

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Potencial antifúngico e antibiofilme de diferentes tipos de própolis brasileiras sobre  
isolados patogênicos de espécies de *Candida não-albicans*

ROSE VANESSA BANDEIRA REIDEL

PORTO ALEGRE, 2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Potencial antifúngico e antibiofilme sobre isolados patogênicos de *Candida* não-  
*albicans* de diferentes tipos de própolis brasileiras

Dissertação apresentada por **Rose  
Vanessa Bandeira Reidel** para  
obtenção do GRAU DE MESTRE em  
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser  
Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria

Porto Alegre, 2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25.03.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Maikon Francisco Corrêa Barros  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Miriam Anders Apel  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Bandeira Reidel, Rose Vanessa  
Potencial antifúngico e antibiofilme de diferentes tipos de própolis brasileiras sobre isolados patogênicos de espécies de *Candida* não-albicans / Rose Vanessa Bandeira Reidel. -- 2014. 107 f.

Orientadora: Gilsane Lino von Poser.  
Coorientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. própolis. 2. fungos emergentes. 3. biofilme. 4. susceptibilidade antifúngica. 5. análise química. I. Poser, Gilsane Lino von, orient. II. Fuentefria, Alexandre Meneghello, coorient. III. Título.

*A consciência da complexidade nos faz compreender que não poderemos escapar jamais da incerteza e que jamais poderemos ter um saber total: a totalidade é a não verdade.”*

Edgar Morin



## Agradecimentos

À professora Dra. Gilsane Lino von Poser pela orientação, convívio, amizade, carinho e incentivo para aprender mais e ir além

Ao professor Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria pela co-orientação e por mostrar um pouco da dimensão maravilhosa dos fungos

Aos meus queridos colegas do Laboratório de Farmacognosia: Gabi, Gari, Flávia, Fernando, Henrique, Maikon e Stephanie pela amizade e aprendizagem

Aos colegas do Grupo de Micologia Aplicada pela amizade e conhecimento compartilhado

À todos colegas que passaram pelo Laboratório de Farmacognosia, pela amizade e troca de conhecimentos

Aos professores deste Curso de Pós-Graduação pelos ensinamentos passados

Aos funcionários da faculdade de Farmácia da UFRGS em especial a secretaria do PPGCF

À CAPES pelo apoio financeiro

À Maribete pela obtenção dos Espectros de Massas

Aos colegas Gari e Henrique pela ajuda na obtenção dos espectros de RMN

Ao meu filho Rômulo pelo estímulo de alegria, amor e criatividade

Ao meu marido Marcelo pelo amor, confiança, pela compreensão da ausência do convívio familiar e incentivo para ir além

À minha mãe por me ensinar desde cedo a ter “gosto” pelos estudos, em especial pela química, pelo apoio e força...

Aos meus irmãos Fábio e Joana pelo carinho e apoio

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para essa etapa de minha vida





## Resumo

Potencial antifúngico e antibiofilme sobre isolados patogênicos de *Candida* não-*albicans* de diferentes tipos de própolis brasileiras

Palavras-chave: própolis, biofilmes, *Candida* não-*albicans*, microdiluição em caldo

A própolis é um material resinoso coletado pelas abelhas de diversas partes das plantas como brotos, folhas jovens e exsudatos. É utilizado para embalsamar animais que tenham morrido dentro da colmeia, vedar as paredes e conferir proteção frente a doenças. O emprego desse produto natural com finalidade medicinal remonta a antiguidade, tendo iniciado junto com antigas civilizações como a Egípcia, Grega e Romana e perduram até os dias atuais com ampla utilização em múltiplas finalidades terapêuticas médicas e veterinárias. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antifúngico, a capacidade de remover e inibir biofilmes de espécies de *Candida* não-*albicans* de diferentes tipos de própolis e analisar a composição química da própolis obtida do Rio Grande do Sul (RS). Foram realizadas macerações e extrações sequenciais com solventes em ordem crescente de polaridade a fim de purificar os extratos. Em seguida foi feita a determinação da atividade antifúngica pelo método da microdiluição em caldo e o ensaio de remoção e inibição de biofilmes através de teste em corpo de prova (utilizando cateter como material teste). Após, foi realizada a análise química da fração diclorometano de própolis obtida do RS. De modo geral, os extratos e frações de própolis vermelha e própolis nativa do RS demonstraram forte atividade anti-*Candida* frente às leveduras testadas e significativa capacidade de remoção de seu biofilme aderido em cateteres, como corpo de prova. A própolis verde apresentou baixo espectro de ação antifúngica. A análise química da fração diclorometano de própolis obtida do RS levou ao isolamento dos flavonoides pinocembrina, pinostrobinina e pinostrobinina chalcona. Os resultados evidenciam o potencial da própolis nativa do RS e da própolis vermelha para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos e desinfetantes contra *Candida* não-*albicans*.



## Abstract

Antibiofilm and antifungal potential about pathogenic isolates of *Candida non-albicans* of different types of brazilian propolis

Keywords: propolis, biofilms, *Candida non-albicans*, broth microdilution

Propolis is a resinous material collected by bees from various plant parts such as buds, young leaves and exudates. It is used to embalm animals that have died inside the hive, seal the walls and confer protection against the disease. The use of this natural product with medicinal purposes dates back to antiquity, having started with ancient civilizations as the Egyptian, Greek and Roman, and lasted to the present day with extensive use in multiple medical and veterinary therapeutic purposes. The aim of this study was to evaluate the antifungal potential, the ability to remove and inhibit biofilms of *Candida non-albicans* of different types of propolis and analyze the chemical composition of propolis obtained from Rio Grande do Sul (RS). Maceration and sequential extractions with solvents in order of increasing polarity were performed to purify the extracts. Then the antifungal activity was determined by the method of broth microdilution testing and removal and inhibition of biofilms through test of body of proof (catheter using as test material). After, the chemical analysis of the dichloromethane fraction of propolis obtained in RS was performed. In general, the extracts and fractions of propolis of RS demonstrated strong anti-*Candida* activity across the tested yeasts and significant capacity removal of biofilm attached in catheter, as test body. The green propolis had low action spectrum antifungal. Chemical analysis of the dichloromethane fraction of propolis native to RS led to the isolation of the flavonoids pinocembrin, chalcone pinostrobin and pinostrobin. The results show the potential of the RS native propolis and red propolis for the development of new antifungal agents and disinfectants against non-*albicans Candida*.



## Lista de figuras

Figura 1- Distribuição geográfica de alguns tipos de própolis e a sua correlação com a composição química. ....	26
Figura 2 - Estrutura química básica de um flavonoide.....	46
Figura 3- Mecanismo de ação dos flavonoides como captadores ( <i>scavengers</i> ) de espécies reativas envolvido na sua capacidade antioxidante.....	48
Figura 4- Estrutura do biofilme de <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> .....	53
Figura 5- Modelo com as etapas de desenvolvimento de biofilme. ....	54
Figura 6- Estágios da formação de biofilme por <i>Candida</i> spp. em superfície de cateter.	54
Figura 7- Imagens das própolis utilizadas no presente estudo (própolis nativa do RS, própolis verde e própolis vermelha)..	57
Figura 8- Fluxograma da obtenção dos extratos dos diferentes tipos de própolis estudadas.....	58
Figura 9- Estrutura química dos compostos isolados da fração diclorometano da própolis nativa do RS. ....	78



## Lista de tabelas

Tabela 1- Compostos característicos da própolis de diferentes origens geográficas .....	26
Tabela 2 - Diferentes classes de compostos identificados em amostras de própolis .....	42
Tabela 3- <i>Screening</i> antifúngico dos extratos dos diferentes tipos de própolis estudadas.....	66
Tabela 4- Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos extratos de própolis nativa do RS utilizando métodos de microdiluição em caldo .....	67
Tabela 5- Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos extratos de própolis vermelha utilizando métodos de microdiluição em caldo .....	69
Tabela 6- Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos extratos de própolis verde utilizando métodos de microdiluição em caldo .....	71
Tabela 7- Resultados da avaliação da capacidade de remoção de biofilme pelos extratos de própolis nativa do RS e fração diclorometano de própolis vermelha. ....	74
Tabela 8- Inibição da formação de biofilme pelo extrato etanólico de própolis nativa do RS e fração diclorometano de própolis vermelha.. ....	76
Tabela 9- RMN de H <sup>1</sup> dos produtos isolados PN1 (pinocembrina), PN2 (pinostrobina) e PN3 (pinostrobina chalcona) da própolis nativa do RS.....	79
Tabela 10- RMN de C <sup>13</sup> dos produtos isolados PN1 (pinocembrina), PN2 (pinostrobina) e PN3 (pinostrobina chalcona) da própolis nativa do RS.....	79





## Lista de abreviaturas

- CAPE- Éster feniletíl do ácido cafeico
- CIM- Concentração inibitória mínima
- MeOH- Metanólico
- D-GαIN-D-galactosamina
- TNF-α- Fator de necrose tumoral-α
- IC<sub>50</sub>- Concentração necessária para impedir 50% da atividade
- DNA- Ácido desoxirribonucleico
- G2-Fase gap 2 da divisão celular
- IL-1β- Interleucina 1 beta
- NO- Óxido nítrico
- ERRO- Espécies reativas de oxigênio
- ERN- Espécies reativas de nitrogênio
- LDL- *Low density lipoprotein*
- PH- Potencial hidrogeniônico
- TLR-2- *Toll-like* receptor 2
- TLR-4- *Toll-like* receptor 4
- PPPH- 1 –difeníl- 2- picríl–hidrazil
- ABTS- 2 -azinobis-3-etilbenzotiozolína-6-ácido sulfônico
- FRAP- *Ferric reducing antioxidant power*
- EEP- Extrato etanólico de própolis
- FPS- Fator de proteção solar
- UVA- Radiação ultravioleta A
- UVB- Radiação ultravioleta B
- GTF- Glucosil tranferase
- DMSO- Dimetil sulfóxido
- UV- Luz ultravioleta
- CCD- Cromatografia em camada delgada

RMN <sup>1</sup>H- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN <sup>13</sup>C- Ressonância magnética nuclear de carbono

PN1- Pinocebrina

PN2- Pinostrobrina

PN3- Pinostrobrina chalcona

CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*

RPMI- Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

MOPS- Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico

UFC- Unidade formadora de colônia

CFM- Concentração fungicida mínima

TSB- Caldo de triptose de soja

GEE- *Generalizes Estimating Equations*

EEPN- Extrato etanólico de própolis nativa do RS

EHPN- Extrato *n*-hexano de própolis nativa do RS

EEPR- Extrato etanólico de própolis vermelha

EHPR- Extrato *n*-hexano de própolis vermelha

FDPR- Fração diclorometano de própolis vermelha

EEPG- Extrato etanólico de própolis verde

EHPG- Extrato *n*-hexano de própolis verde

FDPG- Fração diclorometano de própolis verde

CBS- *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (Banco Internacional de Isolados)

FC- Formação controle de biofilme

CFM- Concentração fungicida mínima

TSB- Caldo de triptose de soja

DMSO- Sulfóxido de dimetil

## Sumário

<b>1 Introdução .....</b>	<b>19</b>
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>23</b>
<b>3 Revisão bibliográfica .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Características gerais e classificação da própolis .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Aspectos etnofarmacológicos da própolis.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3 Aspectos biológicos e farmacológicos da própolis .....</b>	<b>32</b>
3.3.1 Atividade antimicrobiana .....	32
3.3.1.1 Atividade antifúngica.....	32
3.3.1.2 Outras atividades antimicrobianas .....	34
3.3.2 Atividade hepatoprotetora .....	36
3.3.3 Atividade antitumoral .....	36
3.3.4 Atividade antioxidante.....	37
3.3.5 Atividade imunomodulatória.....	39
3.3.6 Outras atividades relatadas .....	39
<b>3.4 Aspectos toxicológicos da própolis .....</b>	<b>41</b>
<b>3.5 Composição química da própolis .....</b>	<b>41</b>
<b>3.6 Flavonoides.....</b>	<b>45</b>
3.6.1 Características químicas dos flavonoides.....	40
3.6.2 Propriedades biológicas dos flavonoides .....	47
3.6.2.1 Atividade antioxidante .....	47
3.6.2.2 Atividade antimicrobiana .....	50
3.6.2.3 Atividade antitumoral .....	51
<b>3.7 Considerações gerais sobre biofilmes de <i>Candida spp.</i> .....</b>	<b>52</b>
3.7.1 Produtos naturais utilizados no controle de biofilmes fúngicos.....	55
<b>4 Materiais e métodos.....</b>	<b>57</b>

<b>4.1 Material em estudo</b> .....	57
<b>4.2 Preparação dos extratos e frações</b> .....	57
<b>4.3 Análise, isolamento e identificação dos compostos</b> .....	59
4.3.1 Extratos diclorometano e frações da coluna cromatográfica de própolis nativa do RS .....	59
4.3.2 Métodos cromatográficos empregados para o isolamento .....	59
4.3.3 Solventes e reagentes .....	59
4.3.4 Elucidação estrutural .....	59
<b>4.5 Avaliação da atividade antifúngica</b> .....	60
4.5.1 Micro-organismos e meios .....	60
4.5.2 Testes de susceptibilidade antifúngica .....	60
4.5.3 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) .....	61
4.5.4 Teste de remoção de biofilme em cateter .....	61
4.5.5 Teste de inibição da formação de biofilme (atividade antibiofilme) .....	62
4.5.6 Análise estatística dos resultados .....	63
<b>5 Resultados e discussão</b> .....	65
<b>5.1 Avaliação da atividade antifúngica</b> .....	65
<b>5.2 Avaliação da capacidade de remoção de biofilmes de <i>Candida</i> spp. e prevenção de sua formação (antibiofilme)</b> .....	73
<b>5.3 Análise química</b> .....	77
5.3.1 Isolamento das substâncias.....	77
5.3.2 Identificação das substâncias isoladas.....	77
<b>6 Conclusões</b> .....	83
<b>7 Referências</b> .....	85
<b>Anexo 1: Espectros de RMN e espectros de massas</b> .....	99

## 1 Introdução

Os insetos compreendem cerca de 75% de todas espécies animais e devem ter produzido muitos compostos naturais que contribuíram para sua sobrevivência durante injúrias ambientais que teriam ocorrido durante os 4 a 500 milhões de anos de sua evolução. A sua utilização na medicina tradicional chinesa remonta a cerca de 3000 anos e a pelo menos 1000 anos na América do Sul (RATCLIFFE *et al.*, 2011). Nesse contexto, as abelhas produzem diversos produtos e entre eles, a própolis desempenha um papel importante na defesa da colmeia frente a invasores, manutenção da temperatura e sanidade interna contribuindo para a permanência desses insetos sociais e/ou “superorganismo” (colmeia) no ecossistema.

Os polinizadores, entre eles as abelhas, são componentes imprescindíveis para manutenção da biodiversidade. Na agricultura as abelhas podem aumentar o rendimento das culturas polinizadas por animais em até 96%. Entretanto, esses insetos têm apresentado um declínio no decorrer dos últimos anos, devido principalmente à fragmentação e perda de habitat, agroquímicos, mudanças climáticas, entre outros (AIZEN e HARDER, 2009; POTTS *et al.*, 2010; KLEIN *et al.*, 2007). Isso afeta a obtenção dos produtos agrícolas, entre eles os apícolas.

Existem cerca de 25.000 espécies de angiospermas, destas em torno de 90% são polinizadas por animais, principalmente insetos. Somente as abelhas compreendem aproximadamente 25.000-30.000 espécies em todo o mundo, todas visitantes de flores (KEARNS *et al.*, 1998). Essa interação de abelhas e plantas com flores são sistemas dinâmicos onde ocorrem interações do tipo mutualismo e competição (TAURA e LAROCA, 2004). Essas múltiplas interações conferem aos materiais produzidos e coletados pelas abelhas uma imensa diversidade química, resultante da intensa organização e divisão de tarefas desses insetos na busca por alimento e manutenção da colmeia.

A própolis é um material resinoso coletado pelas abelhas operárias de diferentes partes das plantas, brotos e exsudatos. Os compostos identificados na resina da própolis podem se originar de três fontes: exsudato das plantas coletado pelas abelhas, substâncias secretadas pelo metabolismo da abelha e materiais que são introduzidos durante a elaboração da própolis. O termo própolis (do grego: *pro*= para, em defesa e *polis* = cidade ou comunidade) reflete sua importância para as abelhas sendo utilizada no revestimento interno das paredes da colmeia, assim como para proteger a colônia de doenças e cobrir pequenos animais que tenham morrido em seu interior, evitando sua decomposição (MARCUSSE, 1995; BANKOVA *et al.*, 2000).

A composição química da própolis depende das características fitogeográficas do local de coleta, uma vez que as abelhas escolhem diferentes plantas como fonte de própolis em diferentes habitats. O espectro de voo de uma abelha *Apis mellifera* abrange um raio de cerca de 4-5 km em torno da colmeia de onde abelhas campeiras coletam pólen e néctar para alimentação, bem como resina para própolis. Variações na composição também foram observadas entre amostras de própolis coletadas na mesma região, por diferentes raças de *Apis mellifera*. Como resultado, a composição química da própolis é variada sendo uma fonte valiosa de diferentes compostos biológicos naturais ativos de diferentes estruturas químicas e também um indicador de contaminação ambiental. No entanto, estes aspectos dificultam uma padronização da própolis, sendo que as propriedades biológicas devem ser unidas a uma investigação detalhada de sua composição química em comparação com a sua origem botânica (CUNHA *et al.*, 2004a; BANKOVA, 2005; SALATINO *et al.*, 2005; SILICI e KUTLUCA, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2005; ORSI *et al.*, 2006; POPOVA *et al.*, 2010).

Entre os mecanismos de resistência desenvolvidos por patógenos, especialmente bactérias e fungos está a formação de biofilmes. Esses agregados microbianos tridimensionais que ocorrem aderidos a superfícies vivas e inanimadas estão envolvidos em cerca de 80% de todas as infecções no corpo humano. São altamente resistentes a medicamentos e as defesas do hospedeiro (SUN *et al.*, 2013). Nesse sentido, é relevante a busca por novos agentes antifúngicos e desinfetantes para

o controle de fungos e biofilmes associados resistentes aos medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico.

Diversos estudos evidenciam e confirmam o emprego tradicional e milenar da própolis no tratamento e prevenção de uma ampla extensão de doenças, destacando-se as de origem microbiana. Esse produto animal apresenta-se como promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos e produtos relacionados à saúde. Tendo em vista a variedade e complexidade química dos diferentes tipos de própolis falta estudos que ratifiquem as atividades terapêuticas propostas popularmente , assim como, a descoberta de potenciais de cura e profilaxia ainda não conhecidos. Também, cabe salientar o emprego milenar desse material resinoso como antisséptico/antimicrobiano, por exemplo, na prática de mumificação de cadáveres no Egito.

Assim, diante do aumento da resistência aos medicamentos antifúngicos e aos produtos comumente utilizados como desinfetantes em ambientes hospitalares e a emergência de fungos patogênicos, o presente trabalho procurou investigar o potencial antifúngico e antibiofilme da própolis, levando em consideração sua utilização popular como agente antimicrobiano.





## 2 Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

Avaliar a capacidade antifúngica de diferentes extratos e frações de própolis verde, vermelha e da própolis nativa do Rio Grande do Sul (RS) frente a diferentes isolados de *Candida* spp.;

Investigar a capacidade de remoção de biofilme e atividade antibiofilme de diferentes extratos de própolis nativa do RS e de um extrato de própolis vermelha frente a diferentes isolados de *Candida* spp.

Após o estudo do potencial antifúngico, objetivou-se isolar e identificar os compostos majoritários na fração mais ativa da amostra de própolis do (RS).



### 3 Revisão bibliográfica

#### 3.1 Características gerais e classificação da própolis

Abelhas forrageiras produzem a própolis misturando resinas de plantas com a cera de suas glândulas. A coloração da própolis é dependente de sua procedência, variando de marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado. O produto é uma massa com textura variável, algumas amostras são duras e friáveis, outras são moldáveis e viscosas. Possui odor característico que pode variar de uma amostra para outra, sendo que existem amostras que não possuem qualquer odor (MARCUSSE, 1996; SALATINO *et al.*, 2011).

Fatores como a ecologia vegetal da região onde a própolis foi coletada e até mesmo a variabilidade genética das rainhas, também influenciam na composição química da própolis, existindo assim, diversos tipos de própolis. Esse produto natural é em grande parte representativo da flora local, pois é resultante da coleta de diferentes plantas em diversos ecossistemas pelas abelhas (LUSTOSA *et al.*, 2008; SFORCIN e BANKOVA, 2011).

Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia a fonte dominante de própolis é o exsudado do botão do álamo (*Populus* sp.). Na Rússia a própolis do tipo “bétula” é obtida da espécie *Betula verrucosa*, a própolis do mediterrâneo é proveniente principalmente de espécies de Cupressaceae e a própolis do Pacífico é obtida de *Macaranga tanarius*. Entretanto, na América do Sul existe uma grande diversidade vegetal para retirada da resina, o que dificulta a correlação da própolis com a fonte produtora (LUSTOSA *et al.*, 2008; SFORCIN e BANKOVA, 2011). Assim, conforme a diversidade e flora característica de uma determinada região vários tipos de resinas podem ser obtidos pelas abelhas resultando em diferentes tipos de própolis, como pode ser observado na figura 1 e tabela 1.

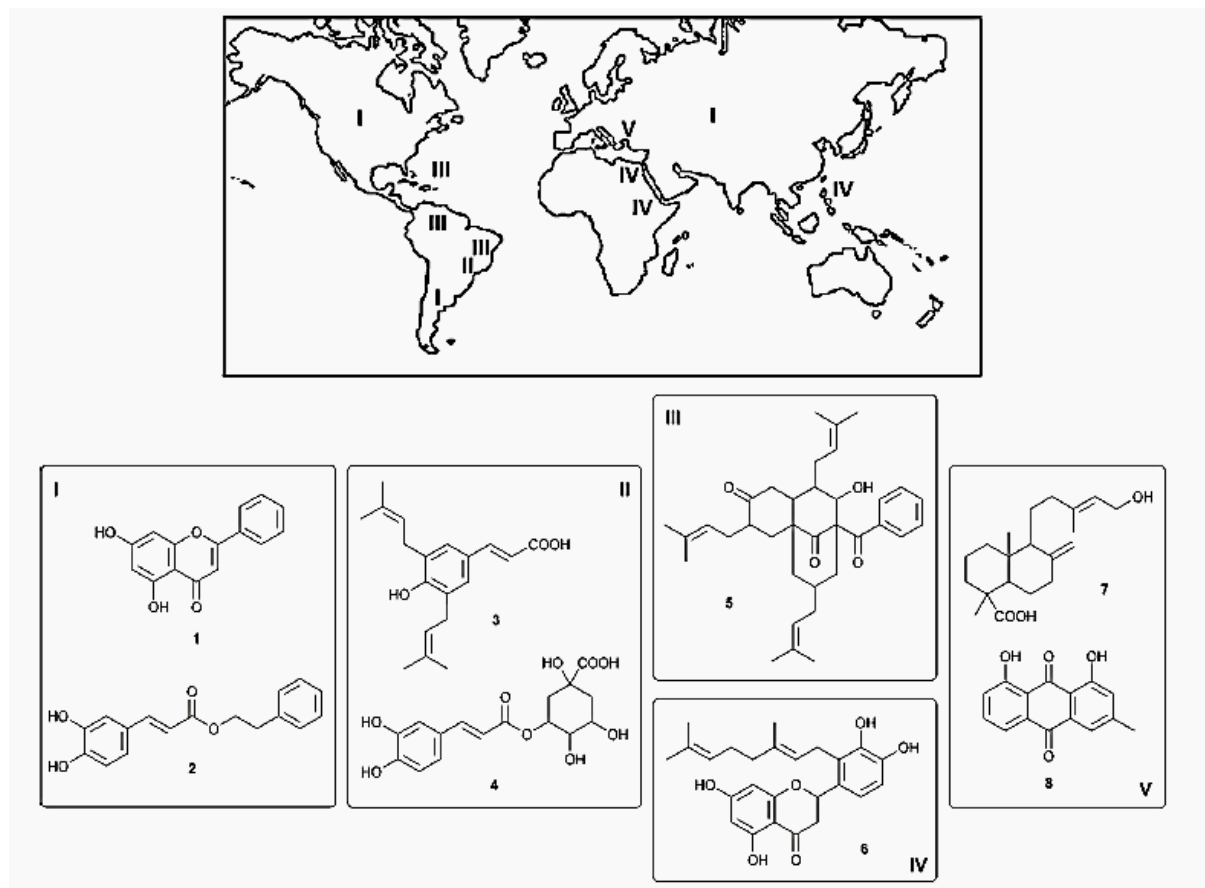


Figura 1- Distribuição geográfica de alguns tipos de própolis e a sua correlação com a composição química. I: própolis de álamo da zona temperada, com flavonoides sem substituintes no anel B (por exemplo: crisina, 1) e ésteres de fenilpropanoides (ex. ester feniletil do ácido cafeico (CAPE), 2). II: própolis verde brasileira, com fenilpropanóides prenilados (ex. artepilina C, 3) e ácidos cafeoilquínicos (ex. 4). III: própolis derivada de *Clusia*, com benzofenonas preniladas (ex. nemorosona, 5). IV: Própolis derivada de *Macaranga* spp. com flavonoides geranil (ex. 6). V: própolis da Grécia, Creta e Turquia, contendo principalmente diterpenoides (ex. ácido isocuprêssico, 7) ou antraquinonas (ex. crisofanol, 8) (Reproduzido de SALATINO *et al.*, 2011).

