Revista COOPEX (ISSN:2177-5052)

Fungos patogênicos e a desmistificação do controle com o extrato de própolis em vinho branco

Pathogenic fungi and the demystification of control with propolis extract in white wine

Edlene Régis Silva Pimentel[1], Valter Oliveira Nascimento[2], Jorge Miguel Lima Oliveira[3], Elisabete de Farias Sousa Oliveira[4], Fayrusse Correia de Medeiros[5]; Aline Carla de Medeiros [6]; e Patricio Borges Maracaja[7] George do Nascimento Ribeiro[8]

RESUMO: A própolis é um material resinoso coletado pelas abelhas por diversas partes das plantas,como folhas, brotos, sendo utilizados para embalsar animais que tenham morrido dentro dacolmeia, vedar as paredes e conferir proteção frente às doenças. A utilização desse produtonatural com finalidade medicinal remete a antiguidade, tendo evidências de seu empregojunto as antigas civilizações, como a Grega, Romana e Egípcia, mantendo-se até os diasatuais com finalidades terapêuticas, médicas e veterinárias. O objetivo desse trabalho foiexaminar a citotoxicidade *in vitro* do extrato da própolis em vinho branco contra gênerosespecíficos de fungos, desmitificando a atividade antifúngica para determinadas cepas. Foram utilizadas amostras de própolis produzidas por abelhas *Apis melífera*, chegando àforma *in natura*, sendo trituradas e misturadas ao vinho branco, tendo como produto finalo extrato da própolis, para posteriormente apresentar as concentrações desejadas parapesquisa, sendo estas 0,5%, 1,0% e 2,0%, e em seguida, utilizado como tratamento antifúngico contra as cepas *Trichophyton mentagrophytes*, *Madurella mycetomatis*,De modo geral, os extratos de própolis vermelha oriunda da cidade Baía da Traição,município do estado da Paraíba, na região do Nordeste brasileiro, não possui potencialantifúngico contra as espécies do gênero nas concentrações de (0,5%, 1,0% e 2,0%), utilizando-se de vinho branco para construção de seu extrato. Os resultados evidenciam baixo efeito citotóxico sobre as cepas estudadas.

Palavras-chave: Própolis. Mycoses. Doenças Fúngicas. Fungos. Infecção por fungos.

ABSTRACT: Propolis is a resinous material collected by bees from various parts of plants, such as leaves, buds,and is used to embalm animals that have died inside the hive, seal the walls and provide protection against disease. The use of this natural product for medicinal purposes goes back to antiquity,with evidence of its use with ancient civilizations, such as the Greek, Roman and Egyptian, andit remains today with therapeutic, medical and veterinary purposes. The aim of this study was toexamine the in vitro cytotoxicity of the propolis extract in white wine against specific genera of fungi, demystifying the antifungal activity strains. Samples of propolis produced by *Apis melífera* bees were used, arriving in the fresh form, being crushed and mixed with white wine, having asa final product the propolis extract, to later present the desired concentrations for research, thesebeing 0.5%, 1.0% and 2.0%. Then, used as an antifungal treatment against *Trichophytonmentagrophytes, and Madurella mycetomatis*, In general, red propolis extracts from the city of Baía da Traição, a municipality in the state of Paraíba, in the Northeast region of Brazil, do not have antifungal potential against species of the genus in concentrations of (0.5%, 1.0% and 2.0%), using white wine to build its extract. The results show a low cytotoxic effect on the strains studied.

Keywords: Propolis. Mycoses. Fungal diseases. Fungi. Fungal infection.

1Universidade Federal de Campina Grande. Cuité, Paraíba, Brasil. https://orcid.org/0000- 0003-0352-5825. 6
2 Doutorando do PPGRN - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, Paraíba, Brasil.
3 Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, Paraíba, Brasil. jorge_scot@hotmail.com
4 Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, Paraíba, Brasil.
5Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, Paraíba, Brasil.
6Prof. D. Sc. do PPGGSA - Universidade Federal de Campina Grande. Pombal, Paraíba, Brasil.
7Prof. D. Sc. do PPGGSA - Universidade Federal de Campina Grande. Pombal, Paraíba, Brasil.
8Prof. D. Sc. do PPGRN - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, Paraíba, Brasil.

INTRODUÇÃO

A apicultura vem sendo utilizada como ciência e a arte de prolongar, sustentar e reter a saúde usando produtos obtidos de colmeias de abelhas, como mel, pólen de abelha, própolis e geleia real. Atualmente, temos visto a rápida aplicação de produtos apícolas na medicina tradicional e moderna. Nos últimos anos, observamos muitos estudos voltados a investigar os benefícios relacionados à saúde e suas propriedades farmacológicas dos produtos derivados apícolas. No Brasil, por ser um país rico em biodiversidade a descobertas de novos agentes fármacos fitoterápicos eficazes e menos tóxicos contra microrganismo patogênicos, contribui significativamente no campo da saúde (OSTROSKY *et al.*,2008; FREIRES *et al.*, 2016).

