

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA  
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMACOLOGIA CLÍNICA**

**DISSERTAÇÃO**

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E  
ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA E VERDE**



**AISLAN PEREIRA LIRA DE ABREU**

**FORTALEZA – CE  
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA  
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMACOLOGIA CLÍNICA**

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E  
ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA E VERDE.**

**AISLAN PEREIRA LIRA DE ABREU**

*Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia Clínica.*

**Orientador:** Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Suzana Maria Pereira Galvão

**FORTALEZA  
2008**

**AISLAN PEREIRA LIRA DE ABREU**

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E  
ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA E VERDE.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa (Orientadora)**

Universidade Federal do Ceará

---

**Profa. Dra. Gisela Costa Camarão (Examinador interno)**

Universidade Federal do Ceará

---

**Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes (Examinador externo)**

Universidade Federal do Piauí

## **DEDICATÓRIA**

***“Dedico este trabalho a minha mãe Antonia, quem me presenteou com a dádiva da vida, e a minha amada esposa, Francilene, e filhos, Maria Eduarda e Pedro Henrique, os quais apóiam tudo o que faço e faz valer a pena tudo que realizo”.***

## **AGRADECIMENTOS**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente, àqueles que tornaram possível a realização deste trabalho:

À minha orientadora professora Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa, pelo seu comprometimento com a ciência, pela força, por estar sempre disponível nas orientações e contribuição para a realização desse trabalho;

À Coordenadora do Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica, professora Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes pela brilhante forma com que conduz esse programa, pelo imenso amor pela pesquisa clínica e principalmente por gerar oportunidades como essa;

A todos os professores que efetivamente contribuíram com os ensinamentos sempre muito atualizados e aos funcionários da UNIFAC, em especial a Fábria e a Flávia, pela presteza no atendimento e o doce acolhimento;

À minha co-orientadora professora Dra. Suzana Maria Pereira Galvão da Faculdade de Ensino Superior de Floriano – FAESF/PI, estando sempre disponível nas orientações;

À Universidade Federal do Piauí e Universidade Federal do Pernambuco por abrir suas portas e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa;

À Diretora da Faculdade de Ensino Superior de Floriano, professora Elza Bucar, pelo apoio, incentivo e colaboração inestimáveis nas mais variadas etapas deste trabalho e a FAESF por todo apoio material e logístico.

A Humbérila Melo, Ricardo, Gean e Júnior, colegas da FAESF pelo apoio técnico na realização prática desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas de Mestrado e agora amigos pelo companheirismo e pelos momentos de alegria que passamos juntos.

*Um senhor de 70 anos viajava de trem tendo ao seu lado um jovem universitário, que lia o seu livro de ciências.*

*O senhor, por sua vez, lia um livro de capa preta. Foi quando o jovem percebeu que se tratava da Bíblia e estava aberta no livro de Marcos. Sem muita cerimônia o jovem interrompeu a leitura do velho e perguntou:*

*- O senhor ainda acredita neste livro cheio de fábulas e crendices?*

*- Sim, mas não é um livro de crendices. É a Palavra de Deus. Estou errado?*

*- Mas é claro que está! Creio que o senhor deveria estudar a História Universal. Veria que a Revolução Francesa, ocorrida há mais de 100 anos, mostrou a miopia da religião. Somente pessoas sem cultura ainda creem que Deus tenha criado o mundo em seis dias. O senhor deveria conhecer um pouco mais sobre o que os nossos cientistas pensam e dizem sobre tudo isso.*

*- É mesmo? E o que pensam e dizem os nossos cientistas sobre a Bíblia?*

*- Bem, respondeu o universitário, como vou descer na próxima estação, falta-me tempo agora, mas deixe o seu cartão que eu lhe enviarei o material pelo correio com a máxima urgência.*

*O velho então, cuidadosamente, abriu o bolso interno do paletó e deu o seu cartão ao universitário.*

*Quando o jovem leu o que estava escrito, saiu cabisbaixo sentindo-se pior que uma ameba.*

*No cartão estava escrito:*

*Professor Doutor Louis Pasteur,  
Diretor Geral do Instituto de Pesquisas Científicas da Universidade Nacional da França.*

*"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima".*

*Louis Pasteur.*

***RESUMO***

## RESUMO

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA E VERDE.** Aislan Pereira Lira de Abreu. Orientadora: Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa. Co-orientadora: Dra. Suzana Maria Pereira Galvão. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

A atividade anti-inflamatória da própolis é bastante descrita na literatura e alguns trabalhos sugerem que pode estar relacionada à presença de flavonoides, os quais apresentam atividade inibitória sobre a ciclooxigenase e a lipoxigenase. Entretanto os resultados não são conclusivos e assim, inúmeros pesquisadores têm investigado a atividade anti-inflamatória da própolis em diversos modelos de inflamação sugerindo possibilidade de vários mecanismos de ação. Neste sentido, o presente trabalho realizou um estudo comparativo da atividade anti-inflamatória da própolis vermelha, uma espécie nova, pouco estudada, oriunda do litoral de Pernambuco e da própolis verde, de Minas Gerais em dois modelos animais de inflamação, o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos e o edema de pata induzido por carragenina em ratos. Foi observada atividade anti-inflamatória em ambos modelos, porém constatou-se uma maior efetividade para a própolis vermelha. Uma outra atividade farmacológica da própolis bem conhecida popularmente e bem estudada cientificamente é sua ação antimicrobiana. Foi objetivo deste trabalho também investigar comparativamente a ação antifúngica dos tipos de própolis em várias cepas de *Candida*. Embora, a constatação de cepas de *Candida* em qualquer microbiota do homem não induza nenhum transtorno que possa favorecer patologia, as leveduras de *Candida* spp. talvez sejam o fungo mais oportunista descrito. Desse modo, esses processos estão relacionados a um grande número de doenças e mau funcionamento orgânico. Assim o aumento crescente das infecções por *Candidas* (sobretudo nosocomial) e de sua resistência a antimicrobianos tem despertado a busca por novas alternativas terapêuticas. Neste sentido, este estudo também testou a sensibilidade de sete espécies de *Candida* sp. de interesse clínico à ação da própolis vermelha e verde. Os resultados do ensaio de inibição em placas de Petri usando discos de papel impregnado de extrato de própolis mostraram variáveis níveis de inibição, sendo que, uma discreta inibição foi observada para a maioria das cepas. Em suma, esses estudos, embora preliminares, apontam diferenças de efetividade entre a própolis verde e vermelha e despertam o interesse para a necessidade de análise mais aprofundada do assunto, tendo em vista a escassez de estudos realizados para a própolis vermelha.

**Palavras-chave:** Própolis verde. Própolis vermelha. Antifúngico. Anti-inflamatório.

## ***ABSTRACT***

## **COMPARATIVE STUDY OF ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF RED AND GREEN PROPOLIS EXTRACT.**

Aislan Pereira Lira de Abreu. Supervisor: Dr Francisca Cléa Florenço de Sousa. Co-supervisor: Dr Suzana Maria Pereira Galvão. Master Degree. Pharmacology Post Graduate Program Department of Physiology and Pharmacology. Faculty of Medicine. Federal University of Ceara – Brazil.

The anti-inflammatory activity of propolis is fairly described in the literature and some studies suggest that may be related to the presence of flavonoids, which have inhibitory activity on the cyclooxygenase and lipoxygenase. However the results are not conclusive and thus, many researchers have investigated the anti-inflammatory activity of propolis in several models of inflammation suggesting possibility of multiple mechanisms of action. In this sense, this work has made a comparative study of anti-inflammatory activity of red propolis, a new species, little studied, came from coast of Pernambuco and green propolis, from Minas Gerais in two animal models of inflammation, swelling of the ear induced by Croton oil in mice and the paw edema induced by carrageenan in rats. Antiinflammatory activity was observed in both models, but there was a greater effectiveness for the red propolis. Another pharmacological activity of propolis popularly known and well scientifically studied is its antimicrobial activity. It was objective of this study also to investigate and compare the action of anti-fungal activity of two types of propolis in several strains of candida. Although the finding of strains of Candida at any microflora of man does not induce any inconvenience that may promote disease, the yeast of Candida spp. are perhaps the most opportunistic fungus described. Thus, these cases are related to a large number of organic diseases and malfunctions. Thus the rising tide of infections caused by Candida (especially nosocomial) and its resistance to antibiotics has increased the search for new therapeutic alternatives. Accordingly, this study also tested the sensitivity of seven species of Candida sp. of clinical interest, to the action of red and green propolis. The test results of inhibition in Petri dishes using discs of paper impregnated with extract of propolis, showed varying levels of inhibition, with a slight inhibition been observed for most strains. In short, these studies, although preliminary, indicate differences in effectiveness between the red and green propolis and appeal to the need for more thorough analysis of the issue in view of the scarcity of studies for the red propolis.

**Keywords:** Green propolis. Red propolis. Antifungal. Anti-inflammatory.

## ***LISTA DE FIGURAS E TABELAS***

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Foto da <i>Baccharis dracunculifolia</i> (L) no momento que a abelha coleta resina para produção de própolis verde	27
Figura 2. Fotografia de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> (L)	28
Figura 3. Estrutura dos flavonóides 1-10 e flavonol 11	29
Figura 4. Estrutura de Isoflavonas 12-18	30
Figura 5. Estrutura de Isoflavanonas 19-22	30
Figura 6. Estrutura de Isoflavanas 23-26	31
Figura 7. Estrutura de chalconas 27-30 e um auronol 31	31
Figura 8. Estrutura de pterocarpanos 32-37 e um 2-arilbenzofurano 38	32
Figura 9. Estrutura de um neoflavonoide 39 e lignanas 40-42	32
Figura 10-. Pesagem dos discos (5mm) das orelhas de camundongos em balança analítica	47
Figura 11. Injeção intraplantar de carragenina na pata direita do rato	49
Figura 12. Atividade antiedematogênica de extratos de própolis vermelha e verde em edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos	53
Tabela 1. Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis verde e vermelha no edema de pata induzido por carragenina em ratos	55
Figura 13. Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis verde (EPvd) e vermelha (EPvm) no edema de pata induzido por carragenina	56
Figura 14. Registro dos halos de inibição com discos contendo extratos de própolis verde e vermelha	59
Tabela 2: Medidas dos halos de inibição com discos contendo extratos de própolis verde e vermelha em placas de Agar Sabouraud após semeio de diferentes espécies de <i>Candidas</i>	60