Tabela 1: Compostos característicos da própolis de diferentes origens geográficas, tipos e fontes vegetais.

Origem geográfica	Tipo de própolis	Fonte vegetal	Principais constituintes
<b>América do Sul</b>			
Brasil, Central e Sudeste	Verde	<i>Baccharis</i> spp.	Ácidos <i>p</i> -cumáricos prenilados; ácidos cafeoilquínicos, fenilpropanoides prenilados
Brasil, Sul	-	<i>Araucaria</i> spp.	Acetofenonas preniladas, ácidos diterpênicos

Brasil, Nordeste	Vermelha	<i>Dalbergia ecastophyllum</i> , <i>Clusia</i> spp.	Isoflavonoides, neoflavonoides, lignanas, benzofenonas polipreniladas
Brasil, Nordeste	-	<i>Clusia</i> spp.	Benzofenonas polipreniladas
Brazil, Amazônia	-	<i>Clusia</i> spp.	Benzofenonas polipreniladas, triterpenoides
Argentina, Tucumán	-	<i>Zuccagna punctata</i>	Flavonoides com anel B não substituído, 8- metoxiflavanonas, chalconas
Chile	-		Lignanas
Cuba	Vermelha	Leguminosae	Isoflavonoides
Cuba	Marrom	<i>Clusia</i> spp.	Benzofenonas polipreniladas
Cuba	Amarela	Desconhecido	Flavonoides polimetoxilados e triterpenoides
Venezuela	Vermelha	<i>Clusia</i> spp.	Benzofenonas poliisopreniladas
Colômbia	-	Coníferas	Diterpenoides labdano
<b>América Central e do Norte</b>			
El Salvador	-	Coníferas	Glicosídeos labdano, chalconas
México	-	Álamos	Flavonoides com o anel B não substituído, ésteres do ácido fenilpropanóico
Canadá	Álamo	Álamos	Flavonoides, anel B não substituído, ésteres fenilpropanóicos, <i>p</i> - hidroxiacetofenona
Estados Unidos	-	Desconhecido	Flavonoides
<b>África</b>			
Quênia	-	<i>Macaranga</i> spp.	Lignanas, geranilestilbenos,

			geranil flavonoides
Ilhas Canárias	-	Desconhecido	Lignanas furofuranas
Egito	-	<i>Macaranga</i> spp.	Flavanonas geranil
	-	Desconhecido	Antraquinonas
<b>Europa</b>			
Mediterrâneo (Bulgária, Grécia, Algéria, Turquia)	Álamo	<i>Populus</i> seção <i>Aigeiros</i>	Ésteres dos ácidos cafeico e ferúlico, flavanonoides com anel B não substituído
Turquia	-	<i>Populus alba</i> , <i>P. tremuloides</i> , <i>Salix alba</i>	Flavonoides com anel B não substituído, vanilina, bisabolol, crisofanol (antraquinona)
Grécia, Chipre, Creta	-	Álamo, <i>Cupressaceae</i>	Flavonoides com anel B não substituído, antraquinonas, diterpenos
Holanda	-	Álamo	Flavonoides com anel B não substituído, ésteres de glicerol e ácido cinâmico
<b>Ásia</b>			
Nepal	-	Leguminosae subfamília Faboideae	Isoflavonas, neoflavonoides, Flavanonois, flavanois
Taiwan	-	<i>Macaranga</i> spp.	Flavanonas geranil
China	Álamo	Álamo	Flavonoides com anel B não substituído
Coréia	Álamo	Álamo	Flavonoides com anel B não substituído, ésteres do ácido cafeico
Japão	-	Álamo	Ésteres do ácido cafeico
	-	<i>Macaranga</i> spp.	Flavanonas geranil

A determinação da origem geográfica e, principalmente, a origem vegetal, aliada à fenologia da planta hospedeira juntamente com a análise de sua composição química são fatores que podem possibilitar o controle de qualidade e padronização das amostras de própolis para uma efetiva aplicação terapêutica (PARK *et al.*, 2002).

Assim, diante das dificuldades de classificar as diferentes amostras de própolis diversas substâncias têm sido propostas como marcadores. O marcador é um componente ou classe de compostos químicos produzidos pela fonte vegetal de origem, abundante e constante em certos tipos de própolis. Dois marcadores são considerados para a própolis verde, a artepilina C e o composto 3-prenilcinamato de alila, sendo este último componente, volátil e de fácil detecção por cromatografia gasosa. No Sul do Brasil, no estado do Paraná, pinocembrina tem sido proposta como marcador para as amostras de própolis (ADDELMANN *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2008; SALATINO *et al.*, 2011).

Segundo Park e colaboradores (2002), as própolis do Brasil podem ser agrupadas em 13 grupos distintos, cinco delas correspondem ao Sul, uma ao Sudeste, sete tipos pertencem à região nordeste do país. A espécie *Hyptis divaricata* e *Dalbergia ecastophyllum* são as principais fontes de resina da própolis do nordeste. *Baccharis dracunculifolia* da própolis do sudeste, e *Populus nigra* (álamo) da própolis do Sul do Brasil. Essa classificação não é necessariamente um indicativo das características físicas, químicas e biológicas dos tipos de própolis existentes no Brasil, devido a grande diversidade da flora brasileira e complexa variação genética das abelhas (CABRAL, 2009).

Tendo em vista que cerca de 5% do peso da própolis é de pólen, a análise desse composto pode ser utilizada para correlacionar a própolis com sua origem geográfica e/ou fonte vegetal. Pesquisas de caracterização polínica da própolis obtida em algumas regiões do Rio Grande do Sul, Brasil, evidenciaram que *Eucalyptus* (Myrtaceae), *Mimosa scabrella* (Leguminosae- Mimosoideae), *Eupatorium* (Compositae), *Hyptis*

(Labiatae), *Celtis* (Cannabaceae) e *Paspalum* (Poaceae) podem ser as principais fontes botânicas de própolis nesses locais (BARTH *et al.*, 1999; FREITAS *et al.*, 2011).

Entretanto, a tentativa de classificar os diferentes tipos de própolis brasileiras pode levar a uma simplificação da variedade de própolis de uma determinada região. Exemplo disso é a região Sul do país, em que pesquisas realizadas por Bankova e colaboradores (1996) sugeriram *Araucaria angustifolia* como fonte de amostras de própolis do Sul do Brasil, baseados na descoberta de diterpenos do tipo labdano e ao fato que populações naturais da espécie caracterizam a flora do Sul. Contudo, esses metabólitos secundários também estavam presentes nas folhas de *Baccharis dracunculifolia* (BANSKOTA, 2001).

A própolis verde brasileira é produzida principalmente no Estado de Minas Gerais a partir de espécies do gênero *Baccharis* spp. (Asteraceae), predominantemente *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), uma planta espontânea utilizada na medicina popular brasileira (NASCIMENTO *et al.*, 2008). As abelhas fragmentam ápices vegetativos (como brotos, folhas jovens) liberando substâncias resinosas de tricomas e ductos. *Baccharis* é um gênero cosmopolita que conta com grande número de espécies (mais de 500 espécies) distribuídas na Oceania, América Central, do Norte e do Sul. Populações de espécies de *Baccharis* são frequentemente encontradas em vegetações de campo no Brasil, sendo que seus compostos voláteis são atrativos para a coleta de resinas pelas abelhas (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Outro tipo de própolis que tem ganhado destaque nos últimos anos é a própolis vermelha proveniente da região Norte do país, a qual teve sua origem botânica identificada como *Dalbergia ecastophyllum* (Leguminosae), conhecida popularmente como “rabo-de-bugio”. As abelhas coletam o exsudato avermelhado depositado em orifícios na superfície dos ramos da árvore, cuja coloração é conferida pelos flavonoides retusapurpurina A e B, utilizados na indústria de alimentos e cosméticos (PICCINELLI *et al.*, 2011; FROZZA *et al.*, 2013). Este tipo de própolis é típico também de Cuba e Venezuela, onde as origens botânicas foram identificadas como



*Clusia nemorosa* (Clusiaceae) e *Clusia scrobiculata*, respectivamente (LUSTOSA *et al.*, 2008; CABRAL *et al.*, 2009).

### 3.2 Aspectos etnofarmacológicos da própolis

Do ponto de vista etnofarmacológico a própolis vêm sendo utilizada popularmente por um longo período de tempo. Egípcios conheciam bem as propriedades anti-putrefativas da própolis utilizando-a para embalsamar cadáveres. Própolis era reconhecida por suas propriedades medicinais por médicos gregos e romanos como Aristóteles, Dioscórides e Galeno sendo empregada como antisséptico e cicatrizante no tratamento de feridas. Os gregos também a utilizavam como perfume, misturada com plantas aromáticas. Na Itália era utilizada para afinar as cordas de instrumentos musicais, emprego ainda corrente na França até os dias atuais. Incas empregavam a própolis como agente antipirético. Sua utilização continua atualmente na forma natural ou combinada com outros produtos naturais em cosméticos e como constituinte de alimentos saudáveis (CASTALDO e CAPASSO, 2002; KUROPATNICKI, 2013).

O emprego mais recente da própolis para tratamento de problemas de saúde começou em 1950 e 1960 na ex-União soviética e em países do leste da Europa, como Bulgária, República Tcheca e Polônia. Nos países do oeste Europeu, na América do Sul e do Norte e no Japão a própolis adquiriu popularidade somente a partir de 1980. Na metade da década de 80 a própolis tornou-se importante na medicina alternativa e complementar (SALATINO, 2005).

No Brasil, a própolis é empregada de diversas formas e finalidades terapêuticas tanto na medicina humana quanto na veterinária, como extrato (hidroalcoólico), na forma cápsulas, sprays, fazendo parte da composição de nutracêuticos, alimentos saudáveis, de cosméticos e produtos de higiene, entre outros. Na área de alimentos, a utilização da própolis como conservante é bastante destacada em muitos estudos

(LAPPE, 2004; ALI *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2013) assim como associada com plantas medicinais, por exemplo, gel de própolis e calêndula como antimicrobiano e cicatrizante (OGAVA *et al.*, 2003). Na área de veterinária apresenta-se como uma alternativa para controle de doenças na prática agrícola orgânica e biodinâmica (PEIXOTO *et al.*, 2009).

### **3.3 Aspectos biológicos e farmacológicos da própolis**

Muitos estudos têm demonstrado as diversas atividades farmacológicas da própolis: antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antitumoral, antioxidante, antifúngica, anestésica, anticariogênica, etc. (BANSKOTA *et al.*, 2001).

#### **3.3.1 Atividade antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana da própolis tem sido bastante investigada confirmando suas atividades antiviral, antifúngica, antibacteriana e antiprotozoário. *In vitro* a própolis pode agir diretamente em microrganismos e *in vivo* pode estimular o sistema imune, ativando os mecanismos envolvidos na morte de micro-organismos (MARCUSSE, 1995).

##### **3.3.1.1 Atividade antifúngica**

Sforcin e colaboradores (2001) compararam a atividade antimicrobiana *in vitro* de própolis coletadas nas quatro estações do ano frente à *Candida albicans* e *C. tropicalis* isoladas de infecções humanas obtendo resultados que mostram que ambos os fungos foram suscetíveis a baixas concentrações de própolis, sendo que não foram encontradas diferenças na concentração inibitória mínima em relação à sazonalidade de coleta da amostra de própolis

Ota e colaboradores (2001) encontraram atividade fungicida para o extrato etanólico de própolis estudado frente a 20 isolados de *C. albicans*, 20 isolados de *C. tropicalis*, 20 isolados de *C. krusei* e 15 isolados de *C. guilliermondii*, sendo *C. albicans* mais sensível que as outras espécies do seu gênero, como *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*.

Mora e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antifúngica de quatro extratos etanólicos de própolis de diferentes Estados da República Mexicana e quatro extratos comerciais sobre o crescimento de uma cepa de referência (ATCC 10231) e 36 isolados clínicos de origem humana de *Candida albicans*. O extrato obtido de Cuautitlán Izcalli (Estado do México) apresentou a maior atividade biológica inibindo 94,4% dos isolados clínicos na concentração de 0,8 mg/mL, enquanto, a cepa referência foi inibida a uma concentração de 0,6 mg/mL.

Dota e colaboradores (2011) mostraram a atividade de micropartículas de extrato etanólico de própolis contra fungos isolados de candidíase vulvovaginal (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*). Nesse estudo, houve inibição de 96,63% dos isolados pelo extrato etanólico de própolis e inibição de 93,26% dos isolados com as micropartículas de própolis. No entanto, é relevante considerar que a microencapsulação apresentou como vantagens a diminuição da quantidade de etanol e o conseqüente odor presente na forma de extrato. Também, ambas as formas de apresentação apresentaram atividade frente a *C. albicans* e *C. não-albicans*.

Silici e Koc (2006) demonstraram a atividade da própolis frente a micoses superficiais (*Candida glabrata*, *C. albicans*, *Trichosporum* sp. e *Rhodotorula* sp.) com concentração inibitória mínima (CIM) entre 0,01-1,65 µg /mL. *Candida glabrata* foi a cepa mais resistente com concentração inibitória mínima (CIM) para a própolis entre 0,2 e 1,65 µg/mL, e *Rhodotorula* spp. a cepa mais sensível.

A atividade *in vitro* do extrato etanólico de própolis contra 67 isolados fúngicos de onicomicoses (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanea*, *C. glabrata*, *C. stellatoidea*, *Trichosporon sp.*, *Geotrichum candidum* e *Saccharomyces cerevisiae*) em pacientes foi encontrada em pesquisa realizada por Oliveira *et al.* (2006), com valores de CIM na faixa de 3,2 a 50 µg/mL.

### 3.3.1.2 Outras atividades antimicrobianas

Sforcin e colaboradores (2000) ao avaliarem a atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* da própolis brasileira em relação à sazonalidade de sua coleta, verificaram que o crescimento das bactérias Gram-positivas é inibido com baixas concentrações de própolis (0,4%) onde bactérias Gram-negativas foram menos suscetíveis com uma concentração inibitória mínima em torno de 4,5 a 8,0%. Com relação à coleta da própolis nas diferentes estações do ano não houve diferença significativa, sendo que os autores propõem que esse resultado deve ser devido à coleta ter sido realizada na mesma região geográfica e, portanto diferenças de composição e propriedades biológicas são encontradas entre amostras coletadas em regiões diferentes devido à flora local.

Gebara e colaboradores (2002) ao testarem *in vitro* os extratos etanólicos de própolis encontraram como CIM frente a bactérias periodontopatogênicas, as concentrações de 0,25 µg/mL para *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, 1 µg/mL para *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Capnocytophaga gingivalis*. Também testaram microorganismos que desempenham *in vivo* um papel de superinfectantes como *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (tipo selvagem) obtendo como CIM a concentração de 12 µg/mL para *C. albicans* e 14 µg/mL para *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*.

O extrato hidroalcoólico de própolis verde apresentou atividade antileishmania *in vivo* e *in vitro* frente a *Leishmania* (*Viannia*) *brasiliensis*, apresentando-se como uma promissora fonte natural de compostos para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos. *In vitro* o extrato foi ativo apenas para a forma promastigota (doses na faixa de 1 a 750 µg/mL) do parasita, não inativando a forma amastigota. No ensaio *in vivo* com camundongos Balb/C houve um aumento da redução do diâmetro das lesões em cerca de 78,6% com o tratamento por via oral e de 84,35% por via tópica em relação ao grupo controle, após 90 dias de tratamento (PONTIN *et al.*, 2008).

Em outro estudo, Ayres e colaboradores (2007) realizaram ensaios de efeito anti-*Leishmania* (frente a *Leishmania amazonensis*) de extratos etanólicos de diferentes tipos de própolis: própolis verde coletada em Minas gerais e no Paraná e própolis vermelha coletada no estado de Alagoas. Os resultados demonstraram que todos os extratos foram capazes de reduzir a infecção em macrófagos por esse parasita, ou seja, os extratos intensificam o mecanismo de ativação dos macrófagos levando a morte do parasita.

A atividade da própolis contra as formas sanguíneas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas foi avaliada utilizando-se extratos etanólicos em diferentes proporções de solvente e extrato aquoso, obtidos de diferentes regiões do estado de São Paulo e uma amostra do Paraná. Todos os extratos apresentaram capacidade tripanocida (CUNHA *et al.*, 2004b).

Freitas e colaboradores (2006) investigaram os efeitos *in vitro* do extrato etanólico de própolis coletada em Botucatu (SP), cuja fonte vegetal é *Baccharis dracunculifolia* DC., *Eucalyptus citriodora* Hook e *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, frente à trofozoítos de *Giardia duodenalis*. A própolis inibiu o crescimento de trofozoítos, sendo que o nível de inibição variou de acordo com a concentração do extrato e o tempo de incubação. A maior redução do crescimento do parasita foi observada em culturas expostas a 125, 250 e 500 µg/mL de própolis, em todos os períodos de incubação (24, 48, 72 e 96 h). A amostra também inibiu a aderência do

parasita e promoveu mudanças no aspecto celular e nos flagelos da maioria dos trofozoítos.

### 3.3.2 Atividade hepatoprotetora

Banskota e colaboradores (2001) testaram a atividade hepatoprotetora do extrato metanólico (MeOH) de própolis brasileira e de 24 compostos isolados deste extrato em morte celular induzida por D-galactosamina (D-GaIN)/ fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) em culturas primárias de hepatócitos de ratos. Os resultados indicaram que a atividade hepatoprotetora foi devida principalmente aos compostos fenólicos como os flavonoides que apresentam concentração inibitória ( $IC_{50} < 25 \mu M$ ) maior do que o controle positivo silibina ( $IC_{50} 39,6 \mu M$ ) em morte celular induzida por TNF- $\alpha$ . Os diterpenos do tipo labdano isolados do extrato MeOH também exibiram significativa atividade hepatoprotetora para o mesmo modelo experimental. Também, os diterpenos do tipo labdano e alguns compostos fenólicos prenilados apresentaram atividade antibacteriana contra *Helicobacter pylori*.

### 3.3.3 Atividade antitumoral

Diversas pesquisas têm demonstrado a propriedade antitumoral da própolis *in vitro* e *in vivo*. A indução de apoptose é um dos mecanismos propostos para os efeitos terapêuticos da própolis, sendo esse mecanismo dependente dos tipos de compostos e concentração do extrato de própolis. Os efeitos antiproliferativos da própolis em células cancerígenas é resultado de dano ao DNA, cuja supressão ocorre via dois mecanismos: interrupção da proliferação na fase G2 (Gap 2) de crescimento do ciclo celular e diminuição da atividade da enzima telomerase (SAWICKA *et al.*, 2012).

A própolis verde brasileira (10, 25, 50 e 100  $\mu g/100 \mu L$ ) apresentou alto efeito citotóxico *in vitro* frente a carcinoma epidermoide laringeal (células da linhagem Hep-2). A ação antiproliferativa da própolis em células tumorais pode ser resultado de um efeito sinérgico dos seus constituintes, e alguns compostos têm sido investigados.

Éster feniletil ácido cafeico (CAPE) é um dos constituintes da própolis mais investigados com relação à atividade antitumoral (BÚFALO *et al.*, 2009).

Artepilina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), outro constituinte com ação antitumoral presente na própolis verde brasileira, foi investigado por seus efeitos em carcinogênese de cólon, incluindo a fase G(0)/G(1) via estimulação de expressão Cip 1/ p21 em células de câncer de cólon humano e também induziu apoptose em linhagens celulares leucêmicas de diferentes fenótipos (KIMOTO *et al.*, 2001; SHIMIZU *et al.*, 2005).

Pesquisa realizada por Carvalho e colaboradores (2011) avaliou *in vitro* e *in vivo* a atividade antitumoral de extrato e frações de própolis extraída com óleo vegetal comestível (óleo de canola) e extrato etanólico frente a diferentes linhagens celulares tumorais (mama-MDA-MB-435, leucemia- HL-60, cérebro- SF-295 e cólon- HCT-8). Ambos os extratos apresentaram atividade *in vivo*, entretanto, o extrato oleoso foi mais efetivo. Os ensaios *in vitro* demonstraram que o extrato oleoso apresentou maior atividade em relação a suas frações e ao extrato etanólico.

Matsushige e colaboradores (1996) verificaram que o extrato aquoso de própolis (200 mg/kg) apresentou um efeito preventivo na destruição das células  $\beta$ -pancreáticas por inibição da geração da interleucina-1 $\beta$  e atividade da óxido nítrico sintase. CAPE teve um efeito citotóxico dose-dependente em células de glioma C6 reduzindo a viabilidade para 42% em relação ao controle, e aumentando a proporção de hipodiploidia, como indicação de apoptose (LEE *et al.*, 2003).

#### 3.3.4 Atividade antioxidante

Nos processos metabólicos normais, a geração de espécies reativas do oxigênio (ERO) e de espécies reativas do nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas é compensada por um completo sistema antioxidante endógeno. No entanto, devido a diferentes fatores, pode-se produzir um excesso destes radicais livres como o O<sup>2</sup>, ânion

superóxido, radical peroxilo (ROO), radical hidroxilo (OH), oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e peroxinitrito (ONOO), resultando numa situação de estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; MUSCHIETTI e MARTINO, 2009).

O estresse oxidativo e nitroso está associado com o envelhecimento, desordens neurodegenerativas, inflamação, infecções virais, doenças autoimunes, desordens do sistema digestivo como a inflamação gastrintestinal e a úlcera gástrica (REPETO e LLESUY, 2002). Entretanto, é também reconhecido que ERO e ERN desempenham papéis fisiológicos importantes como o controle da pressão sanguínea, na sinalização celular, na apoptose, na fagocitose de agentes patogênicos, entre outros (SCHROETER *et al.*, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Vários compostos presentes na própolis tem sido descritos como potentes inibidores do estresse oxidativo. *In vitro* a própolis inibe a peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e nitração de proteínas. *In vivo* pode aumentar a capacidade antioxidante em animais e seres humanos, levando a diminuição da peroxidação lipídica, que é altamente associada com o risco de doenças cardiovasculares (DALEPRANE e ABDALLA, 2013).

A atividade antioxidante da própolis vermelha tem sido atribuída a presença de chalconas e isoflavonas (incluindo 7-O-metilvestilol, medicarpin e 3,4,2',3'-tetraidrochalcona) que atuam como doadores de elétrons. Contudo, o conteúdo total de flavonoides está correlacionado com a atividade antioxidante, sugerindo que todos os compostos fenólicos e flavonoides contribuem para sua atividade (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

Diversos estudos tem demonstrado o potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* da própolis verde, sendo que compostos presentes como flavonoides e derivados do ácido cumárico são associados com essa propriedade (BURDOCK, 1998; GUIMARÃES *et al.*, 2012). Mello e Hubinger (2012) pesquisaram em ensaio pelo método do DPPH, a



influência da variação de pH na atividade antioxidante em extratos etanólico e aquoso, observando que a atividade foi maior para o extrato etanólico em pH 4,3 e para o extrato aquoso em pH 8,0, com aproximadamente 90% e 40% de atividade, respectivamente.

### 3.3.5 Atividade imunomodulatória

Ensaio *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a própolis pode ativar macrófagos, aumentando sua atividade microbicida, melhora a atividade lítica das células *natural killer* contra células tumorais, aumenta a produção de anticorpos, sugerindo seu uso em vacinas como adjuvante, confirmando sua ação imunomodulatória. Os resultados foram observados quando a própolis foi administrada por um curto intervalo de tempo em animais, embora faltem ainda estudos clínicos para compreender melhor os efeitos e mecanismos de ação no sistema imune (SFORCIN, 2007).

