

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**EFEITOS DA PRÓPOLIS DE ABELHAS AFRICANIZADAS E
MELIPONÍNEOS EM MICROORGANISMOS**

ANA PAULA FARNESI

Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre
em Ciências - Área de concentração:
Genética.

RIBEIRÃO PRETO

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**EFEITOS DA PRÓPOLIS DE ABELHAS AFRICANIZADAS E
MELIPONÍNEOS EM MICROORGANISMOS**

ANA PAULA FARNESI

Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre
em Ciências - Área de concentração:
Genética.

Orientador: Prof. Dr. ADEMILSON ESPENCER EGEA SOARES
RIBEIRÃO PRETO

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Farnesi, Ana Paula

Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em microorganismos. Ribeirão Preto,

2007. 73 p:il; 30cm.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares.

1. Própolis 2. apiterapia

Autora: Ana Paula Farnesi

Título: Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em microorganismos

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em
___/___/___.

Dedico este trabalho:

À Deus pela minha existência.

*Aos meus pais Aurélio e Dalva e ao meu irmão Victor Hugo,
por todo apoio, amor e pelo incentivo ao meu trabalho.*

*Ao meu namorado Diogo por todo o amor, paixão,
compreensão, companheirismo, amizade e paciência durante
a realização deste trabalho.*

*Ao meu grande amigo e orientador Prof. Dr. Ademilson
Espencer Egea Soares, pela colaboração, sabedoria e amizade.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares, pela amizade, carinho, apoio e orientação.

Ao Prof. Dr. Jairo Kennup Bastos, pelo grande apoio na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Nilce Maria Martínez Rossi, pelas sugestões, confiança e grande apoio na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Atílio, pela atenção, paciência, ajuda e amizade.

Ao Prof. Dr. Sérgio Brito, por toda confiança e grande sabedoria.

*Ao Sr. Wilson Melo, pelo fornecimento da própolis da abelha *Scaptotrigona* sp (Tubi), para a realização deste trabalho.*

Ao Prof. Dr. Lionel Seguí Gonçalves, pelos ensinamentos com o manejo de abelhas, pela amizade e por todo apoio.

Ao técnico Maurício (Departamento de Microbiologia da FFCL-USP), pela amizade e ajuda técnica.

À todas as funcionárias da secretária de Genética da FMRP-USP: Maria Aparecida, Susie e Cleuza, pela atenção e ajuda burocrática.

À todos os amigos de laboratório de Farmacognosia: Niege, Sérgio, Ademar, Nilton, Gustavo, Ana Sílvia, William, João Paulo e Walter, pelos momentos de descontração e lições de vida.

À todos os amigos de laboratório de Microbiologia: Luiz, Uberaba, Jardimópolis, Paraná, Vivian pelos momentos de descontração.

À todos os amigos de laboratório de Genética Molecular de Microorganismos: Fernanda Maranhão, Fernanda Paião, Geni, Nalu, Dianna, Ana Cláudia, Roseli, Juliana e Dona Geralda, pela amizade e apoio nos momentos difíceis.

Aos amigos de laboratório de Patologia: Luiz Fernando, Cleverson, Aline, Rose e Patrícia, pela amizade e momentos alegres.

À todos os amigos de laboratório de Genética de abelhas: Anete, Michelli, Fernanda, Rodrigo, Tiago, Carlitos, Weyder, Rogério, Michelli Prioli, Sérgio, David, Aline, Omar, Umberto, Vera, Adriana, Amanda, Ana Rita, Camilas, Marina, Vanessa, Tita, Ivan, Geusa, Érika, Robertos, Grão, Líli, Francis, Sérgio, Mônica, Paulo Emílio, Gesline, Karina, Profa. Márcia, Profa. Dra. Zilá, Prof. Dr. Klaus, Prof. Dr. David, Prof. Dr. Lionel, Jairo, João, Adélino e Luiz Roberto pela amizade, descontração e pelas lições de vida.

Em especial à minha grande amiga Marcela Bezerra, pela amizade, pelo carinho e pelos momentos felizes, que foram muitos.

Ao meu namorado Diogo por todo o amor, paixão e todos os dias de alegria, que foram e serão eternos.

A todos os meus familiares por tudo.

Às instituições CAPES e CNPq, pela ajuda financeira oferecida na realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma me esqueci de citar nestes agradecimentos mas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Ana Paula Farnesi

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. Introdução.....	1
1.1. Produtos Naturais.....	1
1.2. Própolis.....	4
1.2.1. Principais atividades atribuídas à própolis.....	4
1.2.2- Principais substâncias encontradas na própolis e fatores que influenciam na composição química da própolis	6
1.3- Própolis verde	8
1.4- Atividades biológicas da própolis verde	9
1.4.1- Atividade antitumoral.....	9
1.4.2- Atividade antimicrobiana	9
1.5- <i>Trichophyton rubrum</i>	9
1.6- <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo experimental.....	12
2- Objetivos Gerais.....	13
3- Material e métodos.....	15
3.1- Própolis.....	15
3.1.1- Maceração.....	15
3.1.2- Filtração.....	16
3.2- Linhagens de fungos	16
3.2.1- Linhagem de <i>Trichophyton rubrum</i>	16
3.2.2- Linhagem de <i>Aspergillus nidulans</i>	17
3.3- Manutenção e estoque das linhagens de fungos.....	17
3.3.1- Linhagens de <i>Trichophyton rubrum</i> e <i>Aspergillus nidulans</i>	17
3.4- Preparo da suspensão de conídios.....	17
3.4.1- Linhagem de <i>Trichophyton rubrum</i>	17
3.4.2- Linhagem de <i>Aspergillus nidulans</i>	18
3.5- Determinação da concentração inibitória mínima CIM.....	18

3.5.1- CIM pelo método de microdiluição para <i>Aspergillus nidulans</i>	19
3.5.2- CIM pelo método de microdiluição para <i>Trichophyton rubrum</i>	20
3.5.3- CIM pelo método de microdiluição para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
3.5.4- CIM pelo método de microdiluição para <i>Micrococcus luteus</i>	21
3.5.5- CIM pelo método de microdiluição para <i>Staphylococcus aureus</i>	22
3.5.6- CIM pelo método de microdiluição para <i>Escherichia coli</i>	23
3.6- Bioautografia.....	23
3.6.1- Dissolução dos extratos.....	24
3.6.2- Microorganismos indicadores.....	24
3.6.3- Detecção da atividade antimicrobiana.....	24
3.7- Determinação do perfil químico dos extratos hidroalcoólicos das diferentes amostras de própolis.....	25
4- Resultados e Discussão	27
4.1- CIM para <i>Aspergillus nidulans</i>	27
4.2- CIM para <i>Trichophyton rubrum</i>	29
4.3- CIM para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
4.4- CIM para <i>Micrococcus luteus</i>	35
4.5- CIM para <i>Staphylococcus aureus</i>	38
4.6- CIM para <i>Escherichia coli</i>	41
4.7- CIM para antibiótico padrão.....	44
4.8- Avaliação da atividade antibacteriana.....	47
4.8.1- <i>Micrococcus luteus</i>	49
4.8.2- <i>Staphylococcus aureus</i>	50
4.8.3- <i>Escherichia coli</i>	51
4.8.4- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
5- Conclusões.....	58
6- Perspectivas.....	59
7- Referências bibliográficas.....	60
8- Anexos.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CIM: concentração inibitória mínima

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

+: indica o crescimento do microorganismo na concentração correspondente

-: indica a inibição do microorganismo na concentração correspondente

HCL: ácido clorídrico

MeOH: metanol

NaOH: hidróxido de sódio

NCCLS: Comitê de Laboratório Clínico Padrão

TSA: meio de cultura Triptona Soja Ágar

TSB: meio de cultura Triptona Soja Caldo.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1-** Cromatograma do extrato hidroalcoólico da própolis verde (*Apis mellifera*), coletada em janeiro de 2005, detecção em 280nm.....46
- FIGURA 2-** Cromatograma do extrato hidroalcoólico da própolis da abelha indígena *Melipona quadrifasciata*, coletada em janeiro de 2005, detecção em 280 nm.....46
- FIGURA 3-** Cromatograma do extrato hidroalcoólico da própolis da abelha indígena *Scaptotrigona* sp, coletada em janeiro de 2005, detecção em 280 nm.....47
- FIGURA 4-** Cromatograma do extrato hidroalcoólico da própolis da abelha indígena *Melipona compressipes fasciculata*, coletada em janeiro de 2005, detecção em 280 nm.....47
- FIGURA 5-** Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana dos seguintes extratos: A= própolis verde B= própolis da abelha indígena *Scaptotrigona* sp; C= própolis da abelha *Melipona quadrifasciata*, frente ao *Micrococcus luteus* por meio de Bioautografia.....49
- FIGURA 6-** Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana do extrato de própolis da abelha *Melipona quadrifasciata*, frente ao *Micrococcus luteus* por meio de Bioautografia.....49
- FIGURA 7-** Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana dos seguintes extratos: A= própolis verde (*Apis mellifera*); B= própolis da abelha *Scaptotrigona* sp; C= própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* frente ao *Staphylococcus aureus*, por meio de Bioautografia.....50
- FIGURA 8-** Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana da própolis

da abelha *Melipona quadrifasciata*, frente ao *Staphylococcus aureus*, por meio de Bioautografia.....50

FIGURA 9- Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana dos seguintes extratos: A= própolis da abelha *Scaptotrigona* sp; B= própolis verde (*Apis mellifera*); C= própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* frente a *Escherichia coli*, por meio de Bioautografia51

FIGURA 10- Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana dos seguintes extratos: A= própolis da abelha *Scaptotrigona* sp; B= própolis verde (*Apis mellifera*); frente a *Escherichia coli*, por meio de Bioautografia.....51

FIGURA 11- Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana da própolis da abelha *Melipona quadrifasciata*, frente a *Escherichia coli*, por meio de Bioautografia.....52

FIGURA 12- Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana dos seguintes extratos: A= própolis verde (*Apis mellifera*); B= própolis da abelha *Scaptotrigona* sp; C= própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* frente a *Pseudomonas aeruginosa*, por meio de Bioautografia.....52

FIGURA 13- Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana dos seguintes extratos: A= própolis verde (*Apis mellifera*); B= própolis da abelha *Scaptotrigona* sp; frente a *Pseudomonas aeruginosa*, por meio de Bioautografia.....53

FIGURA 14- Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana da própolis da abelha *Melipona quadrifasciata*, frente a *Pseudomonas aeruginosa*, por meio de Bioautografia.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gradiente multi-linear de eluição para análise qualitativa em CLAE de amostras de própolis.....	26
Tabela 2: Diferentes concentrações de própolis das abelhas: <i>Scaptotrigona</i> sp, <i>Melipona compressipes fasciculata</i> , <i>Apis mellifera</i> e <i>Melipona quadrifasciata</i> testadas frente ao <i>Aspergillus nidulans</i>	27
Tabela 3: Diferentes concentrações de própolis das abelhas: <i>Tetragonisca angustula</i> , <i>Plebeia droryana</i> , <i>Scaptotrigona bipunctata</i> , <i>Friesiomelitta varia</i> , <i>Nannotrigona testaceicornis</i> testadas frente ao <i>Aspergillus nidulans</i>	28
Tabela 4: Diferentes concentrações de própolis das abelhas: <i>Scaptotrigona</i> sp, <i>Melipona compressipes fasciculata</i> , <i>Apis mellifera</i> , <i>Melipona quadrifasciata</i> e <i>Tetragonisca angustula</i> testadas frente ao <i>Trichophyton rubrum</i>	30
Tabela 5: Diferentes concentrações de própolis das abelhas: <i>Scaptotrigona bipunctata</i> , <i>Friesiomelitta varia</i> , <i>Plebeia droryana</i> e <i>Nannotrigona testaceicornis</i> testadas frente ao <i>Trichophyton rubrum</i>	31
Tabela 6: Diferentes concentrações de própolis das abelhas: <i>Scaptotrigona</i> sp, <i>Apis mellifera</i> , <i>Melipona quadrifasciata</i> e <i>Tetragonisca angustula</i> testadas frente à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
Tabela 7: Diferentes concentrações de própolis das abelhas: <i>Plebeia droryana</i> , <i>Scaptotrigona bipunctata</i> , <i>Friesiomelitta varia</i> e <i>Nannotrigona testaceicornis</i> , testadas frente à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
Tabela 8: Diferentes concentrações de própolis das abelhas: <i>Scaptotrigona</i> sp, <i>Apis mellifera</i> , <i>Plebeya droriana</i> e <i>Tetragonisca angustula</i> , testadas frente à <i>Micrococcus luteus</i>	36
Tabela 9: Diferentes concentrações de própolis das abelhas: <i>Melipona quadrifasciata</i> , <i>Scaptotrigona bipunctata</i> , <i>Friesiomelitta varia</i> e <i>Nannotrigona testaceicornis</i> , testadas frente à <i>Micrococcus luteus</i>	37

Tabela 10: Diferentes concentrações de própolis das abelhas: <i>Scaptotrigona</i> sp, <i>Apis mellifera</i> , <i>Tetragonisca angustula</i> e <i>Nannotrigona testaceicornis</i> , testadas frente à <i>Staphylococcus aureus</i>	39
Tabela 11: Diferentes concentrações de própolis das abelhas: <i>Melipona quadrifasciata</i> , <i>Plebeia droryana</i> , <i>Scaptotrigona bipunctata</i> e <i>Friesiomelitta varia</i> testadas frente à <i>Staphylococcus aureus</i>	40
Tabela 12: Diferentes concentrações de própolis das abelhas: <i>Scaptotrigona</i> sp, <i>Apis mellifera</i> e <i>Melipona quadrifasciata</i> , testadas frente à <i>Escherichia coli</i>	42
Tabela 13: Diferentes concentrações de própolis das abelhas: <i>Tetragonisca angustula</i> , <i>Plebeia droryana</i> , <i>Scaptotrigona bipunctata</i> , <i>Friesiomelitta varia</i> e <i>Nannotrigona testaceicornis</i> , testadas frente à <i>Escherichia coli</i>	43
Tabela 14: Protocolo de antibiótico padrão para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Micrococcus luteus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	44

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo estudar a atividade antifúngica e antibacteriana de diferentes tipos de própolis, tanto de abelhas africanizadas (verde) quanto meliponíneos. A concentração inibitória mínima, sendo a menor concentração de um agente inibidor em que não se observa o crescimento macroscópico do microorganismo, foi determinada para todas as amostras de própolis. Para análise do perfil químico das amostras foi utilizada como metodologia (CLAE), visando determinar as classes de substâncias presentes nas amostras de própolis. Em todos os microorganismos testados as própolis das abelhas *Tetragonisca angustula*, *Plebeia droryana*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Friesiometilitta varia* e *Nannotrigona testaceicornis* não apresentaram atividade antifúngica nem antibacteriana. Nenhuma das amostras de própolis testadas apresentou atividade antifúngica frente ao *Aspergillus nidulans*. A linhagem do fungo *Trichophyton rubrum* mostrou-se sensível a alguns tipos de própolis sendo que a própolis verde foi mais eficaz. Alguns tipos de própolis apresentaram atividade antibacteriana, indicando a importância dessas resinas na terapêutica humana e veterinária.