## ***LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS***

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*C. albicans* – *Candida albicans*  
*C. parapsilosis* – *Candida parapsilosis*  
*C. tropicalis* – *Candida tropicalis*  
*C. guilliermondii* - *Candida guilliermondii*  
*C. cruzei* – *Candida cruzei*  
*C. lusitanae* – *Candida lusitanae*  
*C. dubliniensis* – *Candida dubliniensis*  
*A. mellifera* – *Apis mellifera*  
*D. ecastophyllum* – *Dalbergia ecastophyllum*  
COX – Ciclooxygenase  
CAPE – ácido fenil éster caféico  
PMNs - polimorfonucleares  
i.p – intraperitoneal  
EEP – extrato etanólico de própolis  
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana  
m/v – massa/volume  
µL – microlitro  
g – grama  
mg – miligrama  
Kg – quilograma  
ml – mililitro  
mm – milímetro  
cm – centímetro  
Min. – Minutos  
VI – volume inicial  
VF – volume final  
VE – volume do edema  
EPvd – extrato de própolis verde  
EPvm – extrato de própolis vermelha  
NaCl – cloreto de sódio  
e.p.m – erro padrão da média

## **SUMÁRIO**

## SUMÁRIO

<b>I INTRODUÇÃO</b>	18
<b>II REVISÃO DA LITERATURA</b>	21
1 Histórico	22
2 Caracterização	24
3 Química	28
4 Atividade Antimicrobiana	33
5 Atividade Anti-inflamatória	36
<b>III RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b>	39
<b>IV OBJETIVOS</b>	41
a. Objetivos gerais	42
b. Objetivos específicos	42
<b>V PROTOCOLO EXPERIMENTAL</b>	43
1 Desenho do estudo	44
2 Tamanho da amostra	44
3 Coleta da própolis	45
4 Obtenção dos extratos	45
5 Atividade anti-inflamatória	46
5.1 Edema de orelha	46
5.2 Edema de pata	48
6 Atividade antifúngica	49
7 Aspectos éticos	50
<b>VI RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	51
1 Atividade anti-inflamatória	52
1.1 Edema de orelha	52
1.2 Edema de pata	54
2. Atividade antifúngica	58
<b>VII CONCLUSÃO</b>	62
<b>VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	64

## ***INTRODUÇÃO***

## I. INTRODUÇÃO

Paradoxalmente, no século XXI a população tem despertado um interesse maior pela medicina natural em todo o mundo. No Brasil não tem sido diferente, visto que muitas indústrias nacionais estão montando um setor de Pesquisa & Desenvolvimento na área de fitomedicina e com isso vem aumentando cada vez mais o número de produtos fitoterápicos que chegam ao mercado devidamente registrado nos órgãos competentes, genuinamente brasileiros.

Dentro deste contexto, a própolis vem se destacando pelas suas propriedades terapêuticas tais como: antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante e anticariogênica (Park et al., 1998).

A própolis brasileira desperta especial interesse aos países da Europa e Japão devido à ausência de pesticidas, metais pesados e antibióticos e isso tem contribuído para um aumento das exportações. Ao contrário da própolis vermelha, descoberta recentemente, a própolis verde vem sendo extensamente estudada nos últimos 20 anos e já está mais caracterizada do ponto de vista fitoquímico e de variabilidades sazonais. Até 2006, existiam 12 tipos de própolis, quando, Daugsch e colaboradores (2006), classificaram esse novo tipo de própolis (vermelha) da costa do nordeste, como própolis do grupo 13.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar comparativamente a atividade anti-inflamatória tópica de extratos de própolis verde e vermelha, no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton em camundongos,

e a atividade anti-inflamatória sistêmica, através da administração intraperitoneal de própolis no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos. A atividade antifúngica também será avaliada através do estudo da suscetibilidade de cepas de *Candida* de diferentes espécies, como *C. albicans*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. kruzei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*.

## ***REVISÃO DE LITERATURA***

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### 1. HISTÓRICO

A própolis é um dos muitos produtos naturais que vêm sendo utilizados durante séculos pela humanidade (Vargas *et al.*, 2004). Os egípcios conheciam as propriedades anti-putrefativas da própolis e a empregavam para embalsamar cadáveres. Além disso, foi reconhecida por suas propriedades medicinais por médicos e filósofos gregos e romanos como Aristóteles, Dioscorides, Plínio e Galeno (Capasso & Castaldo, 2002). O uso de extratos de própolis na medicina popular data de 300 a.C. (Da Silva *et al.*, 2006).

Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, a própolis foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes e na segunda guerra mundial foi empregada em várias clínicas soviéticas (Pereira *et al.*, 2002).

A própolis começou a ser apreciada como meio para tratamento de problemas de saúde nos anos de 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 não adquiriu popularidade até 1980. Na metade dos anos 80, a própolis tornou-se um importante produto na medicina alternativa e complementar. O Japão é o principal importador de própolis, com preferência pela própolis brasileira (Salatino *et al.*, 2005).

O termo própolis já era descrito no século XVI na França e a Farmacopéia de Londres do século XVII lista a própolis como droga oficial (Capasso & Castaldo, 2002; Pereira *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2004). Em 1908 surgiu o primeiro trabalho científico sobre suas propriedades químicas e “composição”, indexado no *Chemical Abstracts* (referência n° 192). Em 1968 surgiu no *Chemical Abstracts* o resumo da primeira patente utilizando a própolis Romena, para a produção de loções para banho. Até meados do ano 2000, o número de trabalhos publicados citados no *Chemical Abstracts* totaliza 450, oriundos de 39 países, dos cinco continentes, além de 239 patentes (Pereira *et al.*, 2002).

Partindo-se então, de 2003 até início de 2008, uma busca realizada no *European Patent Office* tomando-se *Worldwide* como base de dados, mostrou mais de 500 pedidos de patentes relacionados à própolis, o que evidencia um exponencial interesse pela própolis (European Patents Office, 2008). Esses dados podem ser explicados, também, por um número maior e um maior aprofundamento nos estudos relativos à própolis: sua composição química e atividade biológica.

No Brasil, o interesse pela própolis aconteceu somente na década de 80 com o trabalho pioneiro de Ernesto Ulrich Breyer (1981), demonstrando em seu livro, “Abelhas e saúde”, as propriedades terapêuticas da própolis e sua utilização como antibiótico natural (Lima, 2006).

## 2. CARACTERIZAÇÃO

A própolis é uma substancia usada desde a antiguidade por suas atividades biológicas no tratamento de várias doenças na Grécia e Roma (Burdock, 1998). A palavra própolis vem do grego, onde *pro* significa “em defesa de” e *polis* significa “cidades”, representando a defesa das cidades das abelhas ou colméia (Almeida e Menezes, 2002). A qualidade da própolis brasileira devido a um menor teor de metais pesados, pesticidas e antibióticos, chamou a atenção do mercado japonês que iniciou sua importação após o Congresso Internacional de Apicultura realizado em Nagoya, Japão em 1985 (Yamamoto, 1997), citado por Lima (2006).

É uma mistura heterogênea composta de substancias retiradas de exsudatos de plantas pelas abelhas. Mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras (Burdock, 1998). A própolis é coletada por abelhas a partir de diversas partes das plantas como brotos, botões florais, casca e exsudatos resinosos (Park *et al.*, 1997). A própolis recolhida de uma colméia de abelhas, também conhecida como própolis bruta, apresenta em sua composição básica cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra, Estes valores se referem à espécie *Apis mellifera* L., cuja própolis é a mais estudada entre as abelhas (Menezes, 2005).

A resina contida na própolis é coletada na vegetação das cercanias da colméia. O espectro de vôo de uma abelha *A. mellifera* abrange um raio de cerca de 4-5 km em torno da colméia, de onde abelhas campeiras coletam pólen e néctar

para alimentação, bem como resina para a própolis. Não são conhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, mas se sabe que elas são seletivas nesta coleta (Salatino *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2005).

As propriedades biológicas da própolis estão diretamente ligadas a sua composição química, e este possivelmente é o maior problema para o uso da própolis na terapia, tendo em vista que a sua composição química varia com a flora da região, locais e épocas de coleta (Pereira *et al.*, 2002; Park *et al.*, 1998; Bianchini, 1998). A variação sazonal como a diminuição em alguns componentes biologicamente ativos, no caso dos fenólicos é acompanhada pelo aumento de outros, por exemplo, ácidos diterpênicos. Deste modo pode-se esperar que algumas atividades biológicas, relacionadas a estes compostos - antibacteriana, antifúngica - sejam similares em diferentes estações do ano (Bankova, 1998). Muitos dos compostos isolados pertencem principalmente a três grupos, flavonóides, ácidos fenólicos e ésteres (Simões, 2004).

A coloração da própolis depende de sua procedência. Varia de marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado. Possui odor característico que pode variar de uma amostra para outra (Marcucci, 1996).

Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia, a fonte dominante de própolis é o exsudato do botão de álamo (*Populus sp.*). Entretanto, na América do Sul a espécie vegetal do gênero *Populus* não é nativa, existindo uma grande diversidade vegetal para retirada de resina, o que dificulta a correlação da própolis com a fonte

produtora (Park *et al.*, 2002). Outras espécies vegetais empregadas como fontes de própolis em várias partes do mundo são pinheiros, carvalho, salgueiro, acácia, entre outras (Markham *et al.*, 1996).

A própolis vermelha é relatada como sendo típica de Cuba e da Venezuela, onde as origens botânicas foram identificadas como *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) e *Clusia scrobiculata*, respectivamente (Trusheva *et al.*, 2006). A própolis vermelha é ainda pouco estudada, é encontrada nas regiões Norte e Nordeste, sobretudo nas áreas litorâneas. Trusheva *et al.* (2006) apresentaram resultados sobre a atividade antibacteriana, antioxidante, bem como os constituintes químicos de uma amostra de própolis vermelha coletada em Maceió.

Na produção de própolis vermelha do nordeste, as abelhas a coletam de diversas árvores e arbustos que ocorrem no litoral. Possui como prováveis fontes a *Rizophora mangle* (mangue vermelho), *Schinus terebentifolius* (Aroeira) e a *Dalbergia ecastophyllum* (L.), sendo essa última, a principal fonte da própolis utilizada no presente estudo. Já a própolis verde, possui como principal fonte o alecrim (*Baccharis dracunculifolia*), tanto que o próprio mercado especifica a própolis de Minas Gerais de cor verde, como sendo de alecrim (Lima, 2006).