A administração de extrato etanólico (200 mg/kg) de própolis verde brasileira, em camundongos, por 3 dias, aumentou a imunidade inata, ativando as etapas iniciais da resposta imune por regulação da expressão do receptor TLR-2 e TLR-4 e produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6) por macrófagos e células esplênicas, contribuindo para o reconhecimento de microrganismos e ativação de linfócitos por células apresentando antígenos (ORSATTI *et al.*, 2010).

### 3.3.6 Outras atividades relatadas

Song e colaboradores (2002) evidenciaram em ensaio *in vitro* e *in vivo* a atividade estrogênica da própolis através da ativação de receptores de estrogênio sugerindo o potencial para proteção contra câncer de mama ou osteoporose. A utilização da própolis para o tratamento de tumor de mama é comum na medicina popular oriental. A combinação de veneno de abelha (0,2 mg) e própolis (0,5 g) promoveu alívio dos sintomas da menopausa em 85% das mulheres tratadas durante a menopausa. Contudo, faltam estudos sobre os efeitos adversos, farmacocinética, dose-

resposta e mecanismo de ação de fitoestrógenos, assim como, triagens clínicas a longo prazo que confirmem seus efeitos benéficos à saúde.

Apesar de o alumínio (hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio) ser amplamente utilizado como adjuvante em vacinas, o seu papel no desenvolvimento de nefrotoxicidade, doença de Alzheimer, reações subcutâneas, modificações de epítomos, seu limitado efeito adjuvante em antígenos polissacarídeos, evidencia a necessidade de encontrar novos adjuvantes para vacinas, mais seguros e potentes. Estudos sugerem o potencial da própolis como uma alternativa segura de adjuvante em vacinas, melhorando a resposta celular, proporcionando uma maior atividade fagocítica, aumentando atividade leucocitária, prolongando a proteção da vacina. Entretanto, faltam estudos que elucidem o mecanismo pelo qual ela atua, podendo ser classificada na mesma categoria de adjuvantes que os polissacarídeos sendo capaz de ativar a resposta imune inata, celular e humoral (ASHRY e AHMAD, 2012).

Kakino e colaboradores (2012) observaram o efeito laxante, já relatado na medicina popular, do extrato aquoso de própolis verde *in vivo*, sendo esse efeito mediado por um aumento da tensão contraccional do íleo em parte por ativação do receptor de acetilcolina.

Campos e colaboradores (1998) avaliaram o efeito anti-hiperalgésico do extrato etanólico de própolis coletada na região Sul do Brasil. O extrato administrado de forma sistêmica apresentou uma significativa ação anti-hiperalgésica quando avaliado em modelos químicos, mas não térmicos, de nocicepção em ratos e camundongos. A ausência de propriedades anti-hiperalgésicas do extrato de própolis nos testes (térmicos) da placa quente e de retirada da cauda, que são muito sensíveis a ação de opióides, sugere que a interação do extrato com o sistema opióide não é responsável pela ação analgésica dos princípios ativos presentes no extrato de própolis, não sendo consequência de um efeito depressor não específico central ou periférico.

### 3.4 Aspectos toxicológicos da própolis

A própolis é relativamente não tóxica, apresentando a dose diária segura para seres humanos de 1,4 mg/kg de peso corporal, ou aproximadamente 70 mg/dia. Entretanto, reações alérgicas são comumente relatadas na clínica, podendo ser apresentadas em todas as partes do corpo (BURDOCK, 1998). Dermatites de contato ocupacional e gengivite ulcerativa estão entre os principais efeitos alérgicos. Casos clínicos de reações sistêmicas como choque anafilático, edema laringeal, falência renal aguda após a utilização de própolis e produtos contendo própolis têm sido mencionados. A associação com medicamentos como contraceptivos e anti-inflamatórios não esteroidais é outro fator que pode ocasionar reações adversas (HSU *et al.*, 2004; KOMERICKI e KRÄNKE, 2009). O alérgeno principal relatado é o dimetilalilo éster do ácido cafeico, um composto com atividade haptênica cuja propriedade sensibilizante pode ser relacionada à presença de grupos hidroxilas livres no anel aromático (BURDOCK, 1998). Outros compostos com moderada ação sensibilizadora são o salicilato de benzila, cinamato de benzila, cinamato de metila, tetrocrisina, ácido ferúlico e ácido cumárico (KOMERICKI e KRÄNKE, 2009; ALIBONE *et al.*, 2011).

### 3.5 Composição química da própolis

Os compostos químicos isolados da própolis podem ser organizados em alguns grupos como: álcoois, aldeídos, ácidos alifáticos e ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos aromáticos (como ácido gálico, ácido cinâmico, ácido salicílico, cumárico, ésteres aromáticos, chalconas e diidrochalconas, flavonoides (flavanonas, flavonas e flavonois), cetonas, ácidos graxos, terpenoides, açúcares, vitaminas B1, B2, B6, C e E, assim como diversos minerais (MARCUSSE, 1995). Na tabela 2, estão apresentados os principais compostos encontrados nos diferentes tipos de própolis.

Tabela 2- Diferentes classes de compostos identificados em amostras de própolis

<b>Substâncias</b>
<b>Derivados de álcool e fenol</b>
Alcool benzílico; álcool cinamílico; glicerol; glicerolfosfato; hidroquinona; isobutenol; álcool fenetílico; álcool fenetílico; álcool prenílico
<b>Aldeídos</b>
Aldeído caproico, <i>p</i> -hidroxibenzaldeído, isovanilina, vanilina, aldeído 2-hexenoico
<b>Aminoácidos</b>
Alanina, $\beta$ - alanina, ácido $\alpha$ -aminobutírico, ácido $\delta$ -aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, 2-aminopropanoico, cistina, cisteína, Ácido glutâmico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ornitina, fenilalanina, prolina, ácido piroglutâmico, sarcosina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina
<b>Ácidos alifáticos e ésteres</b>
Ácido acético, ácido acético, ácido angélico, ácido butírico, ácido crotônico, ácido fumárico, ácido isobutírico, ácido metilbutírico, acetato de benzila, acetato de isobutila acetato de isopentila
<b>Ácidos aromáticos</b>
Ácido <i>p</i> -anísico, Ácido benzoico, ácido cafeico, ácido cinâmico; ácido diidrocinâmico, ácido cumárico ( <i>-o,-m,-p</i> ); ácido 3,4-dimetoxicinâmico; ácido ferúlico; ácido gálico; ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico; ácido isoferúlico; ácido 4-metoxicinâmico; ácido protocatéquico; ácido salicílico; ácido 3, 4,5-trimetoxidihidrocinâmico; ácido vanílico; ácido verátrico
<b>Cetonas</b>
6-metil-hep-5-en-2-ona; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; 2-heptadecanona; acetofenona; <i>p</i> -acetofenol; dihidroxiacetofenona; metilacetofenona
<b>Hidrocarbonetos e ésteres graxos</b>
Heneicosano (C21); trieicosano (C23); pentaicosano (C25); heptaicosano (C27); nonaicosano (C29); hentriacontano (C31); tritriacontano (C33); hexadecanoato de

---

dotriacontila; [(Z)-octadec-9-enoato] de dotriacontila; [(Z)-octadec-9-enoato] de hexacosila; hexadecanoato de hexacosila; hexadecanoato de octacosila; [(Z)-octadec-9-enoato] de octacosila; hexadecanoato de tetracosila; [(Z)-octadec-9-enoato] de tetracosila; hexadecanoato de tetratriacontila; [(Z)-octadec-9-enoato] de tetratriacontila; hexadecanoato de triacontila; [(Z)-octadec-9-enoato] de triacontila; ácido araquínico; ácido behênico; ácido cerótico; ácido esteárico, ácido láurico; ácido lignocérico; ácido linoleico; ácido mirístico; ácido montânico; ácido oleico; ácido palmítico

### **Açúcares**

Frutofuranose-1; frutofuranose-2; B-D-frutofuranosil- $\alpha$ -D-glicopirranose; sacarose; A-D-frutofuranosil- $\beta$ -D-glicopirranose; isômero; xilitol

### **Ésteres de ácidos aromáticos**

Benzoato de benzila; benzoato de cinamila; benzoato de etila; benzoato de metila; 3,4-diidroxifenila; cafeato de 1,1-dimetilalila; 3,4-hidroxifenil)-2-metilbutila; cafeato de 2-metil-2-butenila; 3,4-diidroxifenil)-3-metilbutila; cafeato de 3-metil-3-butenila; cafeato de benzila; cafeato de butenila; cafeato de butila; cafeato de cinamila; cafeato de etila; cafeato de feniletila; cafeato de pentenila; cafeato de pentila; cafeato de prenila; cafeato de 3,4-dimetoxibenzila; cinamato de 3-metil-3-butenila; cumarato de benzila; cumarato de benzila; cumarato de benzila; cumarato de feniletila; cumarato de prenila; ferulato de 3-metil-2-butenila; ferulato de 3-metil-3-butenila; ferulato de benzila; ferulato de prenila; isoferulato de 3-metil-3-butenila; isoferulato de benzila; isoferulato de cinamila; isoferulato de feniletila; isoferulato de prenila; salicilato de benzila; salicilato de metila

### **Ésteres do ácido p-cumárico**

Benzil p-cumarato; feniletil p-cumarato

### **Terpenoides e esteroides**

$\alpha$ -acetoxibetulenol;  $\beta$ -bisabolol; 1,3-dimetil-8-(1-metiletil)-tríciclo;  $\alpha$ -copaeno;  $\beta$ -diidrofucosterol ;1,8-cineol; calinasterol; cimeno; estigemasterol; fucosterol; geraniol; guaiol; limoneno;

### **Chalconas e diidrochalconas**

2', 6',  $\alpha$ -triidroxil-4'-metoxichalcona; 2', 6'-diidroxil-4'-metoxidihidrochalcona; 2',

---

---

4', 6'-triidroxiidrochalcona; 3-O-acetilpinobanksina; naringenina-chalcona; pinobanksina; pinicembrina-chalcona; pinostrobina-chalcona; sacuranetina; isoliquiritigenina;

### **Flavanonol**

Aromadendrin

### **Flavanonas**

3,7-diidroxi-5-metoxiflavanona; 2,5-diidroxi-7-metoxiflavanona; 3,7-diidroxi-5-metoxiflavanona; 3-O-acetilpinobaksina; 3-O-butanoilpinobanksina; 3-O-hexanoilpinobanksina; 3-O-metilpinobanksina; 3-O-pentanoilpinobanksina; 3-O-pentenoilpinobanksina; 3-O-propanoilpinobanksina; alnusitol; alpinetina; naringenina; sacuranteína; pinocembrina

### **Flavonas e flavonóis**

Canferida; canferol; crisina; fisetina; galangina; isalpinina; isorramnetina; pectolinarigenina; quercetina; ramnazina; ramnetina; ramnotricina; tectocrisina

### **Isoflavonoides**

Neovestilol; vestilol; 3,7-di-O-metilquercetina; 3-O-metilcanferol; 3-O-metilgalangina; 4-O-metilcanferol; 7,4'-di-O-metilcanferol; 7-O-metilapigeina; 7-O-metilcanferol; acetina; alnusina; alpinetina; apigenina; betuletol

### **Derivados do ácido cinâmico**

Ácido cinâmico; ácido ferúlico; ácido (2,2-dimetil-2H-1-benzopiran-6-il)-2-propenoico); plicatin B; capilartemisina

---

Fonte: Adaptado de Marcucci (1996); Tazawa *et al.* (1999); Oldoni *et al.* (2011)

Trusheva e colaboradores (2006) identificaram 14 compostos em uma amostra de própolis vermelha coletada no estado de Alagoas, sendo que 6 desses compostos eram novos para a própolis, entre eles estavam fenóis simples, triterpenoides, benzofenonas preniladas e epóxido de naftoquinona. Neste estudo três componentes demonstraram significativa atividade antimicrobiana, principalmente frente à *C. albicans* e dois apresentaram atividade antioxidante frente ao radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH).

Banskota e colaboradores (1998) isolaram 23 compostos da fração acetato de etila do extrato metanólico da própolis, entre eles os compostos ácido 2,2-dimetilcromeno-6-carboxílico, ácido 4-hidróxi-3-prenilcinâmico, ácido agático, betuletol, éster 15-metil do ácido agático, ácido agatálico, ácido cuprêssico, tremetona, viscidona e o composto 3,5,7-triidroxi-4'-metoxiflavonol identificado pela primeira vez em própolis.

Kusumoto e colaboradores (2001) estudaram quimicamente o óleo essencial da própolis Brasileira identificando 9 compostos, entre eles dois compostos novos. As estruturas dos compostos novos foram elucidadas como 2,2-dimetil-8-prenil-6-vinilcromeno e 2,6-diprenil-4-vinilfenol.

Foram isolados uma mistura de flavonóis (ramnocitrina, eupalitina e acetina), triterpenos ( $\alpha$  e  $\beta$ -amirinas e lupeol), ácidos (3-prenil-4-hidróxicinâmico, artepilina) e uma nova substância, o ácido (*E*)-3-[4-(3-fenilpropanoiloxi)]-3,5-diprenilcinâmico de uma amostra de própolis verde de Minas Gerais (Brasil) em pesquisa realizada por Tavares e colaboradores (2010).

Trusheva e colaboradores (2006) identificaram dentre 14 compostos, os isoflavonoides pterocarpan medicarpin e isosativan na própolis vermelha Brasileira. Os outros compostos identificados foram:  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, lupeol, cicloartenol, isosativan, trans-anetol, gutiferona, xantocimol, isoeugenol, metil-eugenol, metil-isoeugenol, elemicin, isoelemicin, 20 (29)-lupen-3-one, 2,3-epóxi-2-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftalenodiona, sendo os seis últimos compostos ainda não reportados para a própolis.

### 3.6 Flavonoides

Os flavonoides são compostos polifenólicos que apresentam ampla distribuição no reino vegetal. São encontrados nas plantas principalmente na forma de glicosídios, constituindo os pigmentos amarelos, laranjas, azuis e vermelhos das flores. Eles regulam o crescimento, desenvolvimento e a defesa das plantas. Fazem parte da dieta humana, estando presentes em frutas e vegetais, sendo a ingestão diária cerca de 1-2 g. São os principais componentes de muitos produtos vegetais e animais de uso medicinal, como a própolis e o mel que tem sido utilizado desde a antiguidade (CAZAROLLI *et al.*, 2008; PRASAIN *et al.*, 2007). Assim, como são responsáveis em grande parte pela constituição e atividades farmacológicas da própolis torna-se importante ressaltar alguns aspectos químicos e biológicos desses compostos.

### 3.6.1 Características químicas dos flavonoides

Mais de 10.000 estruturas de flavonoides já foram descritas, evidenciando a diversidade dessa classe de metabólitos secundários. O termo flavonoide é um nome comum para pigmentos de plantas, sobretudo derivados de benzo- $\gamma$ -pirona, que é sinônimo de cromona. São compostos de baixo peso molecular, derivados de fenilbenzopironas, formados pela união de três anéis (A, B e C), dois deles aromáticos. A estrutura química básica dessa classe de metabólitos secundários pode ser visualizada na figura 2. Esse grupo compreende as flavonas, flavonóis, antocianos, chalconas, auronas, diidroflavonoides, flavanas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonoides, neoflavonoides e os biflavonoides (HAVSTEEN, 2002; AGATI *et al.*, 2012).

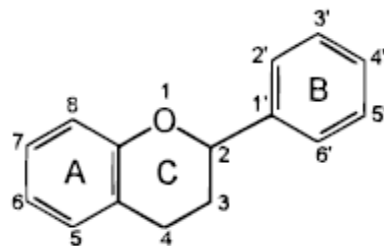


Figura 2 - Estrutura química básica de um flavonoide



Os flavonoides são biossintetizados pela via do ácido chiquímico e ácido acético. A sua formação é resultado da condensação de três unidades de malonil-CoA (C-2) e uma unidade de ácido *p*-cumárico (C-9) originando o núcleo fundamental (C6-C3-C6) compondo os dois núcleos benzênicos conectados por uma unidade de três carbonos com um núcleo pireno contendo oxigênio. São encontrados na natureza principalmente como derivados glicosilados (heterosídeos), embora as formas livres (aglicona ou genina) sem o açúcar possam ser encontradas como constituintes majoritários em diversas plantas (CAZAROLLI, 2008).

### 3.6.2 Propriedades biológicas dos flavonoides

Diversas atividades biológicas dos flavonoides são conhecidas: anti-inflamatória, antioxidante, antialérgica, hepatoprotetora, antitrombótica, antimicrobiana. Tem sido proposto que os flavonoides exercem efeitos benéficos em múltiplos estados patológicos, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, e distúrbios neurodegenerativos.

#### 3.6.2.1 Atividade antioxidante

Muitas das ações biológicas dos flavonoides têm sido atribuídas às suas propriedades antioxidantes, quer como doadores de hidrogênio ou através de sua influência no status redox intracelular modulando efeitos celulares através da interação com proteínas sinalizadoras como as quinases (RICE-EVANS, 2004).

As propriedades doadoras de elétrons dos flavonoides compreendem uma transição redox mediante a qual a molécula antioxidante (Fl-OH) doa um elétron ao radical livre (R), como pode ser visto na figura 3. Durante essa etapa o caráter radical é transferido ao antioxidante, formando um antioxidante radical-derivado (Fl-O<sup>•</sup>).

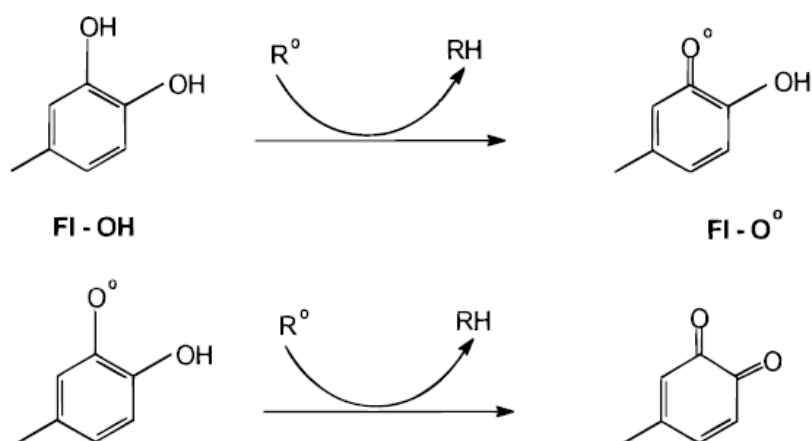


Figura 3- Mecanismo de ação dos flavonoides como captadores (*scavengers*) de espécies reativas (Adaptado de Pietta, 2000).

Por outro lado, os compostos fenólicos podem atuar como pró-oxidantes em sistemas contendo metais redox-ativos. Em presença de oxigênio, metais de transição como Cu e Fe catalisam o ciclo redox de fenóis, levando a formação de espécies reativas de oxigênio e outros radicais orgânicos que podem danificar o DNA, lipídios, e outras moléculas orgânicas. Assim, por exemplo, o radical fenoxila produzido através de reações antioxidantes e na biossíntese da lignina é um potencial pró-oxidante (SAKIHAMA *et al.*, 2002).

Entretanto, uma breve atividade pró-oxidante pode ser benéfica para saúde conferindo as células resistência a estímulos posteriores devido a essa resposta adaptativa. Apesar de sua capacidade antioxidante, a própolis, e muitos de seus flavonoides como galangina, crisina e pinocembrina induzem dano oxidativo ao DNA de forma transiente e sujeita a reparo, sendo esse dano atribuído ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produzido pela própolis (TSAI *et al.*, 2012).

Han e colaboradores (2010) isolaram do extrato etanólico de própolis coreana diversos flavonoides: pinostrobin, tectocrisina, éter 3-acetoxi-7-metil pinobancsina, alpinona, pinobancsina, pinocembrina e crisina e testaram seu potencial antioxidante mediante reação de Fenton e pelo método do sequestro do radical livre (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiozolino-6-ácido-sulfônico) ABTS. Todos os flavonoides apresentaram

atividade contra o radical superóxido e 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) e vários flavonoides mostraram atividade moderada frente ao ABTS.

Ahn e colaboradores (2009) investigaram a atividade antioxidante de vários componentes da própolis (acacetina, apigenina, artepilina C, éster feniletil do ácido cafeico, crisina, ácido *p*-cumárico, galangina, kamferol, quercetina e pinocembrina), a maioria flavonoides, através do ensaio de captação de radical livre DPPH e ensaio do FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), baseado na capacidade dos fenóis em reduzir  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ . O éster feniletil do ácido cafeico e a quercetina apresentaram forte ação antioxidante. Artepilina C, galangina apresentaram atividade com menor intensidade. Em oposição, acacetina, apigenina, crisina e pinocembrina apresentaram atividade antioxidante muito baixa. Segundo os autores as atividades podem ser correlacionadas com as estruturas dos compostos, como a quantidade de grupos hidroxilas, a ressonância dos elétrons nos núcleos A e B, assim como o núcleo fenil *o*-di-hidroxi dos flavonoides.

Estudo realizado por Gregoris e colaboradores (2011) demonstrou a alta atividade antioxidante do extrato etanólico da própolis (EEP) e seus componentes polifenólicos, encontrado na ação inibitória da peroxidação lipídica do ácido linoleico. Estes compostos apresentaram efetividade como protetores solares com amplo espectro UVB e UVA em medida de fator de proteção solar (FPS). No teste de peroxidação lipídica o EEP, o ácido cafeico e derivados, os flavonoides canferol, quercetina e galangina apresentaram atividade antioxidante similar a catequina ( $\text{IC}_{50} < 1$  mg/L). Pinocembrina, crisina, apigenina e naringenina apresentaram baixa atividade ( $\text{IC}_{50} > 15$  mg/L) em relação à referência. Na medida do FPS uma concentração  $\leq 8\%$  da maioria dos componentes da própolis foi suficiente para obter um FPS-20, um valor cerca de duas vezes mais baixo do que compostos comerciais utilizados como referência (tinosorb S, oxibenzona, octinoxato e padimato O) para o teste, os quais requerem um valor similar ao EEP. Em relação ao filtro físico dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) a própolis e seus componentes apresentaram efeito sinérgico aumentando os

valores de FPS de 20 para 50-60. Nos parâmetros para proteção UVA, o EEP e seus componentes apresentaram máxima proteção contra os raios UVA.

### 3.6.2.2 Atividade antimicrobiana

A utilização de preparações contendo flavonoides como principais constituintes fisiologicamente ativos com finalidade antimicrobiana é antiga. As propriedades da própolis são referenciadas ao longo do antigo Testamento sendo prescrito por Hipócrates (460-377 aC) na Grécia Antiga para o tratamento de feridas e úlceras. A propriedade antimicrobiana da própolis tem sido atribuída ao seu alto conteúdo de flavonoides, principalmente devido à presença de galangina e pinocembrina (CUSHNIE e LAMB, 2005).

Koo e colaboradores (2002) testaram 30 compostos incluindo flavonoides, derivados do ácido cinâmico e terpenóides encontrados na própolis frente a isolados de *Streptococcus mutans* e atividade da glucosiltransferase (GTF), uma enzima produzida pela bactéria e associada ao seu fator de virulência na patogênese da cárie dental. Flavonoides foram os compostos mais ativos entre os testados. Flavonols, flavonas e derivados do ácido cinâmico não mostraram atividade antibacteriana nas concentrações testadas, entretanto, foram efetivos inibidores da GTF. Todas as flavanonas inibiram o crescimento bacteriano, sendo a pinocembrina a mais ativa delas, com CIM de 250  $\mu$ M (64  $\mu$ g/mL) para todos os isolados testados. O diidroflavonol pinobancsina-3-acetato também apresentou atividade antibacteriana. De todos os compostos avaliados a flavona apigenina foi o composto mais efetivo como inibidor da GTF e o *tt*-farnesol foi o mais efetivo agente antibacteriano.

O flavonol galangina apresenta-se como um potencial agente antibacteriano, com atividade contra diferentes isolados de *Staphylococcus aureus* resistente a 4-quinolona com CIM aproximado de 50  $\mu$ g/mL, sendo sugerido que a enzima topoisomerase IV possa estar envolvida no mecanismo dessa ação (CUSHNIE e LAMB, 2006).