Palavras-chave: propolis, apiterapia.

Abstract

Our objective was to examine the antifungal and antibacterial activities of several types of propolis, including Africanized honey bee green propolis and propolis produced by meliponini bees. The minimal inhibitory concentration, considered to be the lowest concentration of an inhibitory agent in which there is no macroscopic growth of the microorganism, was determined for all the propolis samples. CLAE methodology was used for the analysis of the chemical profiles of the samples, in order to determine the classes of substances in the propolis samples. Propolis from the bees *Tetragonisca angustula*, *Plebeia droryana*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Friesiomelita varia* and *Nannotrigona testaceicornis* presented no antifungal or antibacterial activity. None of the propolis samples presented antifungal activity against *Aspergillus nidulans*. The fungus *Trichophyton rubrum* was sensitive to several types of propolis, green propolis being the most efficient against this species. Various types of propolis also presented antibacterial activity, demonstrating the potential importance of these resins for human and veterinary medicine.

Key-Words: propolis, apitherapy.

1- Introdução

1.1- Produtos Naturais

Há muitos anos, as drogas vêm sendo as formas de intervenção terapêutica disponíveis aos médicos, mais amplamente usada no combate às infecções. As principais fontes de novas drogas são agora os produtos químicos sintéticos, mas os produtos naturais ainda são importantes em diversas afecções.

As primeiras descrições sobre produtos naturais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Esse papiro foi descoberto e publicado por Georg Ebers, sendo traduzido pela primeira vez em 1890, por H. Joachin. Foi encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II, porém pertence à época da XVIII dinastia. Enumera mais ou menos 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (Vilela 1977).

Durante a civilização grega, vários filósofos podem ser destacados por suas obras sobre história natural. Dentre esses, sobressaem-se Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, que se caracterizou por tomar a natureza como guia na escolha dos remédios (*Natura medicatrix*) e Teofrasto (372 a.C), discípulo de Aristóteles, que escreveu vários livros sobre a história das plantas. É seu o registro da utilização da espécie botânica *Papaver somniferum*, planta cujo princípio ativo é a morfina (Valle 1978).

No século I da era cristã, destaca-se o eminente médico grego Dioscóride, autor de notável obra sobre medicina e farmácia intitulada "De Materia Medica", que serviu como guia de ensino nestas áreas até a época do Renascimento. No mesmo século, o naturalista latino Plínio, cognominado "O Velho", escreveu extensa obra sobre história natural. No século seguinte sobressai Galeno, farmacêutico e médico grego, autor de vários livros sobre medicina e farmácia. Suas formulações medicamentosas originaram a farmácia galênica.

A civilização árabe trouxe importante contribuição à medicina natural. A ela deve-se o emprego dos purgativos vegetais e o conhecimento do sabor doce da urina dos diabéticos. No século X, impõem-se o nome do médico islâmico Avicena (Abu Ali al Hussin ibn Abdallah ibn Sina), estudioso botânico, criador de um tratado sobre medicamentos cardíacos. Sua obra mais importante "Canon", foi durante muito tempo o texto médico mais popular da Europa (Mahran 1977).

Todo o empirismo mágico-feiticeiro da arte de curar ao longo da história da humanidade, das teriagas às mandrágoras, encontra em Paracelso (1493-1541) sua figura mais polêmica. É sua a criação da teoria da "assinatura dos corpos" segundo a qual a "atividade farmacológica" de uma planta estaria relacionada com o seu aspecto morfológico. Assim, por exemplo, a serpentária, erva da família das aráceas cuja haste malhada lembra o corpo de uma serpente, serviria para a cura de picadas de cobras (Mors, 1982).

As grandes navegações trouxeram a descoberta de novos continentes, legando ao mundo moderno um grande arsenal terapêutico de origem vegetal até hoje indispensável à medicina.

As culturas americanas, especialmente a Inca, Asteca, Maya, Olmeca e Tolteca consignaram à civilização moderna a quina, a ipecacuanha, a coca e muitas outras drogas de valor terapêutico.

O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal começa a acontecer no século XVIII. Nesse século, juntamente com o XIX, foram feitos diversos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcalóides. São desta época o isolamento de morfina (1806), quinina e estriquinina (1820).

Após a metade do século XVIII, Lavoisier destruiu a teoria do flogístico criando as bases da química moderna ao estabelecer a natureza da combustão, permitindo desse modo a determinação da composição centesimal das substâncias orgânicas.

O final dos anos vinte e toda a década de trinta do século XX pode ser caracterizado pelo grande número de trabalhos sobre o isolamento e a identificação de substâncias de natureza esteroideal.

A introdução dos métodos espectroscópicos e das diferentes modalidades de cromatografia na fitoquímica alterou gradualmente os objetivos e a filosofia dos trabalhos de isolamento e de determinação estrutural de Produtos Naturais.

A utilização de métodos espectroscópicos em identificação estrutural permitiu a redução das quantidades do material necessário à análise e

possibilitou, ao mesmo tempo, a determinação em curto espaço de tempo de estruturas complexas.

1.2- Própolis

Há relatos históricos que a própolis tem sido utilizada desde a antiguidade quando os egípcios embalsamavam os faraós, com uma mistura de ervas e própolis. O estudo sobre a própolis iniciou-se no Instituto de Veterinária em Kazan (URSS), em 1947, investigando suas propriedades antimicrobianas e curativas.

A própolis é um produto natural, tendo uma ampla ação biológica tanto para o homem quanto para os animais, podendo ser utilizado na medicina humana e veterinária.

A própolis (Grego; *pro*, em defesa + *polis*, cidade) é utilizada pelas abelhas para selar eventuais aberturas na colméia, para proteção contra microorganismos e como substância embalsamadora que recobrem as carcaças.

1.2.1-Principais atividades biológicas atribuídas à própolis

Acredita-se que a própolis é utilizada pelo homem desde o ano 300 a.C. Atualmente, vem sendo utilizada por suas atividades antiséptica, antimicótica, bacteriostática, antiinflamatória, anestésica, antioxidante, cicatrizantes, entre outras. Suas aplicações, também na área dermatológica, são muito amplas, tais como na regeneração de tecidos, tratamento de queimaduras, psoríases,

herpes simples e genital. É utilizada em cremes dentais, produtos farmacêuticos e cosméticos, podendo ser encontrada sob a forma de tabletes, pó e goma de mascar (Burdok 1998).

Nos últimos anos, diversos estudos mostraram que a própolis possui atividades: antiviral (Debiaggi *et al.*, 1990; Amoros *et al.*, 1992), antibacteriana (Ikeno *et al.*, 1991; Aga *et al.*, 1994; Mirzoeva *et al.*, 1997; Park e Ikegaki., 1998; Abd e Hegazi, 2002; Ugur e Arslan, 2004, Sonmez *et al.*, 2005; Uzel *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005; Popova *et al.*, 2005; Scazzocchio *et al.*, 2006), antifúngica (Valdes *et al.*, 1987; Dobrowolki *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 2006, Sawaya *et al.*, 2002, Ota *et al.*, 2001; Koc *et al.*, 2005; Ozcan 2004; Silici & Koc, 2006, Aly & Elewa, 2007) e contra protozoários (Higashi e Castro, 1994, Silva Cunha *et al.*, 2004). A própolis de abelhas nativas (sem ferrão), tais como: *Tetragonisca angustula*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Scaptotrigona* sp., *Partamona*, *Melipona* sp, mostraram que são altamente eficazes contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Fernandes *et al.*, 2001, Miorin *et al.*, 2003).

De acordo com Velikova *et al.*, (2000) a própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* apresenta atividade moderada contra *Staphylococcus aureus*.

Além dessas atividades, foi também descrita a ação sobre a regeneração cartilaginosa e óssea (Burdok, 1998), atividade antitumoral (Rao *et al.*, 1992; Frenkel *et al.*, 1993; citados por Burdok, 1998), cardioprotetora (Chopra *et al.*, 1995; Cook & Samman., 1995; Hollman *et al.*, 1996), imunomoduladora (Havsteen., 1983; Ivanoska *et al.*, 1995), e antimutagênica (Cizmarick & Lahitova., 1998; Varanda *et al.*, 1999).

Alguns trabalhos que detectaram a atividade antimutagênica da própolis (Cizmarick e Lahitova,1998; Varanda *et al.*,1999), sugeriram que esta ação poderia estar associada ao potencial antioxidante dos flavonóides presentes em sua composição química (Krol *et al.*,1990; Scheller *et al.*, 1990; Volpert e Elstner.,1993; Pascual *et al.*,1994; Said.,2000).

Vários estudos têm mostrado a atividade anticancerígena de alguns componentes da própolis, dentre eles os ésteres do ácido cafeico (Rao *et al.*,1992; 1993; 1995; Frenkel *et al.*, 1993; Matsuno *et al.*,1997; Kimoto *et al.*,1998). Acredita-se que a atividade desses componentes possa estar relacionada ao metabolismo do ácido araquidônico, inibindo a progressão do câncer. Compostos isolados da própolis brasileira, como o Artepelin C (3,5 diprenil- 4- ácido hidroxicinâmico) e o diterpenóide clerodana (PRF-1) apresentaram atividade citotóxica sobre células tumorais, *in vivo* e *in vitro*, inibição da síntese de DNA e indução de apoptose nestas células (Matsuno *et al.*, 1997; Kimoto *et al.*,1998).

1.2.2- Principais substâncias encontradas na própolis e fatores que influenciam na composição química da própolis

Há grande dificuldade em padronizar a composição química da própolis, uma vez que fatores geográficos, sazonais e climáticos podem exercer influência sobre as plantas, que são fontes da própolis (Cheng e Wong, 1996).

A identificação dos componentes da própolis tem sido realizada por técnicas de cromatografia líquida de alta performance (Bankova *et al.*,1992; Barberán *et al.*,1993), cromatografia gasosa em coluna capilar (Bankova *et al.*,

1992) e espectrometria de massa (Greenaway *et al.*,1991), que demonstraram a grande complexidade e diversidade destes componentes.

Ainda que não tenha sido completamente definida a composição da própolis, que inclui ácidos graxos e fenólicos (incluindo ácido cinâmico e cafeico) e seus ésteres, aldeídos aromáticos, alcóois, sesquiterpenos, naftalenos e flavonóides. Dentre estes compostos, os flavonóides e os derivados do ácido cafeico, como o fenetil éster (CAPE) e o benzil cafeato, despertam especial interesse por serem apontados como os principais responsáveis pelas atividades terapêuticas relacionadas à própolis (Bankova, *et al.*,1983; Amoros *et al.*, 1992; Marcucci, 1995).

Na própolis brasileira, ocorrem principalmente compostos fenólicos, especialmente flavonóides como a flavona e o campeferide e derivados do ácido cinâmico (Boudourova-Krasteva *et al.*, 1997; Bankova *et al.*, 1998). Entretanto, foi observado que, dependendo da estação do ano, existe variação dos componentes; Os diterpenos, por exemplo, são detectados na própolis produzida durante o verão e outono, mas não estão presentes na própolis produzida nas outras estações do ano (Bankova *et al.*,1998).

Dentre as substâncias já identificadas da própolis europeia, destacam-se os flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), chegando a alcançar concentrações em torno de 10% em algumas amostras e apresentando mais de 30 flavonóides aglicônicos diferentes (Campos *et al.*, 1990, Marcucci, 1996).

Diferentes flavonóides foram isolados e identificados em amostras de própolis de várias regiões do mundo, como por exemplo: kaempferide, apigenina, crisina, luteolina, pinobankisina, narigenina, aromadendrina-4`-metil

éter, 5,6,7-triidroxi-3,4'-dimetoxiflavona, acacetina, alpinol, entre outros (Bankova *et al.*, 1992; Banskota *et al.*, 1998; Boudorava-Krasteva *et al.*, 1997; Garcia-Vigueira *et al.*, 1992; Koo & Park, 1997; Martos *et al.*, 1997; Markam *et al.*, 1996; Pereira *et al.*, 1998; Siess *et al.*, 1996; Vennat *et al.*, 1995). Algumas atividades biológicas da própolis são atribuídas aos flavonóides tais como: antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, antifúngica, analgésica entre outras (Aga *et al.*, 1994; Marcucci, 1996).

Por outro lado estudos revelaram que a própolis brasileira, principalmente dos estados de São Paulo e Minas Gerais, são constituídas majoritariamente por derivados de ácido-*p*-cumárico. Estas substâncias possuem marcantes atividades biológicas, como por exemplo: antitumoral e antimicrobiana, mas estão ausentes na própolis européia, norte-americana e asiática (Marcucci e Bankova, 1999).

1.3- Própolis verde

Este tipo de própolis é produzida no cerrado brasileiro, rica em derivados prenilados, é conhecida no mundo todo com “green propolis”, apresentando fragmentos da planta *Baccharis dracunculifolia*, que possui uma coloração característica, e é utilizada principalmente pelos japoneses. Quanto maior o número de fragmentos de *Baccharis dracunculifolia* presente na própolis mais intensa é a sua coloração verde (Bastos, 2001).

1.4- Atividades biológicas da própolis verde

1.4.1- Atividade antitumoral

A própolis verde tem sido utilizada principalmente no Japão, na profilaxia e também para auxiliar o tratamento de vários tipos de cânceres, com isso apresenta um alto valor no mercado. O ácido 3,5-diprenil-*p*-cumárico, isolado desta própolis possui efeito protetor para carcinomas pulmonares (Kimoto *et al.*, 2001a) e atividade antileucêmica (Kimoto *et al.*, 2001b).

1.4.2- Atividade antimicrobiana

AGA *et al.*, (1994), demonstraram que o ácido-3,5-diprenil-*p*-cumárico, isolado da própolis coletado no estado de São Paulo, possui alta atividade antimicrobiana contra 18 cepas de microorganismos.