**Figura 1.** Foto da *Baccharis dracunculifolia* (L) no momento que a abelha coleta resina para produção de própolis verde (Fonte: Geocities).

Park, *et al.* (1998) verificaram que existe grande variação na concentração de flavonóides, os principais compostos responsáveis pela ação farmacológica, entre extratos dependendo da concentração etanólica utilizada para extração, e esse fato está intimamente relacionado com a sua atividade biológica.

Recentemente, foi encontrada uma própolis vermelha em colméias localizadas ao longo do litoral e costas de rios no nordeste brasileiro a qual foi classificada como própolis do grupo 13 (Daugusch *et al.*, 2006). Foi observado que as abelhas coletavam o exsudato vermelho da superfície da *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Donnelly *et al.*, 1973; Matos *et al.*, 1975), sugerindo que essa é a origem botânica da própolis vermelha.



**Figura 2.** Fotografia de *Dalbergia ecastophyllum* (L) retirada de uma área de restinga do litoral de Pernambuco, município de Itapissuma em 2006.

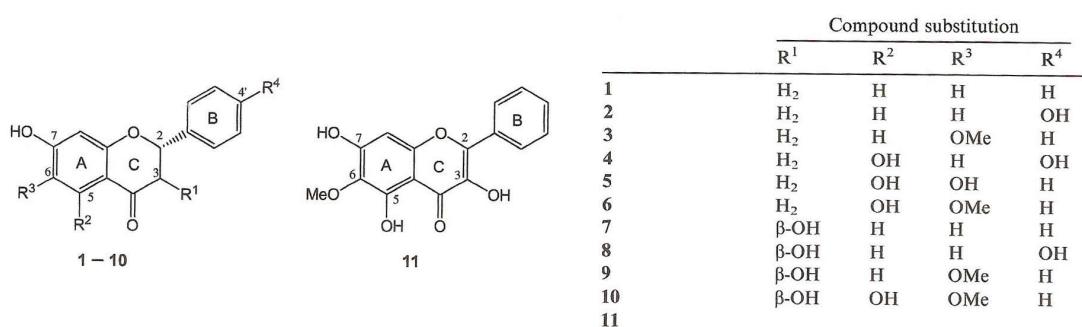
### 3. QUÍMICA

A composição química da própolis é bastante complexa e variada, estando intimamente relacionada com a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas (Park *et al.*, 2002) e com o período de coleta da resina (Rocha *et al.*, 2003). Além disso, a variabilidade genética das abelhas rainhas também influencia na composição química (Park *et al.*, 1998). Deste modo, um número significativo de trabalhos com a química da própolis foi publicado para entender que sua

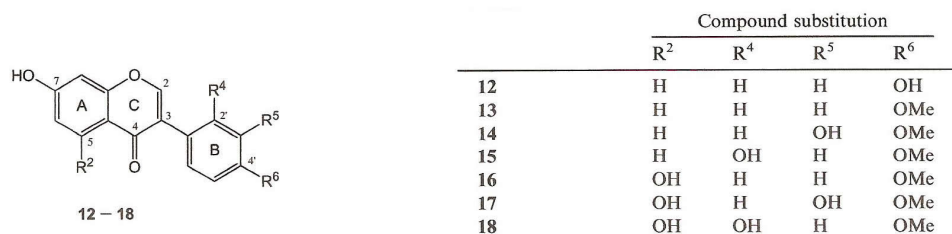
composição varia grandemente e depende da flora local e da região de coleta (Bankova, 2005-a).

Daugšch e seus colaboradores (2006) analisaram comparativamente as amostras de exsudatos das plantas e da própolis vermelha, mostrando que o perfil cromatográfico da própolis é exatamente o mesmo da *D. ecastophyllum*. As figuras abaixo representam algumas das principais *substâncias* identificadas por Li, *et al.*, (2008) em um recente trabalho de caracterização desse novo tipo de própolis (vermelha).

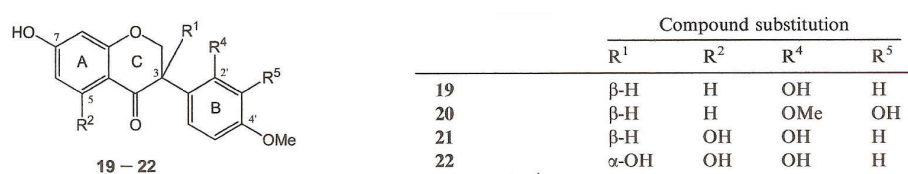
**Figura 3.** Estrutura dos flavonóides 1-10 e flavonol 11.



<b>1</b>	(2S)-7-ydroxyflavanone	<b>7</b>	(2R,3R)-3,7-dihydroxyflavanone
<b>2</b>	(2S)-liquiritigenin	<b>8</b>	Garbanzol
<b>3</b>	(2S)-7-hydroxy-6-methoxyflavanone	<b>9</b>	(2R,3R)-3,7-dihydroxy-6-methoxyflavanone
<b>4</b>	(2S)-naringenin	<b>10</b>	Alnustinol
<b>5</b>	(2S)-dihydrobaicalein	<b>11</b>	Alnusin
<b>6</b>	(2S)-dihydrooroxylin A		

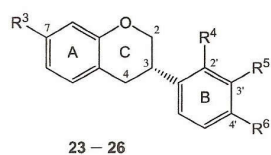
**Figura 4.** Estrutura de Isoflavonas 12-18.

<b>12</b>	Daidzein	<b>16</b>	Biochanin
<b>13</b>	Formononetin	<b>17</b>	Pratensein
<b>14</b>	Calycosin	<b>18</b>	2'-hydroxybiochanin A
<b>15</b>	Xenognosin B		

**Figura 5.** Estrutura de Isoflavanonas 19-22.

<b>19</b>	(3S)-vestitone	<b>21</b>	(3S)-ferreirin
<b>20</b>	(3S)-violanone	<b>22</b>	(3R)-4'-methoxy-2',3,7-trihydroxyisoflavanone

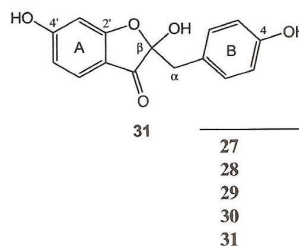
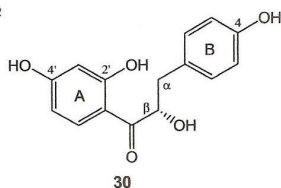
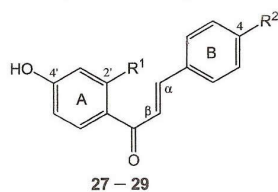
**Figura 6.** Estrutura de Isoflavanas **23-26**.



	Compound substitution			
	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>
<b>23</b>	OH	OH	H	OMe
<b>24</b>	OH	OMe	H	OH
<b>25</b>	OMe	OH	H	OMe
<b>26</b>	OH	OMe	OH	OMe

<b>23</b>	(3S)-vestitol	<b>25</b>	(3S)-7-O-methylvestitol
<b>24</b>	(3S)-isovestitol	<b>26</b>	(3S)-mucronulatol

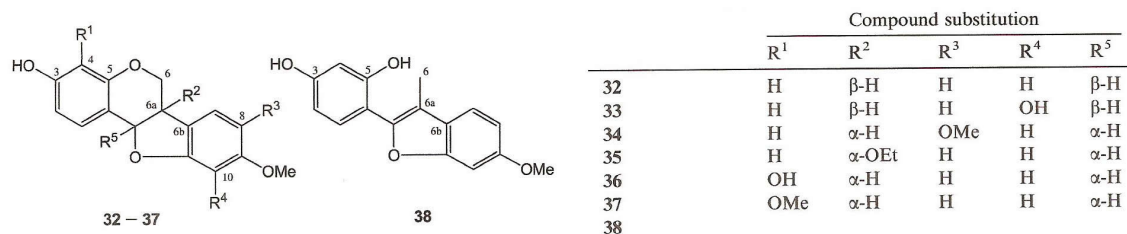
**Figura 7.** Estrutura de chalconas **27-30** e um auronol **31**.



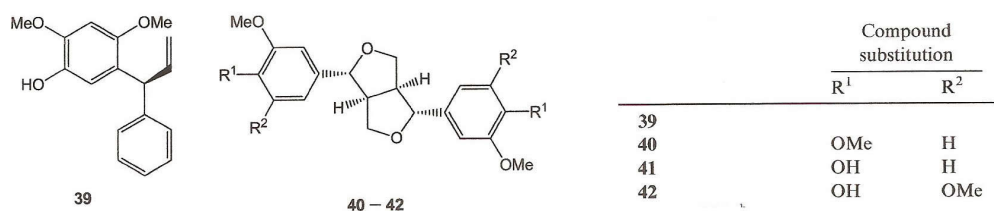
Compound substitution

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
OH	H
OH	OH
OMe	OH

<b>27</b>	2',4'-dihydroxychalcone	<b>30</b>	( $\alpha$ S)- $\alpha$ ,2',4,4'-tetrahydroxydihydrochalcone
<b>28</b>	Isoliquiritigenin	<b>31</b>	2,6-dihydroxy-2-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-3-benzofuranone
<b>29</b>	4,4'-dihydroxy-2'-methoxychalcone		

**Figura 8.** Estrutura de pterocarpanos **32-37** e um 2-arilbenzofurano **38**.

<b>32</b>	(6a <i>S</i> ,11a <i>S</i> )-medicarpin	<b>36</b>	(6a <i>R</i> ,11a <i>R</i> )-3,4-dihydroxy-9-methoxypterocarpan
<b>33</b>	(6a <i>S</i> ,11a <i>S</i> )-3,10-dihydroxy-9-methoxypterocarpan	<b>37</b>	(6a <i>R</i> ,11a <i>R</i> )-4-methoxymedicarpin
<b>34</b>	(6a <i>R</i> ,11a <i>R</i> )-3-hydroxy-8-9-dimethoxypterocarpan	<b>38</b>	2-(2',4'-dihydroxyphenyl)-3-methyl-6-methoxybenzofuran
<b>35</b>	(6a <i>S</i> ,11a <i>S</i> )-6a-ethoxymedicarpin		

**Figura 9.** Estrutura de um neoflavonoide **39** e lignanas **40-42**.

<b>39</b>	(7 <i>S</i> )-dalbergiphenol	<b>41</b>	(+)-pinoresinol
<b>40</b>	(+)-pinoresinol dimethyl ether	<b>42</b>	(+)-syringaresinol

Segundo Park *et al.*, (2002) o melhor indicador da origem botânica da própolis é a análise da sua composição química comparada com a provável fonte vegetal. A determinação da origem geográfica da própolis e, principalmente, a origem vegetal, se faz importante no controle de qualidade e até mesmo na padronização das amostras de própolis para uma efetiva aplicação terapêutica.