Peng e colaboradores (2012) pesquisaram a atividade antifúngica de pinocembrina isolada de própolis frente à *Penicillium italicum*, um fitopatógeno que causa perdas consideráveis em pós-colheita, obtendo uma inibição significativa da taxa respiratória do fungo durante o crescimento micelar e germinação dos esporos através da interferência na energia de homeostase ocasionando ruptura da membrana celular do patógeno e distúrbios do metabolismo. Assim, esse composto apresenta-se como uma alternativa natural de controle desse fungo que ocorre principalmente em frutos cítricos.

### 3.6.2.3 Atividade antitumoral

Pequisas *in vitro* e *in vivo* e os ensaios clínicos indicam que os flavonoides presentes em muitos dos alimentos que fazem parte de nossa dieta apresentam efeitos quimiopreventivos e quimioterápicos. A desativação de carcinógenos, efeito antiproliferativo, arresto da divisão celular, indução da apoptose e da diferenciação, inibição da angiogênese, efeito antioxidante, reversão da resistência a multidrogas ou a combinação desses efeitos são alguns dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antitumoral (REN *et al.*, 2003).

As chalconas são uma subclasse dos flavonoides, conhecidas como os pigmentos amarelos das flores podendo estar presentes em diversas partes das plantas (raízes, brotos, folhas, sementes). Esse grupo multifuncional e seus alvos atuam em quase todos os aspectos das células tumorais, incluindo crescimento, proliferação, invasão e metástase. Pinostrobin chalcona apresentou atividade citotóxica demonstrada através do ensaio *in vitro* de incorporação do vermelho neutro frente às linhas celulares de linha celular de carcinoma epidermoide (KB), linha celular de carcinoma de mama dependente de hormônio (MCF7), carcinoma cervical (CaSki), carcinoma de colon (HCT116), linha celular não humana de fibroblasto (MRC5), com IC<sub>50</sub> (µg/mL) de 6,2; 7,3; 7,7; 54,1 e 7,9, respectivamente (MALEK *et al.*, 2011).

Os flavonoides crisina, apigenina, apigenina-7-*O*-glicosídeo e pinocembrina demonstraram significativo efeito antiproliferativo nas linhas celulares de câncer cervical (HeLa), hepático (Hepg-2) e de mama (MCF-7). Galangina inibiu a expressão do gene do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em células de câncer de pulmão (A549) (LUDWICZUK *et al.*, 2011; MAMADALIEVA *et al.*, 2011)

### 3.7 Considerações gerais sobre biofilmes de *Candida* spp.

O aumento na prevalência das micoses, o aparecimento de isolados fúngicos resistentes aos agentes antimicóticos empregados na atualidade e seus efeitos colaterais são alguns indicadores da necessidade de encontrar novos compostos com os requisitos de um antifúngico ideal (MORA *et al.*, 2008).

Espécies de *Candida* são encontradas na microbiota normal do homem. Alterações das barreiras teciduais, da própria microbiota ou da resposta imune promovem um desequilíbrio na relação hospedeiro-parasita, permitindo a invasão do microrganismo nos tecidos do hospedeiro, causando infecções denominadas candidíases.

Nas duas últimas décadas houve um aumento do número de infecções causadas por novas espécies de *Candida*, principalmente *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. *Candida albicans* é um fungo polimórfico, com crescimento como hifa e/ou pseudohifa e como blastosporos (levedura). *Candida tropicalis* produz blastosporos, pseudohifas e hifas verdadeiras. Para *C. parapsilosis* o crescimento blastosporo é predominante, e estas espécies não produzem hifas verdadeiras, ocasionalmente geram pseudo-hifas. Ao contrário, *C. glabrata* não é polimórfica, crescendo apenas como blastosporos (SILVA *et al.*, 2011).

As diferenças morfológicas entre as espécies de *Candida* também refletem nas características dos biofilmes por elas formados. *Candida tropicalis* formam um

biofilme com estrutura de monocamada descontínua e uma matriz com baixo nível de carboidratos e proteínas, *C. parapsilosis* apresenta um biofilme com estrutura em monocamada ou multicamada descontínua, alto nível de carboidratos e baixo nível de proteínas, *C. glabrata* possui um biofilme compacto distribuído em monocamada ou multicamada com alto nível de proteínas e carboidratos, como pode ser visto na figura 4 (SILVA *et al.*, 2011).



Figura 4- Estrutura do biofilme de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Imagens de microscopia eletrônica de Varredura após 48 horas de crescimento em ágar Sabouraud. (Adaptado de Silva *et al.*, 2011).

Por fazerem parte da microbiota normal humana as espécies de *Candida* podem com facilidade entrar em contato com dispositivos implantados, tais como stents, prótese, tubos endotraqueais e vários tipos de cateteres. Este contato com estas superfícies pode levar a formação de biofilmes que são definidos como derivados microbianos de uma comunidade sésil caracterizada por células que são ligadas a um substrato ou interface, sendo incorporados em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares produzidas por eles, exibindo assim um fenótipo alterado com relação à taxa de crescimento e transcrição genética. A composição geral da matriz pode incluir carboidratos, proteínas, fósforo, glicose e hexosaminas (DONLAN e COSTERTON, 2002; BLANKENSHIP e MITCHELL, 2006).

A formação dos biofilmes inicia com a etapa de aderência em um substrato externo (tecido do hospedeiro ou dispositivo médico), seguido de proliferação das células leveduriformes através da superfície e o desenvolvimento de hifas. A fase final do desenvolvimento do biofilme é o estágio de maturação: o crescimento como levedura parece ser reprimido, o crescimento de hifas é elevado, e a matriz extracelular

envolve o biofilme. Essas etapas podem ser visualizadas através dos esquemas das figuras 5 e 6 (BLANKENSHIP e MITCHELL, 2006).

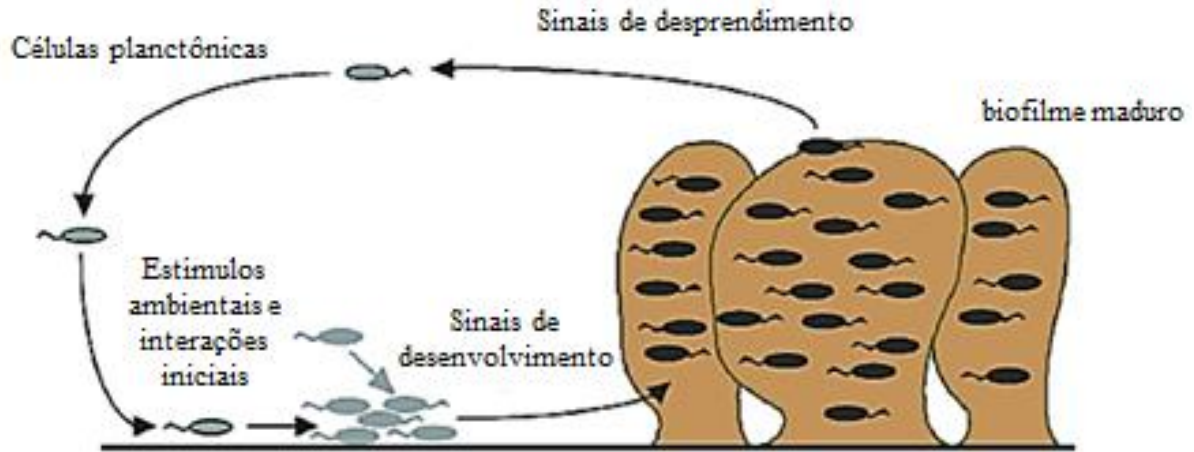


Figura 5- Modelo com as etapas de desenvolvimento de biofilme. Células planctônicas individuais podem formar contatos célula superfície e célula-célula resultando na formação de microcolônias. Células no biofilme podem retornar para a forma planctônica para completar o ciclo de desenvolvimento do biofilme (Adaptado de O'TOOLE, 2000).

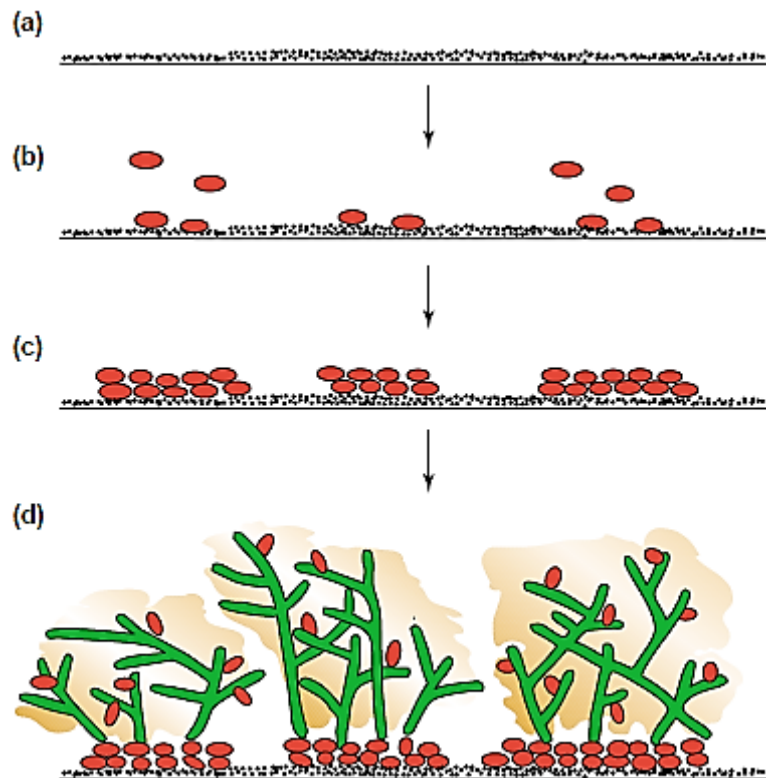


Figura 6- Estágios da formação de biofilme por *Candida* spp. em superfície de cateter. (a) Superfície de cateter com película adsorvida acondicionada de proteínas do hospedeiro (pontos pretos). (b) Adesão inicial da levedura a superfície (vermelho). (c) Formação de camadas basais de microcolônias leveduriformes. Isto ancora cada microcolônia para a superfície. (d) Conclusão da formação da microcolônia por adição na parte superior, principalmente camada de hifas e matriz (amarelo) que envolve ambas as leveduras (vermelho) e hifas (verde). Biofilmes maduros contêm numerosas microcolônias com canais de água intercalados para permitir circulação de nutrientes (Adaptado de DOUGLAS, 2003).



A formação de biofilmes por *Candida* traz importantes repercussões clínicas devido ao aumento da resistência à terapia antifúngica e a habilidade das células dentro de biofilmes de resistir às defesas do sistema imune do hospedeiro (RAMAGE *et al.*, 2005). Portanto, a busca por produtos que possuam atividade tanto na remoção de biofilmes fúngicos assim como na inibição de sua formação é fundamental para garantir sucesso no tratamento e prevenção de doenças fúngicas.

### 3.7.1 Produtos naturais utilizados no controle de biofilmes fúngicos

Sandasi e colaboradores (2011) avaliaram o efeito de extratos diclorometano/metanol (1:1) de *Echinacea angustifolia*, *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, *Malaleuca alternifolia*, *Hypericum perforatum*, *Thymus vulgaris*, *Aspalathus linearis* e *Camelia sinensis*, sobre biofilmes e formas planctônicas de *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Esses autores verificaram grande resistência dos biofilmes frente aos extratos testados em relação às formas planctônicas, sendo que apenas o extrato de *M. piperita* exibiu atividade antibiofilme (< 50%) contra ambos patógenos estudados. Uma atividade maior foi encontrada diante das formas planctônicas. Os extratos de *E. angustifolia*, *R. officinalis* e *M. piperita* apresentaram a maior ação antimicrobiana com valores de CIM entre 0,38 e 2,5 mg/mL.

Estudo realizado por Rane e colaboradores (2014) demonstrou a atividade de proantocianidinas derivadas dos frutos (oxicoco ou *cranberry*) de *Vaccinium macrocarpon* frente ao biofilme de *C. albicans* em modelo *in vitro* de biofilme urinário. Esse fungo está associado a infecções do trato urinário de origem hospitalar. Concentração de 128 mg/L semelhante a encontrada em sucos comerciais, diminuiu a formação de biofilme em 89,3%.

Sampaio e colaboradores (2009) pesquisaram atividade antimicrobiana atribuída pelo uso popular dos frutos de *Caesalpinia ferrea* (“pau-ferro”) contra patógenos orais formadores de biofilme (*Candida albicans*, *Streptococcus salivarius*, *S. oralis*, *Lactobacillus casei*) através da determinação da CIM e do modelo

multiespécie de biofilme. Esse último modelo simula as condições do ambiente oral, como superfície dentária, saliva, etc. Nesse estudo os autores encontraram valores de CIM de 25 a 100 µg/mL. Para o ensaio de biofilme, não houve crescimento nas diluições microbianas de  $10^{-5}$  mostrando a atividade antimicrobiana na formação do biofilme. No entanto, essa ação é menor quando comparado a clorexidina ( $10^{-4}$ ), que foi utilizada como controle positivo.

Muitos estudos destacam a utilização de óleos essenciais na prevenção ou erradicação de biofilmes fúngicos, assim como, a contribuição da nanotecnologia para a estabilização e liberação controlada de compostos naturais com atividade antimicrobiana (GRUMEZESCU, 2013). Nesse âmbito, nanopartículas magnéticas híbridas contendo óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* inibiram intensamente a capacidade de aderência e o desenvolvimento de biofilme de *C. albicans* e *C. glabrata* em superfície de cateter, havendo redução de 85% a 98% na contagem de células viáveis quando comparado ao controle (nanopartículas não carregadas de óleo essencial) na fase de desenvolvimento de biofilme de 48 e 72 horas (CHIFIRIUCH *et al.*, 2012).

Em suma, os produtos naturais são uma fonte imensa de moléculas únicas para a busca de novos protótipos e potenciais medicamentos frente a fungos patogênicos (BAKER, 2007). São necessários mais estudos para a busca por alternativas de controle de biofilmes microbianos devido ao aumento da resistência desses as opções terapêuticas disponíveis. Também, a pesquisa com a própolis para essa finalidade é ainda incipiente.

## 4 Materiais e métodos

### 4.1 Material em estudo

Foram utilizadas amostras de própolis verde (b), vermelha (c) e uma amostra de própolis do RS (a), sendo que as duas primeiras foram adquiridas da empresa Natucentro (Bambuí, MG, Brasil) e a última da empresa Apiários Adams, Comercial Exportadora Ltda. (Taquara, RS, Brasil) como pode ser visto na figura 7.

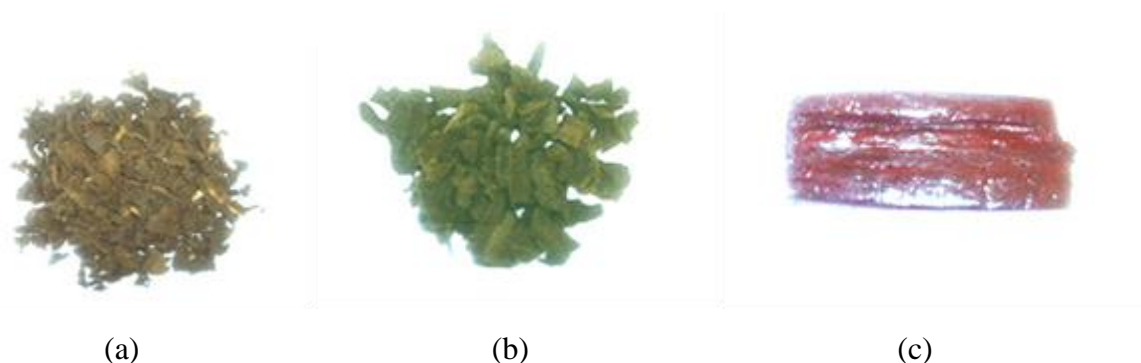


Figura 7 – Imagens das própolis utilizadas no estudo: (a) própolis nativa do RS, (b) própolis verde e (c) própolis vermelha. Fonte: Própria autora.

### 4.2 Preparação dos extratos e frações

Como pode ser observado na figura 8, as amostras de própolis em estudo foram maceradas diretamente com solventes de polaridade crescente, visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades, a temperatura ambiente durante um período de no mínimo 48 horas sob agitação ocasional, até o esgotamento do material. A amostra de própolis vermelha foi macerada em etanol. Outra porção da amostra de própolis vermelha foi macerada em hexano seguido de extração com diclorometano. A própolis verde foi macerada da mesma forma. A própolis nativa do RS foi macerada com etanol e outra porção foi macerada com hexano seguido de extração com solventes em ordem crescente de polaridade (diclorometano, acetato de

etila e metanol). Em seguida os extratos foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, utilizando-se temperatura não superior a 55 °C (FILHO e YUNES, 1998; SIMÕES *et al.*, 2007). Os extratos e frações levados aos ensaios biológicos foram dissolvidos em sulfóxido de dimetilo (DMSO) 2% objetivando a concentração final de 1000 µg/mL.

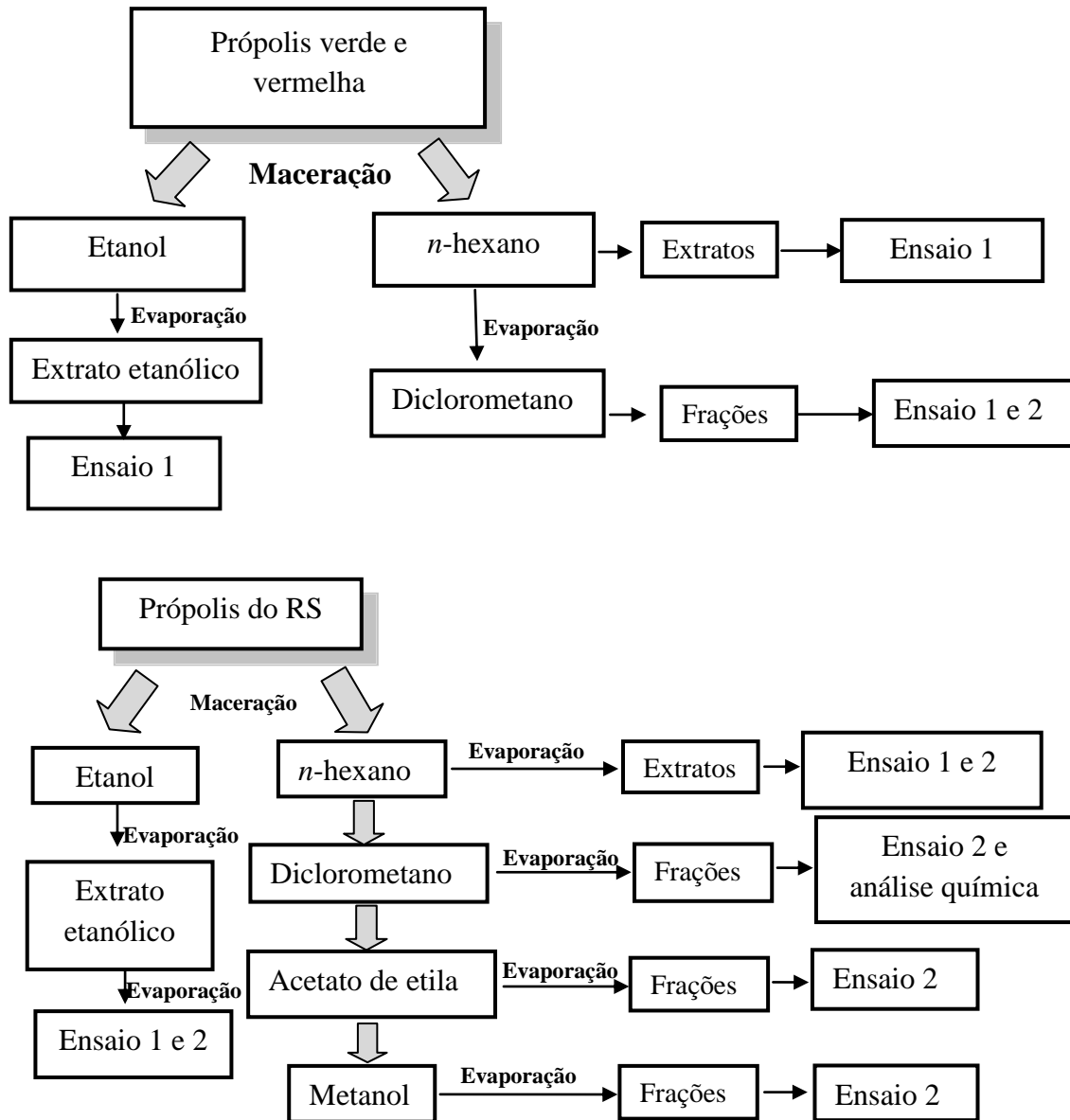


Figura 8- Fluxograma da obtenção dos extratos e frações de própolis e posterior ensaio biológico e análise química. Ensaio 1: Avaliação da atividade antifúngica; ensaio 2: atividade antibiofilme.

### 4.3 Análise, isolamento e identificação dos compostos

#### 4.3.1 Extratos diclorometano e frações da coluna cromatográfica de própolis nativa do RS

O perfil cromatográfico do extrato diclorometano e eluatos obtidos das colunas cromatográficas foram analisados através de Cromatografias de Camada Delgada analíticas com a utilização de sistemas eluentes: diclorometano (100%) e diclorometano:metanol (98:2). Como agentes reveladores foram utilizados a lâmpada de luz ultravioleta (UV) (254 e 365 nm) e anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento.

#### 4.3.2 Métodos cromatográficos empregados para o isolamento

O isolamento das substâncias das fração diclorometano da própolis do RS foi realizado empregando-se métodos cromatográficos tais como cromatografia em coluna de gel de sílica, usando hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em mistura de polaridade crescente como eluente. As frações foram monitoradas através de CCD analítica.

#### 4.3.3 Solventes e reagentes

Os solventes e reagentes utilizados para a realização do trabalho foram de procedência Merck<sup>®</sup> e Química Moderna<sup>®</sup>.

As separações em coluna cromatográfica foram realizadas empregando-se gel de sílica de procedência Acros Organics<sup>®</sup>, com tamanho de partícula 0,060-0,200 mm.

#### 4.3.4 Elucidação estrutural

Para a elucidação estrutural das substâncias isoladas foram utilizados métodos espectroscópicos e espectrométricos. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) e os espectros de massas das substâncias PN1, PN2 e PN3 foram obtidos na Central Analítica do Departamento de Química da UFRGS e no Laboratório do Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico do Departamento de Farmácia da UFRGS, respectivamente.

## 4.5 Avaliação da atividade antifúngica

### 4.5.1 Micro-organismos e meios

Para a avaliação da atividade antifúngica, capacidade de remoção de biofilme e atividade antibiofilme foram utilizados isolados clínicos depositados na coleção de fungos do Laboratório de Micologia Aplicada da Faculdade de Farmácia da UFRGS: isolados RL16, RL17, CT09 de *Candida tropicalis*, isolados RL01, CP04 e RL13 de *Candida parapsilosis*, isolados CK02, CK03 e CK04 de *C. krusei* e isolados CG03, RL02, RL03 de *C. glabrata*. Para a realização dos ensaios os fungos foram cultivados em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol a 32 °C por 24 horas.

### 4.5.2 Testes de susceptibilidade antifúngica

A concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e frações foi determinada utilizando como referência o método de Microdiluição em caldo preconizado pelo *Clinical and Laboratory and Standards Institute* (CLSI, 2008), especificamente o documento de referência M27-A3 com RPMI-MOPS (RPMI 1640 meio contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio- Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA- tamponada para pH 7.0 com 0,165 mol/L de tampão MOPS-Sigma). A concentração utilizada dos extratos foi de 1,9 a 500 µg/mL e alíquotas de 100 µL foram adicionadas em placas de 96 poços. Fluconazol foi utilizado como controle positivo. Os experimentos foram realizados em duplicata. As microplacas para determinação da concentração inibitória

mínima foram incubadas em estufa a 32 °C durante 48 horas. A concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração de compostos na qual o fungo não apresentou crescimento visível.

#### 4.5.3 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Após a leitura do teste de susceptibilidade, uma alíquota de 20 µL dos poços em que se determinou a CIM e as duas concentrações imediatamente mais elevadas, assim como os controles de crescimento dos micro-organismos foram subcultivados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e incubados a 35 °C por 24 horas. A CFM foi considerada como a menor concentração do extrato que não apresentou crescimento fúngico na superfície do meio de cultivo após incubação (LUBIAN *et al.*, 2010).