A própolis vermelha é incorporada ao grupo 13, recentemente descrito na região Nordeste do Brasil (por exemplo, Bahia, Paraíba, Sergipe, Pernambuco e Alagoas) (DAUGSCH; MORAES; FORT *et al.*, 2008). Com características químicas e farmacológicas únicas no mundo, a própolis vermelha, produzida nos manguezais do estado de Alagoas, Brasil. Em 2012, recebeu um certificado de Indicação Geográfica (IG).

A própolis é uma substância coletada por espécie de abelhas *Apis melifera, onde* coletam resinas e exsudatos de plantas e adicionam suas secreções salivares para produzir própolis, das várias indicações terapêuticas, foram evidenciadas por muitos autores. Diferentes estudos identificaram propriedades antifúngica (NAGATU *et al.*, 2011), efeito antioxidante (KUMAZAWA *et al*., 2007), efeitos antimicrobianos e citotoxicidade (NEDJI; LOUCIF-AYAD, 2014). Além disso, um número crescente de estudos está sendo realizado para investigar a atividade antiparasitária da própolis (DANTAS *et al.*, 2006).

A fitoterapia, juntamente a outras práticas, foi inserida no Sistema Único de Saúde (SUS) através da portaria nº 971/2006, em que o Conselho Nacional de Saúde regulamentou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (BRASIL, 2006). Com a implantação da fitoterapia junto ao SUS evidenciou a

necessidade de investigações a respeito desta área com o objetivo de enriquecer o conhecimento dos profissionais da saúde, além de evidenciar sua eficácia (BRASIL, 2006).

A importância deste estudo reside no fato da necessidade da pesquisa de novos antimicrobianos de origem natural, especificamente, antifúngicos alternativos no mercado, os quais venham apresentar uma baixa toxidade, maior eficácia, fácil acessibilidade e menor custo.

Nesse sentido, torna-se como questão norteadora da pesquisa a seguinte pergunta: Dentre os vários empregos da própolis como modalidade terapêutica dificilmente significa qualquer indicação antifúngica, pois existe uma grande diversidade de fungos no Brasil necessitando de estudos mais aprofundados.

Defendemos a tese de que, o extrato da própolis é uma opção vantajosa frente a muitos antifúngicos convencionais existentes no mercado farmacêutico. Não o bastante, até o presente momento observa-se uma ausência de relatos na literatura de atividade biológica (efeito antifúngico) da própolis sobre espécies de *Microsporum gypseum* e *Aspergilus niger*.

A pesquisa teve como objetivos investigar a citotoxicidade e a atividade antifúngica *in vitro,* do extrato da própolis em vinho branco, desmistificando a sua atividade antifúngica em dois tipos de cepas fúngicas. A própolis comumente utilizada na colmeia como componente vedante, além de proteger contra a invasão de intrusos, onde possui odor característico (SAWICKA *et al.,* 2012). Sua composição é complexa e a cor varia dependendo da espécie de planta e da localização onde é produzida: savanas, florestas tropicais, desertos, regiões costeiras e montanhosas (SANTOS; 2012).

Própolis: definição e características

A própolis é um dos poucos remédios naturais que manteve sua popularidade durante um longo período de tempo (CASTALDO; CAPASSO, 2002). O seu uso, pela medicina popular, data de 300 a.C (BANSKOTA *et al.,* 2001). A própolis era utilizada pelos egípcios nos processos de embalsamento devido a sua propriedade antiputrefante, porque era o instrumento adequado que iria proteger de fungos, vírus e bactérias. Gregos e romanos usavam a própolis como antisséptico e cicatrizante; os incas, como um agente

antipirético e farmacopeias londrinas do século XVII listavam a própolis como um medicamento oficial **(**SFORCIN; BANKOVA, 2011). Uma das suas peculiaridades se deve ao fato de que, mesmo congelada ou envelhecida, a própolis não apresenta alterações qualitativas na sua composição em relação às amostras frescas (SCHMIDT *et al.*, 2014; CONTI; BANKOVA; SFORCIN, 2015).

Composição química e classificação da própolis

Mais de 300 substâncias química já foram nos descritas mais variados tipos de própolis. Vários estudos afirmam que as diferenças em porcentagem de componentes individuais de própolis, dependem da origem dos vegetais a partir dos quais a resina é coletada, e as espécies de abelhas (SANTOS, 2012).

A Tabela 1 aponta os principais componentes químicos geralmente encontrados na própolis, bem como alguns tipos de própolis mais estudados, sua composição química principal, e suas origens geográficas.

Tabela 1 – Composição química geral de própolis, tipos de própolis mais difundidos, assim como suas origens geográficas e seus constituintes químicos principais

COMPOSIÇÃO QUÍMICA GERAL (%)	TIPOS DE PRÓPOLIS MAIS DINFUNDIDOS	ORIGEM GEOGRÁFICA	PRINCIPAIS CONSTITUINTES
Flavonóides (18-20%): Crisina, apigenina, galangina, etc.	Vermelha	Brasil Cuba México	Isoflavonóides
Alcoóis e Terpenos (2-3%): Glicerol, a-cedrol, xilitol, eritritol.	Bétula	Rússia	Flavonas, flavonóides
Açúcares (15-18%): D-altrose, D-glucose, maltose, D-frutose, arabinopiranose.	Mediterrânea	Sicília Grécia CretaMalta	Diterpenos
Ácidos graxos e Alifáticos (24-26%): Ácido glucônico, ácido fosfórico, ácido	Álamo	Europa América do Norte Regiões não-Tropicais da Ásia	Seus ésteres Ácidos *p*-cumarínicos prenilados

isofelúrico, ácido glutâmico etc.	ácido	Nova Zelândia	Ácidos diterpenos

Ácidos aromáticos (5-10%): Ácido benzóico, ácido caféico, ácido cinâmico, ácido felúrico.	Verde (alecrim) Brasileira	Brasil

Fonte: Adaptada de Sforcin e Bankova, (2011) Sawicka *et al. (*2012).