1.5- *Trichophyton rubrum*

As infecções micóticas possuem ampla variedade e difusão, apresentando manifestações clínicas diversas, seguindo a natureza dos tecidos em que se localizam. As infecções podem ser desde superficiais até profundas. Ambas as enfermidades micóticas induzem estados alérgicos. A diferenciação do gênero, espécie e variedade têm base nos critérios morfológicos e reprodutivos.

Dermatófitos são fungos queratinofílicos, que produzem queratinases causadoras de infecções na pele, cabelos e unhas, atingindo tanto indivíduos hígidos quanto imunodeprimidos. Tais fungos são classificados em três

gêneros anamórficos: *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*, sendo que cada gênero apresenta formação e morfologia de seus conídios (estrutura de reprodução assexuada) diferentes, sendo que são divididos em espécies zoofílicas, geofílicas ou antropofílicas (Kwon-Chung e Bennett, 1992). As micoses profundas apresentam um grupo heterogêneo que afeta as mucosas e vísceras.

Neste grupo a *Candida albicans* ocupa um lugar muito importante sendo uma forma intermediária entre dermatófitos e microorganismos que causam infecções profundas.

O *Trichophyton rubrum*, é o dermatófito mais comum do mundo sendo responsável por causar a maioria das infecções na pele.

De um modo geral, o controle das infecções fúngicas depende inicialmente dos complexos e mecanismos de defesa de cada hospedeiro. Se a doença se instalar quando ocorrer falha nesta defesa, será necessário utilizar drogas fungicidas ou fungistáticas que atuem contra os patógenos no intuito de evitar danos ao hospedeiro.

As infecções causadas por determinados tipos de fungos podem causar doenças desde o extrato córneo da pele até fígado, baço, pulmão, coração e rins. Em geral doenças causadas por fungos tendem a ser benignas, sendo que as micoses podem ser classificadas como: superficiais, cutâneas, subcutâneas, profundas e oportunistas. As micoses cutâneas ocorrem em tecidos queratinizados como: pele, unhas, cabelos e pêlos.

O grau de lesão se deve ao conjunto de vários fatores como a magnitude de destruição tecidual, estado imunológico do hospedeiro,

habilidade do agente em se multiplicar (Baron 1996). A infecção com dermatófitos ocorre através do contato direto com animais e humanos infectados, ou indiretos, através de fômites contaminados (Weitzman e Summerbell, 1995).

Os sintomas podem variar, desde brandos até mais graves sendo que geralmente não ocorre invasão de órgãos internos. As lesões dermatofílicas são: eritematosas, circulares e pruriginosas, podendo estar presente em diversas partes do corpo. O dermatófito mais freqüente isolado em casos clínicos de *Tinea pedis* (pés), *Tinea corporis* (corpo), *Tinea manuum* (mão), *Tinea unguium* (unhas) e *Tinea cruris* (virilha) é o *Trichophyton rubrum* (Anstey *et al.*, 1996; Zais e Rebell, 1996; Foster *et al.*, 2004).

Este mesmo patógeno foi responsável por 48,63% dos casos de dermatofitoses na cidade de São Paulo no período de 1992 a 2002 (Chinelli *et al.*, 2003) e 49,72% em Goiânia no período de janeiro a dezembro de 1999 (Costa *et al.*, 2002). Em Lausanne (Suíça) e em Nova York, este patógeno foi responsável, respectivamente por 62,5% e 67% dos casos de onicomicose (unha), (Monod *et al.*, 2002; Jennings *et al.*, 2002).

O dermatófito obtém do hospedeiro, nutrientes para sua sobrevivência tais como: fonte de carbono, enxofre, fósforo e nitrogênio.

As lesões menos inflamatórias causadas por *Trichophyton rubrum* são mais crônicas e resistentes (Sohnle, 1993; Wagner e Sohnle, 1995; Ogawa *et al.*, 1998).

1.6- *Aspergillus nidulans* como modelo experimental

O fungo *Aspergillus nidulans* é um modelo biológico conveniente para estudos de mecanismos de resistência a drogas.

Seu ciclo de vida pode ser tanto sexual quanto assexual. Possui hifas multinucleares que produzem esporos assexuais ou conídios. Apesar de ser um fungo homolático é possível fazer cruzamentos entre linhagens distintas deste organismo. Quando colocadas em contato, ocorre fusão de hifas com os núcleos geneticamente distintos passando a ocupar o mesmo citoplasma (heterocários). A fusão destes núcleos origina núcleos diplóides com 16 cromossomos, os quais sofrem meiose seguida de mitose formando os chamados ascósporos. Há ainda a possibilidade de formação do heterocário que, ao invés de sofrer meiose, sofrerá não disjunções sucessivas até que o estado haplóide estável seja atingido (ciclo parassexual). A análise das colônias geradas permite a identificação de genes e o seu mapeamento genético ao longo dos 8 grupos de ligação do *Aspergillus nidulans*.

2- Objetivos Gerais

Estudar e avaliar as atividades *in vitro* de diferentes tipos de própolis, tanto de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) quanto de meliponíneos (*Scaptotrigona* sp., *Plebeia droryana*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes fasciculata*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Friesiometitta varia* e *Tetragonisca angustula*) contra a patogenicidade de: *Aspergillus nidulans*, *Trichophyton rubrum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Micrococcus luteus*.

Determinar as Concentrações Inibitória Mínima (CIM) de acordo com o Comitê Nacional de Laboratório Clínico Padrão com o método de microdiluições.

Para atingir este objetivo, os seguintes aspectos foram abordados:

- Obtenção das linhagens dos seguintes fungos: *Aspergillus nidulans* e *Trichophyton rubrum*.
- Obtenção de linhagens das seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.
- Análise do crescimento das linhagens;
- CIM das linhagens de *Aspergillus nidulans*, *Trichophyton rubrum*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.
- Obtenção de extratos hidroalcoólicos e obtenção de extratos brutos secos de todas as amostras de própolis coletadas;

- Cromatografia de camada delgada (Bioautografia) das seguintes bactérias:
Staphylococcus aureus, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

3- Material e métodos

3.1- Própolis

A própolis verde foi obtida na cidade de Capetinga, estado de Minas Gerais, em janeiro de 2005. A própolis da abelha *Scaptotrigona* sp., foi obtida na cidade Barra do Corda no estado do Maranhão em janeiro de 2005, a própolis da abelha *Melipona compressipes fasciculata* foi obtida em janeiro de 2005 na cidade de São Luis no estado do Maranhão. Já as própolis das abelhas: *Melipona quadrifasciata*, *Plebeia droryana*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Friesiometilitta varia* e *Tetragonisca angustula*, foram obtidas no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP na cidade de Ribeirão Preto, estado de São Paulo.

Para a extração das substâncias ativas em um breve tempo foi necessária a pulverização, para aumentar a superfície de contato com o solvente, facilitando deste modo à extração.

3.1.1-Maceração

A extração dos primeiros princípios ativos da própolis foi realizada mediante a utilização de álcool 70%, à temperatura ambiente, sendo macerada por 48 horas. Foi ainda agitada seis vezes ao dia, pois a agitação acelera e melhora o processo de extração, (em média 30g de própolis pulverizada em 100mL de etanol 70%).

3.1.2- Filtração

Para separar o extrato de própolis dos resíduos, foi empregada a primeira fase de decantação, depois de uma filtração prévia, mediante um filtro a vácuo. A filtração fina foi efetuada através de papel filtro, em um aparato a vácuo. O filtrado foi levado para um Rotaevaporador, a 80^oC, 115 rpm, para a obtenção do extrato da própolis.

O extrato da própolis foi armazenado em frascos âmbar, levado a estufa a 45^oC por 7 dias para eliminação de água. Posteriormente, foi armazenado em vidros âmbar, foi tampado hermeticamente e armazenado à temperatura ambiente.

3.2- Linhagens de fungos.

3.2.1- Linhagem de *Trichophyton rubrum*

Os ensaios antifúngicos foram realizados no laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, do departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, sob supervisão da Prof. Dra. Nilce M. Martinez-Rossi.

A linhagem H6 (ATCC MYA-3108) de *Trichophyton rubrum* utilizada neste trabalho foi isolada de um paciente, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, portador de *Tinea cruris*. Esta linhagem foi identificada através do método de McGinnis (1980) pela Profa. Dra. Cláudia Maria Leite Maffei, responsável pelo setor de Micologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos

da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. As características desta linhagem são: colônia branca de aspecto cotonoso e encorpado, o reverso da colônia não apresenta pigmentação após 15 dias de crescimento em meio Ágar Sabouraud (Atlas, 1993). Estudos de seu cariótipo mostraram a presença de pelo menos cinco cromossomos e o seu genoma apresenta aproximadamente 22,05 Mbp (Cervelatti *et al.*, 2004).

3.2.2-Linhagem de *Aspergillus nidulans*

A linhagem de *Aspergillus nidulans* utilizada neste trabalho foi paba A1.

3.3- Manutenção e estoque das linhagens de fungos.

3.3.1- Linhagens de *Trichophyton rubrum* e *Aspergillus nidulans*

Para a preservação da linhagem *Trichophyton rubrum* MYA-3108 por períodos mais longos, foram utilizados tubo de ensaio contendo meio Ágar Sabouraud inclinado (Atlas, 1993). Para a preservação de *Aspergillus nidulans* por um período longo, foram utilizados grânulos de sílica gel.

3.4-Preparo da suspensão de conídios

3.4.1- Linhagem de *Trichophyton rubrum*

A linhagem de H6 (ATCC MYA-3108) de *Trichophyton rubrum* foi cultivada por 14 dias a 28^oC em meio Ágar Sabouraud. Após este período, o micélio foi coletado com o auxílio de uma espátula estéril e colocado em solução salina 0,9%(m/v) acrescida de Tween 80 0,01%(v/v). Em seguida, a mistura foi agitada vigorosamente para desagregar os conídios, filtrada através

de lã de vidro para a remoção das hifas e centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos, em centrífuga clínica à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensionado em solução salina 0,9% (m/v) e a concentração de conídios desta solução foi estimada através da contagem em câmara de Neubauer.

3.4.2- Linhagem de *Aspergillus nidulans*

A linhagem de *Aspergillus nidulans* foi cultivada em meio Completo suplementado com 2 mL de glicose e 2 mL de nitrato para cada 100mL de meio. Após este período, o micélio foi coletado como auxílio de uma espátula estéril e colocado em solução salina 0,9%(m/v) acrescida de Tween 80 0,01%(v/v). Em seguida, a mistura foi agitada vigorosamente para desagregar os conídios, filtrada através de lã de vidro para a remoção das hifas e centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos, em centrífuga clínica à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensionado em solução salina 0,9% (m/v) e a concentração de conídios desta solução foi estimada através da contagem em câmara de Neubauer.

3.5- Determinação da concentração inibitória mínima CIM.

Esta técnica foi utilizada para se saber a menor concentração de própolis que inibe o crescimento macroscópico dos microorganismos.

O teste foi realizado em placas de 96 poços em triplicata, sendo incubadas a 28^oC por sete dias para *Trichophyton rubrum* e quatro dias para *Aspergillus nidulans*. Após este período, foi observado o crescimento dos fungos através da turvação do meio de cultivo. Meio de cultivo sem inóculo,

meio sem própolis mas com inóculo e meio com etanol 1% foram utilizados como controles.

A CIM foi determinada para as linhagens das seguintes bactérias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O teste foi realizado em placas de 96 poços em triplicata, sendo incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

3.5.1- CIM pelo método de microdiluição para *Aspergillus nidulans*

Este experimento foi realizado para verificar se os extratos das própolis exercem alguma ação sobre *Aspergillus nidulans*. O procedimento foi realizado segundo estabelecido pelo Comitê Nacional de Padronização (NCCLS)- documento M-38^a. Uma alíquota de 0,1mL de uma suspensão de conídios contendo $3,9 \times 10^4$ conídios/mL correspondente a uma transmitância de 80-82% a 530nm, as seguintes amostras de própolis foram inoculadas em meio RPMI: própolis da abelha *Scaptotrigona* sp., própolis da abelha *Melipona quadrifasciata*, própolis da abelha *Melipona compressipes fasciculata*, própolis da abelha *Plebeia droryana*, própolis da abelha *Scaptotrigona bipunctata*, própolis da abelha *Nannotrigona testaceicornis*, própolis da abelha *Friesiometitta varia* e própolis da abelha *Tetragonisca angustula* e própolis verde. Para todas as amostras de própolis foram utilizadas as seguintes concentrações: 0.01, 0.022, 0.045, 0.09, 0.1875, 0.375, 0.75, 1.5, 3.0; e 3.75, 7.5, 15.0, 30.0, 60.0, 120.0, 240.0, 480.0 mg/mL (4×10^4 conídios/mL). O teste foi realizado com placas de 96 poços em triplicata. As placas foram incubadas por quatro dias e após este período o crescimento do fungo foi observado.

3.5.2- CIM pelo método de microdiluição para *Trichophyton rubrum*

Este experimento foi realizado para verificar se os extratos das própolis exercem alguma ação sobre *Trichophyton rubrum*. Uma alíquota de 0,1mL de uma suspensão de conídios contendo 5×10^4 conídios/mL, correspondente a uma transmitância de 70-75% a 530nm, as mesmas amostras de própolis (item 3.5.1), foram testadas para *Trichophyton rubrum*. Foram utilizadas as seguintes concentrações: 0.001, 0.002, 0.004, 0.008, 0.016, 0.032, 0.064, 0.11, 0.23, 0.46, 0.93, 1.87, 3.75, 7.5, 15.0 e 30.0 mg/mL (contendo 5×10^4 conídios/ mL) . O teste foi realizado em placas de 96 poços em triplicata. As placas foram incubadas por sete dias e após este período o crescimento do fungo foi observado.

Outras concentrações foram testadas para própolis da abelha *Scaptotrigona sp.* e *Melipona quadrifasciata*: 15, 16.5, 22.5, 25.5, 27.5, 30 mg/mL, (contendo $1,7 \times 10^4$ conídios/mL), 27.5, 28.5, 29.5 e 30.0 mg/mL, (contendo $5,3 \times 10^4$ conídios/mL).

Outras concentrações foram testadas para própolis da abelha *Melipona compressipes fasciculata*: 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, (contendo $1,7 \times 10^4$ conídios/mL), 25.0, 26.0, 27.0, 28.0, 29.0, e 30 mg/mL, (contendo $5,3 \times 10^4$ conídios/mL).