#### 4.5.4 Teste de remoção de biofilme em cateter

Os ensaios de remoção de biofilme e inibição de formação de biofilme foram realizados através de metodologia adaptada de Sharma and Anand (2002); Malheiros e colaboradores (2010) e Tondo e colaboradores (2010) com algumas modificações. Foi utilizado o dispositivo intravenoso do tipo cateter como corpo de prova (modelo aspirado traqueal- Mark Med). O inóculo de  $1.5 \times 10^6$  UFC/mL de acordo com a escala 0,5 de McFarland, de uma cultura dos isolados selecionados foi semeado em placas de Petri com caldo triptona soja (TSB- *Tryptose Soy Broth* (Oxoid®) e incubado a 32 °C (24 h). Após esta etapa, 1 mL da cultura foi adicionada a 99 mL de peptona estéril, compondo a solução mãe para o teste de formação de biofilme. Os cateteres esterilizados foram inicialmente imersos na suspensão de levedura pelo período de 96 h em estufa a 32 °C para ocorrer à formação de biofilme. Os cateteres foram lavados três vezes com água peptonada estéril para remoção de possíveis células fracamente aderidas. Após esse período foi adicionado o cateter em um tubo falcon para verificar a formação de biofilme sob 50 mL de peptona estéril. Após 24 h de incubação os cateteres foram sonicados (USC 700, UNIQUE) por 10 minutos para que as células

aderidas sejam liberadas do cateter. Nesse caso, a formação de biofilme foi utilizada como controle.

Um dos cateteres presentes na solução mãe foi deixado em contato com a própolis diluída previamente em por 1 minuto. Para contagens das UFC, diluições seriadas decimais foram realizadas e uma alíquota de 20 µL foi semeada em meio ágar Saboraud. As placas foram incubadas a 32 °C durante 24 h para contagem de colônias. A capacidade de remoção do biofilme é visualizada a partir da contagem do número de colônias removidas presentes nas placas, ou seja, quanto maior o número de colônias presentes, maior a capacidade de remoção do biofilme formado no cateter.

#### 4.5.5 Teste de inibição da formação de biofilme (atividade antibiofilme)

Para o ensaio de inibição da formação de biofilme em cateter uma suspensão de  $1-5 \times 10^6$  UFC/mL de uma cultura dos isolados selecionados foi semeada em caldo TSB (Oxoid®) e incubada a 32 °C (24 h). Após, 1 mL da cultura foi adicionado a 99 mL de peptona estéril, compondo a solução mãe para o teste de verificação da inibição da formação de biofilme. Os cateteres esterilizados e que entraram em contato previamente com a amostra de própolis foram imersos na suspensão de levedura pelo período de 96 h em estufa a 32 °C para ocorrer a formação de biofilme. Os cateteres foram lavados três vezes com peptona estéril para remoção de possíveis células fracamente aderidas. Após esse período, o cateter foi colocado em um falcon contendo 50 mL de peptona estéril e sonicados (USC 700, UNIQUE) por 10 minutos para que todas as células aderidas fossem liberadas do cateter. Como descrito no ensaio anterior de remoção de biofilme, foi realizado em paralelo a verificação da formação de biofilme em cateter como controle. Diluições seriadas decimais foram realizadas e uma alíquota de 20 µL de cada uma delas foi semeada em meio ágar Saboraud. As placas foram incubadas a 32 °C (24 h) para contagem de colônias. Para a capacidade de inibição da formação de biofilme são contadas as colônias formadas presentes na placa, ou seja, quanto menor a quantidade de colônias presentes, maior a capacidade de o extrato prevenir a formação de biofilme pelos isolados de *Candida*.



#### 4.5.6 Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos nos testes de biofilme foram submetidos à análise de variância (*Generalizes Estimating Equations-GEE*) e ao teste de Bonferroni para detectar diferenças significativas. Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos. O software SPSS versão 18 foi empregado.



## 5 Resultados e discussão

### 5.1 Avaliação da atividade antifúngica

De acordo com os resultados expressos na tabela 3, o extrato etanólico de própolis vermelha e da própolis nativa do RS, assim como o extrato *n*-hexano e a fração diclorometano de própolis vermelha apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos isolados (100%) de *Candida* testados neste trabalho.

Ao analisar o extrato *n*-hexano de própolis nativa do RS e o extrato *n*-hexano de própolis verde, pode-se observar atividade antimicrobiana frente a 42,8% dos isolados analisados, sendo que todos os isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram resistentes a esses extratos, não apresentando inibição do crescimento. O extrato etanólico e fração diclorometano de própolis verde tiveram atividade antimicrobiana contra 71,4% dos isolados testados, sendo os isolados de *C. glabrata* resistentes.

Como no *screening* preliminar realizado a maioria dos fungos apresentou sensibilidade frente aos diferentes extratos testados (tabela 3), foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) desses extratos e frações.

Tabela 3- *Screening* antifúngico dos extratos e frações dos diferentes tipos de própolis estudadas frente a isolados patogênicos de diferentes espécies de *Candida não-albicans*.<sup>a</sup>

<i>Candida</i> spp.	Própolis							
	EEPN	EHPN	EEPR	EHPR	FDPR	EEPG	EHPG	FDPG
<i>Candida glabrata</i>								
RL02	S	S	S	S	S	R	S	R
RL03	S	S	S	S	S	R	S	R
<i>Candida krusei</i>								
CK02	S	S	S	S	S	S	S	S
CK03	S	nd	nd	nd	S	nd	nd	nd
<i>Candida</i>								
<i>parapsilosis</i>	S	R	S	S	S	S	R	S
RL01	S	R	S	S	S	S	R	S
RL13								
<i>Candida tropicalis</i>								
RL16	S	R	S	S	S	S	R	S
RL17	S	R	S	S	S	S	R	S

<sup>a</sup>Concentração testada: 500 µg/mL ; R: resistente; S: sensível; nd: não determinado; EEPN: extrato etanólico de própolis nativa do RS; EHPN: extrato *n*-hexano própolis nativa do RS; EEPR: extrato etanólico própolis vermelha; EHPR: extrato *n*-hexano própolis vermelha; FDPR: Fração diclorometano própolis vermelha; EEPG: extrato etanólico própolis verde; EHPG: extrato *n*-hexano própolis verde; FDPG: Fração diclorometano própolis verde.

De acordo com a tabela 4, *C. krusei* e *C. parapsilosis* foram os fungos mais suscetíveis ao extrato etanólico de própolis nativa do RS com valores de CIM  $\leq 250$  e  $\leq 125$  µg/mL, respectivamente. Esses fungos emergentes são relacionados a infecções nosocomiais; o primeiro acomete especialmente portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea, enquanto que o segundo manifesta-se principalmente em crianças e recém-nascidos em unidades de terapia intensiva, apresenta grande capacidade de produzir biofilme e frequentemente coloniza a pele. Ambos estão associados a manifestações clínicas incluindo fungemia, meningite, endocardite, endoftalmite, artrite séptica e peritonite (WEEMS, 1992; LEVY, 1998; ASBECK *et al.*, 2009). Oliveira e colaboradores (2006) encontraram

valores de CIM na faixa de 6,3 a 50  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato etanólico de própolis obtida do Paraná frente a *C. parapsilosis*, mostrando uma atividade melhor quando comparado aos valores de CIM encontrados no presente estudo. Ota e colaboradores (2001) encontraram valores de CIM da própolis proveniente de São Paulo, contra *C. krusei*  $\leq 11000 \mu\text{g/mL}$ , superiores ao encontrado no presente trabalho. Nesse caso, a amostra de própolis nativa do RS apresentou uma capacidade antifúngica maior. A explicação para esses contrastes de CIM podem estar nas características fitogeográficas diferentes do local de coleta desse produto animal. Com relação ao extrato *n*-hexano de própolis nativa nenhum dos fungos foi suscetível nas concentrações testadas.

Tabela 4- Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* dos extratos de própolis nativa do RS utilizando métodos de microdiluição em caldo M27-A3 recomendado por CLSI.<sup>a</sup>

<i>Candida</i> spp.	Extratos própolis nativa do RS			
	Etanol (EENP)		<i>n</i> -hexano (EHPN)	
	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Candida glabrata</i>				
RL02	250	Fungistático	R	-
RL03	500	Fungistático	R	-
CG03	250	Fungistático	R	-
<i>Candida krusei</i>				
CK02	31,25	125	R	-
CK03	-	-	R	-
CK04	250	500	R	-
<i>Candida parapsilosis</i>				
RL01	125	500	-	-
RL13	125	Fungistático	-	-
CP04	62,5	Fungistático	-	-
<i>Candida tropicalis</i>				
RL16	125	500	-	-
RL17	250	500	-	-
CT09	250	Fungistático	-	-

<sup>a</sup> Dados da susceptibilidade antifúngica em  $\mu\text{g/mL}$ ; R: resistente; -: não testado devido a ausência de atividade fungistática.

O extrato etanólico de própolis vermelha (EEPR) inibiu o crescimento de todos os isolados fúngicos testados (Tabela 5), sendo que *C. glabrata* foi o fungo mais suscetível com valor de CIM  $\leq 31,25 \mu\text{g/mL}$ . Infecções por esse fungo podem ser superficiais (trato urinário, orofaringe, vulvovaginal, etc.) ou sistêmicas, que são comuns principalmente em pacientes imunocomprometidos ou com *Diabetes mellitus* (FIDEL *et al.*, 1999). Em relação ao extrato *n*-hexano de própolis vermelha, *C. glabrata* foi o fungo mais suscetível com valor de CIM  $\leq 31,25 \mu\text{g/mL}$ . *Candida glabrata* e *C. krusei* apresentam baixa susceptibilidade aos antifúngicos, sendo sensíveis doses dependentes (SDD) e resistentes ao fluconazol. A CIM para fluconazol é de  $32 \mu\text{g/mL}$  e  $64 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente, valores superiores aos encontrados no presente estudo, o que evidencia o potencial antifúngico da própolis vermelha. Todos os fungos testados foram inibidos pela fração diclorometano de própolis vermelha (FDPR) (valor de CIM  $\leq 62,5 \mu\text{g/mL}$ ), sendo fungicida em 45% dos casos. Essa destacada atividade da fração diclorometano pode ser explicada do ponto de vista químico devido a grande quantidade de compostos fenólicos ativos os quais foram mais extraídos por essa fração de maior polaridade.

Tabela 5- Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* dos extratos de própolis vermelha utilizando métodos de microdiluição em caldo M27-A3 recomendado por CLSI.<sup>a</sup>

<i>Candida</i> spp.	Extratos própolis vermelha					
	Etanol (EEPR)		<i>n</i> -hexano (EHPR)		Diclorometano (FDPR)	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Candida glabrata</i>						
RL02	7,81	Fungistático	15,62	Fungistático	15,62	Fungistático
RL03	31,25	Fungistático	31,25	Fungistático	15,62	Fungistático
CG03	7,81	Fungistático	15,62	Fungistático	15,62	Fungistático
<i>Candida krusei</i>						
CK02	62,5	Fungistático	62,5	Fungistático	31,25	Fungistático
CK03	500	500	R	-	-	-
CK04	500	Fungistático	R	-	62,5	250
<i>Candida parapsilosis</i>						
RL01	500	Fungistático	250	Fungistático	31,25	Fungistático
RL13	62,5	Fungistático	250	Fungistático	62,5	250
CP04	125	Fungistático	500	Fungistático	62,5	Fungistático
<i>Candida tropicalis</i>						
RL16	500	500	R	-	62,5	125
RL17	500	500	250	Fungistático	62,5	250
CT09	500	Fungistático	R	-	62,5	250

<sup>a</sup> Dados da susceptibilidade antifúngica em µg/mL; R: resistente; -: não testado devido a ausência de atividade fungistática.

O valor de CFM apresentado pela FDPR foi menor do que o valor do respectivo EEPR, assim como, a FDPR apresentou em geral valores menores de CIM contra os diferentes isolados testados. Esse fato pode ser relacionado à concentração maior de isoflavonoides presentes na FDPR comparado ao EEPR. Isoflavonoides, como medicarpina e homoterocarpina podem ser responsáveis pela alta atividade anti-*Candida* da própolis vermelha como demonstrado por Trusheva e colaboradores (2009) que reportaram a atividade antimicrobiana dos isoflavonoides contra *Candida albicans*. Os efeitos biológicos desse tipo de própolis não são considerados um efeito sinérgico entre vários compostos, como pode ser observado pelo efeito maior da fração

diclorometano em relação ao extrato etanólico, sugerindo a necessidade de isolamento e identificação dos compostos responsáveis pelas atividades farmacológicas (ALENCAR *et al.*, 2007).

*Candida tropicalis* é menos comum do que outras espécies de *Candida*, entretanto é um importante patógeno estando associado à leucemia e neutropenia prolongada, apresentando alta taxa de resistência aos antifúngicos atualmente disponíveis (KONTOYIANNIS *et al.*, 2001). Essa elevada resistência aos antifúngicos pode ser observada pela menor atividade das diferentes própolis avaliadas diante dessa espécie. Os resultados de CIM do extrato etanólico de própolis nativa do RS e própolis vermelha, extrato hexânico e fração diclorometano de própolis vermelha situaram-se na faixa de 62,5 a 500 µg/mL, valores bem acima do CIM (2 µg/mL) do fluconazol frente a essa espécie de *Candida*.

Em 1988 foi descrita a atividade do extrato etanólico de própolis frente a 23 isolados do gênero *Candida* isoladas de diferentes partes do corpo humano, encontrando uma ação fungistática em uma concentração de 0,55 mg/mL (MORA *et al.*, 2008). Os extratos etanólicos de própolis avaliados no presente estudo apresentaram efeito fungistático frente aos isolados de *Candida* testados com valores de concentração menores, na faixa de 0,00781 a 0,5 mg/mL, mostrando o promissor efeito da própolis frente a esses patógenos.

Pesquisa realizada por Junior e colaboradores (2012) também demonstrou a atividade antimicrobiana da própolis vermelha brasileira contra *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, com valores de CIM  $\leq$  1000 µg/mL.

Considerando os extratos e fração de própolis verde (tabela 6), houve um baixo espectro de ação frente aos fungos avaliados, sendo que apenas a cepa CK02 de *Candida krusei* foi inibida pelo extrato etanólico e pela fração diclorometano, com



valor de CIM  $\leq$  250  $\mu\text{g/mL}$ . Jorge e colaboradores (2008) mostraram que a própolis verde não foi ativa frente a *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, sendo ativa frente a *Staphylococcus aureus* e *Kocuria rhizophila* (valores de CIM de 100 a 300  $\mu\text{g/mL}$ ).

Tabela 6- Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* dos extratos de própolis verde utilizando métodos de microdiluição em caldo M27-A3 recomendado por CLSI.<sup>a</sup>

<i>Candida</i> spp.	Extratos própolis verde					
	Etanol		<i>n</i> -hexano		Diclorometano	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Candida glabrata</i>						
RL02	-	-	R	-	-	-
RL03	-	-	R	-	-	-
CG03	-	-	R	-	-	-
<i>Candida krusei</i>						
CK02	250	Fungistático	R	-	250	Fungistático
CK03	R	-	R	-	R	-
CK04	R	-	R	-	R	-
<i>Candida parapsilosis</i>						
RL01	R	R	-	-	R	-
RL13	R	R	-	-	R	-
CP04	R	R	-	-	R	-
<i>Candida tropicalis</i>						
RL16	R	-	-	-	R	-
RL17	R	-	-	-	R	-
CT09	R	-	-	-	R	-

<sup>a</sup> Dados da susceptibilidade antifúngica em  $\mu\text{g/mL}$ ; R: resistente ; -: não testado devido a ausência de atividade fungistática.

Portanto, os resultados mostram que das oito amostras de própolis testadas, 5 apresentaram uma forte atividade antifúngica frente à *Candida* spp. Estes são resultados promissores, levando em consideração que espécies de *Candida* não-*albicans* são de grande interesse clínico devido à emergente frequência com que

colonizam e infectam seres humanos, causando infecções com alta mortalidade e morbidade, sendo associadas com doenças degenerativas, malignidades, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunossupressão induzida por drogas ou procedimentos médicos e decréscimo de suscetibilidade aos agentes antifúngicos (COLLIN *et al.*, 1999; COLOMBO e GUIMARÃES, 2003) .

Pesquisa realizada por Colombo e colaboradores (2006) em seis hospitais terciários do Rio de Janeiro e São Paulo, envolvendo 145 episódios de candidemia, demonstrou que as espécies mais frequentemente isoladas foram *C. albicans* (37%), *C. parapsilosis* (25%), *C. tropicalis* (24%), *C. rugosa* (5%) e *C. glabrata* (4%). Assim, a candidemia ocasionada por *C. glabrata* é rara no Brasil, enquanto, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são a grande maioria (70%) das espécies de *Candida* não-*albicans*. Na América Latina, *C. parapsilosis* é a segunda causa principal de infecção invasiva em diferentes casos observados. Portanto, a busca por novos compostos bioativos contra fungos emergentes é necessária levando-se em consideração o aumento da ocorrência de candidemias em infecções nosocomiais. Nesse contexto, a própolis apresenta-se como uma possível fonte de uma nova droga, ou mesmo um novo adjuvante, no combate de fungemias como pode ser visto pelos resultados apresentados.

Ota e colaboradores (2001) avaliaram a atividade antifúngica da própolis brasileira frente a diferentes isolados de *Candida*, entre elas *C. krusei* e *C. tropicalis*. O extrato etanólico de própolis foi fungicida contra todos os isolados testados apresentando valores de CIM de 3000 a 12000 µg/mL. No presente estudo, foram encontrados valores de CIM de 31,25 a 500 µg/mL, para os extratos etanólicos das diferentes própolis testadas mostrando que as amostras testadas apresentaram uma considerável atividade antifúngica, superior a atividades anteriormente reportadas.

Kujumgiev e colaboradores (1999) mostraram a ação da própolis obtida de diferentes regiões, incluindo amostras procedentes do Brasil contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e frente ao vírus da influenza aviária. Todos os extratos apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana apenas frente à bactéria

gram-positiva e alguns extratos apresentaram atividade frente ao vírus. Nesse estudo, os autores encontraram atividades semelhantes para própolis com composições químicas diferentes sugerindo que a atividade está relacionada a um efeito sinérgico dos diferentes metabólitos secundários presentes e não meramente a um componente isoladamente, apresentando um grande valor como mistura natural e não apenas como fonte de um novo composto individual antifúngico, antibacteriano e antiviral.

A atividade antibacteriana e antifúngica da própolis pode ser devido a presença de compostos polares, principalmente fenóis (flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres), e o seu mecanismo de ação pode ser devido a inibição da divisão celular, através da inibição da replicação do DNA do micro-organismo (TAKAISI-KIKUNI e SHILCHER,1994).

## **5.2 Avaliação da capacidade de remoção de biofilmes de *Candida* spp. e prevenção de sua formação (antibiofilme)**

A fração diclorometano de própolis vermelha e o extrato etanólico de própolis nativa do RS foram mais ativos pelo ensaio de susceptibilidade frente às leveduras de *Candida não- albicans*. Assim, foram selecionados para os ensaios de remoção e inibição da formação do biofilme fúngico.

Os biofilmes formados por *Candida* spp. são mais resistentes do que as células planctônicas aos agentes antifúngicos. Entre os mecanismos de resistência sugeridos estão a restrita penetração de fármacos através da matriz do biofilme, mudanças fenotípicas resultantes de um decréscimo na taxa de crescimento ou limitação de nutrientes e expressão de genes de resistência induzido por contato com uma superfície (DOUGLAS, 2003).

Entre os fungos testados, o biofilme formado em cateter por *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* foram os mais suscetíveis à remoção, apresentando a

maior parte dos isolados removidos pelos seis extratos, com valores de contagem de colônias removidas na faixa de 4,4 a 8,1 log UFC cm<sup>-2</sup> (Tabela 7).

Tabela 7- Resultados da avaliação da capacidade de remoção de biofilme pelos extratos e frações de própolis nativa do RS e fração diclorometano de própolis vermelha.<sup>a</sup>

<i>Candida</i> spp.	Vermelha		Nativa do RS				Referência
	FDPR	EEPN	EHPN	FDPN	FAEPN	FMPN	FC <sup>b</sup>
<i>C. tropicalis</i>							
RL16	4,40	6,24	5,70	6,24	4,70	7,00	5,70
RL17	4,70	5,88	5,40	5,70	0	5,40	5,88
<i>C. glabrata</i>							
RL02	6,00	5,40	0	0	0	4,40	4,40
RL03	5,88	7,70	0	0	4,4	4,40	5,30
CG03	4,88	7,48	0	0	0	5,40	5,70
<i>C. parapsilosis</i>							
RL01	7,40	8,10	0	6,70	0	0	6,88
RL13	6,40	7,44	6,40	6,70	7,18	7,35	7,10
CP04	5,88	7,48	6,40	5,40	4,40	5,40	5,00

<sup>a</sup> Dados da atividade removedora de biofilme em log UFC cm<sup>-2</sup>. EEPN: extrato etanólico de própolis nativa do RS; EHPN: extrato *n*-hexano própolis nativa do RS; FDPN: Fração diclorometano própolis nativa do RS; FAPN: Fração acetato de etila própolis nativa do RS; FMPN: Fração metanólica de própolis nativa do RS; FDPR: Fração diclorometano própolis vermelha; <sup>b</sup>FC: Formação controle de biofilme.

Dentre os extratos e frações de própolis nativa do RS o que apresentou um espectro de ação mais amplo foi o extrato etanólico possuindo capacidade de remover o biofilme formado por todos os isolados de *Candida* ssp. avaliados, com valores de 5,4 a 8,1 log UFC cm<sup>-2</sup>.

Entretanto, não houve diferença significativa na efetividade de remoção do biofilme pelo extrato etanólico de própolis nativa do RS em relação ao extrato hexano e as respectivas frações, com exceção da fração acetato de etila que apresentou uma capacidade significativamente (P<0,05) menor de remoção do biofilme dos diferentes fungos em relação ao extrato etanólico.

O biofilme formado pelos isolados clínicos de *C. glabrata* foi removido pelo extrato etanólico de própolis nativa do RS (EEN), fração metanólica de própolis nativa do RS (FMPN) e fração diclorometano de própolis vermelha (FDPR) com valores entre 4,4 a 7,48 log UFC cm<sup>-2</sup>. A fração acetato de etila de própolis nativa do RS (FAEPN) foi capaz de remover apenas o biofilme formado pela cepa RL03 de *C. glabrata*, com 83,01% de remoção.

Comparando a capacidade de remoção das frações diclorometano das duas própolis analisadas, a própolis vermelha apresentou um espectro de ação maior frente às diferentes espécies de *Candida* spp.

Agarwal e colaboradores (2008) encontraram quatro óleos vegetais entre 30 testados com atividade contra o biofilme formado por *Candida albicans* apresentando valores de 28,57 a 80,87% de redução do biofilme. Os extratos de própolis vermelha e própolis do RS analisados no presente trabalho apresentaram valores de remoção de biofilme de *Candida* não-*albicans* na faixa de 77 a 100% de redução, mostrando uma atividade melhor em relação a esse estudo realizado com outros produtos naturais.

Queiroz (2010) avaliou o extrato etanólico (EEP) e fração diclorometano das própolis do tipo 3 (interior do estado do Paraná) e do tipo 13- vermelha (coletada na região de mangue no estado de Alagoas) sobre biofilmes em pré-adesão de *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* obtidas do Banco Internacional de Isolados - *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) através da determinação do CIM e microscopia eletrônica de varredura, encontrando atividade anti-biofilme em pré-adesão com valores máximos de 250 µg/mL para EEP (*C. parapsilosis*) e 250 µg/mL para fração diclorometano (*C. parapsilosis*) da própolis tipo 3 e CIM 125 µg/mL para EEP tipo 13 (*C. tropicalis*) e 31,3 µg/mL para fração diclorometano (*C. parapsilosis*), não mostrando efetividade frente à *Candida krusei*.

Com relação ao extrato etanólico de própolis nativa do RS e a fração diclorometano de própolis vermelha, verificou-se um potencial maior de remoção pelo

extrato etanólico de própolis nativa do RS em relação à fração diclorometano de própolis vermelha ( $P < 0,05$ ).

Observando os resultados do ensaio de inibição da formação de biofilme apresentados na tabela 8, onde tanto o EEPN quanto a FDPR foram avaliados com relação à capacidade de inibição da formação de biofilme pelas diferentes espécies de *Candida* não-*albicans*, verifica-se que ambos não foram capazes de impedir a formação de biofilme pela maioria dos isolados testados, não havendo diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os valores de formação controle e formação de biofilme após contato com as amostras. Cabe salientar, que foi testada a inibição da formação utilizando um tempo de permanência em contato com a própolis relativamente curto (1 min), podendo esse fato ser uma limitação do estudo. Talvez o contato por um período maior fosse necessário.