De acordo com Alencar *et al.* (2007), o qual descreve a composição química e atividade biológica de um novo tipo de própolis brasileira, a própolis vermelha é considerada o tipo 13.

As Figuras 1 e 2 ressaltam o aspecto físico das amostras de própolis bruta verde e vermelhas brasileiras (SANTOS, 2012).



Figura 1 – Aspecto físico das amostras de própolis bruta verde (A) brasileira
Fonte: Santos (2012).



Figura 2 – Aspecto físico das amostras de própolis bruta vermelha (B) brasileira
Fonte: Santos (2012).

Segundo Park *et al*. (2002), as própolis brasileiras, no que diz respeito a seu perfil químico, podem ser agrupadas em 13 grupos distintos. Como exemplo, têm-se as própolis, cujas origens botânicas localizam-se: cinco delas na região Sul, uma no Sudeste e sete tipos pertencentes à região Nordeste do país.

A espécie *Hypts divaricata* e *Dalbergia ecastophylum* representa as principais fontes de resina pertencente à região Nordeste. *Cacchares dracunculifolia* da própolis do Sudeste e *Populos nigra* da própolis do Sul do Brasil. Porém, devido à diversidade existente na flora brasileira, podemos dizer que essa classificação não é necessariamente um indicativo das características físico-química e biológicas dos tipos de própolis existentes no Brasil.

Em relação às funções biológicas e aplicações terapêuticas, a própolis possui muitas propriedades biológicas e farmacológicas, seu mecanismo de ação tem sido amplamente investigado nos últimos anos, utilizando diferentes modelos experimentais *in vitro* e *em vivo*. A própolis tem sido empregada extensivamente desde tempos antigos. Egípcios se beneficiaram das propriedades anti-putrefativas da própolis, com a finalidade de embalsamar seus mortos. Os incas utilizavam como agente antipirético, na Itália utilizava-se para afinar cordas de instrumentos musicais. Os Gregos também a utilizavamcomo perfumes, misturadas a plantas aromáticas. Na medicina, Gregos e Romanos aplicavam como antisséptico e no tratamento de feridas (CASTALDO; CAPASSO, 2002;SFORCIN, 2007).

Vale destacar que o uso da própolis, como modalidade terapêutica para tratamento de saúde, teve início em 1950 e 1960 na ex-União Soviética, Bulgária, Polônia eRepública Tcheca. E, a partir de 1980, difundiu-se para a América do Sul e Norte, Japãoe países do oeste Europeu (SALATINO, 2005).

No Brasil, o emprego da própolis apresenta diversas finalidades, sendo utilizada para tratamento de saúde na forma de extrato (hidroalcoólico), no formato de cápsulas e sprays, fazendo parte da composição de nutracêuticos, produção de alimentos saudáveis, produção de produtos de higiene pessoal e cosméticos. Na área de alimentos como conservantes (ALI *et al*., 2010; SOUZA *et al*., 2013). A própolis apresenta características farmacológicas e biológicas e propriedades antifúngicas, antibacteriana, antitumorais, antivirais, antiparasitária, anti-inflamatória, antioxidante (SFORCIN *et al.,* 2007; GEKKER *et al.,* 2005; ORSI *et al.,* 2005; FREITAS *et al.,* 2006; BÚFALO *et al.,* 2009).

Trichophyton Mentagrophytes: definição e patogênese

Trichophyton mentagrophytes é uma espécie de fungo patógenos, capaz de gerar dermatomicose em seres humanos e outros animais, promovendo danos à saúde humana e a criação de animais (ZHANG *et al.,* 2017).

Figura 3 – Colônia de *Trichophyton Mentagrophytes*



Fonte: http://www. wikipedia.org/wiki/trichophyton_mentagrophytes. Acesso em: 30 out. 2019.

Em relação aos aspectos clínicos das dermatofitoses inclui lesões cutâneas, comumente conhecidas por *Tineas* sendo sua nomeação está relacionada de acordo com a área comprometida: *Tinea capitis* (região do couro cabeludo), *Tinea corporis* (região do corpo/ pele), *Tinea manum* (região das mãos), *Tinea cruris* (região inguinal), T*inea pedis* (região dos pés) e *Tinea unguium* (unhas das mãos e dos pés) (CORTEZ *et al.*, 2012).

De acordo com Andrews e Burns (2008), a *Tinea capitis* é uma dermatofitose que acomete com maior frequência crianças, sobretudo em idade escolar. Inicialmente manifesta-se manifesta como uma lesão circular, semelhante a um anel, de coloração avermelhada e escamosa, acompanhada de alopécia, que pode se tornar agudamente inflamada, formando lesões ulceradas. A sua forma inflamatória caracteriza-se por placas e nódulos supurativos, cobertos de exsudato viscoso e crostas sobre área pilosa.