Outras concentrações foram testadas para própolis verde: 3.75, 4.0, 4.5, 5.5, 7.5mg/mL, (contendo $1,7 \times 10^4$ conídios/mL), 5.5, 6.5, e 7.5 mg/mL. (contendo $5,3 \times 10^4$ conídios/mL).

3.5.3- CIM pelo método de microdiluição para *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa foi replicada em tubos de ensaio contendo TSB e incubada em estufa a 37°C por 24 horas. Posteriormente, foi transferida para tubos contendo Müller Hinton ágar por 24 horas. Utilizando uma alça de platina esterilizada o microrganismo indicador foi transferido para tubo contendo 5 mL de solução salina, padronizada comparativamente com tubo 0,5 da escala de MacFarland (0,05 mL de cloreto de bário a 1,0% + 9,95 mL de ácido sulfúrico a 1,0%). Diluições sucessivas foram realizadas até a obtenção de um inóculo de 10^7 células/mL. A suspensão obtida foi adicionada ao meio Müller Hinton na proporção de 2 %, obtendo-se o inóculo. Foram utilizadas as mesmas amostras de própolis (item 3.5.1), com as seguintes concentrações: 400.0, 350.0, 250.0, 200.0, 190.0, 180.0, 170.0, 160.0, 150.0, 140.0, 130.0, 120.0, 110.0, 100.0, 90.0, 80.0, 70.0, 60.0 e 50.0 µg/mL.

Para a própolis verde, foram testadas as seguintes concentrações: 400, 399, 398, 397, 396, 395, 394, 393, 392, 391, 380, 370, 360, 350 µg/mL.

Para a própolis da abelha *Melipona quadrifasciata*, foram testadas as seguintes concentrações: 200.0, 199.0, 198.0, 197.0, 196.0, 195.0, 194.0, 193.0, 192.0, 191.0, 190.0 µg/mL.

3.5.4- CIM pelo método de microdiluição para *Micrococcus luteus*

Para *Micrococcus luteus* foram utilizados os mesmos procedimentos descritos para *Pseudomonas aeruginosa* (item 3.5.3) para obtenção do inóculo. Foram utilizadas as mesmas amostras de própolis (item 3.5.1), nas seguintes

concentrações: 400.0, 350.0, 250.0, 200.0, 190.0, 180.0, 170.0, 160.0, 150.0, 140.0, 130.0, 120.0, 110.0, 100.0, 90.0, 80.0, 70.0, 60.0 e 50.0 µg/mL.

Para a própolis verde, foram testadas as seguintes concentrações: 190.0, 189.0, 188.0, 187.0, 186.0, 185.0, 184.0, 183.0, 182.0, 181.0, 180.0 µg/mL.

Para a própolis da abelha *Scaptotrigona* sp., foram testadas as seguintes concentrações: 350.0, 349.0, 348.0, 347.0, 346.0, 345.0, 344.0, 342.0, 341.0, 340.0, 330.0, 320.0 µg/mL.

Para a própolis da abelha *Melipona quadrifasciata*, foram testadas as concentrações: 250.0, 245.0, 240.0, 239.0, 238.0, 237.0, 236.0, 235.0 230.0, 220.0, 210.0, 220.0 µg/mL.

3.5.5- CIM pelo método de microdiluição para *Staphylococcus aureus*

Para *Staphylococcus aureus* foram utilizados os mesmos procedimentos descritos para *Pseudomonas aeruginosa* (item 3.5.3) para obtenção do inóculo. Foram utilizadas as mesmas amostras de própolis (item 3.5.1), nas seguintes concentrações: 400, 350, 250, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60 e 50 µg/mL.

Para a própolis verde, foram testadas as concentrações: 250.0, 249.0, 248.0, 247.0, 246.0, 245.0, 244.0, 243.0, 242.0, 241.0, 240.0, 230.0, 220.0, 210.0, 200.0 ug/mL.

Para a própolis *Scaptotrigona* sp., foram testadas as concentrações: 400.0, 399.0, 398.0, 397.0, 396.0, 395.0, 394.0, 393.0, 392.0, 391.0, 390.0, 380.0, 370.0, 360.0, 350.0 µg/mL.

Para, a própolis da abelha *Melipona quadrifasciata*, foram testadas as concentrações: 400.0, 399.0, 398.0, 397.0, 396.0, 395.0, 394.0, 393.0, 392.0, 391.0, 390.0, 380.0, 370.0, 360.0, 350.0 µg/mL.

3.5.6- CIM pelo método de microdiluição para *Escherichia coli*

Para *Escherichia coli* foram utilizados os mesmos procedimentos descritos para *Pseudomonas aeruginosa* (item 3.5.3) para obtenção do inóculo. Foram utilizadas as mesmas amostras de própolis (item 3.5.1), nas seguintes concentrações: 400.0, 350.0, 250.0, 200.0, 190.0, 180.0, 170.0, 160.0, 150.0, 140.0, 130.0, 120.0, 110.0, 100.0, 90.0, 80.0, 70.0, 60.0 e 50.0 µg/mL.

Para a própolis verde, foram testadas as concentrações: 400.0, 399.0, 398.0, 397.0, 396.0, 395.0, 394.0, 393.0, 392.0, 391.0, 390.0, 380.0, 370.0, 360.0 e 350.0 µg/mL.

3.6- Bioautografia

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no laboratório de Farmacognosia, do departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, sob supervisão do Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos.

Resumidamente, os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana foram analisados através de cromatografia comparativa em camada delgada (CCD), utilizando-se placas de vidro com sílica gel G₆₀F₂₅₄ 5 x 20 cm (Art. 7730-Merck) com a espessura de camada de 0,25 mm.

3.6.1- Dissolução dos extratos

Os extratos foram solubilizados em solventes adequados de acordo com a extração. Neste caso o acetato de etila e o metanol, obtendo-se uma concentração conhecida de 30 mg/mL. Nas placas foram aplicados 8 µL do extrato solubilizado com o auxílio de uma microseringa graduada.

3.6.2- Microorganismos indicadores

Para revelação das placas foram utilizados os seguintes microrganismos indicadores *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14885). Eles foram replicados em tubo de ensaio contendo TSA e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

Utilizando uma alça de platina esterilizada o microrganismo indicador foi transferido para tubo contendo 5 mL de solução salina, a qual foi padronizada comparativamente com tubo 0,5 da escala de MacFarland (0,05 mL de cloreto de bário a 1,0% + 9,95 mL de ácido sulfúrico a 1,0%). Diluições sucessivas foram realizadas até a obtenção de um inóculo de 10^7 células/mL. A suspensão obtida foi adicionada ao meio Müller Hinton na proporção de 2 %, obtendo-se o inóculo. Este foi mantido em banho Maria a 50 °C até o momento do uso.

3.6.3- Detecção da atividade antimicrobiana

As placas cromatográficas, após eluição, foram cuidadosamente secas e as substâncias eluídas foram observadas sob luz ultravioleta (UV) a 254 nm e a 366 nm.

Sobre as placas, com o auxílio de uma pipeta esterilizada, foi adicionado, lentamente, 20 mL do inóculo (meio Müller Hinton).

Aos controles positivos de inibição do crescimento foram aplicados, depois da devida solidificação da placa, 10 µg de gentamicina (Laborclin), sendo incubadas a uma temperatura de 37° C por 24 horas. Após este período as placas foram reveladas com solução de Ágar 1 % contendo 0,02 % de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) e reincubadas a 37° C por cerca de 30 minutos.

3.7- Determinação do perfil químico dos extratos hidroalcoólicos das diferentes amostras de própolis

Os reagentes e os solventes utilizados foram de grau analítico, sendo que para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência foram empregados solventes de grau cromatográfico e a água empregada na preparação das soluções foi purificada em sistemas de filtro MILLI-Q-PLUS da MILLIPORE (Bedford, USA).

Todos os solventes e soluções empregados como fases móveis em cromatografia líquida de alta eficiência, foram filtrados em membrana de nitrato de celulose.

A identificação foi realizada comparando-se o tempo de retenção, lambda máximo e a razão das áreas dos picos em 280 e 320 nm ($A^{280/320}$) de acordo com SOUSA (1999), em cromatografia líquida de alta eficiência utilizando-se três condições diferentes:

Condição 1: fase estacionária coluna C-18 (CLC-ODS), especificada e como fase móvel gradiente multi-linear.

Condição 2: fase estacionária coluna C-18 (CLC-ODS) e como fase móvel sistema isocrático com 25% de solução tampão pH 4,0 (93,9% água + 0,8% de ácido acético + 0,3% de acetato de amônio + 5% de MeOH) e 75% de acetonitrila, fluxo de 1,5 mL/min.

Condição 3: fase estacionária a coluna CN e como fase móvel sistema isocrático com 25% de solução tampão pH 4,0 (93,9% de água + 0,8% de ácido acético + 0,3% de acetato de amônio + 5% de MeOH) e 75% de acetonitrila, fluxo de 1,5 mL/min.

Fase móvel: gradiente multi-linear desenvolvido por SOUSA (1999), apresentado na tabela 1:

Tabela 1: Gradiente multi-linear de eluição para análise qualitativa em CLAE de amostras de própolis.

Tempo (min)	Bomba A (%)	Bomba B (%)
0 – 5.0	75	25
10.0	65	35
15.0	62	38
20.0	60	40
45.0	55	45
50.0	30	70
55.0	20	80
60.0	0	100

Bomba A: 93,9 % água + 0,8 % de ácido acético + 0,3 % de ácido de amônio + 5 % de MeOH

Bomba B: acetonitrila

Fluxo: 1mL/min

Deteção: UV a 280 nm.

4- Resultados

4.1- CIM para *Aspergillus nidulans*

Os resultados do teste de Concentração Inibitória Mínima apresentada nas tabelas 2 e 3 permitem concluir que nenhuma das amostras de própolis apresentou atividade antifúngica frente ao *Aspergillus nidulans*.

Tabela 2: Diferentes concentrações de própolis testadas frente ao *Aspergillus nidulans*.

Concentrações testadas mg/mL	<i>Scaptotrigona</i> sp.	<i>Melipona compressipes fasciculata</i>	<i>Apis mellifera</i> (verde)	<i>Melipona quadrifasciata</i>
0.01	+	+	+	+
0.02	+	+	+	+
0.04	+	+	+	+
0.09	+	+	+	+
0.18	+	+	+	+
0.37	+	+	+	+
0.75	+	+	+	+
1.50	+	+	+	+
3.00	+	+	+	+
3.75	+	+	+	+
7.50	+	+	+	+
15.0	+	+	+	+
30,0	+	+	+	+
60,0	+	+	+	+
120,0	+	+	+	+
240,0	+	+	+	+
480,0	+	+	+	+

“+” indica o crescimento do microorganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microorganismo indicador não cresceu na concentração correspondente.

Tabela 3: Diferentes concentrações de própolis testadas frente ao *Aspergillus nidulans*.

Concentrações testadas mg/mL	<i>Tetragonisca angustula</i>	<i>Plebeia droryana</i>	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	<i>Friesiomelitta varia</i>	<i>Nannotrigona testaceicornis</i>
0.01	+	+	+	+	+
0.02	+	+	+	+	+
0.04	+	+	+	+	+
0.09	+	+	+	+	+
0.18	+	+	+	+	+
0.37	+	+	+	+	+
0.75	+	+	+	+	+
1.50	+	+	+	+	+
3.00	+	+	+	+	+
3.75	+	+	+	+	+
7.50	+	+	+	+	+
15.0	+	+	+	+	+
30,0	+	+	+	+	+
60,0	+	+	+	+	+
120,0	+	+	+	+	+
240,0	+	+	+	+	+
480,0	+	+	+	+	+

“+” indica o crescimento do microorganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microorganismo indicador não cresceu na concentração correspondente.

4.2- CIM para *Trichophyton rubrum*

Nem todas as amostras de própolis mostraram-se eficazes contra o *Trichophyton rubrum*, confirmando o estudo de Koc *et al.*, (2005). Eles demonstraram que somente alguns tipos de própolis apresentam ação antifúngica contra as linhagens de *Trichophyton rubrum*. A concentração inibitória mínima determinada foi 29,5mg/mL para a própolis da abelha *Scaptotrigona* sp. (tabela 4); 29,0mg/mL própolis da abelha *Melipona compressipes fasciculata*, (tabela 4); 29,5mg/mL própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* (tabela 4); 6,5mg/mL para própolis verde (*Apis mellifera*). A partir destes resultados pode-se afirmar que a eficácia ocorreu na seguinte ordem: Própolis verde (*Apis mellifera*) > Própolis da abelha *Melipona compressipes fasciculata*> Própolis da abelha *Scaptotrigona* sp. e *Melipona quadrifasciata* testadas frente ao *Trichophyton rubrum*. Podemos concluir ainda que as própolis das abelhas *Tetragonisca angustula* (tabela 4), *Plebeia droryana*, *Friesiomelitta varia*, *Scaptotrigona bipunctata* e *Nannotrigona testaceicornis* (apresentadas na tabela 5) não apresentaram nenhuma atividade frente ao *Trichophyton rubrum*.

Tabela 4: Diferentes concentrações de própolis testadas frente ao *Trichophyton rubrum*.

<i>Scaptotrigona</i> sp. mg/mL	<i>Melipona</i> <i>compressipes</i> <i>fasciculata</i>	<i>Apis mellifera</i> (verde)	<i>Melipona</i> <i>quadrifasciata</i>	<i>Tetragonisca</i> <i>angustula</i>	
0.001	+	0.001	+	0.001	+
0.002	+	0.002	+	0.002	+
0.004	+	0.004	+	0.004	+
0.008	+	0.008	+	0.008	+
0.016	+	0.016	+	0.016	+
0.032	+	0.032	+	0.032	+
0.064	+	0.064	+	0.064	+
0,11	+	0,11	+	0,11	+
0.23	+	0.23	+	0.23	+
0.46	+	0.46	+	0.46	+
0.93	+	0.93	+	0.93	+
1.87	+	1.87	+	1.87	+
3.75	+	3.75	+	3.75	+
7.50	+	7.50	-	7.50	+
15.0	+	15.0	-	15.0	+
30.0	-	30.0	-	30.0	-
15.0	+	15.0	+	3.75	+
16.5	+	20.0	+	15.0	+
22.5	+	25.0	+	16.5	+
25.5	+	30.0	-	22.5	+
27.5	+	25.0	+	25.5	+
30.0	-	26.0	+	27.5	+
27.5	+	27.0	+	27.5	+
28.5	+	28.0	+	27.5	+
29.5	-	29.0	-	28.5	+
30.0	-	30.0	-	29.5	-
				30.0	-

“+” indica o crescimento do microorganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microorganismo indicador não cresceu na concentração correspondente.