Tabela 8- Inibição da formação de biofilme pelo extrato etanólico de própolis nativa do Rio Grande do Sul (RS) e fração diclorometano de própolis vermelha.<sup>a</sup>

<i>Candida</i> spp.	Própolis		Referência FC <sup>b</sup>
	Extrato etanólico	Fração diclorometano	
<i>Candida glabrata</i>			
RL02	5,40	4,70	4,40
RL03	7,18	5,00	5,30
CG03	5,40	5,40	5,70
<i>Candida parapsilosis</i>			
RL01	7,00	6,70	6,88
RL13	6,40	5,24	7,10
CP04	5,40	4,70	5,00
<i>Candida tropicalis</i>			
RL16	6,40	6,40	5,70
RL17	4,40	6,88	5,88

<sup>a</sup>Contagem de colônias fúngicas em UFC cm<sup>-2</sup>. <sup>b</sup>FC: Formação controle de biofilme.

### 5.3 Análise química

#### 5.3.1 Isolamento das substâncias

A fração diclorometano, devido a importante atividade apresentada nos testes biológicos, foi submetida a fracionamento através de cromatografia em coluna utilizando-se misturas de *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol com gradiente de concentração variável começando em *n*-hexano:diclorometano (90:10) até a fase móvel diclorometano: acetato de etila:metanol (50:40:5), obtendo-se seis frações. O monitoramento das frações foi feito através de CCD analítica e sugeriu a presença de um composto com aparente pureza no eluato 3 (eluente: *n*-hexano:diclorometano -50:50) com aspecto cristalino e alaranjado, chamado de PN1. Posteriormente, o eluato 5 obtido dessa coluna foi submetido a um fracionamento em coluna cromatográfica com a mesma sequência de solventes que resultou em 49 frações que foram reunidas conforme a semelhança de composição observada através da CCD. A fração 15 dessa coluna foi purificada através de outra coluna cromatográfica separando-se duas substâncias puras (PN2 e PN3). As substâncias isoladas foram submetidas a análises espectroscópica e espectrométrica.

#### 5.3.2 Identificação das substâncias isoladas

As substâncias PN1 e PN2 foram identificadas como diidroflavonas. Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN (tabela 9) apresentaram os sinais característicos de anel B não substituído (multiplete em cerca de 7,3 ppm) e os sinais característicos referentes aos hidrogênios das posições 2 e 3. O produto PN2 apresenta, ainda, uma metoxila, confirmada pelo sinal em 3,72 ppm e uma hidroxila fenólica em 12,03 ppm. O valor de deslocamento do sinal dessa hidroxila indica que a mesma está quelada a uma carbonila e, portanto, está ligada na posição 5. Os espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN (Tabela 10) mostram sinal de carbono carbonílico o qual foi atribuído pela sua posição característica na região de maior frequência do espectro ( $\delta$  195,39 ppm). Também, os

carbonos C-5 e C-7 estão ligados a oxigênio e apresentam sinais em  $\delta$  164,28 ppm e  $\delta$  165,11 ppm. Esse produto foi identificado como pinocembrina. A outra di-hidroflavona apresenta os mesmos sinais nos espectros de  $^1\text{H}$  RMN, exceto pela presença do sinal da metoxila. O sinal do carbono carbonílico foi atribuído pela sua posição característica, na região de maior frequência do espectro ( $\delta$  195,73 ppm). Os carbonos C-5 e C-7 estão ligados a oxigênio e apresentam sinais em  $\delta$  167,90 ppm e  $\delta$  55,62 ppm. Esse produto foi identificado como pinostrobina.

A estrutura do composto PN2 foi confirmada pela análise dos espectros bidimensionais (HSQC e COSY) apresentados no anexo 2.

O composto PN3 foi identificado como uma chalcona derivada de pinostrobina. O espectro de  $^1\text{H}$  RMN dessa chalcona apresenta sinais característicos de metoxila em 3,80 ppm e hidroxilas fenólicas em 11,92 ppm e 12,02 ppm. A partir dos dados espectrais de  $^{13}\text{C}$  RMN pode-se visualizar sinais correspondentes aos carbonos C-2', C-4' e C-6' ligados a oxigênio em  $\delta$  165,93 ppm;  $\delta$  163,54 ppm e  $\delta$  148,58 ppm, respectivamente.

Os três compostos foram submetidos a espectrometria de massas, a qual confirmou a massa molecular das substâncias citadas (PN1; PN2; PN3: 257 M+H; 271 M+H e 271 M+H, respectivamente). A estrutura química dos compostos identificados pode ser visualizada na figura 9. Os espectros de RMN e espectros de massas estão apresentados no anexo 2.

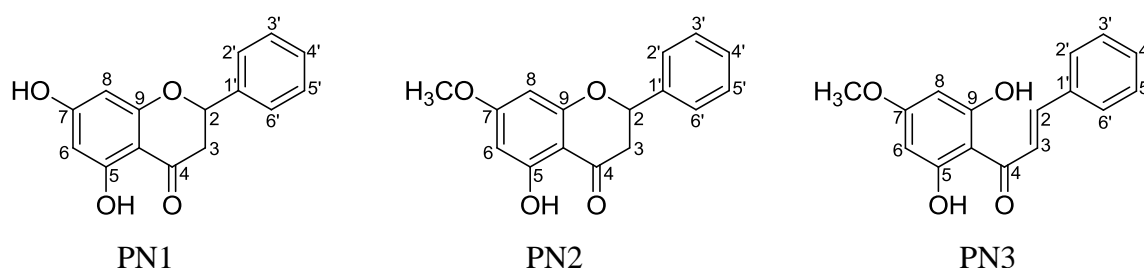


Figura 9: Estrutura química dos compostos isolados da fração diclorometano da própolis nativa do RS no presente estudo: (1) pinocembrina, (2) pinostrobina e (3) pinostrobina chalcona.



Tabela 9- RMN de  $^1\text{H}$  dos produtos isolados PN1 (pinocembrina), PN2 (pinostrobrina) e PN3 (pinostrobrina chalcona) da própolis obtida do RS.<sup>a</sup>

	PN1		PN2		PN3
<b>H-2</b>	5,40( <i>dd</i> , J=4Hz;12Hz)	<b>H-2</b>	5,31 ( <i>dd</i> , J=4Hz ;12Hz)	<b>H-2</b>	7,65 ( <i>m</i> )
<b>H-3'a</b>	3,04 ( <i>dd</i> ,J=96Hz; 16Hz)	<b>H-3'a</b>	2,95 ( <i>dd</i> ,J=12Hz; 28Hz)	<b>H-3</b>	7,42 ( <i>m</i> )
<b>H-3'b</b>	2,84 ( <i>dd</i> , J=8Hz;16Hz)	<b>H-3'b</b>	2,74 ( <i>dd</i> ,J=4 Hz; 20Hz)	<b>H-4</b>	7,42 ( <i>m</i> )
<b>5-OH</b>	12,03 ( <i>s</i> )	<b>5-OH</b>	12,03 ( <i>s</i> )	<b>H-5</b>	7,65 ( <i>m</i> )
<b>7-OH</b>	11,50 ( <i>s</i> )	<b>7-Me</b>	3,72 ( <i>s</i> )	<b>H-6</b>	7,65 ( <i>m</i> )
<b>H-6</b>	6,02 ( <i>s</i> )	<b>H-6</b>	6,00 ( <i>dd</i> , J=4Hz;8Hz)	<b>H-7</b>	8,05 ( <i>d</i> , J= 16Hz)
<b>H-8</b>	6,49 ( <i>d</i> , J=16Hz)	<b>H-8</b>	6,00 ( <i>dd</i> , J=4Hz;8Hz)	<b>H-8</b>	7,82 ( <i>d</i> , J=16Hz)
<b>H-2'</b>	7,26 ( <i>s</i> )	<b>H-2'</b>	7,38 ( <i>d</i> , J=8Hz)	<b>H-3'</b>	5,99 ( <i>s</i> )
<b>H-3'</b>	7,41 ( <i>m</i> )	<b>H-3'</b>	7,34 ( <i>m</i> )	<b>H-5'</b>	6,12 ( <i>s</i> )
<b>H-4'</b>	7,41 ( <i>m</i> )	<b>H-4'</b>	7,34 ( <i>m</i> )	<b>2'-OH</b>	11,92 ( <i>s</i> )
<b>H-5'</b>	7,41 ( <i>m</i> )	<b>H-5'</b>	7,34 ( <i>m</i> )	<b>6'-OH</b>	12,02 ( <i>s</i> )
<b>H-6'</b>	7,26 ( <i>s</i> )	<b>H-6'</b>	7,38 ( <i>d</i> , J=8Hz)	<b>4'-MeO</b>	3,80 ( <i>s</i> )

<sup>a</sup> Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN foram registrados em 400 MHz, com amostras dissolvidas em  $\text{CDCl}_3$  (clorofórmio deuterado),  $\delta$  em ppm.

Tabela 10- RMN de  $^{13}\text{C}$  dos produtos isolados PN1 (pinocembrina), PN2 (pinostrobrina) e PN3 (pinostrobrina chalcona) da própolis obtida do RS.<sup>a</sup>

	PN1	PN2	PN3
<b>C-1</b>	-	-	135,30
<b>C-2</b>	79,17	79,15	127,05
<b>C-3</b>	43,28	43,25	130,18
<b>C-4</b>	195,39	195,73	128,51
<b>C-5</b>	164,28	167,90	128,76
<b>C-6</b>	95,56	95,11	127,05
<b>C-7</b>	165,11	55,62	143,14
<b>C-8</b>	96,78	94,24	124,95
<b>C-9</b>	162,93	162,76	192,66
<b>C-10</b>	102,75	103,10	-
<b>C-1'</b>	138,3	138,49	105,41
<b>C-2'</b>	126,12	126,16	165,93
<b>C-3'</b>	128,87	128,83	94,64
<b>C-4'</b>	128,87	128,83	163,54
<b>C-5'</b>	128,87	128,83	94,64
<b>C-6'</b>	126,12	126,16	148,58

<sup>a</sup> Os espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN foram registrados em 100 MHz, com amostras dissolvidas em  $\text{CDCl}_3$  (clorofórmio deuterado),  $\delta$  em ppm.

O estudo químico da fração diclorometano de própolis nativa do RS resultou no isolamento dos flavonoides pinocembrina, pinostrobina e pinostrobina chalcona. Esses compostos são encontrados em diversas famílias vegetais como Amaranthaceae, Asteraceae, Bignoniaceae, Cistaceae, Cleonaceae, Combretaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Hydrophyllaceae, Lauraceae, Sapindaceae, Mirtaceae, Pinaceae, Piperaceae, Turnaceae e Zingiberaceae. No Brasil não são comumente identificados em amostras de própolis, sendo mais característicos de própolis provenientes da região temperada de ambos os hemisférios Norte e Sul (PARK *et al.*, 2002; SALATINO *et al.*, 2011; ATHIKOMKULCHAI *et al.*, 2013). Considerando que a região Sul do Brasil onde foi obtida a amostra de própolis analisada nessa pesquisa apresenta clima temperado característico, tal fato, pode justificar a identificação desses flavonoides.

Muitas atividades farmacológicas têm sido descritas para pinocembrina, entre elas anti-inflamatória, anticancer, neuroprotetora e antimicrobiana (RASUL *et al.*, 2013). Quando presente como constituinte da própolis, esse composto tem sido proposto como o principal responsável pela ação antimicrobiana desse produto natural.

Ramirez e colaboradores (2013) investigaram a atividade antifúngica do extrato bruto de *Piper ecuadorensis* e de pinostrobina e pinocembrina isoladas dessa planta frente a *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* verificando uma atividade maior para o extrato bruto (31,25-62,5 µg/mL) em relação aos compostos isolados, sendo que apenas pinocembrina (125 µg/mL) foi ativa frente aos fungos testados. Os autores sugeriram que o grupo hidroxila no C-7 da pinocembrina ao invés do grupo metoxila presente no mesmo carbono na pinostrobina é necessário para a atividade biológica.

Diversos estudos têm demonstrado as atividades farmacológicas de pinostrobina e pinostrobina chalcona incluindo citotóxica, antioxidante, gastroprotetiva, antimicrobiana, anti-inflamatória, antinociceptiva, antiespasmódica, antileishmania, neuroprotetora, entre outras (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999; HWANG *et al.*, 2006;

SHINDO *et al.*, 2006; POERWONO *et al.*, 2010; ADBELWAHAB *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011).

Muitos estudos tem mostrado a atividade fungicida dos flavonoides. Alguns desses compostos, como galangina, izalpinina, ramoncitrina, pinocembrina, pinostrobinina e chalconas, foram identificados na própolis e considerados responsáveis por essa atividade muito reportada empiricamente. Essas pesquisas ajudam a confirmar o uso popular da própolis em dermatites fúngicas e bacterianas (ÁVILA *et al.*, 2008; BATOVSKA *et al.*, 2009; AGÜERO *et al.*, 2010).



## 6 Conclusões

Os ensaios de avaliação da atividade antifúngica e de remoção de biofilme mostraram o potencial da própolis nativa do RS e da própolis vermelha para o desenvolvimento de novos produtos visando infecções e contaminações de superfície de cateter de *Candida não-albicans* emergentes;

A fração diclorometano de própolis vermelha e o extrato etanólico de própolis nativa do RS foram fungicidas em 45% dos testes;

Os extratos e frações de própolis verde testado não foram efetivos na inibição da maioria dos isolados fúngicos testados, inibindo apenas o isolado CK02 de *Candida krusei*;

De modo geral, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na capacidade de remoção de biofilmes de *Candida não-albicans* sobre superfícies de catéteres pelo extrato etanólico e extrato *n*-hexano e respectivas frações de própolis nativa do RS, com exceção da fração acetato de etila que apresentou uma atividade um pouco menor, os demais foram capazes de remover os biofilmes de maneira semelhante;

Houve diferença significativa na capacidade de remoção dos biofilmes dos fungos testados entre a fração diclorometano de própolis vermelha e o extrato etanólico de própolis nativa do RS, sendo que a última apresentou maior ação removedora;

As amostras de própolis testadas não foram bem sucedidas na inibição da formação do biofilme, não sendo eficientes na prevenção da formação dos biofilmes fúngicos testados pelo período de tempo de contato avaliado nesse estudo;

Foram encontrados os flavonoides pinocembrina, pinostrobin e pinostrobin chalcona na fração diclorometano da própolis obtida do RS, podendo esses compostos ser relacionados à relevante atividade antifúngica apresentada por essa amostra.

## 7 Referências

ABDELWAHAB, S.I.; MOHAN, S.; ABDULLA, M.A.; SUKARI, M.A.; ABDUL, A.B.; TAHA, M.M.E.; SYAM, S.; AHMAD, S.; LEE, K-H. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property *in vivo*: possible involvement of indirect antioxidant action. *Journal of Ethnopharmacology*, v.137, p.963-970, 2011.

AHN, M.; KUNIMASA, K.; KUMAZAWA, S.; NAKAYAMA, T.; KAJI, K.; UTO, Y.; HORI, H.; NAGASAWA, H.; OHTA, T. Correlation between anticariogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Molecular Nutrition & Food Research*, v.53, p.643-651, 2009.

ÁVILA, H.P.; SMÂNIA, E.F.A.; MONACHE, F.D.; JÚNIOR, A.S. Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.16, p.9790-9794, 2008.

ADELMANN, J. *Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/ antioxidante*. 2005.186f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ADELMANN, J.; PASSOS, M.; BREYER, D.H. ; SANTOS, M.H.R.; LENZ, C.; LEITE, N. F.; LANÇAS, F.M.; FONTANA, J.D. Exotic flora dependence of na unusual Brazilian propolis: The pinocembrin biomarker by capillary techniques. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.43, p.174-178, 2007.

AGARWAL, V.; LAL. P.; PRUTHI, V. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. *Mycopathologia*, v.165, p.13-19, 2008.

AGATI,G.;AZZARELLO,E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M.Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance.Plant Science

AGÜERO, M.B.; GONZALEZ, M.; LIMA, B.; STEVAZ, L.; SÁNCHEZ, M.; ZACCHINO, S.; FERESIN, G.E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; PALERMO, J.; WUNDERLIN, D.; TAPIA, A. Argentinean propolis from *Zuccagnia punctate* Cav. (Caesalpinieae) exudates: phytochemical characterization and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, p.194-201, 2010.

AIZEN, M.; HARDER, L.D. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current Biology*, v.19, p.915-918, 2009.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. Chemical composition

and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 278-283, 2007.

ALI, F.; KASSEM, G.M.; ATTA-ALLA, O. Propolis as a natural descontaminant and antioxidant in fresh oriental sausage. *Veterinaria Italiana*, v.46, n.2, p.167-172.

ALIBONI, A.; D'ANDREA, A.; MASSANISSO, P. Treatment of propolis specimens from central Italy to yield a product with a lower charge of allergenic species. *Separation and Purification Technology*, v.82, p.71-75, 2011.

ASBECK, E.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Clinical Reviews in Microbiology*, v.35, n.4, p.283-309, 2009.

ASHRY, E.S.H.E.; AHMAD, T.A.. The use of propolis as vaccine'adjuvant. *Vaccine*, v.31, p.31-39, 2012.

ATHIKOMKULCHAI, S.; AWALE, S.; RUANGRUNGSI, N.; RUCHIRAWAT, S.; KADOTA, S. Chemical constituents of Thai propolis. *Fitoterapia*, v.88, p.96-100, 2013.

AYRES, D.C.; MARCUCCI, M.C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.102, n.2, p.215-220, 2007.

BAKER, D.D.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural Product Reports*, v.24, p.1225-1244, 2007.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, p.114-117, 2005.

BANKOVA, V.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, v.31, p.3-15, 2000.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, v.15, 561-571, 2001.

BARTH, O.M.; DUTRA, V.M.L.; JUSTO, R.L.; Análise polínica de algumas amostras de própolis do Brasil meridional. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.29, n.4, p.663-667, 1999.

BATOVSKA, D.; PARUSHEV, S.; STAMBOLIYSKA, B.; TSVETKOVA, I.; NINOVA, M.; NAJDENSKI, H. Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.44, p. 2211-2218, 2009.



BLANKENSHIP, J.R.; MITCHELL, A. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*, v.9, p.588-594, 2006.

BROWN, M.J.F.; PAXTON, R.J. The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie*, v.40, p.410-416, 2009.

BÚFALO, M.C.; CANDEIAS, J.M.G.; SFORCIN, J.M. *In vitro* cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoide carcinoma (HEp-20 cells). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 6, p. 483-487, 2009.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, v.36, p.347-363, 1998.

CABRAL, I.S.R. OLDONI, T.L.C. PRADO, A. BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M. ILKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CAMPOS, R.O.P; PAULINO, N.; DA SILVA, C.H.M; SCREMIM, A.; CALIXTO, J.B. Anti-hiperalgesic effect of an ethanolic extract of propolis in mice and rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.50, p.1187-1193, 1998.

CARVALHO, A. A.; FINGER, D.; MACHADO, C. S.; SCHIMIDT, E.M.; COSTA, P.M.; ALVES, A.P.N.N.; MORAIS, T.M.F.; QUEIROZ, M.G.R.; QUINÁIA, S.P.; ROSA, M.R.; SANTOS, J.M.T.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; SAWAYA, C.H.F.; EBERLIN, M.N.; TORRES, Y.R.. In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food Chemistry*, v.126, p.1239-1245, 2011.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, v. 73, p.1-6, 2002.

CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E.H.; FIGUEIREDO, M.S.R.B.; FOLADOR, P.; DAMAZIO, R.G.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, v.8, p.1429-1440, 2008.

CHIFIRIUC, C.; GRUMEZESCU, V.; GRUMEZESCU, A.M.; SAVIUC, C.; LAZĂR, V.; ANDRONESCU, E. Hybrid magnetite nanoparticles/*Rosmarinus officinalis* essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity. *Nanoscale Research Letters*, v.7, p.209-215, 2012.

CLSI-CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. Approved standard M-27A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.2008.

COLLIN, B.; CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H. Antifungal resistance in non-*albicans Candida* species. *Drug Resistance Updates*, v.1, p.9-14, 1999.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUÉR, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a Nationwide sentinela surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n.8, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.36, n.5, p.599-607, 2003.

CUNHA, I.B.S.; SAWAYA, A.C.H.F.; CAETANO, F.M.; SHIMIZU, M.T.; MARCUSSI, M. C; DREZZA, F.T.; POVIA, G.S.; CARVALHO, P.O. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.15, p. 964-970, 2004a.

CUNHA, I.B.D.S.; SALOMÃO, K.; SHIMIZU, M.; BANKOVA, V.; CUSTÓDIO, A.R.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Antitrypanosomal activity of Brazilian propolis from *Apis mellifera*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v.52, n.5, p.602-604, 2004b.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.26, p.343-356, 2005.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Assessment of the antibacterial activity of galangin against resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*, v.13, p.187-191, 2006.

DALEPRANE, J.B.; ABDALLA, D.S. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and angiogenic actions. *Evidence-based Complementary and Alternative medicine*, v. 2013, p.1-8, 2013.

DONLAN, R.; COSTERTON, W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DOTA, K.F.D.; CONSOLARO, M.E.L.; SVIDZINSKI, T.I.E.; BRUSCHI, M.L. Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. *Evidence-based Complementary and Alternative medicine*, v.2011, 2011.

DOUGLAS, L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, v.11, n.1, 2003.

FIDEL, P.; VASQUEZ, J.A.; SOBEL, J. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, p.80-96, 1999.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos para modificação estrutural, para otimização de atividade. *Química Nova*, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

FREITAS, S.F.; SHINOHARA, L.; SFORCIN, J.M.; GUIMARÃES, S. *In vitro* effects of própolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine*, v.13, p.170-175, 2006.

FROZZA, C.O.; GARCIA, C.S.C.; GAMBATO, G.; SOUZA, M.D.O.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F.F.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O.A.; HENRIQUES, J.A.P.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*, v.52, p.137-142, 2013.

FUNARI, C.; FERRO, V. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.26, n.1, p.171-178, 2006.

GEBARA, E. C. E.; LIMA, L.A.; MAYER, M.P.A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, p. 365-369, 2002.

GREGORIS, E.; FABRIS, S.; BERTELLE, M.; GRASSATO, L.; STEVANATO, R. Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. *International Journal of Pharmaceutics*, v.405, p.97-101, 2011.

GRUMEZESCU, A.M. Essential oils and nanotechnology for combating microbial biofilms. *Current Organic Chemistry*, v.17, p.90-96, 2013.

GUIMARÃES, N.S.S.; MELLO, J.C.; PAIVA, J.S.; BUENO, P.C.P.; BERRETTA, A.A.; TORQUATO, R.J.; NANTES, I.L.; RODRIGUES, T. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. *Food and Chemical Toxicology*, v.20, p.1091-1097, 2012.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLINGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. *Food Chemistry Toxicology*, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HAN, M.; LEE, I.; KIM, Y.; KIM, J.T.; CHOE, K.; YUN, B. Flavonoids from propolis inhibit DNA single strand breakage by the Fenton reaction. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, v.53, n.4, p.512-515, 2010.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, v.96, p.67-202, 2002.

HSU, C-Y.; CHIANG, W-C.; WENG, T-I; CHEN, W-J.; YUAN, A. Laryngeal edema and anaphalactic shock after topical propolis use for acute pharyngitis. *American Journal of Emergency Medicine*, v.22, n.5, 2004.

HWANG, T-L.; YEH, S-H.; LEU, Y-L; CHERN, C-Y.; HSU, H-C. Inhibition of superoxide anion and elastase release in human neutrophils by 3'-isopropoxychalcone via a cAMP-dependent pathway. *British Journal of Pharmacology*, v.148, p.78-87, 2006.

JORGE, R.; FURTADO, N.A.J.C.; SOUZA, J.P.B.; SILVA, A.A.; GREGORIO, L.E.; MARTINS, C.H.G.; SOARES, A.E.E.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A. Brazilian propolis: seasonal variation of the prenylated p-cumaric acids and antimicrobial activity. *Pharmaceutical Biology*, v.46, p.889-893, 2008.

JUNIOR, W.B.; MIRANDA, E.O.; ALVINO, V.; ARAUJO, B.; SILVA, D.W.; PORFIRIO, Z. Antimicrobial activity of fractions of red propolis from Alagoas Brazil. *Ciências Biológicas e da da Saúde*, v. 33, n.1, p.03-10, 2012.