#### **4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

A atividade antibacteriana, assim como, a antifúngica da própolis têm sido as propriedades biológicas mais intensamente estudadas (Kujungiev *et al.*, 1999). Estas propriedades são atribuídas principalmente à flavonona pinocembrina, ao flavonol galangina e ao éster feniletil do ácido caféico, com um mecanismo de ação baseado provavelmente na inibição do RNA-polimerase bacteriano (Uzel *et al.*, 2005). Outros componentes como os flavonóides, o ácido caféico, ácido benzóico, ácido cinâmico, provavelmente agem na membrana ou parede celular do microorganismo, causando danos funcionais e estruturais (Scazzocchio *et al.*, 2005).

A própolis possui atividade antibacteriana maior contra bactérias Gram-positivas e limitada contra Gram-negativas (Lu *et al.*, 2005; Marcucci *et al.*, 2001; Rezende *et al.*, 2006). Até o momento, não se tem dados que respondam o porquê desta menor atividade dos extratos de própolis contra bactérias Gram-negativas. Sabe-se que estas bactérias possuem uma parede celular quimicamente mais complexa e um teor lipídico maior, o que poderia explicar essa maior resistência (Vargas *et al.*, 2004).

A própolis também tem demonstrado excelentes atividades fungistática e fungicida, em testes *in vitro* contra leveduras identificadas como causadores de onicomicoses (Oliveira *et al.*, 2006).

Leveduras do gênero *Candida* constituem um grupo de fungo presente na microbiota da pele e mucosa do homem desde o nascimento. Seu advento é decorrente da presença na cavidade vaginal ou no ambiente de centro cirúrgico, sendo adquirida através da passagem do feto via canal vaginal ou do ato de cesariana (Birman, 1998). Estas leveduras são detectadas momento após o nascimento, na cavidade bucal do recém-nascido e duas a três semanas em todo trato gastrointestinal da criança (Caramalac, 1995; Donnez & Soyes, 1987; Lacaz *et al.*, 1991; Marcantoni, 1999; Odds, 1993; Pinto, 2003; Ribeiro, 2002). A convivência levedura-hospedeiro ocorre durante toda a vida, sendo detectada nas sucessivas microbiotas humanas até o estabelecimento da definitiva (Pinto, 2003).

A princípio, a constatação de cepas de *Candida* em qualquer microbiota do homem não induz nenhum transtorno que possa favorecer patologia, embora as leveduras de *Candida* spp. talvez sejam o fungo mais oportunista descrito. Todavia, quaisquer alterações orgânicas, independente da natureza, comumente favorecem a manifestação infecciosa deste fungo leveduriforme, principalmente quando as condições tóxicas, quanto aos aspectos físico-químico e biológico da pele ou mucosa envolvida, propiciam a sua proliferação exacerbada com aguçamento de seus fatores de virulência, havendo ainda alguma irregularidade funcional do sistema imunológico do homem (Carvalho *et al.*, 2003; Marcantoni, 1999).

Candidíase orofaríngea é a infecção fúngica mais comum entre os pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), muitas vezes é detectada em episódios recorrentes, principalmente quando a contagem de linfócitos CD4 for baixa (Campisi, *et al.*, 2002; Fidel Jr, 2002). Com a utilização dos novos anti-retrovirais na terapia HAART (*highly active antiretroviral therapy*) passou a observar-se uma redução na ocorrência de infecções oportunistas, porém para os pacientes de diagnóstico tardio ou aqueles que não respondem adequadamente à terapêutica anti-retroviral, a candidíase orofaríngea ainda é muito freqüente (Eyeson, *et al.*, 2002; Greenspan, *et al.*, 2004; Telles, *et al.*, 2002).

WINGETER, *et al.*, (2007) verificaram em estudo realizado com pacientes portadores de HIV de ambos os sexos, que 58% destes apresentavam culturas positivas para *Candida* spp., com idade variando de 19 a 69 anos, onde a *Candida albicans* foi a espécie isolada na maioria (93%) e os outros 7% correspondiam a outras espécies de leveduras *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*.

Responsável por mais de 85% das infecções fúngicas, a *Candida albicans* é tipicamente tratada com antimicóticos do grupo azol, que muitas vezes já estão associados a fenômenos de resistência. Devido suas propriedades farmacológicas, estudos com a própolis mostraram eficácia no combate a *Candida* sp. presente em infecções vaginais utilizando duchas vaginais contendo extratos de própolis (Imhof *et al.*, 2005).

A relevância das infecções por *Candida* spp. em ambiente hospitalar passou a ganhar importância a partir da década de 1980, interligada ao avanço da tecnologia

científica médica e do melhor conhecimento dos mecanismos desencadeadores de doenças, propiciando uma sobrevivência maior do homem. Este fato fez com que as intervenções de procedimentos clínico-laboratoriais expusessem os pacientes a uma seletividade de microrganismos mais resistentes, favorecidos pelo uso indiscriminado ao longo do tempo dos fármacos disponíveis no mercado. Deste modo, os relatos de cepas de *Candida* spp. envolvidas em enfermidades humanas na condição de agente principal e/ou secundário tornaram-se mais freqüentes, fazendo deste microrganismo um dos mais relevantes e intimamente associado às infecções nosocomiais (Beck-Sagué & Jarvis, 1993; Colombo & Guimarães, 2003).

Estudos realizados em diferentes países têm mostrado diferença na epidemiologia das infecções invasivas por *Candida* spp. No período de agosto de 2002 a agosto de 2003, foi conduzido estudo na Santa Casa Complexo Hospitalar em Porto Alegre, Brasil, para determinar a distribuição das espécies de *Candida*. A maioria dos episódios (51,6%) ocorreu por espécies outras que *C. albicans*, incluindo *C. parapsilosis* (25,8%), *C. tropicalis* (13,3%), *C. glabrata* (3,3%), *C. krusei* (1,7%) e outras espécies (7,5%) (Antunes, 1996).

## **5. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

Outra propriedade da própolis bastante citada na literatura é sua atividade anti-inflamatória. Os processos inflamatórios estão associados a diversas doenças e suas causas são variadas. Freqüentemente a própolis é recomendada por fitoterapeutas devido suas propriedades anti-inflamatórias que foram descritas

principalmente contra doenças do sistema musculo-articular e outros tipos de inflamações, infecções, reumatismos e torções (Marcucci, 1995). Já foi utilizada na dermatologia, na cicatrização de ferimentos, regeneração de tecidos, tratamento de queimaduras, neurodermites, eczemas, dermatites de contato, úlceras externas, psoríase, lepra, herpes simples, zoster e genitalis, pruridos e dermatófitos (Ghisalberti, 1979; Marccuci, 1995).

A atividade anti-inflamatória observada na própolis parece ser devida à presença de flavonóides, especialmente, galangina. Este flavonóide apresenta atividade inibitória para a ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase. Tem sido relatado também que o ácido fenil éster caféico (CAPE), possui atividade anti-inflamatória por inibir a liberação de ácido araquidônico da membrana celular, suprimindo as atividades das enzimas COX-1 e COX-2 (Borrelli *et al.*, 2002).

Apesar de o mecanismo exato de ação e os compostos principais responsáveis ainda não terem sido estabelecidos, as pesquisas têm se focado no metabolismo do ácido araquidônico, já que as prostaglandinas têm papel fundamental no processo inflamatório (Rossi *et al.*, 2002). Os metabólitos do ácido araquidônico exercem uma variedade de atividades biológicas. Vários estudos têm comprovado que os metabólitos da ciclooxigenase modulam a proliferação celular, crescimento de tumores e respostas imunes, enquanto que os metabólitos da lipooxigenase podem influenciar em várias respostas biológicas incluindo quimiotaxia, secreção de hormônios, transporte de íons, estímulo de adesão de células tumorais, desenvolvimento de tumores e regulação do potencial metastático de células tumorais.

Deste modo vários estudos estabelecem os metabólitos do ácido araquidônico como moduladores de patogênese de várias doenças imunológicas e inflamatórias (Rao *et al.*, 1995). Sud'ina *et al.* (1993) demonstraram que o CAPE, um composto ativo encontrado nos extratos de própolis, contribui para a atividade anti-inflamatória da própolis *in vivo* por inibir a lipoxigenase e por agir como um antioxidante. Rossi *et al.* (2002) relataram que os extratos etanólicos de própolis inibem também a atividade da ciclooxigenase em pulmão de ratos de forma dose-dependente. Além disso, entre os compostos isolados testados apenas o CAPE e a galangina tiveram efeito, sendo o primeiro mais eficaz que o segundo.

Naito *et al.* (2007) demonstraram, em estudo recente, que a aplicação tópica de extrato de própolis é efetiva na inibição do edema de pata em ratos induzido por carragenina e que o efeito inibitório na quimiotaxia de PMNs pode também contribuir para o efeito antiinflamatório.

Em trabalhos com camundongos e coelhos tem sido constatada uma atividade anti-inflamatória de soluções hidroalcoólicas da própolis, tanto em aplicações tópicas, bem como através de injeções ou mesmo via oral. Detalhes desses estudos podem ser encontrados em Ivanovska *et al.* (1995), Park *et al.* (1996), Ledon *et al.* (1997) e Menezes *et al.* (1999). Alguns pesquisadores isolaram determinados compostos da própolis que apresentam conhecida atividade anti-inflamatória. Mirzoeva & Calder (1996) atribuíram esta propriedade à presença na própolis de compostos tais como o ácido cafeico, a quercetina, a narigenina e o éster fenílico do ácido cafeico (CAPE). Esta atividade anti-inflamatória seria resultante da supressão da síntese de prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos.

## ***RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA***

### III. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Apesar dos evidentes avanços tecnológicos da química sintética moderna e dos programas cada vez mais sofisticados na área de biotecnologia, onde são testadas milhares de moléculas por hora, no que diz respeito às suas interações com possíveis receptores no nosso organismo, grau de afinidade e seletividade cada vez mais alvo direcionadas, o homem busca hoje na natureza a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos de origem vegetal, animal e marinhos. Dentro deste contexto, a própolis tem sido bastante pesquisada, sendo a própolis verde muito mais conhecida e tem como fonte o alecrim, tanto que o próprio mercado especifica a própolis de Minas Gerais de cor verde, como sendo de alecrim. Já a própolis vermelha, ainda pouco estudada, é encontrada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, sobretudo nas áreas litorâneas.