Tabela 5: Diferentes concentrações de própolis testadas frente ao *Trichophyton rubrum*.

<i>Plebeia droryana</i> mg/mL		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>		<i>Friesiomelitta varia</i>		<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	
0.001	+	0.001	+	0.001	+	0.001	+
0.002	+	0.002	+	0.002	+	0.002	+
0.004	+	0.004	+	0.004	+	0.004	+
0.008	+	0.008	+	0.008	+	0.008	+
0.016	+	0.016	+	0.016	+	0.016	+
0.032	+	0.032	+	0.032	+	0.032	+
0.064	+	0.064	+	0.064	+	0.064	+
0,11	+	0,11	+	0,11	+	0,11	+
0.23	+	0.23	+	0.23	+	0.23	+
0.46	+	0.46	+	0.46	+	0.46	+
0.93	+	0.93	+	0.93	+	0.93	+
1.87	+	1.87	+	1.87	+	1.87	+
3.75	+	3.75	+	3.75	+	3.75	+
7.50	+	7.50	+	7.50	+	7.50	+
15.0	+	15.0	+	15.0	+	15.0	+
30.0	+	30.0	+	30.0	+	30.0	+
60.0	+	60.0	+	60.0	+	60.0	+
120.0	+	120.0	+	120.0	+	120.0	+
240.0	+	240.0	+	240.0	+	240.0	+
480.0	+	480.0	+	480.0	+	480.0	+

“+” indica o crescimento do microorganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microorganismo indicador não cresceu na concentração correspondente.

4.3- CIM para *Pseudomonas aeruginosa*

Com relação à bactéria *Pseudomonas aeruginosa* a própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* apresentou melhor atividade antimicrobiana (tabela 6) que a própolis verde (tabela 6), sendo que as própolis das abelhas *Scaptotrigona* sp. (tabela 6), *Tetragonisca angustula* (tabela 6), *Plebeia droryana*, *Friesiomelitta varia*, *Nannotrigona testaceicornis* e *Scaptotrigona bipunctata* (apresentadas na tabela 7) não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana. A concentração inibitória mínima determinada foi 199ug/mL para a própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* (tabela 6) e 397ug/mL para própolis da abelha *Apis mellifera* (verde) (tabela 6).

Tabela 6: Diferentes concentrações de própolis testadas frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

<i>Scaptotrigona</i> sp. µg/mL	<i>Apis mellifera</i> (verde)	<i>Apis mellifera</i> (verde)	<i>Melipona</i> <i>quadrifasciata</i>	<i>Melipona</i> <i>quadrifasciata</i>	<i>Tetragonisca</i> <i>angustula</i>
50	+	400	-	50	+
60	+	350	+	60	+
70	+	360	+	70	+
80	+	370	+	80	+
90	+	380	+	90	+
100	+	390	+	100	+
110	+	400	-	110	+
120	+	390	+	120	+
130	+	391	+	130	+
140	+	392	+	140	+
150	+	393	+	150	+
160	+	394	+	160	+
170	+	395	+	170	+
180	+	396	+	180	+
190	+	397	-	190	+
200	+	398	-	200	+
250	+	399	-	250	+
350	+	400	-	350	+
400	+			400	+

“+” indica o crescimento do microorganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microorganismo indicador não cresceu na concentração correspondente.

Tabela 7: Diferentes concentrações de própolis da testadas frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

<i>Plebeia droryana</i> µg/mL		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>		<i>Friesiomelitta varia</i>		<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	
50	+	50	+	50	+	50	+
60	+	60	+	60	+	60	+
70	+	70	+	70	+	70	+
80	+	80	+	80	+	80	+
90	+	90	+	90	+	90	+
100	+	100	+	100	+	100	+
110	+	110	+	110	+	110	+
120	+	120	+	120	+	120	+
130	+	130	+	130	+	130	+
140	+	140	+	140	+	140	+
150	+	150	+	150	+	150	+
160	+	160	+	160	+	160	+
170	+	170	+	170	+	170	+
180	+	180	+	180	+	180	+
190	+	190	+	190	+	190	+
200	+	200	+	200	+	200	+
250	+	250	+	250	+	250	+
350	+	350	+	350	+	350	+
400	+	400	+	400	+	400	+

“+” indica o crescimento do microorganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microorganismo indicador não cresceu na concentração correspondente.

4.4- CIM para *Micrococcus luteus*

Com relação à bactéria *Micrococcus luteus* pode-se afirmar que a própolis verde (*Apis mellifera*) apresentou melhor atividade antimicrobiana (tabela 8), que a própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* (tabela 9) e que a própolis da abelha *Scaptotrigona* sp. (tabela 8). As própolis das abelhas: *Tetragonisca angustula* (tabela 8), *Plebeia droryana* (tabela 8), *Scaptotrigona bipunctata* (tabela 9), *Friesiomelitta varia* (tabela 9) e *Nannotrigona testaceicornis* (tabela 9) não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana. Portanto, a eficácia ocorreu na seguinte ordem: própolis verde > própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* > própolis da abelha *Scaptotrigona* sp. A concentração inibitória mínima foi 187ug/mL própolis da abelha *Apis mellifera* (verde) (tabela 8), 237ug/mL própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* (tabela 9) e 346ug/mL própolis da abelha *Scaptotrigona* sp. (tabela 8).

Tabela 8: Diferentes concentrações de própolis da testadas frente à bactéria *Micrococcus luteus*.

<i>Scaptotrigona</i> sp. µg/mL		<i>Scaptotrigona</i> sp.		<i>Apis mellifera</i> (verde)		<i>Apis mellifera</i> (verde)		<i>Plebeia droryana</i>		<i>Tetragonisca angustula</i>	
50	+	260	+	50	+	180	+	50	+	50	+
60	+	270	+	60	+	181	+	60	+	60	+
70	+	280	+	70	+	182	+	70	+	70	+
80	+	290	+	80	+	183	+	80	+	80	+
90	+	300	+	90	+	184	+	90	+	90	+
100	+	310	+	100	+	185	+	100	+	100	+
110	+	320	+	110	+	186	+	110	+	110	+
120	+	330	+	120	+	187	-	120	+	120	+
130	+	340	+	130	+	188	-	130	+	130	+
140	+	350	-	140	+	189	-	140	+	140	+
150	+	340	+	150	+	190	-	150	+	150	+
160	+	341	+	160	+			160	+	160	+
170	+	342	+	170	+			170	+	170	+
180	+	343	+	180	+			180	+	180	+
190	+	344	+	190	-			190	+	190	+
200	+	345	+	200	-			200	+	200	+
250	+	346	-	250	-			250	+	250	+
350	-	347	-	350	-			350	+	350	+
400	-	348	-	400	-			400	+	400	+
250	+	349	-								
		350	-								

“+” indica o crescimento do microorganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microorganismo indicador não cresceu na concentração correspondente.

Tabela 9: Diferentes concentrações de própolis da testadas frente à bactéria *Micrococcus luteus*.

<i>Melipona quadrifasciata</i>		<i>Melipona quadrifasciata</i>		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>		<i>Friesiometitta varia</i>		<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	
50	+	200	+	50	+	50	+	50	+
60	+	210	+	60	+	60	+	60	+
70	+	220	+	70	+	70	+	70	+
80	+	230	+	80	+	80	+	80	+
90	+	240	-	90	+	90	+	90	+
100	+	250	-	100	+	100	+	100	+
110	+	230	+	110	+	110	+	110	+
120	+	231	+	120	+	120	+	120	+
130	+	232	+	130	+	130	+	130	+
140	+	233	+	140	+	140	+	140	+
150	+	234	+	150	+	150	+	150	+
160	+	235	+	160	+	160	+	160	+
170	+	236	+	170	+	170	+	170	+
180	+	237	-	180	+	180	+	180	+
190	+	238	-	190	+	190	+	190	+
200	+	239	-	200	+	200	+	200	+
250	-	240	-	250	+	250	+	250	+
350	-			350	+	350	+	350	+
400	-			400	+	400	+	400	+

“+” indica o crescimento do microorganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microorganismo indicador não cresceu na concentração correspondente.

4.5- CIM para *Staphylococcus aureus*

Em *Staphylococcus aureus* a eficácia ocorre na seguinte ordem: própolis verde (*Apis mellifera*) > própolis *Melipona quadrifasciata* > própolis da abelha *Scaptotrigona* sp. As própolis das abelhas *Tetragonisca angustula* (tabela 10), *Plebeia droryana* (tabela 11), *Scaptotrigona bipunctata* (tabela 11), *Friesiometitta varia* (tabela 11) e *Nannotrigona testaceicornis* (tabela 10) não apresentaram atividade antimicrobiana, confirmando os estudos feitos por Marcucci (1996). A concentração inibitória mínima foi 249 ug/mL para própolis verde (*Apis mellifera*) (tabela 10); 397ug/mL *Melipona quadrifasciata* (tabela 11) e 399ug/mL própolis da abelha *Scaptotrigona* sp. (tabela 10).

Tabela 10: Diferentes concentrações de própolis da testadas frente à bactéria *Staphylococcus aureus*.

<i>Scaptotrigona</i> sp. µg/mL		<i>Scaptotrigona</i> sp.		<i>Apis mellifera</i> (verde)		<i>Apis mellifera</i> (verde)		<i>Tetragonisca</i> <i>angustula</i>		<i>Nannotrigona</i> <i>testaceicornis</i>	
50	+	400	-	50	+	200	+	50	+	50	+
60	+	350	+	60	+	210	+	60	+	60	+
70	+	360	+	70	+	220	+	70	+	70	+
80	+	370	+	80	+	230	+	80	+	80	+
90	+	380	+	90	+	240	+	90	+	90	+
100	+	390	+	100	+	250	-	100	+	100	+
110	+	400	-	110	+	240	+	110	+	110	+
120	+	390	+	120	+	241	+	120	+	120	+
130	+	391	+	130	+	242	+	130	+	130	+
140	+	392	+	140	+	243	+	140	+	140	+
150	+	393	+	150	+	244	+	150	+	150	+
160	+	394	+	160	+	245	+	160	+	160	+
170	+	395	+	170	+	246	+	170	+	170	+
180	+	396	+	180	+	247	+	180	+	180	+
190	+	397	+	190	+	248	+	190	+	190	+
200	+	398	+	200	+	249	-	200	+	200	+
250	+	399	-	250	-	250	-	250	+	250	+
350	+	400	-	350	-			350	+	350	+
				400	-			400	+	400	+

“+” indica o crescimento do microorganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microorganismo indicador não cresceu na concentração correspondente.

Tabela 11: Diferentes concentrações de própolis da testadas frente à bactéria *Staphylococcus aureus*.

<i>Melipona quadrifasciata</i> µg/mL	<i>Melipona quadrifasciata</i>	<i>Plebeia droryana</i>	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	<i>Friesiomelitta varia</i>	
50	+	400	-	50	+
60	+	350	+	60	+
70	+	360	+	70	+
80	+	370	+	80	+
90	+	380	+	90	+
100	+	390	+	100	+
110	+	400	-	110	+
120	+	390	+	120	+
130	+	391	+	130	+
140	+	392	+	140	+
150	+	393	+	150	+
160	+	394	+	160	+
170	+	395	+	170	+
180	+	396	+	180	+
190	+	397	-	190	+
200	+	398	-	200	+
250	+	399	-	250	+
350	+	400	-	350	+
				400	+

“+” indica o crescimento do microorganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microorganismo indicador não cresceu na concentração correspondente.

4.6- CIM para *Escherichia coli*

Em *Escherichia coli* pode-se afirmar que a própolis que apresentou melhor atividade antimicrobiana foi à própolis verde (*Apis mellifera*) sendo que a concentração inibitória mínima foi 396ug/mL (tabela 12). A própolis da abelha *Scaptotrigona* sp. também apresentou atividade antimicrobiana, sendo que a concentração inibitória mínima foi 399ug/mL (tabela 12).

As própolis das abelhas: *Melipona quadrifasciata*, *Tetragonisca angustula*, *Plebeia droryana*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Friesiomelitta varia* e *Nannotrigona testaceicornis* não apresentaram atividade antibacteriana.

Tabela 12: Diferentes concentrações de própolis da testadas frente à bactéria *Escherichia coli*.

<i>Scaptotrigona</i> sp. µg/mL		<i>Scaptotrigona</i> sp.		<i>Apis mellifera</i> (verde)		<i>Apis mellifera</i> (verde)		<i>Melipona</i> <i>quadrifasciata</i>	
50	+	400	-	50	+	400	-	50	+
60	+	350	+	60	+	350	+	60	+
70	+	360	+	70	+	360	+	70	+
80	+	370	+	80	+	370	+	80	+
90	+	380	+	90	+	380	+	90	+
100	+	390	+	100	+	390	+	100	+
110	+	400	-	110	+	400	-	110	+
120	+	390	+	120	+	390	+	120	+
130	+	391	+	130	+	391	+	130	+
140	+	392	+	140	+	392	+	140	+
150	+	393	+	150	+	393	+	150	+
160	+	394	+	160	+	394	+	160	+
170	+	395	+	170	+	395	+	170	+
180	+	396	+	180	+	396	-	180	+
190	+	397	+	190	+	397	-	190	+
200	+	398	+	200	+	398	-	200	+
250	+	399	-	250	+	399	-	250	+
350	+	400	-	350	+	400	-	350	+
								400	+

“+” indica o crescimento do microorganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microorganismo indicador não cresceu na concentração correspondente.

Tabela 13: Diferentes concentrações de própolis da testadas frente à bactéria *Escherichia coli*.

<i>Tetragonisca angustula</i> µg/mL		<i>Plebeia droryana</i>		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>		<i>Friesiomelitta varia</i>		<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	
50	+	50	+	50	+	50	+	50	+
60	+	60	+	60	+	60	+	60	+
70	+	70	+	70	+	70	+	70	+
80	+	80	+	80	+	80	+	80	+
90	+	90	+	90	+	90	+	90	+
100	+	100	+	100	+	100	+	100	+
110	+	110	+	110	+	110	+	110	+
120	+	120	+	120	+	120	+	120	+
130	+	130	+	130	+	130	+	130	+
140	+	140	+	140	+	140	+	140	+
150	+	150	+	150	+	150	+	150	+
160	+	160	+	160	+	160	+	160	+
170	+	170	+	170	+	170	+	170	+
180	+	180	+	180	+	180	+	180	+
190	+	190	+	190	+	190	+	190	+
200	+	200	+	200	+	200	+	200	+
250	+	250	+	250	+	250	+	250	+
350	+	350	+	350	+	350	+	350	+
400	+	400	+	400	+	400	+	400	+

“+” indica o crescimento do microorganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microorganismo indicador não cresceu na concentração correspondente.