KAKINO, M.; IZUTA, H.; TSURUMA, K.; ARAKI, Y.; SHIMAZAWA, M.; ICHIHARA, K.; HARA, H. *Complementary and Alternative Medicine*, v.12, p.192-200, 2012.

KEARNS, C.A.; INOUE, D.W.; WASER, N.M. Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology Systematics*, v.29, p.83-112, 1998.

KIMOTO, T.; AGA, M.; HINO, K.; KOYA-MIYATA, S.; YAMAMOTO, Y. ; MICALLEF, M.J. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepilin C, an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer Research*, v. 21, p. 221-228, 2001.

KLEIN, A.M.; VAISSIÉRE, B.E.; CANE, J.H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S.A.; KREMEM, C.; TSCHAMTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B*. v.274, p.303-313, 2007.

KOMERICKI, P.; KRÄNKE, B. Maculopapular exanthema from propolis: case report and review of systemic cutaneous and non-cutaneous reactions. *Contact Dermatitis*, v.61, p.353-355, 2009.

KONTOYIANNIS, D.P.; VAZIRI, I.; HANNA, H.A.; BOKTOUR, M.; HACHEM, R.; BODEY, G.P.; RAAD, I. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. *Clinical Infectious Diseases*, v.33, p.1676-1681, 2001.

KOO, H.K.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; PARK, Y.K.; BOWEN, W.H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.46, n.5, p.1302-1309, 2002.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, YU; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, v.64, p.235-240, 1999.

LAPPE, R. Influência da utilização do extrato hidroalcoólico de própolis sobre o desenvolvimento de fungos e características físico-químicas e sensoriais do salame tipo italiano. 2004.77f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

LEE, Y.J.; KUO, H.C.; CHU, C.Y.; WANG, C.J.; LIN, W.C.; TSENG, T.H. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of glioma cells. *Biochemical Pharmacology*, v.66, p. 2281-2289, 2003.

LEVY, I. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. *Clinical Infectious Diseases*, v.26, p.1086-1088, 1998.

LUBIAN, C.T.; TEIXEIRA, J.M.; LUND, R.G.; NASCENTE, P.S.; DELPINO, F.A.B. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bertnh. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.12, n. 2, p.157-162, 2010.

LUDWICZUK, A.; SAHA, A.; KUZUHARA, T.; ASAKAWA, Y. Bioactivity guided isolation of anticancer constituents from leaves of *Alnus sieboldiana* (Betulaceae). *Phytomedicine*, v.18, p.491-498, 2011.

LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B; NUNES, L.C. C; RANDAU, K.P. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.3, 447-454, 2008.

MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V.S. Atividades biológicas dos flavonoides naturais. In: YUNES,R.A.; FILHO,V.C. *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia*. 2.ed. Itajaí:Editora da UNIVALI, 2009.cap. VIII,p.191-213.

MALEK, S.N.A.; PHANG, C.W.; IBRAHIM, H.; WAHAB, N.A.; SIM, K.S. Phytochemical and cytotoxic investigations of *Alpinia mutica* rhizomes. *Molecules*, v.16, p.583-589, 2011.

MAMADALIEVA, N.Z.; HERRMANN, F.; EL-READI, M.Z.; TAHRANI, A.; HAMOUD, R.; EGAMBERDIEVA, D.R.; AZIMOVA, S.S.; SHAHNOZ, S.A.;

WINK, M. Flavonoids in *Scutellaria immaculata* and *S. ramosissima* (Lamiaceae) and their biological activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 63, n.10, p.1346-1357, 2011.

MARCUSSI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, v.19, n.5, 1996.

MARCUSSI, M.C. Propolis; chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, v.26, p. 83-99, 1995.

MATSUSHIGE, K.; BASNET, P.; KADOTA, S.; TANAKA, K.; NAMBA, T. Propolis protects pancreatic  $\beta$ -cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). *Phytomedicine*, v. 3, p. 203-209, 1996.

MELLO, B.C.B.S.; HUBINGER, M.D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. *International Journal of Food Science & Technology*, v.47, p.2510-2518, 2012.

MORA, M. L. Q.; OROZCO, A. L.; HERNÁNDEZ, F. H. GAYOSSO, P.M.; MARTÍNEZ, R.L. ZÁRATE, I.S.; MIRANDA, L.C.; CARRILHO, G.P. TOVAR, C.G.G.; SÁNZHEZ, T.A. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro, S.E.N.; PINTO, M.T.C.; KIKUCHI, T.; MENEGUETI, V.A.F.; MARTINS, D.B.C.; COELHO, S.A.D.; MARQUES, M.J.N.J.; VIRMOND, J.C.S.; MONTESCHIO, P.; D'AQUINO, M.; MARQUES, L.C. Implantação do programa de fitoterapia "Verde Viva" na secretaria de saúde de Maringá (2000-2003). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.13, p.58-62, 2003.

OLIVEIRA, A.C.P.; SHINOBU, C.S.; LONGHINI, R.; FRANCO, S.L.; SVIDZINSKI, T.I.E. Antifungal activity of propolis extract against isolated from onychomycosis lesions. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, n.5, p.493-497, 2006.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review Microbiology*, v.54, p.49-79, 2000.

ORSATI, C.L.; MISSIMA, F.; PAGLIARONE, A.C.; BACHIEGA, T.F.; BÚFALO, M.C.; ARAÚJO, J.P.; SFORCIN, J.M. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytotherapy Research*, v.24, p.1141-1146, 2010.

ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; BARBATINI, R.; GIOVANE, C.; FRILLI, F.S.; SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Radionuclides in honeybee propolis (*Apis mellifera* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.76, p. 637-640, 2006.

OTA, C.; UNTERKIRCHER, C.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M.T. Antifungal activity of propolis on diferents species of *Candida*. *Mycoses*, v. 44, p. 375-378, 2001.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P. ; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

PARK, Y.K; IKEGAKI, M.; ABREU, J.S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação da própolis e suas aplicações. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, n. 3, 1998.

PEIXOTO, E.C.T.M.; GARCIA, R.C.; DOMINGUES, P.F.; ORSI, R.O. Utilização da própolis na saúde animal. *Scientia Agraria Paranaensis*, v.8, n.1-2, p.5-24, 2009.

PENG, L.; YANG, S.; CHENG, Y.J.; CHEN, F.; PAN, S.; FAN,G. Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Science and Biotechnology*, v.21, n.6, p.1533-1539, 2012.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; NETO, F.R.A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, v.25, n.2, p. 321-326, 2002.

PICCINELLI, C.L. ; CAMPONE, L.; RUBIO, O.C.; FERNANDEZ, M.C.; ASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p. 6484-6491, 2011.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v.63, p.1035-1042, 2000.

POERWONO, H.; SASAKI, S.; HATTORI, Y.; HIGASHIYAMA. Efficient microwave prenilation of pinostrobin and biological evaluation of its derivatives as antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.20, p.2086-2089, 2010.

PONTIN, K.; FILHO, A.A.D.S.; SANTOS, F.F; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; NANAYAKKARA, N.P.; BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitology Research*, v.103, p.487-492, 2008.

POPOVA, M.; CHEN, C.N.; CHEN, P.Y.; HUANG, C.Y.; BANKOVA, V. A validated spectrophotometric method for quantification of prenylated flavanones in Pacific propolis from Taiwan. *Phytochemical Analysis*, v. 21, p. 186- 191, 2010.

POTTS, S.G.; BIESMEIJER, J.C.; KREMER, C.; NEUMANN, P. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, v.25, n.6, 2010.

PRASAIN, J.K.; BARNES, S. Metabolism and bioavailability of flavonoids in chemoprevention: current analytical strategies and future prospectus. *Molecular Pharmaceutics*, v.4, n.6, p.846-864, 2007.

QUEIROZ, V.C.P.P. *Avaliação do potencial antifúngico de própolis de Apis mellífera contra leveduras do gênero Candida*. 2010.82f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2010.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D. P.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms: an update. *Eucaryotic Cell*, v.4, n.4, p. 633-638, 2005.

RAMIREZ, J.; CARTUCHE, L.; MOROCHO, V.; AGUILAR, S.; MALAGON, O. Antifungal activity of raw extract and flavonoids isolated from *Piper ecuadorensis* from Ecuador. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.23, n.2, p.370-373, 2013.

RANE, H.S.; BERNARDO, S.M.; HOWELL, A.B.; LEE, S.A. Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence-specific mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.69, p.428-436, 2014.

RASUL, A.; MILLIMOUNO, F.M.; ELTAYB, W.A.; ALI, M.; LI, J.; LI, X. Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *BioMed Research International*, 2013, p.1-9, 2013.

RATCLIFFE, N.A.; MELLO, C.B; GARCIA, E.S; BUTT, T.M; AZAMBUJA, P. Insect natural products and processes: New treatments for human disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.41, p. 747-769, 2011.

REN, W.; QIAO, Z.; WANG, H.; ZHU, L.; ZHANG, L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, v.23, n.4, p.519-534, 2003.

REPPETO, M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant proprieties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 523-534, 2003.

RICE-EVANS, C.; SPENCER, J.P.E.; WILLIAMS, R.J. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? In Serial Review: Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): Absorption, Metabolism and Bioactivity. *Free Radical Biology & Medicine*, v.36, n.7, p.838-849, 2004.

SAKIHAMA, Y; YAMASAKI, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics- induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177, p.67-80, 2002.



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

SALATINO, A.; FERNANDES-SILVA; C.C.; RIGHI, A.A.; SALATINO, M.L. Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports*, v.28, p.925-936, 2011.

SANDASI, M.; LEONARD, C.M.; VAN VUUREN, S.F.; VILJOEN, A.M. Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms *in vitro*. *South African Journal of Botany*, v.77, p. 80-85, 2011.

SAMPAIO, F.C.; PEREIRA, M.S.; DIAS, C.; COSTA, V.C.; CONDE, N.C.O.; BUZALAF, M.A.R. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, v.124, p.289-294, 2009.

SAWAYA, A.C.H.F.; PALMA, A.M.; CAETANO, F.M.; MARCUSSI, M.C.; CUNHA, I. B.S.; ARAUJO, C.E.P.; SHIMIZU, M.T. Comparative study of *in vitro* methods used to analyze the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Letters in Applied Microbiology*, v.35, p. 203-207, 2002.

SAWICKA, D.; CAR, H.; BORAWSKA, M.H.; NIKLINSKI, J. The anticancer activity of propolis. *Folia Histoquimica et Cytobiologica*, v.50, n. 1, p.25-37, 2012.

SAWICKA, D.; CAR, H.; BORAWSKA, M.H.; NIKLINSKI, J. The anticancer activity of propolis. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, v.50, n.1, p.25-37, 2012.

SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p.1-14, 2007.

SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potencial for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, p. 253-260, 2011.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES Jr, A.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.73, p.243-249, 2000.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, C.A.M.; FUNARI, S.R.C; BANKOVA,V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal Venomous Animals and Toxins*, v. 7, n. 1, 2001.

SHIMIZU, K.; DAS, S.K.; HASHIMOTO, T.S.; SOWA, Y.; YOSHIDA, T.; SAKAI, T. Artepilin C in brazilian propolis induces G (0)/ G (1) arrest via stimulation of Cip 1/ p 21 expression in human colon cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, v.44, p. 293-299, 2005.

SHINDO, K.; KATO, M.; KINOSHITA, A.; KOBAYASHI, A.; KOIKE, Y. Analysis of antioxidante activities contained in the *Boesenbergia pandurata* Shult. Rhizome. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.70, n.9, p.2281-2284, 2006.

SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J.P.E.; WILLIAMS, R. J.; CADENAS, E.; RICE-EVANS, C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of Aging*, v.23, p.861-880, 2002.

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. *Letters in Applied Microbiology*, v.43, p.318-324, 2006.

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

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in Microbiology*, v.19, n.5, p.241-247, 2011.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007.

SONG, Y.S.; JIN, C.; JUNG, K.J.; PARK, E. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, v.82, p. 89-95, 2002.

SOUZA, F.B.R.; FISCHER, G.; VARGAS, G.D. Efeito antimicrobiano da própolis contra agentes infecciosos de interesse veterinário. *Science and Animal Health*, v.1, n. 1, p.24-37, 2013.

SUN, F.; QU, F.; LING, Y.; MAO, P.; XIA, P.; CHEN, H.; ZHOU, D. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future Microbiology*, v.8, n.7, p.877-886, 2013.

TAKAISI-KIKUNI, N.B.; SCHILCHER, H. Electron microscopi and microcalorimetric investigations of a possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Medica*, v.60, p.222-227, 1994.

TAURA, H.; LAROCA, S. Biologia da Polinização: interações entre as abelhas (Hym., Apoidea) e as flores de *Vassobia breviflora* (Solanaceae). *Acta Biológica Paranaense*, v.33, p.143-162, 2004.

TAVARES, L.C.; LEMOS T.L.G.; ARRIAGA, A.M.C.; SANTIAGO, G.M.P.; FILHO, R.B. Estudo químico de uma amostra de própolis verde de Passa Quatro, Minas Gerais, Brasil. *Química Nova*, v.33, n.10, p. 2051-2054, 2010.

TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.M.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origin of Green Propolis: Bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v.2, n.6, p.685-686, 2005.

TORRES-SANTOS, E.C.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C.; MEIRELLES, M.N.; ROSSI-BERGMANN, B. Selective effect of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, n.5, 1234-1241, 1999.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMONA, S.; MARCUSSI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 3, n. 2, p. 249-254, 2006.

TSAI, Y.; WANG, Y.; LIOU, C.; LIN, Y.; HUANG, H.; LIU, Y. Induction of oxidative DNA damage by flavonoids of propolis: its mechanism and implication about antioxidant capacity. *Chemical Research in Toxicology*, v.25, p.191-196, 2012.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; BENFATO, V.M.M.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Revista Química Nova*.v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

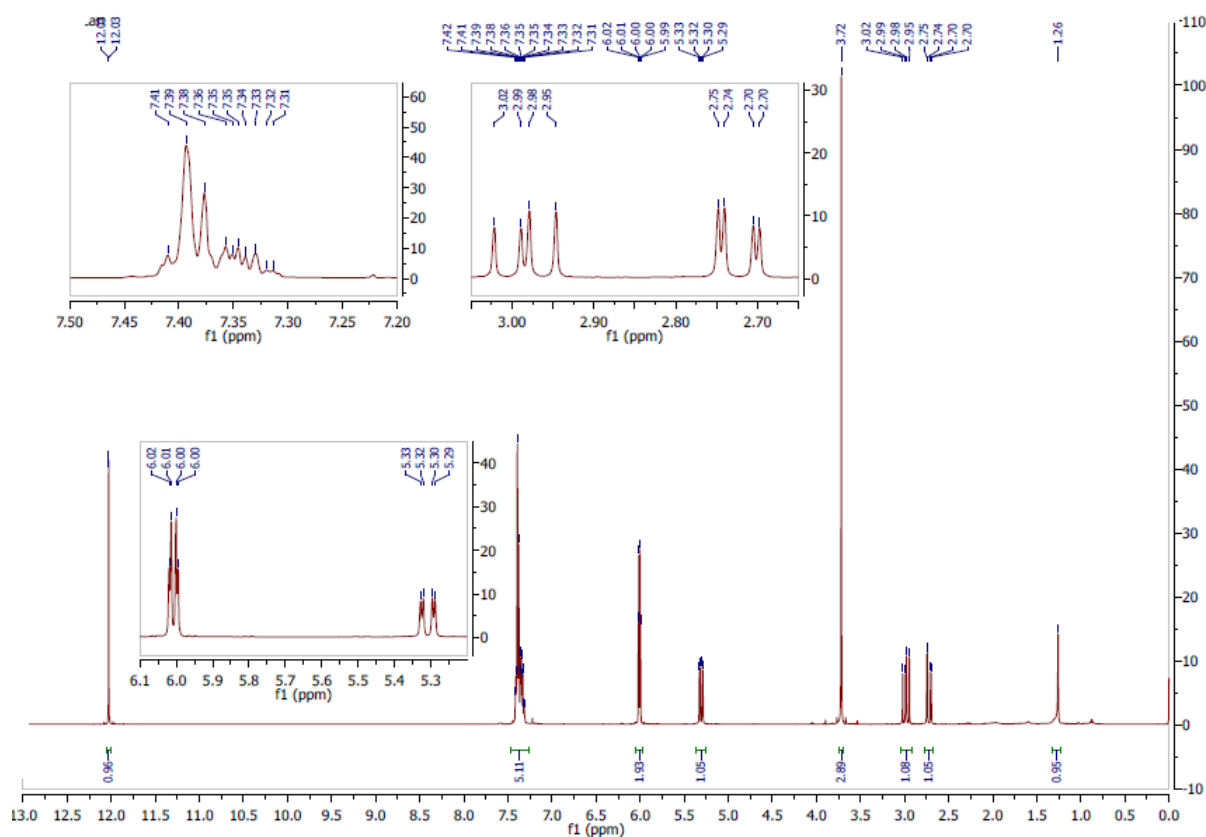
WEEMS, J.J. Jr. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clinical Infections Diseases*, v.14, p.756-766, 1992.

WU, N.; KONG, Y.; ZU, Y.; FU, Y.; LIU, Z. Activity investigation of pinostrobin towards herpes simplex virus-1 as determinate by atomic force microscopy. *Phytomedicine*, v.18, p.110-118, 2011.

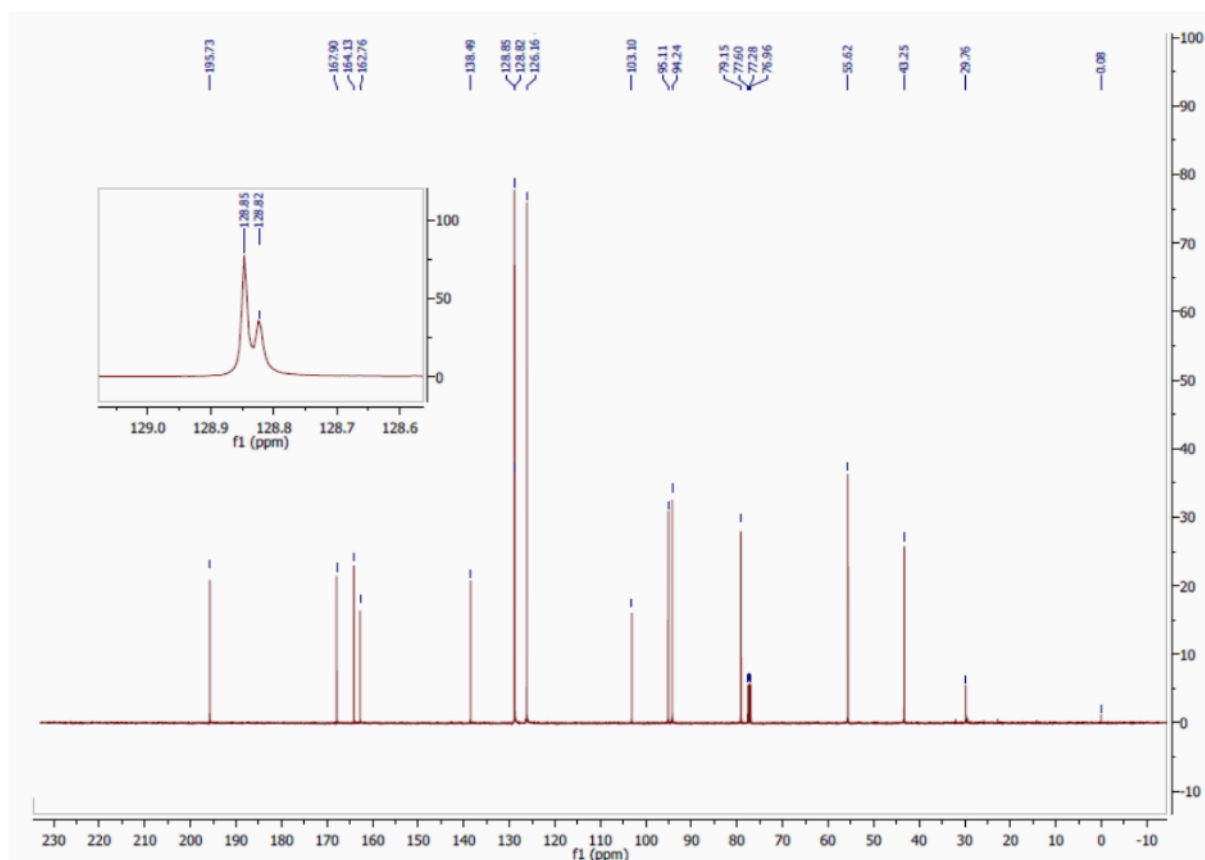


## **ANEXO 1**

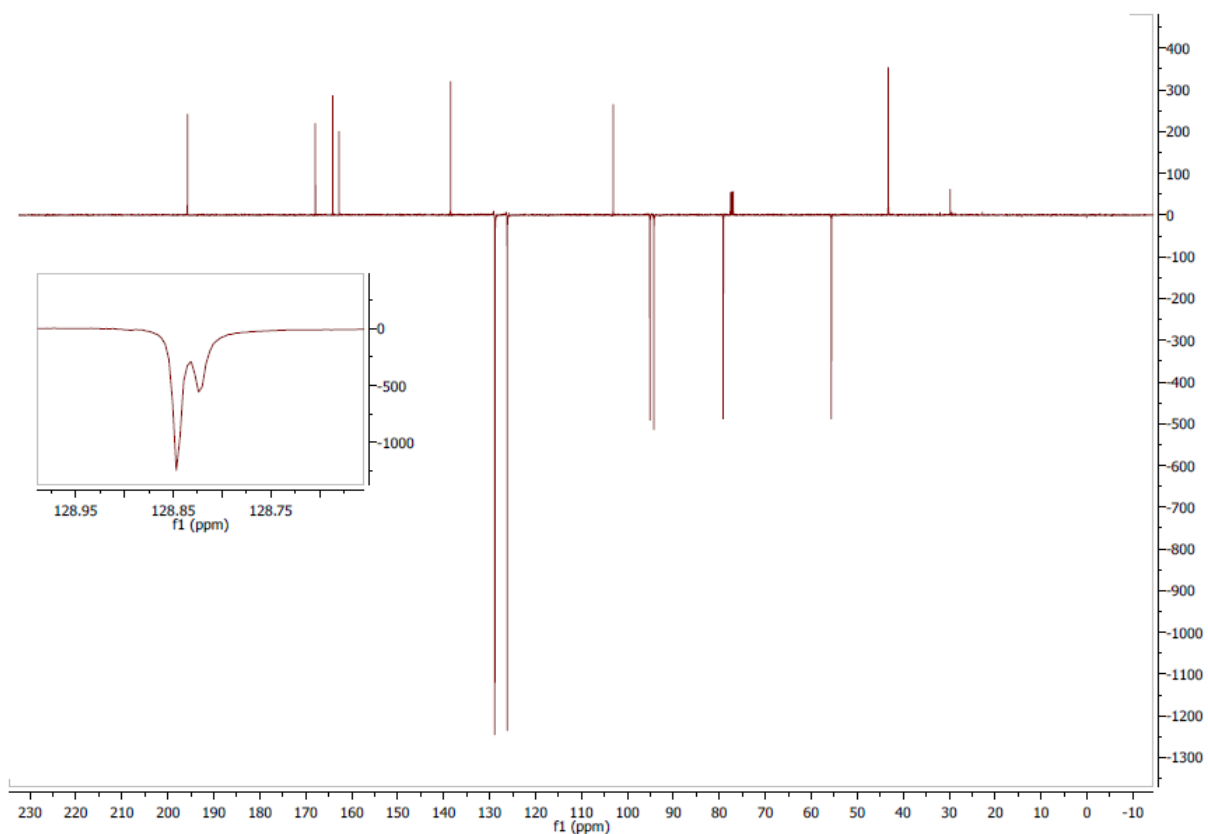
Espectros de  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN e espectros de massas dos compostos pinostrobrina, pinocembrina e pinostrobrina-chalcona.