O modo de transmissão dar-se por contato interpessoal ou por animais infectados, por objetos (pentes, bonés, almofadas), locais onde os esporos dos fungos tenham sido depositados (SERRANO *et al.*, 2007).

O diagnóstico primário dessa da dermatofitose é laboratorial, feito a partir da cultura de amostras de arranhões ou fragmentos da lesão. Sendo a cultura necessária para a identificação definitiva do agente etiológico e para a instituição do tratamento específico com antifúngicos tópicos e/ou sistêmicos (SILVA *et al.*, 2018)

Madurella mycetomatis definição e patogênese

Madurella mycetomatis, é o agente causador de aumicetoma. Sua natureza é uma doença inflamatória subcutânea granulomatosa sendo frequentemente encontrada nas extremidades inferiores, porém também foram manifestadas em outras partes do corpo (AHMED *et al.*, 2004). O micetoma é caracterizado por ser uma infecção crônica, não contagiosa, ocasionada pela introdução traumática de bactérias filamentosas (actinomicetoma) e fungos saprófitos do solo (eumicetoma), afetando principalmente agricultores pelo fato de que em sua maioria esses indivíduos apresentam o hábito de trabalhar e caminhar sem devida proteção (VALLE *et al.*, 2006).

Essa infecção altamente mórbida e destrutiva atinge principalmente indivíduos de baixo nível, sócio econômico, com impacto médico, ocupacional para os familiares, pacientes e comunidade. Limitando as atividades diárias e profissionais dos indivíduos acometidos por esta enfermidade (QUEIROZ TELLES *et al.*, 2011; ZEIN *et al.*, 2012). Apesar do micetona ter sido inserido na literatura médica por meados do século XVIII, é considerada uma doença negligenciada, sem um controle de prevenção ou sistema de vigilância. Contudo em 2013, a Organização Mundial da Saúde adicionou micetoma à lista de doenças negligenciadas, a fim de aumentar a conscientização sobre a necessidade de um melhor monitoramento e combater essa enfermidade. Todavia, o micetoma fúngico não é mais letal; outrora, o diagnóstico frequentemente resultava em amputação do segmento do membro, principalmente em casos de diagnóstico tardio (ZEIN *et al.*, 2012; WELSH *et al.*, 2014).

As características clinicas mais frequentes são nódulos, aumento do volume da área afetada, exsudato e fistulas. A infecção tem início com pequenos nódulos subcutâneos, onde apresenta uma evolução gradativa das lesões inflamatórias crônicas onde apresentam secreção purulenta e seropurulenta contendo grãos pretos (AHMED, 2007).

Em 70% dos casos as lesões estão situadas nos pés, mãos, braços, pernas e costas (El MUTTARDI *et al.,* 2010; VALLE *et al.,* 2006). Por invasão local atinge ossos, articulações, fáscia e músculos (EL MUTTARDI *et al.,* 2010. VENKATSWAMI *et al.,* 2012).

Sinais e sintomas sistêmicos são incomuns e, quando presentes, é resultado do envolvimento de órgãos adjacentes, como os pulmões e o cérebro. Uma característica de a lesão dar-se pela formação de grãos compactos nos tecidos infectados, sendo que, os grãos brancos, amarelos e vermelhos têm origem bacteriana, enquanto os grãos pretos são causados por fungos (VAN BELKUM *et al.,* 2011).

Figura 4 – *Eumicetomas* em estado crônico



Fonte: http:// http://profitaloventura.blogspot.com/2017/07/eumicetomas.html/. Acesso em: 01 nov. 2019.

De maneira geral, as manifestações clínicas apresentam modificações confirme ocorre a evolução da doença, onde independe do agente etiológico. Após a inoculação traumática do microrganismo no tecido subcutâneo, esse passa a se multiplicar, evoluindo para a formação de colônias. A princípio ocorre um aumento lento da área afetada, progredindo para formação de microabscessos, nódulos e por fim fistulas cutânea, por onde é drenado o material exudativo (serosanguinolento ou seropurulento). O período de incubação varia de semanas podendo chegar a anos (VENKATSWAMI *et al.,* 2012).

Sinais e sintomas sistêmicos geralmente não são frequentes, e quando surgem estão relacionados com a extensão da doença, região acometida, e presença de infecção bacteriana secundaria. Nos casos em que ocorre uma progressão da doença sintomas como, astenia e caquexia estão presentes. E nos casos excepcionais os quais apresentam

comprometimento de vísceras, esses podem evoluir para óbito (CHAKRABORTY *et al.*, 2005; WELSH et al., 2011).

A progressão da doença se da solução de continuidade, onde surge novos microabcessos acometendo, portanto, estruturas adjacentes e profundas como tendões, fáscias, músculos, ossos e por fim articulações. Uma complicação seria a destruição óssea em que está vinculada com o tempo de exposição à infecção, a região comprometida e a agressividade do microrganismo (DO VALLE *et al*., 2006).