4.7- CIM para antibiótico padrão

Para determinar a CIM foram utilizados dois antibióticos diferentes, Estreptomicina (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) e Penicilina (*Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*).

A CIM para antibiótico padrão foi determinada (tabela 14), sendo que a concentração inibitória mínima de Estreptomicina para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* está entre 2,95 e 1,475 µg/mL; para *Escherichia coli* a CIM está entre 0,7375 e 0,3688 µg/mL. A CIM de Penicilina para as bactérias *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus* está entre: 5,90 e 2,95 µg/mL.

Tabela 14: Protocolo de antibiótico padrão para *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*.

Concentrações de Antibióticos µg/mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Estreptomicina)	<i>Escherichia coli</i> (Estreptomicina)	<i>Micrococcus luteus</i> (Penicilina)	<i>Staphylococcus aureus</i> (Penicilina)
5,90	-	-	-	-
2,95	-	-	+	+
1,475	+	-	+	+
0,7375	+	-	+	+
0,3688	+	+	+	+
0,1844	+	+	+	+
0,0922	+	+	+	+
0,0461	+	+	+	+
0,0230	+	+	+	+
0,0115	+	+	+	+

“+” indica o crescimento do microorganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microorganismo indicador não cresceu na concentração correspondente.

Para verificarmos se as amostras de própolis apresentaram atividade fungicida, fungistática, bactericida ou bacteriostática, os microorganismos inibidos, foram transferidos para placa de Petri com meios adequados e reincubados em estufa (item 3.4.1, 3.4.2, 3.6.2), sendo que nenhum dos microorganismos testados apresentou crescimento. Isso sugere que as amostras de própolis apresentaram atividade fungicida e bactericida.

Avaliando o perfil cromatográfico obtido da amostra de própolis verde apresentado na figura 1, nota-se a presença de quatro componentes majoritários com distintos níveis de polaridade. Segundo Gregório (2003), os picos detectados em torno de 5 minutos podem ser atribuídos aos ácidos cafeico e cumárico. Os componentes detectados em 25 e 55 minutos são os ácidos 3-prenil-*p*-cumárico e 3,5 *diprenil-p*-cumárico, respectivamente. Além disso, observa-se a presença de compostos minoritários pertencentes à classe dos flavonóides entre 30 e 40 minutos.

Os perfis cromatográficos obtidos das amostras de própolis de origem indígena apresentados nas figuras 2, 3 e 4, são complexos e apresentam componentes com polaridades distintas. Tendo em vista o detector utilizado (UV), pode-se afirmar que os componentes que foram detectados apresentam ligações duplas conjugadas e/ou a presença de anéis aromáticos. Possivelmente esses componentes podem ser derivados de ácidos fenólicos, fenilpropanóides ou flavonóides. Todavia, há a necessidade de utilizar métodos analíticos e eletroscópicos visando atribuir nomes, classes e estruturas químicas dos principais componentes presentes nos diferentes tipos de própolis.

As figuras a seguir ilustram os cromatogramas das análises em cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos hidroalcoólicos das amostras de própolis detecção de 280 nm.

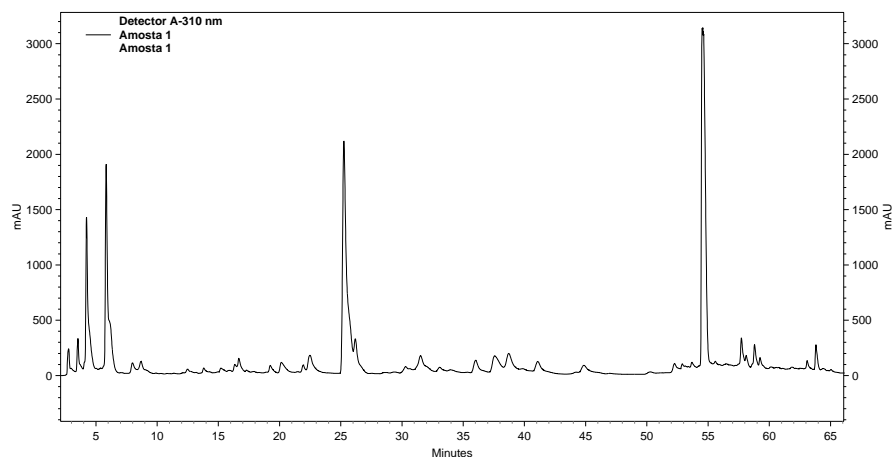


FIGURA 1- Cromatograma do extrato hidroalcoólico da própolis verde (*Apis mellifera*), coletada em janeiro de 2005, detecção em 280nm.

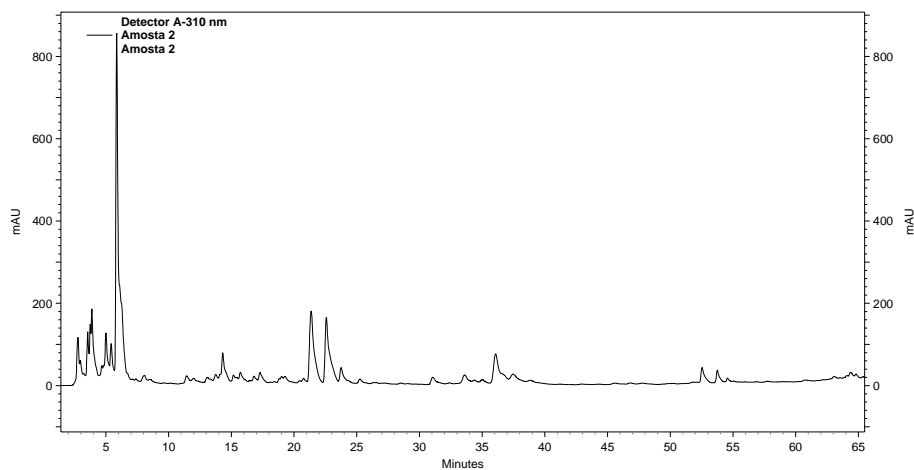


FIGURA 2- Cromatograma do extrato hidroalcoólico da própolis da abelha indígena *Melipona quadrifasciata*, coletada em janeiro de 2005, detecção em 280 nm.

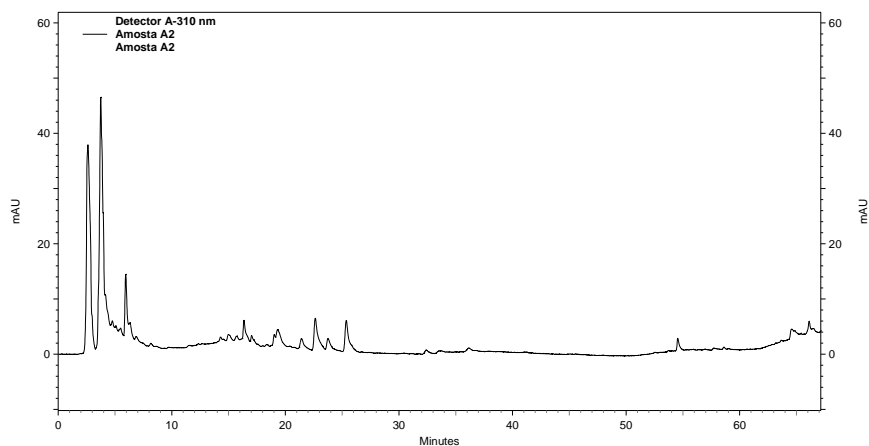


FIGURA 3- Cromatograma do extrato hidroalcoólico da própolis da abelha indígena *Scaptotrigona* sp., coletada em janeiro de 2005, detecção em 280 nm.

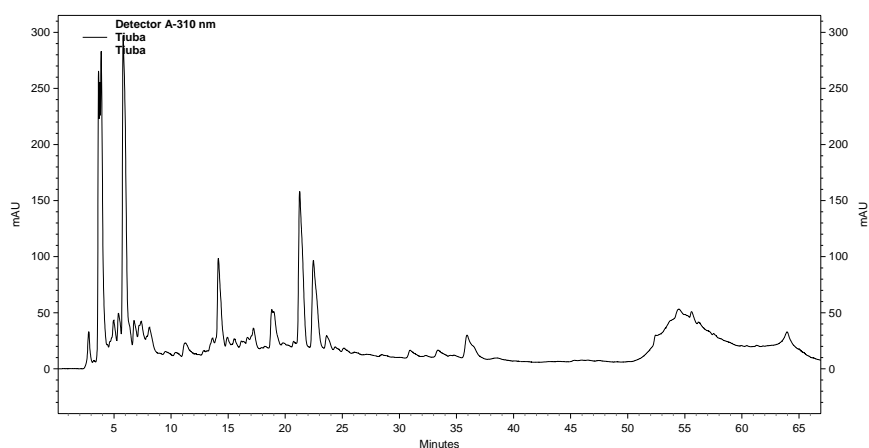


FIGURA 4- Cromatograma do extrato hidroalcoólico da própolis da abelha indígena *Melipona compressipes fasciculata*, coletada em janeiro de 2005, detecção em 280 nm.

4.8- Avaliação da atividade antibacteriana

A partir dos resultados alcançados por cromatografia de camada delgada comparativa (Bioautografia), pode-se afirmar que as amostras de própolis apresentaram perfil cromatográfico e atividade antibacteriana diferentes, respectivamente. Com relação à bactéria *Micrococcus luteus*,

apresentadas nas figuras 5 e 6, pode-se constatar que a própolis verde apresentou melhor atividade antibacteriana que as própolis das abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Scaptotrigona* sp.

Nas figuras 7 e 8 pode-se constatar que em *Staphylococcus aureus* a própolis verde mostrou-se mais eficaz que as própolis das abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Scaptotrigona* sp.

Em *Escherichia coli*, a própolis verde apresentou atividade antibacteriana (figura 9) e a própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* não apresentou nenhuma atividade antibacteriana (figuras 9 e 11).

Em *Pseudomonas aeruginosa* pode-se observar que a própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* (figuras 12 e 14) apresentou melhor atividade antibacteriana que a própolis verde (figuras 12 e 13) e que a própolis da abelha *Scaptotrigona* sp. (figuras 12 e 13) não apresentou nenhuma atividade antibacteriana. Podemos constatar ainda que as amostras de própolis apresentam componentes com polaridades distintas, conseqüentemente atividade antibacteriana diferente.

As figuras a seguir ilustram os resultados obtidos na atividade antibacteriana das diferentes amostras de própolis.

4.8.1- *Micrococcus luteus*

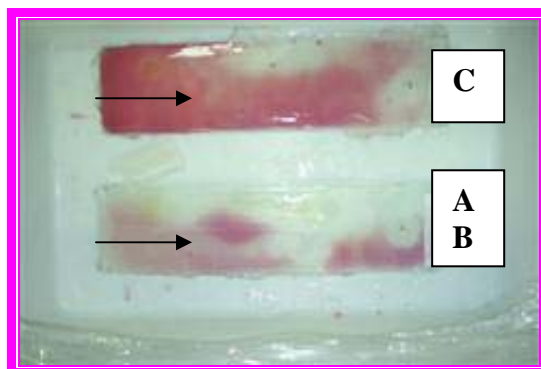


FIGURA 5 – Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana dos seguintes extratos: A= própolis verde B= própolis da abelha indígena *Scaptotrigona* sp.; C= própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* frente ao *Micrococcus luteus* por meio de Bioautografia.



FIGURA 6- Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana do extrato de própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* frente ao *Micrococcus luteus* por meio de Bioautografia.

4.8.2- *Staphylococcus aureus*

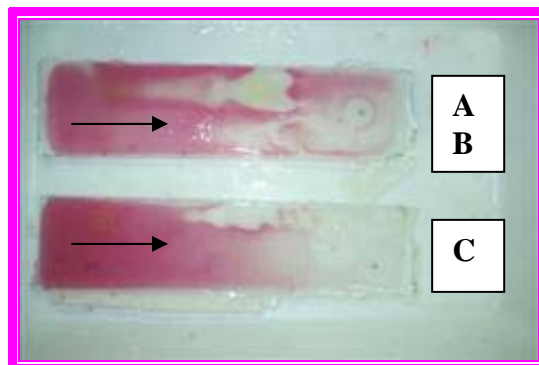


FIGURA 7- Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana dos seguintes extratos: A= própolis verde (*Apis mellifera*); B= própolis da abelha *Scaptotrigona* sp.; C= própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* frente ao *Staphylococcus aureus*, por meio de Bioautografia.



FIGURA 8- Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana da própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* frente ao *Staphylococcus aureus*, por meio de Bioautografia.

4.8.3- *Escherichia coli*

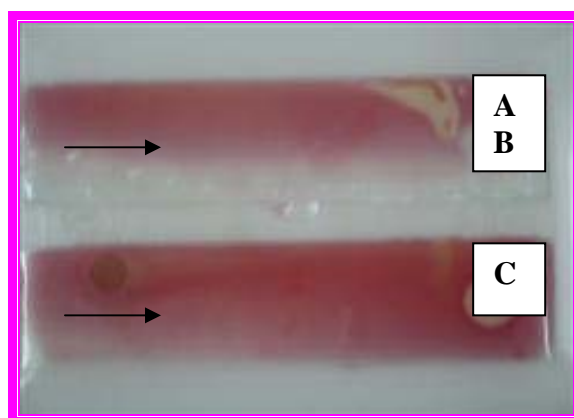


FIGURA 9- Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana dos seguintes extratos: A= própolis da abelha *Scaptotrigona* sp.; B= própolis verde (*Apis mellifera*); C= própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* frente a *Escherichia coli*, por meio de Bioautografia.