Considerando o extenso uso da própolis na medicina popular, principalmente por sua atividade anti-inflamatória e antimicrobiana e a carência de estudos sobre esses efeitos da própolis vermelha, é que o presente estudo propõe-se a investigar a ação anti-inflamatória dos extratos hidroalcoólicos da própolis vermelha em comparação com a própolis verde no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos e edema de pata induzido por carragenina em ratos. A atividade antifúngica com cepas de *Candida albicans*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, *Candida kruzei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii*, também será avaliada.

## ***OBJETIVOS***

## IV. OBJETIVOS

### a. Gerais

- Estudar a atividade anti-inflamatória de extratos de própolis (verde e vermelha).
- Avaliar a atividade antifúngica da própolis (verde e vermelha) em cepas de *Candida*.

### b. Específicos

- i. Determinação da atividade anti-inflamatória dos extratos de própolis verde e vermelha utilizando o modelo de edema de orelha induzido por óleo de *Cróton* em camundongos;
- ii. Determinação da atividade anti-inflamatória dos extratos de própolis verde e vermelha utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos;
- iii. Determinação da suscetibilidade antifúngica dos extratos utilizando cepas de *Candida*;
- iv. Análise comparativa das atividades anti-inflamatória e antifúngica da própolis vermelha e verde.

## ***PROTOCOLLO EXPERIMENTAL***

## V. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

### 1. DESENHO DO ESTUDO

O presente trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ensino Superior de Florianópolis – FAESF, em parceria interinstitucional com a Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, que gentilmente nos forneceu a própolis verde e vermelha. Após a preparação dos extratos, o estudo seguiu duas linhas de trabalho: uma com animais, que investigou a atividade anti-inflamatória tópica através do modelo de edema de orelha em camundongos e sistêmica através do modelo de edema de pata em ratos com a aplicação i.p (intra-peritoneal) dos extratos e outra linha de pesquisa com microorganismos para avaliação da atividade antifúngica com diferentes espécies de *Candida*.

A avaliação dos resultados foi feita comparativamente entre os dois tipos de própolis: verde e vermelha.

### 2. TAMANHO DA AMOSTRA

O estudo com animais (N = 6 por grupo) foi realizado com camundongos da espécie *Mus musculus* e ratos da espécie *Rattus norvegicus*, adultos de ambos os sexos com peso de 25 a 30g e 150 a 200g respectivamente, provenientes do biotério da Faculdade de Ensino Superior de Florianópolis. Os animais foram previamente mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e iluminação (ciclo

claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água. Os testes foram feitos em triplicata.

Os experimentos para determinação da atividade antifúngica foram feitos com cepas de isolados clínicos do laboratório de patologia da Universidade Federal do Piauí-UFPI, para teste de inibição em placa contendo meio de cultura sólido nutritivos para fungos. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética.

### **3. COLETA DA PRÓPOLIS**

A amostra de própolis vermelha foi coletada numa área de restinga próximo à cidade de Itapissuma-PE (no apiário da empresa Mel Brasil Ltda, distrito de Atapuz , estado de Pernambuco, S: 7º 33' 38" W: 35º 0'9"), em outubro de 2006. Esta amostra foi em seguida acondicionada em recipiente plástico opaco, hermeticamente fechado, e conservada sob refrigeração entre (-10 e -5°C). A amostra de própolis verde foi obtida da empresa Apis & Indigenas de Belo Horizonte-MG, em janeiro de 2007 e conservada nas mesmas condições citadas acima para a própolis vermelha.

### **4. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA E VERDE**

Foram preparados extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha e verde (EEP) a 20% (m/v), por maceração durante 48 h, em solução hidroalcoólica a 80%.

Após esse tempo, os extratos foram filtrados e acondicionados em frascos de vidro âmbar segundo metodologia descrita anteriormente por Park *et al* 1998.

Para a realização do modelo de edema de orelha em camundongos, após a obtenção dos extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha e verde, os mesmos foram liofilizados em Rotaevaporador para obtenção dos extratos secos dos dois tipos de própolis. Os extratos secos foram então ressuspensos em álcool etílico P.A para facilitar a aplicação tópica na orelha dos animais, visando maior rapidez na evaporação do solvente, minimizando assim as perdas.

## **5. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

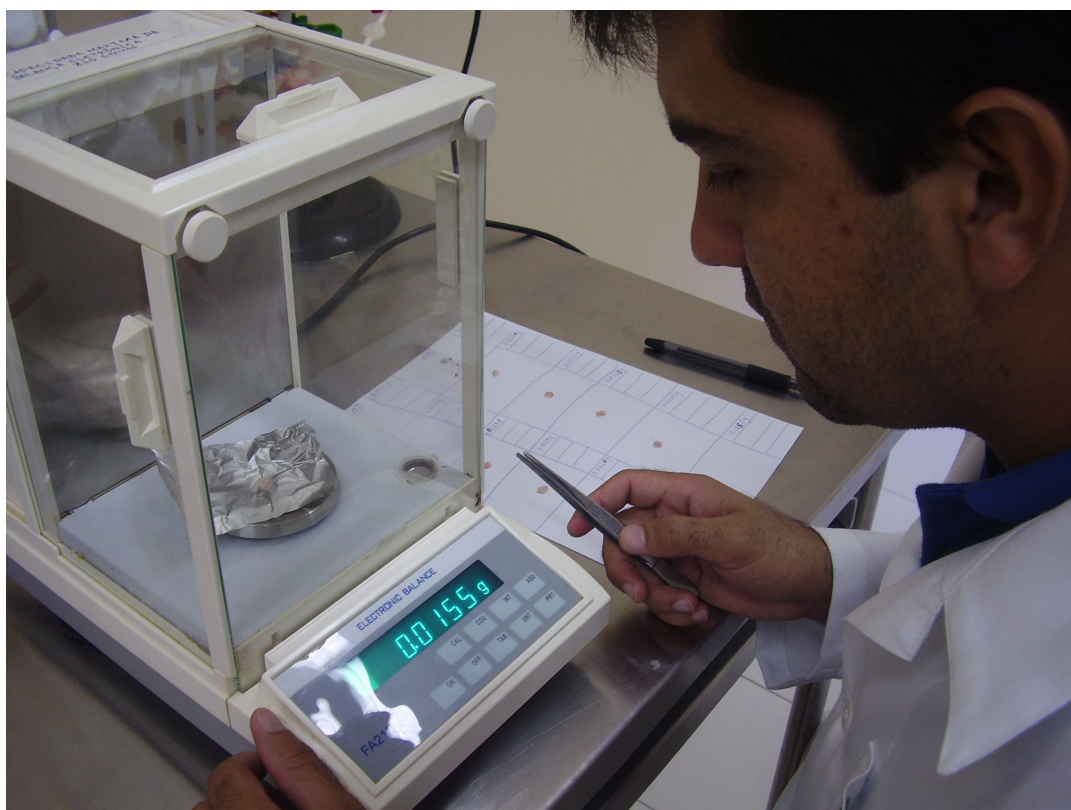
### **5.1 Edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos**

Os camundongos foram divididos em grupos (N=6) e aplicados topicamente (volume de 20 $\mu$ L) em iguais concentrações na orelha com o extrato etanólico de própolis verde (grupo I), extrato etanólico de própolis vermelha (grupo II), ou tratado com Dexametasona em álcool etílico P.A, 2mg/orelha, como controle positivo (grupo IV).

Para as observações dos efeitos antiinflamatórios, os animais foram separados em dois grupos: um experimental e outro controle positivo. Os extratos foram testados no edema agudo após aplicação de 20 $\mu$ L na orelha direita dos camundongos dos subgrupos experimentais I (Própolis verde) e II (Própolis vermelha), ambos a 100mg/ml do resíduo seco em álcool etílico P.A. O subgrupo III foram tratados com o veículo, 20 $\mu$ L de álcool etílico P.A na orelha direita, e o subgrupo IV foram tratados com Dexametasona 20 $\mu$ L (2mg) na orelha direita. Todos

os grupos têm como controle a orelha contralateral administrado o mesmo volume de solução salina (20 $\mu$ L). Após 1 hora da aplicação dos extratos, veículo e droga controle, os animais receberam aplicação tópica de 20 $\mu$ L de óleo de cróton (5% em acetona) na orelha direita, tendo como controle a orelha contralateral administrada o mesmo volume de acetona. Após 4 horas os animais foram sacrificados e removidos discos de 5 mm de diâmetro das orelhas e pesados (Schiantarelli, *et al.* 1982, citado por Braggio, *et al.*,2002).

A diferença entre o peso das orelhas foi tomada como o edema induzido por óleo de cróton.



**Figura 10-** Pesagem dos discos (5mm) das orelhas de camundongos em balança analítica.

## 5.2 Edema de pata induzido por carragenina em ratos

Foram utilizados ratos machos pesando de 150-200 g, reunidos em grupos de seis animais. Estes animais tiveram suas patas traseiras direitas marcadas na borda póstero-proximal da proeminência do calcanhar e seus volumes (ml) determinados através de um pletismógrafo (Plethysmometer-Ugo Basile). Os animais receberam uma injeção intraplantar (100 µL) de carragenina 1 % (tempo 0). Após 1, 2, 3, 4 e 5 horas da injeção do agente edemaciante, o volume da pata foi novamente medido (VF) e o volume de edema (VE) foi determinado pela diferença em relação à medida inicial (VI).

$$VE = VF - VI$$

Trinta minutos (tratamento via i.p.) antes da injeção do agente edemaciante, os animais foram pré-tratados com o extrato hidroalcoólico de Própolis verde e vermelha nas doses de 25mg/kg e 50mg/kg. Os animais controle foram administrados com um volume equivalente de salina 0,9% e Dexametasona 1mg/kg (controle positivo).



**Figura 11.** Injeção intraplantar de carragenina na pata direita do rato.

## 6. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Foi realizado teste de inibição em placa contendo meio sólido Sabouraud, para fungos e leveduras. Para isto discos de papel de filtro estéreis pesando  $30 \text{ mg} \pm 4 \text{ mg/cm}^2$  e 6mm de diâmetro foram embebidos em extratos hidroalcoólicos de própolis verde e vermelha, e após secagem em estufa a  $40^\circ\text{C}$  foram dispostos na placa semeada com uma das espécies de *Candida* em estudo. As placas foram incubadas em estufa de câmara úmida a  $20\text{-}25^\circ\text{C}$  por 48 horas após a semeadura. A leitura é realizada, avaliando-se o tamanho do halo de inibição do crescimento microbiano em milímetros. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética.