Os agricultores possuem um maior índice de infestação, pelo fato de terem mais contato com o solo. Sendo que, regiões anatômicas mais afetadas em primeiro vem os pés afetados (70-80%), seguidos das mãos e pernas (6-12%) (FAHAL *et al*., 2011; ESTRADA *et al*., 2012).

As técnicas atuais para o diagnóstico compreendem principalmente por exames de imagens Ultrassonografia (VENKATSWAMI *et al.*, 2012), Radiografia Simples o (FAHAL *et al*., 2011), Ressonância Magnética (Estrada *et al*., 2012), Tomografia Computadorizada a (El Shamy *et al*., 2012), Sorologia da lesão (De klerk *et al.*, 2012), histopatológico (Venkatswami *et al*., 2012) e diagnóstico laboratorial (VAN DE SANDE *et al*., 2014).

Sobre o tratamento do micetoma, carece o uso de o uso de um fármaco de ação sistêmica ligado ao tratamento cirúrgico (Fahal *et al*., 2011). Sobretudo, antes de início a modalidade terapêutica é necessário identificar a etiologia bacteriana ou fúngica do mesmo modo o paciente apresenta um melhor prognostico quanto mais antecipado for o diagnóstico melhor a resposta terapêutica (WELSH *et al*., 2014).

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo utilizaram-se amostras de própolis produzidas por abelhas *Apis mellifera*, oriundas da cidade Bahia da Traição, município do Estado da Paraíba na região do nordeste brasileiro, coletadas dia 21 do mês de novembro do ano de e 2018. A própolis foi cedida pelo Núcleo de Estudo em Agroecologia – EMEPA – Lagoa Seca – PB.

Após a coleta das amostras da própolis que chegaram à forma *in natura*, foram embaladas a vácuo permanecendo conservada a uma temperatura a -20º até o momento das análises. Em seguida, foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba – IFPB Campos Sousa,

para execução dos ensaios microbiológicos onde as amostras brutas da própolis (Figura 9)**,** foram trituradas e misturado ao vinho branco seco no qual se utilizou da diluição de 1:10, chegando a uma concentração de 10% no extrato da própolis para posteriormente apresentar as concentrações desejadas para pesquisa, sendo estas 0,5%, 1,0% e, por último, 2,0% da concentração do extrato da própolis.

As análises estatísticas foram feitas qualitativamente, devido às características do experimento e resultado apresentado.



Figura 5 – Amostras brutas da própolis
Fonte: Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

Microrganismos - Foram utilizados para estudo quatro tipos de amostras de fungos sendo estes: *Trichophyton mentagrophytes* e, *Madurella mycetomatis* (Figura 10). Gentilmente cedida pelo professor José Cezário de Almeida, Laboratório de Microbiologia da - Universidade Federal de Campina Grande – UFCG Campos Cajazeiras – Paraíba.



Figura 6 – Cepas
Fonte: Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

Preparo das amostras. Iniciando o experimento, preparou-se a substância para ser utilizada como meio para as cepas dos fungos. Pesou-se 39 gramas do Agar batata dextrose em um Becker com o auxílio de uma balança analítica, previamente calibrada, preparando-o de acordo comas instruções do manual do fabricante. E diluiu com em 1000 ml de água destilada até que as partículas ficassem uniformes. Essas substâncias foram autoclavadas até atingir a temperatura de 121°C, ficando por 15 minutos a essa temperatura. Após o resfriamento, colocado nas placas de Petri. Como se trabalhou com quatro espécies diferentes de fungos e três concentrações diferentes de extrato da própolis (0,5%, 1,0% 2,0%).

Usaram-se quatro repetições para cada concentração, por conseguinte, 12 placas e 12 tubos para cada tratamento totalizando 24 placas de Petri e 24 tubos de ensaio. Todos os materiais utilizados para o processamento das amostras passaram pelo processo de autoclavagem, e toda a operação realizou-se próxima a um bico de Bunsen, com a chama a meia altura. Em cada placa colocou-se 20 ml do meio de cultura e para cada tubo 15 ml do meio de cultura (Tabela 4).

Em seguida, foi plantado o fungo no centro de cada placa, sendo que toda a operação se realizou próxima a um bico de Bunsen, com a chama a meia altura. Seguidamente, usou-se de dois discos estéreis que já foram emergidos na solução do extrato da própolis. O mesmo processo foi realizado nos tubos para cada concentração, plantados o fungo no meio de cultura, na superfície exposta do tubo, sou seja, no meio de cultura. Em seguida, com o desenvolvimento dos fungos, que se dá com 48 horas adicionou 1 ml da solução do extrato com o auxílio de uma pipeta sobre os fungos em todos os tubos nas diferentes concentrações.

Nas placas, diferentemente dos tubos, implantaram-se os discos no mesmo momento que se plantaram os fungos, e nos tubos, após o crescimento dos fungos após o período de quatro semanas realizou a mensuração com auxílio de um paquímetro, das distâncias entre o disco que estava embebido com a solução de própolis e o fungo que foi plantado no centro da placa, observando-se o halo de inibição em volta do disso que estava umedecido com a própolis. A leitura em cm, média entre o centro da placa onde o microrganismo foi inoculado e o centro do disco de difusão: 3,5cm. Diferentemente nos tubos, a leitura dava-se macroscopicamente, observando de ocorreu ou não o crescimento do microrganismo.