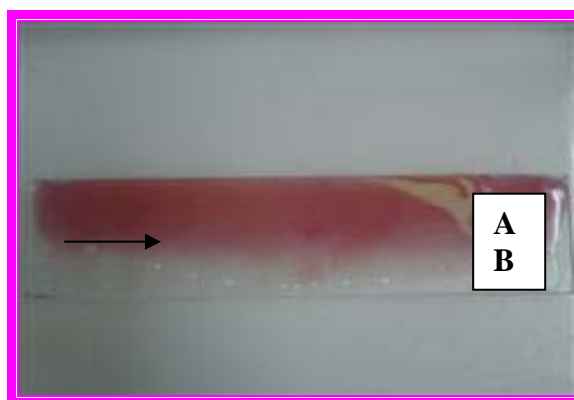


FIGURA 10- Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana dos seguintes extratos: A= própolis da abelha *Scaptotrigona* sp.; B= própolis verde (*Apis mellifera*); frente a *Escherichia coli*, por meio de Bioautografia.

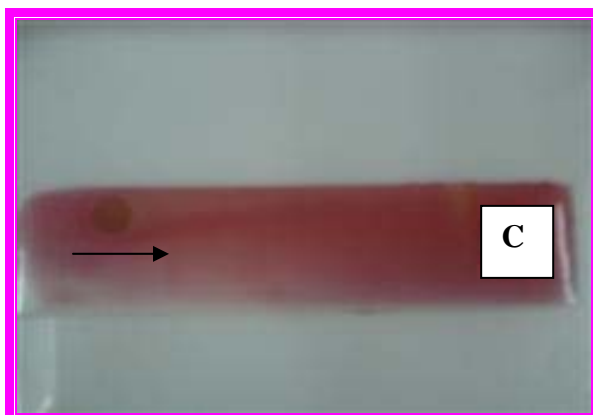


FIGURA 11- Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana da própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* frente a *Escherichia coli*, por meio de Bioautografia.

4.8.4- *Pseudomonas aeruginosa*

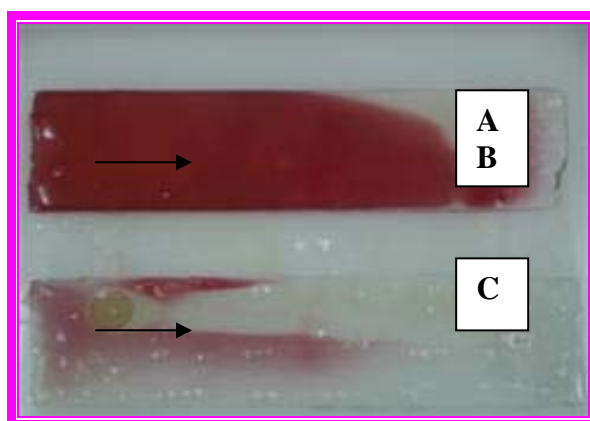


FIGURA 12- Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana dos seguintes extratos: A= própolis verde (*Apis mellifera*); B= própolis da abelha *Scaptotrigona* sp.; C= própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* frente a *Pseudomonas aeruginosa*, por meio de Bioautografia.

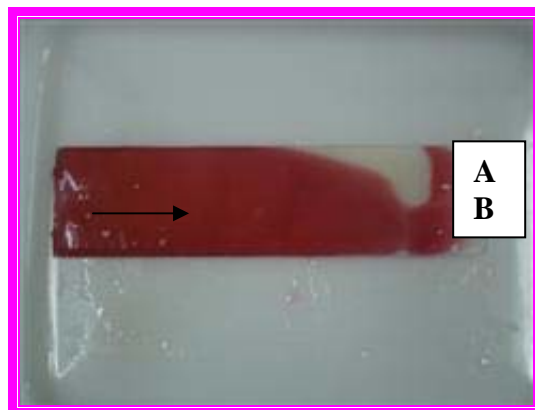


FIGURA 13- Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana dos seguintes extratos: A= própolis verde (*Apis mellifera*); B= própolis da abelha *Scaptotrigona* sp. frente a *Pseudomonas aeruginosa*, por meio de Bioautografia.

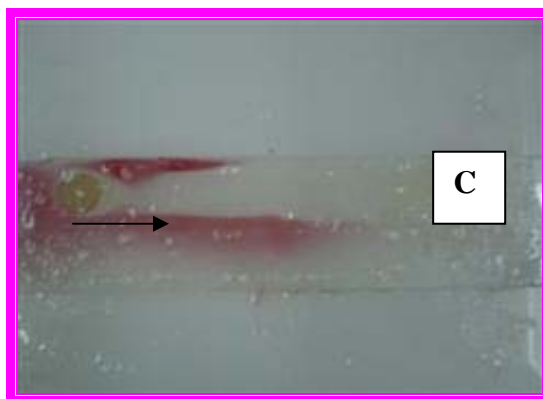


FIGURA 14- Imagem da placa de cromatografia em camada delgada comparativa utilizada para determinação da atividade antibacteriana da própolis da abelha *Melipona quadrifasciata* frente a *Pseudomonas aeruginosa*, por meio de Bioautografia.

Para o controle efetivo dos fungos e bactérias é fundamental o conhecimento sobre a biologia dos patógenos, os seus mecanismos de virulência e os processos de interação com o hospedeiro. Além disso, o relato cada vez mais freqüente de linhagens resistentes aos antifúngicos e antibióticos disponíveis no mercado torna necessárias investigações sobre outras substâncias que atuem de maneira mais específica possível contra fungos e bactérias. Há poucos anos, vários estudos têm sido realizados com relação à susceptibilidade de dermatófitos (*in vitro*) com drogas antifúngicas e os resultados nos mostram variações consideráveis. Os resultados da susceptibilidade antifúngica são influenciados por vários fatores como: pH, tamanho do inóculo, tempo e temperatura da incubação. Com isso, foi estabelecido um protocolo padrão pelo NCCLS, método utilizado neste estudo. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar quais tipos de própolis apresentam atividades antifúngicas e antibacterianas frente a alguns microorganismos.

Há uma grande variedade de fármacos com propriedades antifúngicas e antibacterianas, os quais são oferecidos de várias formas farmacêuticas que podem ter uso tópico ou sistêmico.

Antes de prescrevermos o tratamento, é muito importante darmos o diagnóstico correto, e este pode ser confirmado através da presença de determinados microorganismos nos meios de cultura.

A grande proporção de falhas terapêuticas é devida ao diagnóstico incorreto ou simplesmente a perda de diagnóstico. Por outro lado, a necessidade de estender o tratamento com alto custo às vezes nos leva a desistirmos do tratamento e é sabido que, devido à seleção, cada vez mais aumenta o número de microorganismos resistentes a drogas.

A própolis é uma mistura de substâncias de composição complexa que não apresenta toxicidade; tem sido recomendada como monoterapia e/ou associada com outros produtos farmacêuticos devido suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, anti-tumorais, entre outras (Burdok 1998).

A composição química do extrato de própolis ainda é estudada devido a suas variações naturais.

Neste experimento, diferentes tipos de própolis de abelhas africanizadas e de meliponíneos em diferentes concentrações foram estudadas contra: *Aspergillus nidulans*, *Trichophyton rubrum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*. O possível mecanismo da ação antibacteriana e antifúngica da própolis foi estudado por Takaisi-Kikuni e Schilcher (1994). Eles observaram a inibição da divisão celular na presença de própolis e isto sugere que a própolis devia agir na inibição da replicação do DNA e indiretamente na divisão celular.

Segundo Ghisalberti (1960) a atividade antifúngica e antibacteriana da própolis é devida à presença de componentes polares, principalmente fenóis (flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres).

Os flavonóides são quantitativamente e qualitativamente um dos maiores grupos de produtos naturais conhecidos no mundo. Estes são constituintes das células vegetais superiores, atuam em atividades regulatórias de vitaminas lipossolúveis e eliminam odores que se comunicam com o meio ambiente (Middleton & Teramura, 1993). Eles são reconhecidos pelos polinizadores, que contribuem pela dispersão de pólen.

O uso dos flavonóides contra infecções bacterianas e fúngicas tem duas propostas: (1) “matar” as células das bactérias e fungos ou (2) dificultar os efeitos da difusão das toxinas bacterianas (McClure, 1975; Lopes *et al.*, 1998). As maiorias das bactérias que acometem os homens e animais são mortas na presença de flavonóides. Entretanto, esse mecanismo não é totalmente compreendido, mas é sabido que o efeito bactericida dos flavonóides é devido à perturbação metabólica. Os canais de íons, que são componentes tanto de células animais quanto bacterianas, são pontos sensíveis de inibição e provavelmente alvos dos flavonóides. Nas células animais, esses canais são regulados por reações de fosforilação e desfosforilação. A pesquisa para o uso dos flavonóides para prevenção e cura das doenças já está sendo realizada por vários pesquisadores em alguns países. O uso consciente dessas substâncias é mais comum nos países emergentes do que nas partes industrializadas do mundo.

Neste estudo algumas própolis apresentaram atividades bactericida e fungicida frente a alguns microorganismos. Esses resultados reforçam a

importância e o potencial do extrato de própolis como tratamento de algumas patologias.

A atividade biológica da própolis indica que esta é a defesa das abelhas contra alguns microorganismos. Nossos resultados, bem como dados da literatura, a ação química e biológica da própolis, não podem apontar uma substância individual ou uma classe particular de substância, pois diferentes combinações de substâncias são essenciais na atividade biológica. Isso é importante para notarmos que todas as investigações da atividade antibacteriana e antifúngica, isoladas da própolis, mostraram que não é um único componente que apresenta atividade maior do que o extrato total (Kujumgiev *et al.*, 1993; Serra Bonvehi *et al.*, 1994).

A maioria dos resultados obtidos são muito animadores, pois podemos utilizar a própolis frente a alguns microorganismos tanto em humanos quanto em animais, podemos ainda fazer uma padronização química e biológica da própolis, apesar dos grandes desafios que temos que superar para que possamos alcançar este objetivo.

5-Conclusões

- Em todos os microorganismos testados as própolis das abelhas *Tetragonisca angustula*, *Plebeia droryana*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Friesiometlitta varia* e *Nannotrigona testaceicornis*, não apresentaram atividade antifúngica nem antibacteriana.
- Nenhuma amostra de própolis apresentou atividade antifúngica frente ao *Aspergillus nidulans*.
- A linhagem do fungo *Trichophyton rubrum* mostrou-se sensível a alguns tipos de própolis sendo que a própolis verde foi a mais eficaz.
- Somente alguns tipos de própolis apresentaram atividade antibacteriana.

6-Perspectivas

- Experimentos de infecção *in vivo* através da inoculação de conídios das linhagens em cobaias poderão revelar se as amostras de própolis apresentam as mesmas atividades antifúngicas e antibacterianas que *in vitro*.
- É possível fazer o isolamento químico das substâncias presentes nas amostras de própolis e avaliar a atividade separadamente, para saber se é apenas uma ou várias classes de substâncias que apresentam atividade frente aos microorganismos.

7-Referências Bibliográficas

- Abd El Hady, F.K. & Hegazi, A.G. Egyptian propolis: Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. **Z. Naturforsch.** v.57(3-4), p. 386-394, 2002.
- Aga, H. *et al.*, Isolation and identification of anti-microbial compounds in Brazilian propolis. **Biosc. Biotech. Biochem.** v. 58, p.954-6, 1994.
- Aly, S.A & Elewa, N.A. The effect of Egyptian honeybee propolis on the growth of *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin biosynthesis in Ras cheese. **J. Dairy Res.** v.9, p.1-5, 2007.
- Amoros, M. *et al.* Synergistic effect of flavones and flavonoids against Herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **J. Nat. Prot.** v.55, p.1732-40, 1992.
- Anstey, A. & Lucke T.W. Philpot C. *Tinea capitis* caused by *Trichophyton rubrum*. Br. **J. Dermatol.** v.135, p. 113-115, 1996.
- Atlas, R.M. **Handbook of microbiological media.** Edited by Laerence C. Perks. Ed. CRC Press. P.786, 1993.
- Bankova, V. *et al.* A study on flavonoids of propolis. **J. Nat. Prod.** v.46, p.471-4, 1983.
- Bankova, V. *et al.* Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. **Apidol.**, v.23, p.79-85, 1992.
- Bankova, V. *et al.* Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidol.**, v.29, p.361-7, 1998.
- Banskota, A.H. *et al.* Chemical constituents of Brazilian propolis and their activities. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.61, p.896-900, 1998.

- Barberán, F. T. *et al.* Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochem.**, v.34, p.191-6, 1993.
- Baron S. **Medical Microbiology**. 4th ed. Galveston (TX-USA), 1996.
- Bastos, E.M.A.F. **Origem Botânica e Indicadores de qualidade da “Própolis Verde” Produzida no estado de Minas Gerais**, Brasil,137p. Tese Doutorado-Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.
- Boudourova-Krasteva, G.B. *et al.* Phenolics from Brazilian propolis. **Z. Naturforsch.** v.52c, p. 676-9, 1997.
- Burdok, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chem. Toxicol.** v.36, p.347-63, 1998.
- Campos, M.G.R. *et al.* Characterization of flavonoides in three hive products: bee, pollen, propolis and honey. **Pl. Med., Stuttgart**, v.56, p.580-581,1990.
- Cervelatti E.P. *et al.* Electrophoretic molecular karyotype of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Gen. Mol. Biol.** V.27(1), p.99-112, 2004.
- Cheng, P.C. & Wong, G. Honey bee propolis: prospects in medicine. **Bee World**, v.77, p.8-15,1996.
- Chinelli P.A.V. *et al.* Dermatophyte agents in the city of São Paulo from 1992 to 2002. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** v. 45(5), p.259-263, 2003.
- Chopra, S. *et al.* Propolis protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. **Exp. Mol. Pathol.** v.62, p.190-8,1995.
- Cizmarick J. & Lahitova N. Antimutagenicity of propolis. **Pharm.**, v. 53, p.883-4, 1998.
- Cook, N.C. & Samman, S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. **J. Nutr. Biochem.** v.07, p.66-76, 1995.

- Costa M. *et al.* Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Ver. Bras. Med. Trop.**, v.35(1), p.19-22, 2002.
- Debiaggi, M. *et al.* Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. **Microbiol.**, v.13, p. 207-13, 1990.
- Dobrowolki, J.W. *et al.* Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **J. Ethonopharmacol.**, v.35, p.77-82, 1991.
- Fernandes, A. *et al.* The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* and Brazilian Stingless, **J. Ven. Anim. Tox.**, v.7(2), 2001.
- Foster K.W. *et al.* Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. **Am. Acad. Dermatol.** v.50(5), p.748-752, 2004.
- Frenkel, K. *et al.* Inhibition of tumor promoter-mediated process in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. **Canc. Res.** v.53, p.1255-61, 1993.
- Garcia-Vigueira, C.*et al.* Composition of propolis from two different Spanish regions. **Z. Naturforsch., Mainz**, v.47, p.634-637, 1992.
- Ghisalberti, E. L. Propolis: a review. **Bee World** v.60, p.50-84, 1960.
- Greenaway, W. *et al.* Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. **Z. Naturforsch.** v.46c, p 111-21, 1991.
- Gregorio, L, E., **Influência da sazonalidade na composição polínica, no perfil químico e na atividade antimicrobiana da própolis produzida em Cajuru-SP**, 174p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de São Paulo, 2003.
- Havsteen, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol.** v.32, p.1141-8, 1983.

