic MS. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*. 2003; 158(4): 353-7. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14717457>
 21. Brito KPP, Leite JO, Soares VTB, Araújo ED, Cardoso JC, Maecellini PS. Caracterização físico-química da própolis vermelha e influência nos cuidados de coleta. Instituto de Tecnologia e Pesquisa. 2007.
 22. Kosalec I, Pepeljnjak S, Bakmaz M, Knezevic SV. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharmaceutica*. 2005; 55(4): 423-430. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16375832>
 23. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2007). Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 130 p. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2007/guia_cosmetico.pdf
 24. Lubi NC, Sato MEO, Gaensly F. Desenvolvimento de formas farmacêuticas líquida de uso oral isenta de substâncias glicogênicas, com extrato fluido de *Mikania glomerata* Sprengel - Asteraceae (guaco). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2003; 13(S1): 43-6. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2003000300017&script=sci_arttext
 25. Kim J, Marshall M R, Wei C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 1995; 43(11): 2839-45. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00059a013>
 26. Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial activity of mint essential oils. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 1995; 43(9): 2384-88. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00057a013>
 27. Fernandes Jr. A, Sugizaki MF, Fogo ML, Funari SRC, Lopes CAM. *In vitro* activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *Journal of venomous Animals and Toxins*. 1995; 1(2): 63-9. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0104-79301995000200003&script=sci_arttext
 28. Dotto SR, Travassos RMC, Ferreira R, Santos R, Wagner M. Avaliação da ação antimicrobiana de diferentes medicações usadas em endodontia. *Revista Odonto Ciência*. 2006; 21(53): 266-269. Disponível em: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fo/article/viewFile/1106/878>
 29. Parekh J, Chanda S. *In vitro* antibacterial activity of the crude methanol extract of *Woodfordia fruticosa* kurz. Flower (Lythraceae). *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007; 38: 204-7. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822007000200004&script=sci_arttext
 30. Pereira VG, Gomez RJHC. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. *Ciências Agrárias*. 2007; 28(2): 229-40. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/3432/0>
 31. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001, Seção 1, Página 18.
 32. Barry BW. Dermatological formulations: Percutaneous absorption. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. 1983; 18 (1): 351-402.
 33. Salomão K, Pereira PR, Campos LC, Borba CM, Cabello PH, Marcucci MC, de Castro SL. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2008; 5(3): 317-24. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18830454>

34. Pereira AS, Seixas FRMS, Neto FRA. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*. 2002; 25(2): 321-6. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422002000200021&script=sci_arttext
35. Castro ML, Cury JA, Rosalen PL, Alencar SM, Ikegaki M, Duarte S, Koo H. Propolis from southeastern and northeastern of Brazil: the influence of seasonality in antibacterial activity and phenolic composition. *Química Nova*. 2007; 30(7): 1512-1516. Disponível em: www.scielo.br/pdf/qn/v30n7/02.pdf
36. López BG-C, Schmidt EM, Eberlin MN, Sawaya ACHF. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry*. 2014; 146: 174-180. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613013289>
37. Farias NC, Buffon MM, Cini R. Avaliação *in vitro* da ação antifúngica do digluconato de clorhexidina e nistatina no controle do crescimento de *Candida albicans*. *Visão Acadêmica*. 2003; 4(2):83-8. Disponível em: <http://www.visaoacademica.ufpr.br/v4n2/farias.htm>
38. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimizu MT. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*. 2001; 44(9-10): 375-8. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0507.2001.00671.x/abstract>
39. Packer JF, Luz MMS. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007; 17(1): 102-7. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2007000100019&script=sci_arttext
40. Batista JM, Birman EG, Cury AE. Susceptibility to antifungal drugs of *Candida albicans* strains isolated from patients with denture stomatitis. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*. 1999; 13(4): 343-8. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rousp/v13n4/13n4a04.pdf>