## **7. ASPECTOS ÉTICOS**

O projeto de pesquisa com protocolo experimental detalhado foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Piauí, CEP/FACIME/UESPI credenciado pelo CONEP/MS e aprovado com o nº de protocolo 014/2008/EA.

Os investigadores foram responsáveis por conduzir o estudo em estrita observação ao protocolo aprovado.

## ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

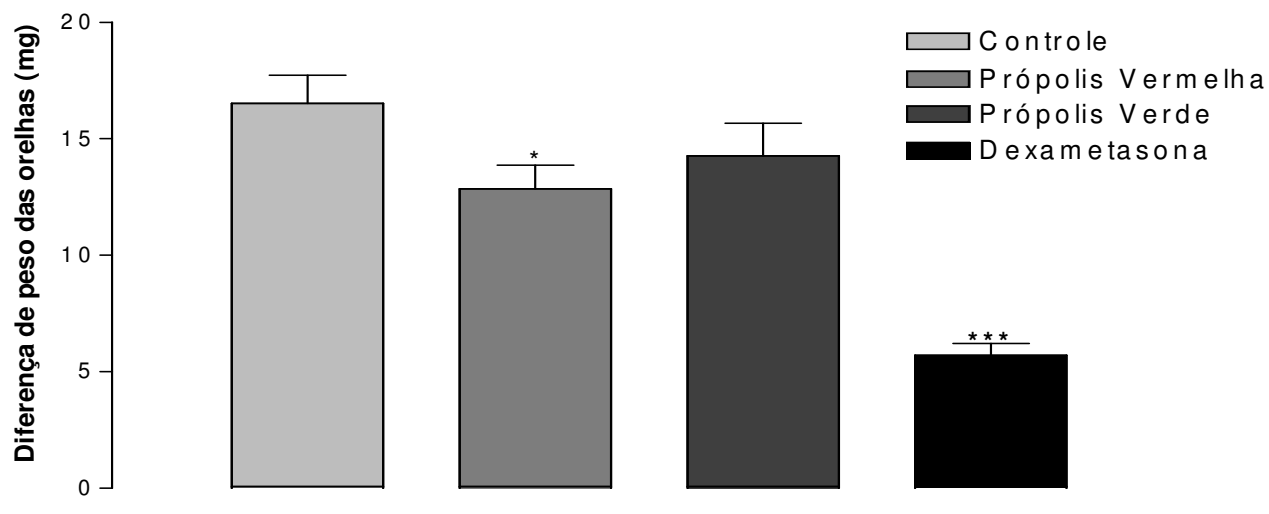
## VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

#### 1.1 Edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos

Os resultados observados no teste do edema de orelha sugerem que, pelo menos nas concentrações utilizadas, a própolis vermelha apresenta atividade anti-inflamatória. A própolis verde, apesar de causar uma diminuição no edema, esta não foi estatisticamente significativa. (**Figura 12**). A princípio estes resultados observados com a própolis verde parecem ser contraditórios com trabalhos anteriores que mostraram a existência de atividade anti-inflamatória para própolis verde (Reis, 2000).

Entretanto, os resultados negativos da própolis verde observados no teste do edema de orelha no presente trabalho, podem ter sido influenciados por outros fatores que podem interferir neste tipo de teste. Às vezes, o animal ao se coçar ou ao fazer contato físico com os outros retira parte do extrato da orelha; por outro lado, também, a pelagem da orelha pode interferir na absorção. Dessa forma, não se pode descartar a hipótese de que essas variáveis possam ter contribuído para os efeitos não estatisticamente significativos observados na atividade anti-inflamatória investigada da própolis verde.



**Figura 12:** Atividade antiedematogênica de extratos de própolis vermelha e verde em edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. \*  $P < 0,05$  \*\*\* $P < 0,001$  (nível de significância em relação ao controle) *one-way ANOVA* e teste de Tuckey *post hoc*.

## 1.2 Edema de pata induzido por carragenina em ratos

O modelo de edema de pata é agudo e progressivo, proporcional à intensidade da resposta inflamatória, o seu desenvolvimento depende do agente flogístico utilizado. O edema induzido por carragenina é um modelo bifásico, com vários mediadores atuando em seqüência para produzir a resposta inflamatória. Na fase inicial (0-1 h) ocorre liberação de histamina, serotonina e bradicinina. A fase posterior (1-6 h) está correlacionada com elevada produção de prostaglandinas, ativação da COX-2 e, mais recentemente liberação de NO, na resposta inflamatória (Silva, 2005).

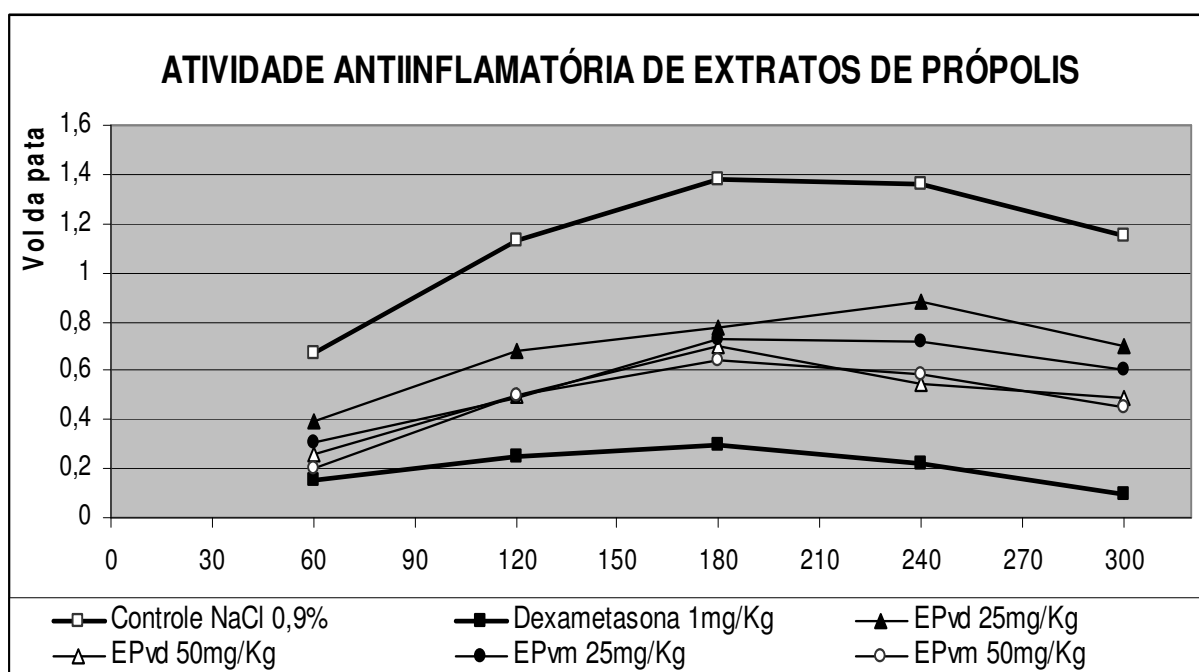
A **Tabela 1** e a **Figura 13** apresentam a evolução do edema de pata induzido por carragenina e a ação dos extratos testados. Pode ser observado que há uma ação tanto na inibição da produção de histamina, serotonina e bradicinina (fase inicial) quanto de prostaglandinas (fase posterior).

Os resultados apresentados na **Tabela 1** e na **Figura 13** mostram a atividade anti-inflamatória sistêmica tanto da própolis verde como da própolis vermelha numa relação dose-dependente. Na **Tabela 1** pode ser observado que, 4 horas após a injeção intraplantar de carragenina houve uma redução no edema da pata de ratos de 1,36 para 0,88 na dose 25mg/kg e de 1,36 para 0,55 na dose de 50mg/kg com a própolis verde e de 1,36 para 0,72 e 0,58 com o extrato de própolis vermelha nas doses de 25mg/kg e 50mg/kg respectivamente.

**Tabela 1:** Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis verde e vermelha no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Os valores representam a diferença de volume, (em mL), entre as patas injetadas com carragenina e aquelas injetadas com salina.

Tempo (Min.)	Controle (NaCl 0,9%)	Dexametasona (1mg/Kg)	EPvd (25mg/Kg)	EPvd (50mg/Kg)	EPvm (25mg/Kg)	EPvm (50mg/Kg)
0						
60	0,67±0,03	0,15±0,03	0,39±0,04	0,26±0,05	0,31±0,04	0,23±0,06
120	1,13±0,06	0,25±0,05	0,52±0,03	0,5±0,08	0,49±0,06	0,6±0,09
180	1,38±0,09	0,3±0,06	0,78±0,07	0,77±0,04	0,75±0,05	0,74±0,08
240	1,36±0,12	0,22±0,07	0,88±0,03	0,55±0,08	0,72±0,04	0,58±0,05
300	1,15±0,10	0,1±0,06	0,7±0,09	0,49±0,11	0,6±0,11	0,49±0,03

Valores expressos como Média ± E.P.M. de 6 animais.



**Figura 13:** Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis verde (EPvd) e vermelha (EPvm) no edema de pata induzido por carragenina.

Resultados similares a estes, também foram observados por Borrelli *et al.* (2002), os quais mostraram que os extratos etanólicos de própolis com CAPE e o CAPE isolado inibem de forma dose-dependente o edema de patas em ratos, o volume de exsudato, a migração dos leucócitos e a artrite induzida por carragenina.

Como descrito acima, a participação do CAPE isolado da própolis, na inibição da síntese de prostaglandinas foi também constatada por Borrelli *et al.* (2002). Além destes compostos, Kro *et al.* (1996) caracterizaram na própolis mais outros 15 compostos que, conhecidamente apresentam esta atividade anti-inflamatória, entre eles o ácido salicílico, a apigenina, o ácido felúrico e a galangina.

A inibição na geração de óxido nítrico por macrófagos é também apontada como um dos fatores responsáveis pela atividade anti-inflamatória da própolis (Nagaoka et al., 2003). Entretanto, outros estudos indicam um aumento na produção de  $H_2O_2$  e NO por estas células (Orsi *et al.*, 2000). Um incremento na mobilidade e espraiamento destas células também foi constatado por Tatefugi *et al.* (2003), da mesma forma que Menezes (2005), em estudos utilizando camundongos e coelhos aplicando soluções hidroalcoólicas de própolis na forma tópica, intraperitoneal ou oral.