- Higashi, K.O & Castro, S.L. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have a impact on its interation with host cell. **J. Ethnopharmacol.** v.43, p. 149-55, 1994.
- Hollmam, P.C.H. *et al.* Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chem.** v.57, p. 43-6,1996.
- Ikeno, K. *et al.* Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Res.** v.25, p.347-51, 1991.
- Ivanoska, M. D. *et al.* Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water soluble derivative. **J. Ethnopharmacol.** v.47, p.135-43, 1995.
- Jennings M.B. *et al.* Study of clinically suspect onychomycosis in a podiatric population, **J. Am. Podiatr. Med. Assoc.** v.92, p.327-330, 2002.
- Kimoto, T. *et al.* Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis. **Canc. detec. Prev.** v.22, p.506-15, 1998.
- Kimoto, T. *et al.* Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetato in mice and protection from it by Brazilian propolis and artepillin C. **Virchows Archiv**, Heidelberg, v.438(3), p.259-270, 2001a.
- Kimoto, T. *et al.* Apoptosis of human leukemia cells induced by artepillin C, an ative ingredient of Brazilian propolis. **Antican. Res.**, Athens, v.21, p.221-228, 2001b.
- Koc, A.N. *et al.* Comparison of in vitro activies of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. **Myc.**,v.48, p.205-210, 2005.
- Koo, M.H & Park, Y.K.; Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Biosc., Biotech. Biochem.**, Tokyo, v.61(2), p.367-369,1997.
- Krol, W. *et al.* Anti-oxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. **Biochem.** v.21, p.593-7, 1990.

- Kujumgiev, A. *et al.* Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. **Pharm.**, v.48, p.785-786, 1993.
- Kwon-Chung KJ & Bennett JE. **Medical mycology**. Ed. Lea and Febiger, USA. p.105-161, 1992.
- Lopes, N.P. Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*. **Plant Med.** v.64, p.667-668, 1998.
- Lu, L.C. *et al.* Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **J Food Microbiol.** vol. 102(2), p.213-20, 2005.
- Mahran, G.; Naturals Products. **Med. Trad.**, v.1, p.23, 1977.
- Marcucci, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidol.**, v.26, p.83-99, 1995.
- Marcucci, M.C. *et al.*, Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Quím.**, São Paulo, v.19, p.529-536, 1996.
- Marcucci, M.C & Bankova, V. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Phytochem.**, Oxford, v.2, p.115-123, 1999.
- Markham, K.R. *et al.*, HPLC and GC-MS identification of major organic constituents in New Zealand propolis. **Phytochem.**, Oxford, v.42, p.205-211, 1996.
- Martos, I. *et al.*, Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. **J. Agr. Food Chem.**, Washington, v.45, n.8, p.2824-2829, 1997.
- Matsuno, T. *et al.* A tumoricidal and antioxidant compound isolated from an aqueous extract of propolis. **Med. Sci. Res.** v.25, p.583-4, 1997.
- McClure, J. W. Physiology and functions of flavonoids, **Chem.**, v.18, p.970-1055. 1975.

- McGinnis MR , **Laboratory handbook of medical mycology**. Academic Press, New York, 1980.
- Middleton, E.M & Teramura, A.H. The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. **Plant Physiol.** v.103, p.741-52, 1993.
- Miorin. P.L, Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **J. Appl. Microbiol.** v. 95(5), p.913-20, 2003.
- Mirzoeva, O.K. *et al.* Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiol. Res**, v.152, p.239-46,1997.
- Monod M. *et al.* Survey of dermatophyte infections in the Lausanne area Switzerland. **Dermatol.** v.205(2), p.201-203, 2002.
- Mors, W. B.; Natural Medicine, **Ciência Hoje**, v. 1, p.14, 1982.
- Ogawa H. *et al.* Dermatophytes and host defense in cutaneous mycoses. **Med. Mycol.** 36(suppl): p.166-173, 1998.
- Oliveira, A.C, *et al.* Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.101(5): 493-7, 2006.
- Ota,C. *et al.* Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*, **Mycosis**, v.44, p.375-378, 2001.
- Ozcan, M. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by pollen and propolis extracts. **J. Med Food**, vol.7(1), p.114-6, 2004.
- Park, Y.K & Ikegaki, M. Preparation of water extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Biosc. Biotech. Biochem.** v.62, p.2230-2, 1998.
- Pascual, C. *et al.* Scavenging activity of propolis extract against oxygen radicals. **J. Ethnopharmacol.** v.41, p.9-13, 1994.

- Pereira, A.S. *et al.* Application of high resolution gas chromatography to crude extracts of propolis. **J. High Res. Chrom.**, v.21(7), p.396-400, 1998.
- Popova, M. *et al.* Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. **Phytom.**, v.12(3), p.221-8, 2005.
- Rao, C.V. *et al.* Effect of caffeic acid esters on carcinogen- induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. **Chem. Biol. Interact.** v.84, p.277-90, 1992.
- Rao, C.V. *et al.* Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoximethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. **Cancer Res.** v.53, p.4182-8, 1993.
- Rao, C.V. *et al.* Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate. **Cancer Res.** v.55, p.2310-15, 1995.
- Said, R.A. **Atividade antioxidante de diferentes concentrações dos extratos aquoso e etanólico da própolis, nas intoxicações agudas por acetaminofen, em camundongos.** Viçosa, 84p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- Sawaya, A.C.H.F. *et al.* Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*, **Microbiol.**, v.35,p.203-207, 2002.
- Scazzocchio, F. *et al.* Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiol Res.** v.161(4), p.327-33, 2006.
- Scheller, S. *et al.* Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. International **J. Rad. Biol.** v.57, p.461-5, 1990.
- Serra Bonvehí, J. & Ventura Coll, F. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis on dietetics. **J. Am. Chem. Soc.**, v.71, p.529-532, 1994.

- Siess, M.H. *et al.*, Flavonoids of honey and propolis: characterization and effects on hepatic drug-metabolizing enzymes and benzopyrene-DNA binding in rats. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.44(8), p.2297-2301, 1996.
- Silici, S. & Koc, A.N. Comparative study of in vitro methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. **Microbiol.** v.43(3), p. 318-24, 2006.
- Silva Cunha, I.B. *et al.* Antitrypanosomal activity of Brazilian propolis from *Apis mellifera*. **Chem. Pharm. Bull (Tokyo)**, v.52(5), p.602-4, 2004.
- Sohnle P.G. Dermatophytosis. *In* Fungal infections and immune responses. **Plenum Press**, New York, p.27-47, 1993.
- Sonmez, S. *et al.* The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. **J. Ethnopharmacol.** v.102(3), p.371-6, 2005.
- Sousa, M.L, **Isolamento dos constituintes de amostra de própolis e caracterização do perfil químico através de cromatografia líquida de alta eficiência**, 113p. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.
- Takaisi-Kikuni, N. B. & Schilcher, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Med.** v.60, 222-227, 1994.
- Ugur, A. & Arslan, T. An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla Province of Turkey. **J. Med. Food**, v.7(1), p.90-4, 2004.
- Uzel, A. *et al.* Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiol. Res.** v.160(2), p. 189-195, 2005.
- Valdes, G. *et al.* Ensayo preliminar de la accion antifúngica de extractos de propoleo sobre *Candida albicans*. **Ciencia Y Tecnica en la agricultura-Apicultura**, v.03, p.41-49, 1987.

Valle, J. R. **A Farmacologia no Brasil, Antecedentes e Perspectivas**, Academia de Ciências do Estado de São Paulo: São Paulo, 1978.

Varanda, E. A. *et al.* Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct- and indirect-acting mutagens. **Terat. Carc. Mutag.** v.19, p.403-413, 1999.

Velikova, M. *et al.* Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees, **Fitoterapia**,v.72, p.693-696, 2000.

Vennat, B. *et al.*, Qualitative and quantitative analysis of flavonoids and identification of phenolic acids from a propolis extract. **J. Pharmacie Belgique**, Bruxelles, v.50(5), p.438-444, 1995.

Vilela, J. D.; Natural life. **Rev. Paul. Med.**, v.89, p.115. 1977.

Volpert, R. & Elstner, E.F. Biochemical activities of propolis extracts. I Standardization and antioxidative properties of ethanolic and aqueous derivatives. **Z. Naturforsch.**, v.48, p.851-7, 1993.

Wagner DK & Sohnle PG, Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts, **Clin. Microbiol. Rev.** v.35, p.317-335, 1995.

Weitzman, I & Summerbell, R. The dermatophytes. **Clin. Microbiol.**, Rev. p.240-259, 1995.

Zais, N & Rebell G. Chronic dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*. **J. Am. Acad. Dermatol.** v. 35(3) p.17-20, 1996.

8-ANEXOS

ANEXO I: Constituintes do Meio Sabouraud

O pH do meio foi ajustado para 5,7. O meio foi autoclavado a 1 atm de pressão e 120⁰C por 20 min. Para preparo do meio sólido foi adicionado Ágar 1,5%(m/v). O meio Sabouraud foi utilizado para o crescimento de *Trichophyton rubrum*.

Meio Sabouraud	g e/ou mL
Glicose	20g
Peptona	10g
Água destilada	1000mL

Meios e soluções para *Aspergillus nidulans*

ANEXO II: Preparo de Meio Completo.

O pH foi ajustado para 6,8. O meio foi autoclavado a 1 atm de pressão e 120⁰C por 20 min. Para preparo do meio sólido foi adicionado agar 1,5% (m/v). O meio completo foi utilizado para crescimento de *Aspergillus nidulans*.

Meio Completo	g e/ou mL
Solução de sais	20mL
Solução de casaminoácidos	10mL
Solução de ácidos nucléicos	2,5 mL
Solução de vitaminas	2,0 mL
Peptona	2,0g
Extrato de levedura	1,0g
Água destilada	1.000mL

ANEXO III: Solução de Sais.

As soluções apresentadas nas tabelas 3, 4, 5 e 6 foram mantidas sob clorofórmio (2mL) a 4^oC.

Solução de Sais	g e/ou mL
Cloreto de potássio	26g
Sulfato de magnésio heptahidratado	26g
Fosfato de potássio monobásico	76g
Solução de elementos-traço	50mL
Água destilada estéril	1000mL

ANEXO IV: Solução de Elementos-Traço.

Solução de Elementos-Traço	mg, g e/ou mL
Borato de sódio decahidratado	40mg
Sulfato de cobre pentahidratado	400mg
Sulfato de ferro heptahidratado	532mg
Sulfato de manganês monohidratado	292mg
Molibdato de sódio bihidratado	800mg
Sulfato de zinco heptahidratado	8g
Água destilada estéril	1000mL

ANEXO V: Solução de Caseína Hidrolisada ou Casaminoácidos

Solução de Caseína Hidrolisada ou Casaminoácidos	g e/ou mL
Caseína hidrolisada	20g
Água destilada estéril	1000mL

ANEXO VI: Solução de Vitaminas**Solução de ácidos nucléicos hidrolisados**

Foi dissolvido 2g de ácido nucléico de levedura em 15mL de HCl e 2g em 15mL de NaOH. A solução foi aquecida por 20 minutos em banho-maria. Posteriormente, as soluções foram ajustadas em pH 6,0. A solução foi filtrada e o volume final foi completado para 40mL com água destilada. A solução foi mantida em clorofórmio (2mL), a 4^oC.

Solução de Vitaminas	mg e/ou mL
Biotina	1mg
Ácido p-aminobenzóico	25mg
Ácido fólico	10mg
Piridoxina	50mg
Tiamina	50mg
Ácido nicotínico	100mg
Pantotenato de cálcio	100mg
Cloreto de colina	100mg
Riboflavina	100mg
Mesoinositol	200mg
Água destilada estéril	100mL

ANEXO VII: Solução de Glicose

As soluções apresentadas nas tabelas 7, 8 e 9 foram preparadas e autoclavadas e mantidas a 4°C.

Solução de Glicose	g e/ou mL
Glicose	50g
Água destilada estéril	100mL

ANEXO VIII: Solução de Nitrato de sódio

Solução de Glicose	g e/ou mL
Nitrato de sódio	59,5g
Água destilada	200mL

ANEXO IX: Solução Salina + Tween

Solução Salina + Tween	g e/ou mL
Cloreto de sódio	9g
Tween 80	0,1mL
Água destilada	1.000mL

Meio RPMI-1640

Foi utilizado 10,4 g do meio RPMI-1640, sendo dissolvido em 900 mL de água destilada. A seguir foi adicionado ao MOPS uma concentração final de 0,165M, agitando-se até a completa dissolução do meio. O pH foi ajustado para 7,0 utilizando hidróxido de sódio 1M e o volume completado para 1L com água destilada. O meio foi esterilizado por filtração e estocado a -20°C.

ANEXO X: Constituintes do meio RPMI- 1640.

Constituinte	g/L	Constituinte	g/L
L-arginina	0,200	Biotina	0,0002
L-asparagina	0,050	D-pantotênico	0,00025
Ácido L-aspártico	0,020	Cloreto de colina	0,003
L-cisteína.2HCL	0,0652	Ácido fólico	0,001
Ácido L-glutâmico	0,020	Mio-inositol	0,035
L-glutamina	0,0300	Niacinamida	0,001
Glicina	0,010	p-aminobenzóico	0,001
L-histidina	0,015	Piridoxina HCL	0,001
L-hidroxiprolina	0,020	Riboflavina	0,0002
L-isoleucina	0,050	Tiamina HCL	0,001
L-leucina	0,050	Vitamina B12	0,000005
L-lisina HCL	0,040	Nitrato de cálcio	0,100
L-metionina	Cloreto de potássio	0,400	-
L-fenilalanina	0,015	Sulfato de magnésio	0,04884
L-prolina	0,020	Cloreto de sódio	6,000
L-serina	0,030	Fosfato de sódio	0,800
L-treonina	0,020	D-glicose	2,000
L-triptofano	0,005	Glutationa	0,001
L-tirosina 2Na	0,020	Vermelho de fenol	0,0053
L-valina	0,020	-	-