No que se refere a Tabela 4, o cálculo dos resultados se deu a partir da transformação de concentração de solução (c1 v1), onde se utilizou de 70 ml de água destilada utilizada para diluir o extrato da própolis que há princípio apresentava-se na concentração de 10% nas respectivas concentrações 0,5%, 1,0% e 2,0% do extrato onde X representa o valor que se deseja encontra.

Tabela 2 – Extrato da própolis utilizado nas três diluições

DILUIÇÕES (70 ml) DE ÁGUA DESTILADA		
0,5%	1,0%	2,0%
C1V1	C1V1	C1V1
10. X = 0,5x70	10 . X = 1x70	10 . X= 2x70
X= 3,5ml	X = 7,0 ml	X= 14 ml

Fonte: Dados da Pesquisa, 2019.

Realizada a primeira leitura, acrescentou-se 2ml de uma concentração de 2% do extrato da própolis em todos os tubos, obtendo um resultado final acrescentado a cada porcentagem preliminar (Tabela 5).

Tabela 3 – Concentrações finais do extrato da própolis após o acréscimo dos 2% do extrato da própolis

CONCENTRAÇÃO FINAL DO EXTRATO DA PRÓPOLIS APÓS O ACRÉSCIMO DOS 2%		
ANTES = 0,5% - 1ml	ANTES = 1,0% -1ml	ANTES = 2,0% - 1ml
DEPOIS = 1,5% - 2ml	DEPOIS = 1,7%- 2ml	DEPOIS = 2,0% -2ml
3 ml	3 ml	3 ml

Fonte: Dados da Pesquisa, 2019.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período estudado, janeiro a março, foram avaliados a ação do extrato da própolis sobre duas espécies de fungos patógenos humanos, sendo estes, *Trichophyton mentagrophytes* e *Madurella mycetomati*, tendo como finalidade de desmistificar o efeito do extrato da própolis produzido com vinho branco sobre tais fungos.

Os resultados obtidos, no que diz respeito à citotoxicidade e atividade antifúngica *in vitro* do extrato da própolis em vinho branco, encontrados neste trabalho e discutidos a seguir, foi dividida em três categorias, e exposto em tabelas.

A seguir encontram-se os resultados referentes às distâncias de crescimentos dos fungos na direção dos discos com tratamento, de acordo com a concentração 0,5%, 1,0% e na categoria de 2,0% do extrato da própolis vermelha.

Avaliações da atividade antifúngica - De acordo com os resultados expressos na Tabela 4, o extrato em vinho branco da própolis vermelha, nativa do Estado da Paraíba, região do Nordeste brasileiro, não obtiveram atividade antifúngica frente aos isolados (100%) contra gêneros específicos de fungos testados neste trabalho encontra-se exposto a seguir:

Tabela 4 – *Screeening* antifúngico do extrato da própolis a uma concentração de (0,5%), frente a isolados patogênicos de diferentes espécies de *fungos*

PLACAS – DILUIÇÃO 0,5%		
FUNGOS	***Trichophyton mentagrophytes***	***Marurella mycetomatis***
DIÂMETRO 1º LEITURA	PLACA A N=1,9 S=0 PLACA B N=2,0 S=1,9 PLACA C N=0 S=0	PLACA A N=0 S=0 PLACA B N=0 S=0 PLACA C N=0 S=0
DIAMETRO 2º LEITURA	PLACA A N=0 S=0 PLACA B N=0 S=0 PLACA C N=0 S=0 PLACA D N=0 S=0	PLACA A N=0 S=0 PLACA B N=0 S=0 PLACA C N=0 S=0 PLACA D N=0 S=0
DIAMETRO 3º LEITURA	PLACA A N=0 S=0 PLACA B N=0 S=0 PLACA C N=0 S=0 PLACA D N=0 S=0	PLACA A N=0 S=0 PLACA B N=0 S=0 PLACA C N=0 S=0 PLACA D N=0 S=0
DIAMETRO 4º LEITURA	PLACA A N=0 S=0 PLACA B N=0 S=0 PLACA C N=0 S=0 PLACA D N=0 S=0	PLACA A N=0 S=0 PLACA B N=0 S=0 PLACA C N=0 S=0 PLACA D N=0 S=0
Leitura em cm; Distância média ente o centro da placa, na qual o fungo foi inoculado e o centro do disco de difusão: 3,5 cm		

Ao analisar o extrato da própolis vermelha a uma concentração de 0,5% pode-se observar atividade antifúngica frente às duas espécies de fungos isolados e analisados, sendo que, praticamente os fungos a partir da terceira leitura foram resistentes a esse extrato, não possuindo inibição do crescimento.

Conforme o *screening* preliminar realizado, dos fungos não teve sensibilidade frente ao extrato testado. Conforme os dados expostos na Tabela 4, a espécie *Marurella mycetomatis* não teve inibição de seu crescimento desde a realização da primeira leitura, que se deu a partir da primeira semana de cultivo do fungo.