A partir dos experimentos realizados no presente trabalho, pode-se, então ressaltar que a atividade anti-inflamatória da própolis é observada, tanto a nível tópico/local (no edema de orelha), quanto a nível sistêmico (edema de pata).

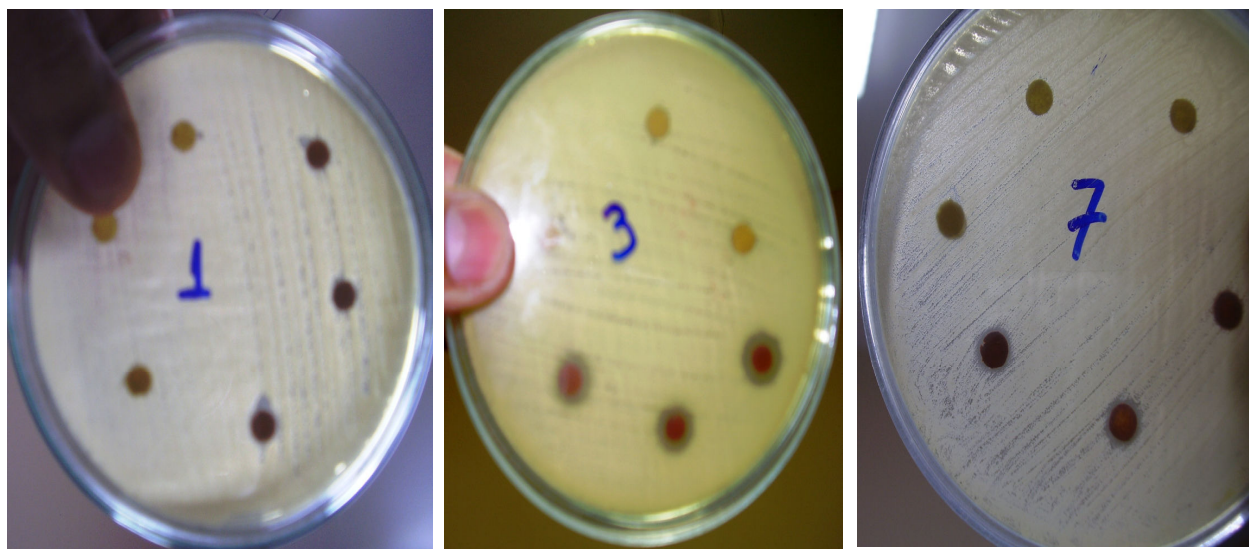
## 2. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os resultados no estudo da atividade antifúngica mostram uma inibição discreta para a *Candida albicans* e *Candida guilliermondii* (**Figura 14, placa 1 e placa 7**), sendo esta melhor observada para a própolis vermelha (discos da direita), quando comparada à verde. Esse achado contraria o estudo realizado por Ota *et al.* (2001), no qual encontrou-se, para extratos alcoólicos de própolis verde, uma melhor efetividade para *C. albicans* sendo que a *C. guilliermondii* apresentou uma maior resistência a ação da própolis verde. Essa espécie (*C. albicans*) é responsável pela maioria das infecções causadas por *Candida*, sendo de particular importância clínica.

Ainda na **Figura 14 (placa 3)** pode-se observar o melhor resultado de inibição conseguido neste ensaio com halo de inibição dos discos contendo própolis vermelha maior que os discos que contêm própolis verde. Trata-se da *Candida dubliniensis*, espécie anteriormente descrita (1995) e primariamente relacionada com candidíase oral em pacientes imunossuprimidos portadores do HIV, sintomáticos ou não.

Na maioria das placas observou-se, pelo menos uma discreta inibição, devendo-se considerar a concentração do extrato que pode ser incorporada ao disco de papel (menos de 5mg). Esses resultados preliminares permitem sugerir uma atividade mais efetiva para o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha do que para o de própolis verde. Esse fato contraria a literatura e outros ensaios anteriores

(Fernandes, 2007), o que pode indicar que são necessários estudos adicionais com uma definição mais precisa das concentrações dos extratos investigados.



**Figura 14.** Registro dos halos de inibição com discos contendo extratos de própolis verde (à esquerda) e vermelha (à direita), **Placa 1:** *C. albicans*, **Placa 3:** *C. dubliniensis* e **Placa 7:** *C. guilliermondii*.

**Tabela 2:** Medidas dos halos de inibição com discos contendo extratos de própolis verde e vermelha em placas de Agar Sabouraud após semeio de diferentes espécies de *Candida*.

CEPAS DE <i>Candida</i>	Própolis verde	Própolis vermelha
<i>Candida albicans</i>	6,5 mm	8,2 mm
<i>Candida parapsilosis</i>	*	*
<i>Candida tropicalis</i>	*	6,5 mm
<i>Candida guilliermondii</i>	6,2 mm	7,0 mm
<i>Candida kruzei</i>	*	*
<i>Candida lusitanae</i>	6,0 mm	6,2 mm
<i>Candida dubliniensis</i>	7,0 mm	10,0 mm

\* Não foi possível observar inibição

Vários estudos a respeito da susceptibilidade de espécies de *Candida* a diferentes antifúngicos têm sido desenvolvidos. Neste aspecto, Ito *et al.* (2004) mostraram a susceptibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas de pacientes indicando a tendência ao aparecimento de resistência. Corroborando com esse estudo Batista *et al.* (1999), chama a atenção para os efeitos colaterais e adversos das drogas antifúngicas utilizadas, sobretudo para a Anfotericina B, tida como droga padrão em efetividade contra esse gênero de fungo. Esse fato impulsiona para a necessidade de se encontrar novas alternativas terapêuticas.

Holderna e Kedzia (1987), estudaram a ação combinada de antimicóticos e própolis em *C. albicans* e encontraram um aumento da inibição mostrando a existência de um efeito sinérgico. Isto abre expectativas para o desenvolvimento de experimentos similares utilizando-se a própolis vermelha.

A partir dos resultados observados pode-se especular que o possível mecanismo de ação da própolis seja a inibição da divisão celular. Talvez a própolis possa operar por inibição da replicação do DNA e, indiretamente, na divisão celular, embora não se possa afirmar que seja semelhante ao modo de ação dos antibióticos clássicos (Ota, 2001).

A maioria dos estudos não detecta a inibição no crescimento de *Candida albicans* em cultura, embora poucos estudos como o de Sosa *et al.* (1997) e Hegazi *et al.* (2000) tenham constatado a inibição desta levedura pela própolis. Realizou-se testes de sensibilidade em 80 cepas de *Candidas* (20 *C. albicans*, 20 *C. tropicalis*, 20 *C. kruzei* e 15 *C. guilliermondii*) mostrando clara atividade antifúngica, sendo a *C. albicans* a mais sensível e a *C. guilliermondii* a menos sensível (Ota, 2001).

Embora a atividade ora apresentada no presente trabalho tenha se mostrado discreta, é importante ressaltar que associações da própolis com antimicrobianos convencionais ou mesmo contra algumas cepas resistentes têm mostrado bons resultados inibitórios. Cepas resistentes a benzilpenicilina, tetraciclina e eritromicina foram sensíveis à própolis. Ou seja, a própolis possui efeito sinérgico quando combinado com um dos três antibióticos para essas cepas resistentes (Shub, 1981).

## ***CONCLUSÃO***

## VII. CONCLUSÃO

Conclui-se que durante todo o estudo, a própolis vermelha apresentou uma melhor atividade anti-inflamatória tópica e sistêmica, e também melhor atividade antifúngica que a própolis verde. É importante ressaltar que os estudos aqui realizados indicam que a própolis, tanto a vermelha, quanto a verde, apresenta potencial para as atividades farmacológicas ora apresentadas. Todavia, ainda serão necessários estudos adicionais, envolvendo ensaios pré-clínicos e clínicos, capazes de determinar as doses corretas a serem administradas para que seja plenamente esclarecido o real efeito da própolis nesses modelos utilizados.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, E. C. de Menezes, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *J. Venom. Anim. Toxins*. 2002, vol. 8, no. 2, pp. 191-212.
- Antunes, R.M.P.; Catao, R.M.R.; Cevallos, B.S.O. Antimicrobial activity of propolis. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.77, p.15-18, 1996.
- Bankova, V.; Boudourova-Krasteva, G.; Popov, S.; Sforcin, J.M.; Funari, S.R.C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis, *Apidologie*, v. 29, p. 361-367. 1998.
- Bankova V. 2005 (a). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol* 100: 114-117.
- Batista, J.M.; Birman, E.G.; Cury, A.E. Susceptibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. *Rev. Odontol Univ. São Paulo*, v.13, n.4, p.343-348, out./dez.1999.
- Beck-Sagué, M. & Jarvis S. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1999. *J. Infect. Dis.*, 167: 1247-1251, 1993.
- Bianchini, L.; Bedendo, I. P. 1998. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Sci agric Piracicaba* 55: 149-152.
- Birman E.G. Um breve retrospecto sobre *Candida* e candidoses em relação à boca. *Rev. Vida* 8 (42): 56-59, 1998.
- Borrelli, F.; Maffia, P.; Pinto, L.; Ianaro, A.; Russo, A.; Capasso, F.; Ialenti, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, v.73, p. S53-S63, 2002.
- Braggio, M. M.; Lima, M. E. L., Veasey; E. A. & Haraguchi, M. Atividades Farmacológicas das Folhas da *Sesbania virgata* (CAV.) PERS. *Arq. Inst. Biol.* v.69, n.4, p.49-53, 2002.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Instrução Normativa nº3, ANEXO VI, 2001. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 19 de janeiro de 2001.
- Burdock G A 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 36: 347-363.
- Cao, Y.H.; Wang, Y.; Yuan, Q. 2004. Analysis of flavonoids and phenolic acid in propolis by capillary electrophoresis. *Chromatographia* 59: 135-140.
- Campisi G, Pizzo G, Milici ME, Mancuso S, Margiotta V. Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus-infected subjects. *Oral Medicine* 93 :281-286, 2002.

Capasso, F.; Castaldo, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002.73:S1-6

Caramalac, D.A. Ocorrência de leveduras em parturientes e recém-nascidos: tipagem das amostras de *C. albicans*. S. Paulo, 1995. 123f. ICB-USP. S. Paulo, 1995.