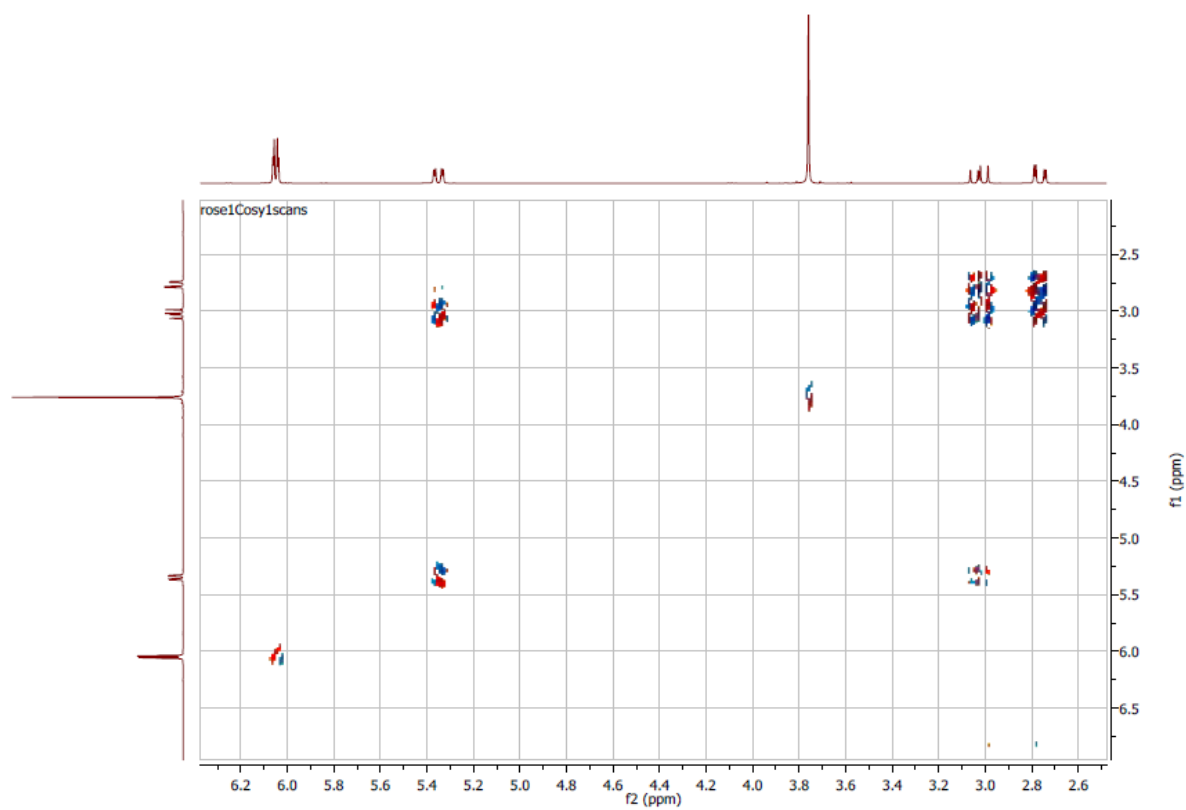
Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto PN2 (pinostrobin) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



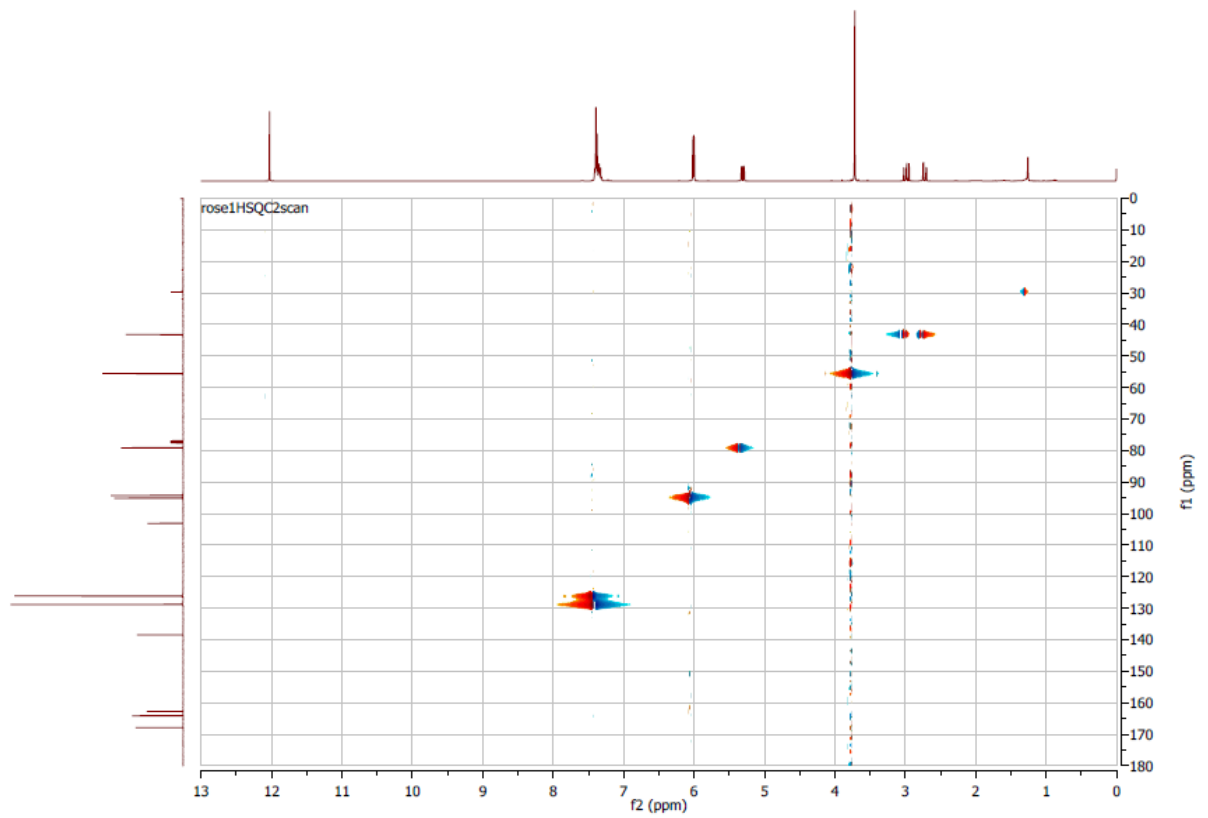
Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto PN2 (pinostrobin) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)



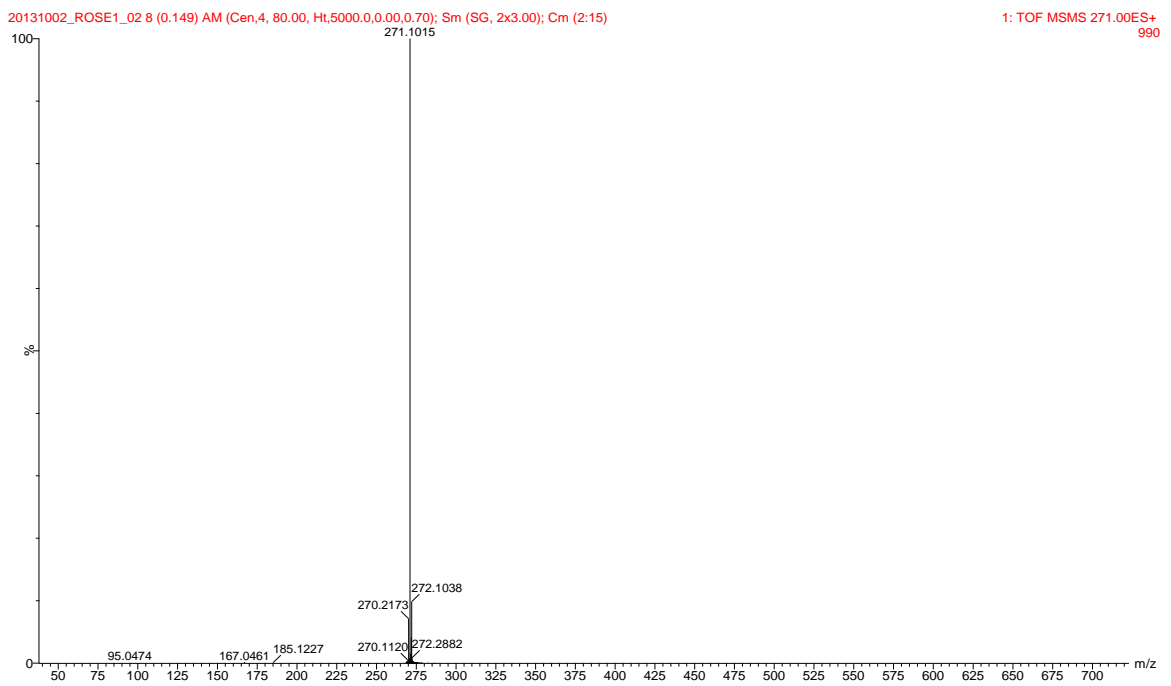
Espectro RMN APT do composto PN2 (pinostrobin) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)



Espectro de RMN COSY do composto PN2 (pinostrobin) ( $\text{CDCl}_3$ )

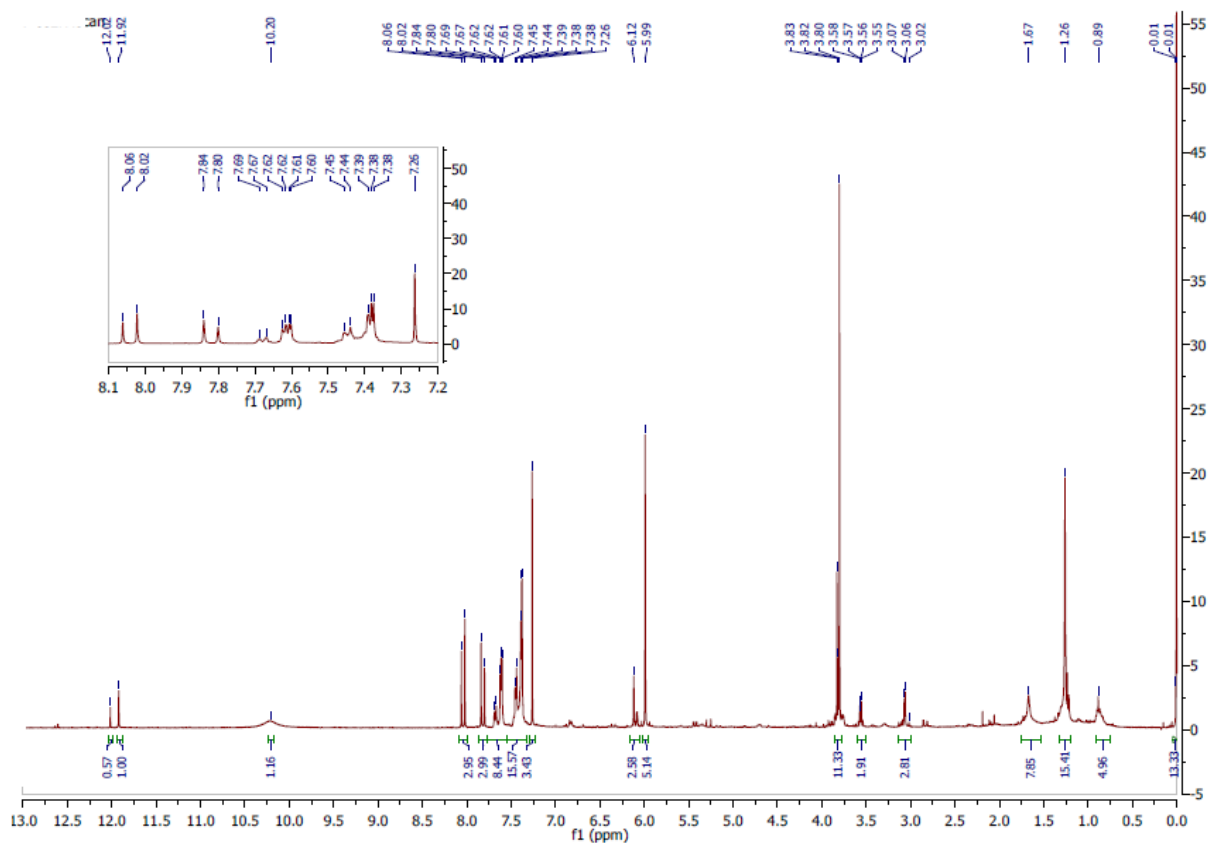


Espectro de RMN HSQC do composto PN2 (pinostrobin) (CDCl<sub>3</sub>)

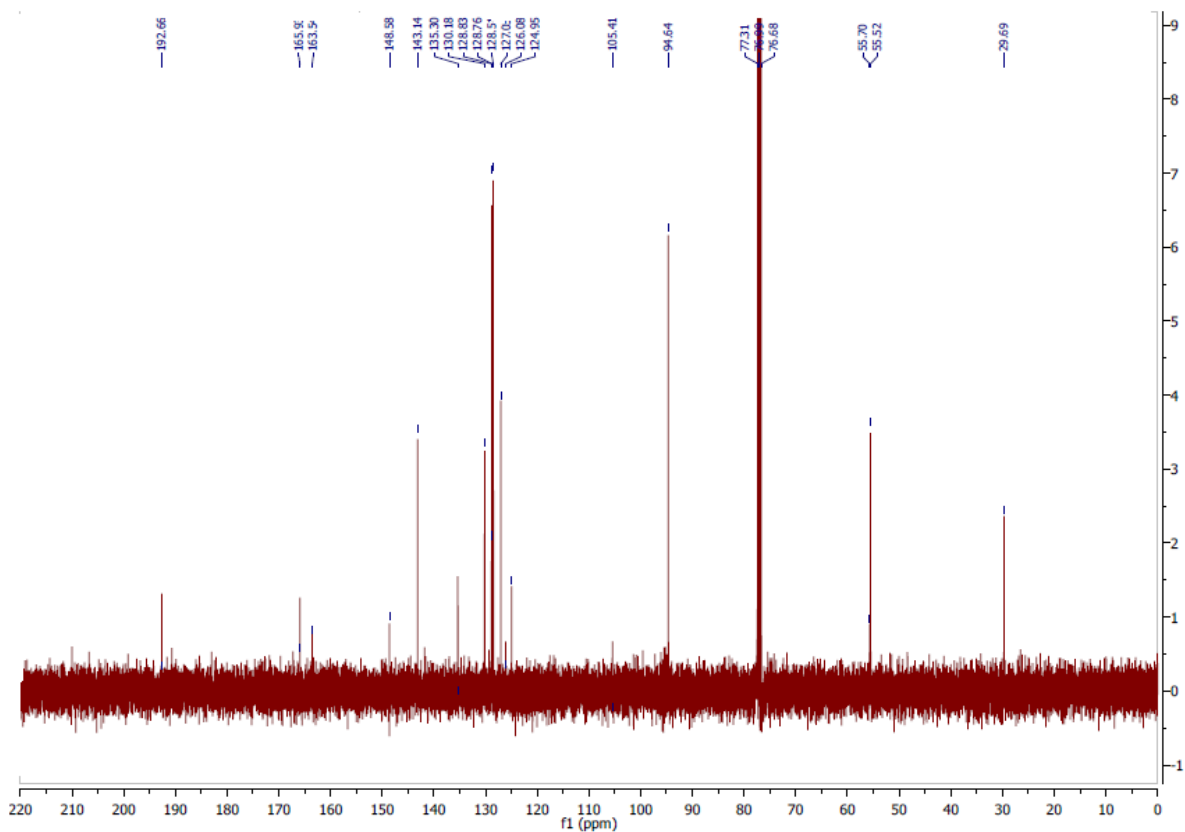


Espectro de massas do composto PN2 (pinostrobin)

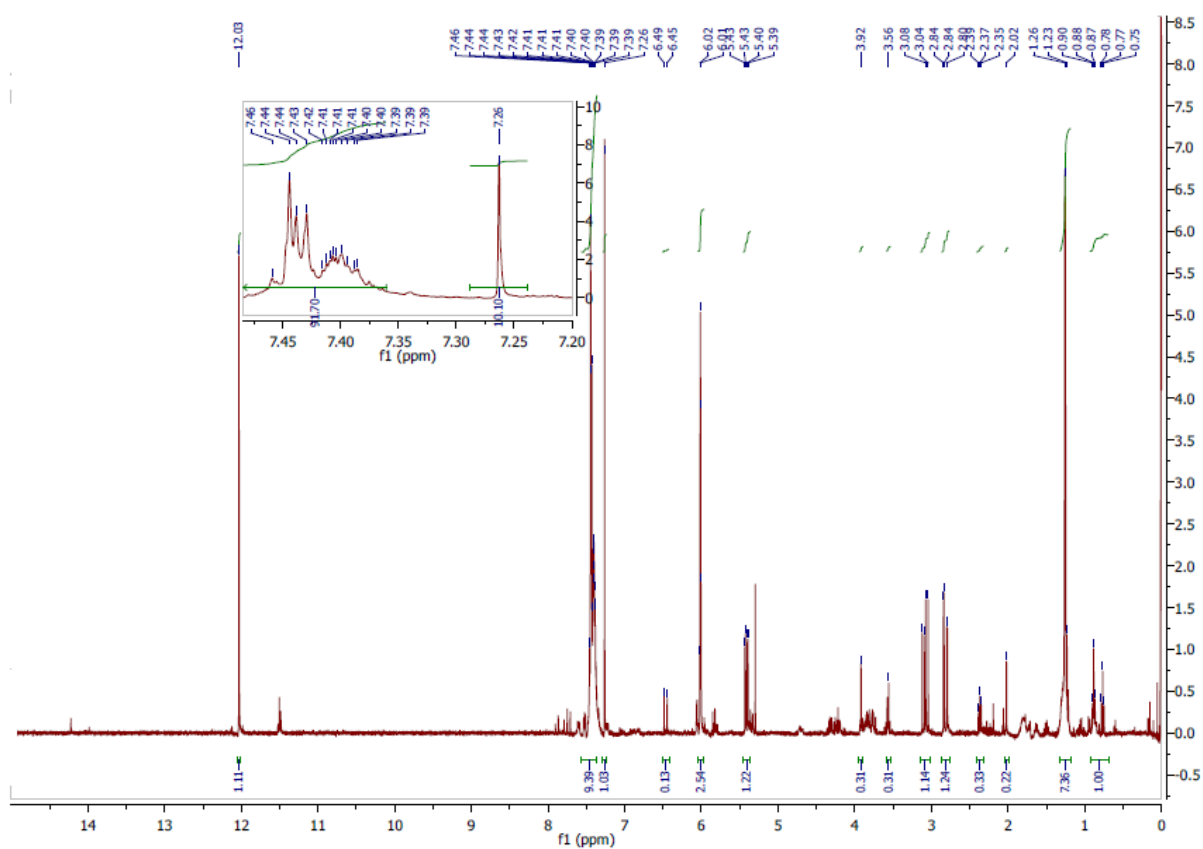
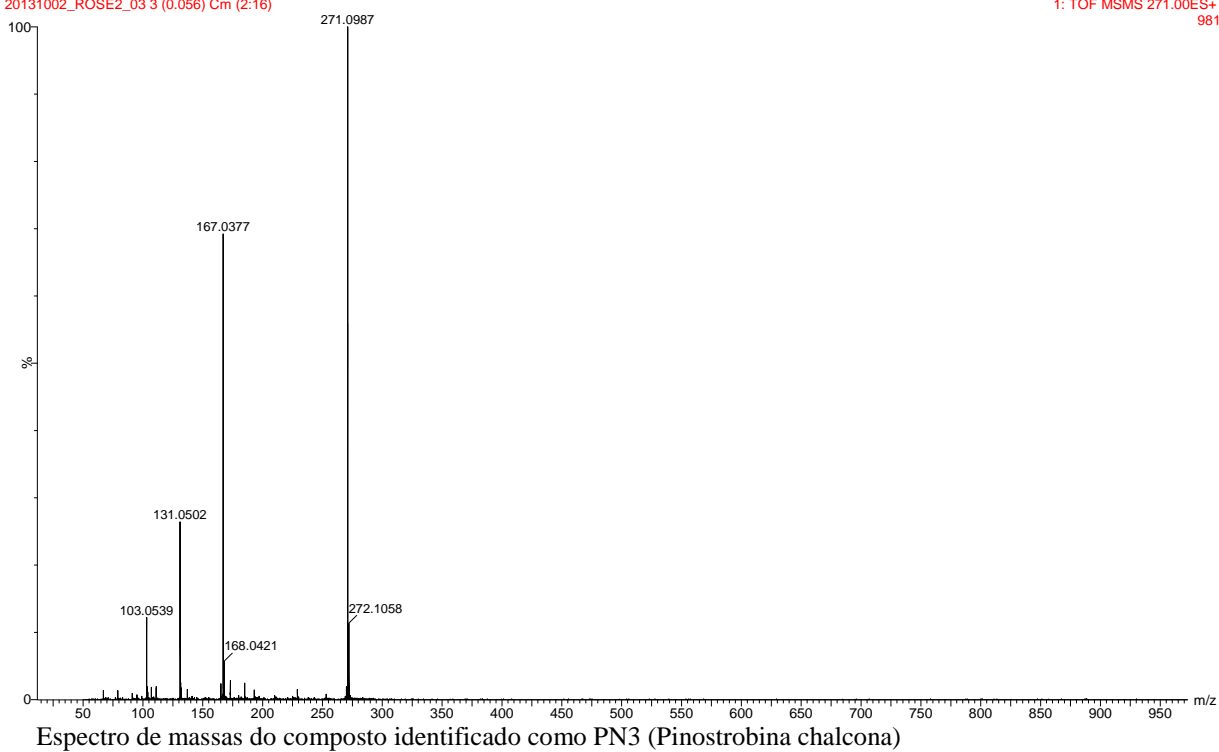


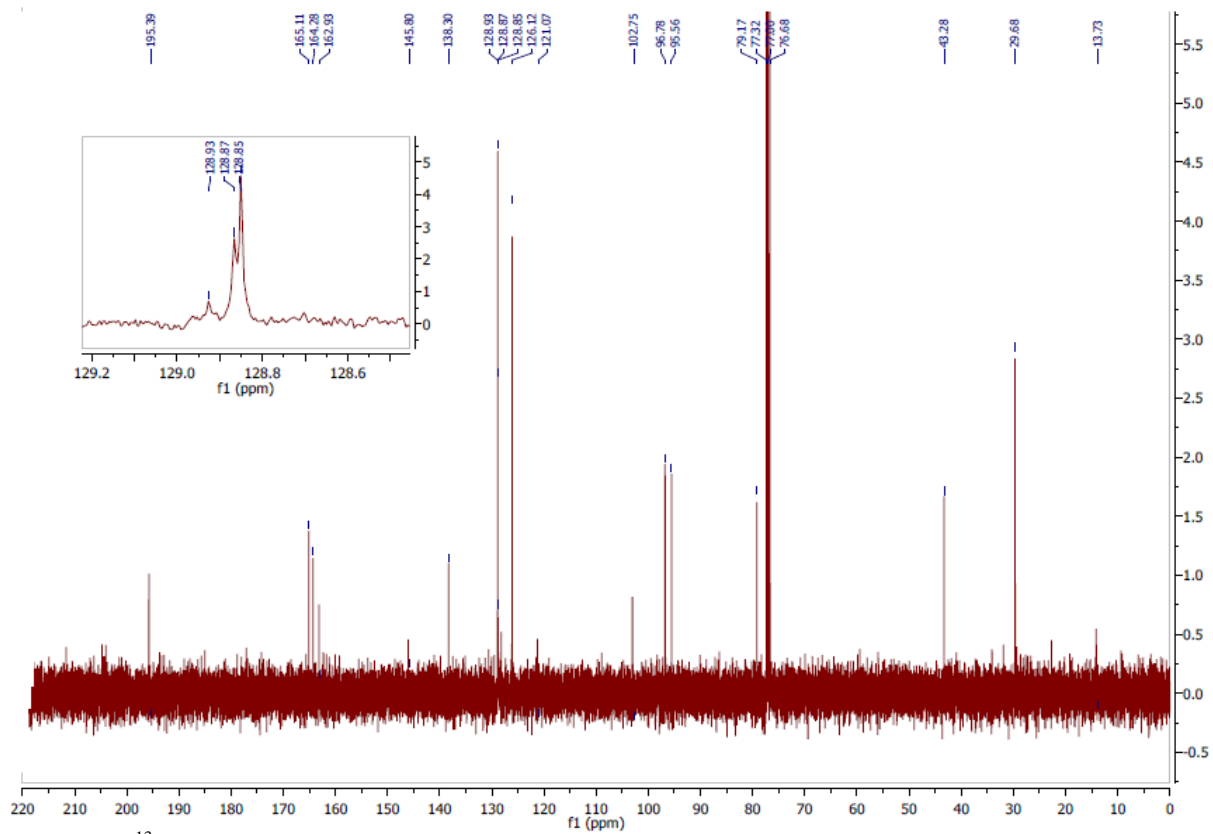


Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto PN3 (Pinostrobin chalcona) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto PN3 (Pinostrobin chalcona) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)





Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto PN1 (pinocembrina) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)