Enquanto que o segundo supracitado está comumente associado à infecção altamente mórbida e destrutiva atinge principalmente indivíduos de baixo nível, sócio econômico, com impacto médico, ocupacional para os familiares, pacientes e comunidade.

No que concerne aos dados apresentados na Tabela 5, utilizou-se do tratamento da concentração de extrato da própolis a 1,0%, observa-se de início, uma menor proliferação das cepas *Marurella mycetomatis*

A própolis não possui potencial como uma possível fonte de uma nova droga, ou mesmo um novo adjuvante no combate as cepas utilizadas na pesquisa, como pode ser visto pelos resultados apresentados.

Na Tabela 6, verifica-se a baixa citotoxicidade do extrato da própolis em vinho branco contra gêneros específicos de fungos, acontecimento percebido nas tabelas 4 e 5 supracitadas, evidenciando assim, um ineficaz potencial antifúngico frente aos patógenos pesquisados.

Tabela 5 – *Screeening* antifúngico do extrato da própolis a uma concentração de (1, 0%), frente a isolados patogênicos de diferentes espécies de *fungos*

	PLACAS – DILUIÇÃO 1%			
FUNGO	***Trichophyton mentagrophytes***		***Marurella mycetomatis***	
DIÂMETRO 1º LEITURA	PLACA A S=1,6	N=0,4	PLACA A S=0	N=0
	PLACA B S=1,0	N=1,1	PLACA B S=0	N=0
	PLACA C S=0,9	N=1,5	PLACA C S=0	N=0
	PLACA D S=1,4	N=0,9	PLACA D S=0	N=0
DIÂMETRO 2º LEITURA	PLACA A S=0	N=0	PLACA A S=0	N=0
	PLACA B S=0,2	N=0	PLACA B S=0	N=0
	PLACA C S=0	N=0	PLACA C S=0	N=0
	PLACA D S=0	N=0	PLACA D S=0	N=0
DIÂMETRO 3º LEITURA	PLACA A S=0	N=0	PLACA A S=0	N=0
	PLACA B S=0	N=0	PLACA B S=0	N=0
	PLACA C S=0	N=0	PLACA C S=0	N=0
	PLACA D S=0	N=0	PLACA D S=0	N=0

DIAMETRO 4º LEITURA	PLACA A S=0	N=0	PLACA A S=0	N=0
	PLACA B S=0	N=0	PLACA B S=0	N=0
	PLACA C S=0	N=0	PLACA C S=0	N=0
	PLACA D S=0	N=0	PLACA D S=0	N=0

Leitura em cm; Distância média ente o centro da placa, na qual foi o fungo foi inoculado e o centro do disco de difusão: 3,5 cm

Estudos evidenciam que as propriedades biológicas, bem como sua composição química, variam de acordo com a região geográfica, fontes de coleta, além da técnica utilizada para produção e a estação do ano em que a própolis é produzida (TORETI *et al.*, 2013).

Pesquisadores apontam que, em virtude da grande diversidade da própolis dificulta sua padronização química, o que muitas vezes inviabiliza sua utilização na indústria farmacêutica. Na saúde, um produto para ser utilizado deve estabelecer parâmetros que tragam confiabilidade, eficácia e segurança. O trabalho com um material padronizado garante um tipo especifico de constituinte químico que exerça atividade biológica específica (BANKOVA, 2005).

Tabela 6 – *Screeening* antifúngico do extrato da própolis a uma concentração de (1, 0%), frente a isolados patogênicos de diferentes espécies de *fungos*

PLACAS – DILUIÇÃO 2%				
FUNGO	***Trichophyton mentagrophytes***		***Marurella mycetomatis***	
DIÂMETRO 1º LEITURA	PLACA A S=2,2	N=1,7	PLACA A S=0	N=0
	PLACA B S=1,3	N=1,0	PLACA B S=0	N=0
	PLACA C S=1,9	N=1,4	PLACA C S=0	N=0
	PLACA D S=2,1	N=1,6	PLACA D S=0	N=0
DIÂMETRO 2º LEITURA	PLACA A S=0	N=0	PLACA A S=0	N=0
	PLACA B S=0,3	N=0	PLACA B S=0	N=0
	PLACA C S=1,1	N=0,4	PLACA C S=0	N=0
	PLACA D S=0,7	N=0	PLACA D S=0	N=0
DIÂMETRO 3º LEITURA	PLACA A S=0	N=0	S=0	
	PLACA B S=0	N=0		
	PLACA C S=0	N=0		
	PLACA D	N=0		

P
L
A
C
A
A

N
=
0
S
=
0
P
L
A
C
A
B

N
=
0
S
=
0
P
L
A
C
A
C

N
=
0
S
=
0
P
L
A
C
A
D

N
=
0
S
=
0

DIAMETRO 4º LEITURA	PLACA A S=0	N=0	PLACA A S=0	N=0
	PLACA B S=0	N=0	PLACA B S=0	N=0
	PLACA C S=0	N=0	PLACA C S=0	N=0
	PLACA D S=0	N=0	PLACA D S=0	N=0

Leitura em cm; Distância média ente o centro da placa, na qual o fungo foi inoculado e o centro do disco de difusão: 3,5 cm

Os resultados obtidos nas três concentrações utilizando o extrato da própolis vermelha em vinho branco para examinar a atividade antifúngica contra os gêneros específicos de fungos, estão expostos nas Tabelas 7, 8 e 9 e mostram uma insuficiente atividade citotóxica.