Carvalho, L.P. et al. Avaliação da resposta imune celular em pacientes com candidíase recorrente. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36(5): 571-576, set-out, 2003.

Colombo, A.L.; Guimarães. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36(5): 599-607, set-out, 2003.

Da Silva, J.F.M.; Souza, M.C.; Matta, S.R.; Andrade, M.R.; Vidal, F.V.N. 2006. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem* 99: 431-435.

Daugusch, A.; Moraes, C.S; Fort, P.; Pacheco E.; Lima, I.B; Abreu, J.A.; Park, Y.K. Própolis Vermelha e sua origem botânica, *Mensagem Doce*, 2006, n° 89, disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/msg89.htm>, acessada em fevereiro de 2008.

Donnelly, D.M.X.; Keenan, P.J.; Prendergast, J.P. 1973. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. *Phytochemistry* 12, 1157-1161.

Donnez, M.E.; Soyes, U. The comparison of vaginal yeast flora of mother and oral mucosa of newborn. *Hacettepe Med. J.*, 20: 86-93, 1987.

Eyson JD, Tenant-Flowers M, Cooper DJ, Johnson NW, Warnakulasuriya KAS. Oral manifestations of an HIV positive cohort in the era of highly active anti-retroviral therapy (HAART) in South London. *Journal Oral Pathology Medicine* 31:169-174, 2002.

Fernandes, G.F.; Costa, C.B. Atividade antimicrobiana *In vitro* de extrato alcoólico de própolis verde contra espécies de *Cândida sp*. *Infarma*, 19, 5/8, 2007.

Fidel Jr PL. Immunity to *Candida*. *Oral Diseases* 8:69-75, 2002.

Ghisalberti, E.L. Propolis: a review. *Bee World*, 60, 59-84, 1979.

Greenspan D, Gange SJ, Phelan JA, Navazesh M, Alves MEAF, MacPhail LA, Mulligan R, Greenspan JS. Incidence of oral lesions in HIV-1-infected women: Reduction a with HAART. *Journal Dental Research* 83:145-150, 2004.

Hegazi, A.G.; Abd, E.I.; Hady, F.K.; Allah, F.A. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, v.55c, p.70-75, 2000.

Hoderna, E. & Kedzia, B. Investigation upon the combined action of propolis and antimycotic drugs on *Candida albicans*. *Herba Pol.* 1987. 33, 145±151.

Ivanovska, N.D.; Dimov, V.B.; Bankova, V.S.; Popov, S.S. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of water soluble derivative on complement activity in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, v.47, p.145-147, 1995.

Krol, W.; Schiller, S.; Czuba, Z. Inhibition of neutrophils chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and phenolic components. *Journal of Ethnopharmacology*, v.55, p.19-25, 1996.

Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 64: 235-240.

Lacaz, C.S. et al. *Micologia Médica*. 8.ed. São Paulo: Savier, 1991, 695p.

Ledon, N.; Casaco, A.; Gonzalez, R.; Merino, N.; Gonzalez, A.; Tolon, Z. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. *Acta Pharmacologica Sinica*, v.18, p.274-276, 1997.

Li, F.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Kadota, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 5433-5440, 2008.

Lima, M.G. 2006. *A produção de própolis no Brasil*. São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica.

Lu, L.; Chen, Y.; Chou, C. 2005. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol* 102: 213-220.

M. Imhof T. M. Lipovac, C.H. Kurz, J. Barta, H.C. Verhoeven, J.C. Huber Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 89, 127—132, 2005.

Marcantoni, M. Ecología de la cavidad bucal In: Negroni, M. *Microbiología Estomatológica*. Panamericana. Madrid. p.189-217. 1999.

Marcucci, M.C. 1996. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Quim Nova* 19: 529-536.

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

Marcucci, M.C.; Ferreres, F.; García-Viguera, C.; Bankova, V.S.; De Castro, S.L.; Dantas, A.P.; Valente, P.H.M.; Paulino, N. 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* 74: 105-112.

Markham, K.R.; Mitchel, K.A.; Wilkins, A.L.; Daldy, J.A.; Lu, Y. 1996. HPLC and CG-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 42: 205-211.

Matos, F.J.A.; Gottlieb, O.R.; Andrade, C.H.S. 1975. Flavonoids from *D. ecastophyllum*. *Phytochemistry* 14, 825-826.

Menezes H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.72, n.3, p.405-411, jul./set., 2005.

Menezes, H.; Alvarez, J.M.; Almeida, E. Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts. *Arzneimittelforsch*, v.49, p.705-707, 1999.

Mirzoeva, O.K. & Calder, P.C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v.55, p.441-449, 1996.

Nagaoka, T.; Banskota, A.H.; T Ezuka, Y.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.26, n.4, p.487-491, 2003.

Naito, Y.; Yasumuro, M.; Kondou, K.; Ohara, N. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. *Phytother Res*. 21(5):452-6, 2007.

Odds, F.C. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. *J. Antimicrob. Chemother*. 39: 1696-1699, 1993.

Oliveira, A.C.P.; Shinobu, C.S.; Longhini, R.; Franco, S.L.; Svidzinski, T.I.E. 2006. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 493-497.

Orsi, R.O.; Funari, S.R.C.; Soares, A.M.V.C.; Calvi, S.A.; Oliveira, S.L.; Sforcin, J.M. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v.6, p.205-219, 2000.

Ota, C. [et al]. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *MYCOSES* 44, 375±378, 2001.

Park, Y.K.; Koo, M.H. 1997. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 367-369.

Park, Y.K.; Koo, M.H.; Abreu, J.A.S.; Ikegaki, M.; Cury, J.A.; Rosalen, P.L. Antimicrobial activity of propolis on oral micro organisms. *Current Microbiology*, v.36, p.24-28, 1998.

Park, Y.K.; Alencar, S.M; Scamparine, A.R.P.; Aguiar, C.L. 2002. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural* 2: 997-1003.

Park, E.H.; Kim, S.H.; Park, S.S. Anti-inflammatory activity of propolis. *Archives of Pharmacal Research*, v.19, p.337-341, 1996.

Pereira, A.S.; Seixas, F.R.M.S.; Neto, F.R.A. 2002. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova* 25: 321-326.

Pinto, P.M. Caracterização fenotípica e análise da variabilidade genética de espécies do gênero *Candida* isoladas de pacientes portadores ou não de doenças de base. 148f. Tese. ICB-UFMG. Belo Horizonte, 2003.

Rao, C. V.; Desai, D.; Rivenson, A.; Simi, B.; Amin, S.; Reddy, B. S. Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate. *Cancer Research*, v. 55 (11), p. 2310-2315, 1995.

Reis, C.M.F.; Carvalho, J.C.T.; Caputo, L.R.G.; Patrício, K.C.M.; Barbosa, M.V.J.; Chieff, A.L.; Bastos, J.K. Atividade anti-inflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. *Rev Bras Farmacogn*. 2000.10: 43-52.

Rezende, G.P.S.R.; Pimenta, F.C.; Costa, L.R.R.S. 2006. Antimicrobial activity of two Brazilian commercial propolis extracts. *Braz J Oral Sci* 5: 967-970.

Ribeiro M.A. Exoenzimas e mecanismos moleculares de resistência fluconazol de *C. albicans* isoladas de mulheres HIV positivas. 156f. Mest. ICB-USP. S. Paulo, 2002.

Rossi, A.; Longo, R.; Russo, A.; Borrelli, F.; Sautebin, L. The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia*, v. 73, p. S30-S37, 2002.

Salatino, A.; Teixeira, E.W.; Negri, G.; Message, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidencebased Complementary and Alternative Medicine*, v.2, n.1, p.33-38, 2005.

Scazzocchio, F.; D'Auria, F.D.; Alessandrini, D.; Pantanella, F. 2005. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research* 4: 327-333.

Shub, T.A.; Kagramanova, K.A.; Voropaeva, S.D.; Kivman, G.Y.A. Effects of propolis on strains of *Staphylococcus aureus* resistant to antibiotics. *Antibiotiki*, 26, 268-71, 1981.

Silva M.; Das, G. Da.; Oliveira, F. De S.; Quintans-Júnior, L.J.; Oliveira, T.M.L. De & Diniz M. De F.F.M., Investigação do Efeito Analgésico Central e Antiinflamatório de *Conocliniopsis prasiifolia* (DC) R.M. King & H. Robinson em Roedores, *Acta Farm. Bonaerense* 24 (4): 533-7, 2005.

Simões, L.M.C.; Gregório, L.E.; Da Silva Filho, A.A.; De Souza, M.L.; Azzolini, A.E.C.S.; Bastos, J.K.; Lucisano-Valin, Y.M. 2004. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J Ethnopharmacol* 94: 59-65.

Sosa, S.; B Aricevic, D.; C Inco, M.; Padovan, D.; Tubaro, A.; Della, L.R. Preliminary investigation on the antiinflammatory and anti-microbial activities of propolis. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, v.7, p.168-171, 1997.

Sud'ina, G. F.; Mirzoeva, O. K.; Pushkareva, M. A.; Korshunova, G. A.; Sumbatyan, N. V.; Varfolomeev, S. D. Caffeic acid phenethyl ester as a lipooxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Letters*, v. 329 (1/2), p. 21-24, 1993.

Tatefugi et al. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2003v.19, p.966-970, 1996.

Teixeira, E.W.; Salatino, A.; Negri, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis, *eCAM*, v.2, p.33-38, 2005.

Telles FQ, Silva N, Carvalho MM, Alcântara AP, Matta D, Barberino MG, Bartezak S, Colombo AL. Evaluation of efficacy and safety of itraconazole oral solution for the treatment of oropharyngeal candidiasis in AIDS patients. *The Brazilian Journal of Infectious Disease* 5:60-66, 2002.

Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Simova. S.; Marcucci, M.C.; Miorin, P.L.; Pasin, F.R.; Tsvetkova, I. 2006. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *eCAM* 3: 249-254.

Uzel, A.; Sorkun, K.; Öncag, Ö. Çogulo, D.; Gençay, Ö.; Salih, B. 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research* 160: 189-195.

WINGETER, M.A.; Guilhermetti, E.; Shinobu, C.S.; Takaki, I.; Svidzinski, T.I.E. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 40, n. 3, jun. 2007.

Vargas, A.C.; Loguercio, A.P.; Witt, N.M.; Da Costa, M.M.; Sá e Silva, M.; Viana, L.R. 2004. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural* 34: 159-163.