Sendo assim, as cepas tiveram uma tendência crescente de crescimento. Desta forma, comprovando a não atividade antifúngica da própolis para baixas concentrações utilizadas. Portanto, considera-se que o extrato da própolis vermelha em vinho branco possuiu um baixo espectro de ação frente as duas amostras de cepas testadas (*Trichophyton mentagrophytes e Marurella Mycetomatis).*

A perspectiva para trabalhos futuros sugere avaliar o uso de produtos naturais a base de própolis em baixas concentrações verificando se exerce ou não atividade citotóxica sobre os patógenos mencionados, assim como, a produção do extrato da própolis em vinho branco, na qual a literatura aponta o extrato etanólico sendo mais utilizado.

Tabela 7 – *Screeening* antifúngico do extrato da própolis a uma concentração de (0,5%), frente a isolados patogênicos de diferentes espécies de *fungos*

TUBOS – DILUIÇÃO 0,5%				
FUNGO	***Trichophyton mentagrophytes***		***Marurella mycetomatis***	
1º LEITURA	TUBO A	**R**	TUBO A	**R**
	TUBO B	**R**	TUBO B	**R**
	TUBO C	**R**	TUBO C	**R**
	TUBO D	**R**	TUBO D	**R**
2º LEITURA	TUBO A	**R**	TUBO A	**R**
	TUBO B	**R**	TUBO B	**R**
	TUBO C	**R**	TUBO C	**R**
	TUBO D	**R**	TUBO D	**R**
3º LEITURA	TUBO A	**R**	TUBO A	**R**
	TUBO B	**R**	TUBO B	**R**
	TUBO C	**R**	TUBO C	**R**
	TUBO D	**R**	TUBO D	**R**
4º LEITURA	TUBO A	**R**	TUBO A	**R**
	TUBO B	**R**	TUBO B	**R**
	TUBO C	**R**	TUBO C	**R**
	TUBO D	**R**	TUBO D	**R**

Fonte: Dados da pesquisa, 2019. Concentração testada: 1,0% de extrato da própolis em vinho branco; R: resistente

Tabela 8 – *Screeening* antifúngico do extrato da própolis a uma concentração de (1,0%), frente a isolados patogênicos de diferentes espécies de *fungos*

	TUBOS - DILUIÇÃO 1,0%			
FUNGO	***Trichophyton mentagrophytes***		***Marurella mycetomatis***	
1º LEITURA	TUBO A	**R**	TUBO A	**R**
	TUBO B	**R**	TUBO B	**R**
	TUBO C	**R**	TUBO C	**R**
	TUBO D	**R**	TUBO D	**R**
2º LEITURA	TUBO A	**R**	TUBO A	**R**
	TUBO B	**R**	TUBO B	**R**
	TUBO C	**R**	TUBO C	**R**
	TUBO D	**R**	TUBO D	**R**
3º LEITURA	TUBO A	**R**	TUBO A	**R**
	TUBO B	**R**	TUBO B	**R**
	TUBO C	**R**	TUBO C	**R**
	TUBO D	**R**	TUBO D	**R**
4º LEITURA	TUBO A	**R**	TUBO A	**R**
	TUBO B	**R**	TUBO B	**R**
	TUBO C	**R**	TUBO C	**R**
	TUBO D	**R**	TUBO D	**R**

Fonte: Dados da pesquisa, 2019. Concentração testada: 1,0% de extrato da própolis em vinho branco; R: resistente

Tabela 9 – *Screeening* antifúngico do extrato da própolis a uma concentração de (2,0%), frente a isolados patogênicos de diferentes espécies de *fungos*

	TUBOS - DILUIÇÃO 2,0%			
FUNGO	***Trichophyton mentagrophytes***		***Marurella mycetomatis***	
1º LEITURA	TUBO A	**R**	TUBO A	**R**
	TUBO B	**R**	TUBO B	**R**
	TUBO C	**R**	TUBO C	**R**
	TUBO D	**R**	TUBO D	**R**
2º LEITURA	TUBO A	**R**	TUBO A	**R**
	TUBO B	**R**	TUBO B	**R**
	TUBO C	**R**	TUBO C	**R**
	TUBO D	**R**	TUBO D	**R**
3º LEITURA	TUBO A	**R**	TUBO A	**R**
	TUBO B	**R**	TUBO B	**R**
	TUBO C	**R**	TUBO C	**R**
	TUBO D	**R**	TUBO D	**R**
4º LEITURA	TUBO A	**R**	TUBO A	**R**
	TUBO B	**R**	TUBO B	**R**
	TUBO C	**R**	TUBO C	**R**
	TUBO D	**R**	TUBO D	**R**

Fonte: Dados da pesquisa, 2019. Concentração testada 2,0% de extrato da própolis em vinho branco; R: resistente

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados sobre a própolis investigada, pode-se concluir que:

✓ O extrato da própolis vermelha oriunda da cidade Bahia da Traição, município do Estado da Paraíba na região do nordeste brasileiro, não possui potencial antifúngico contra as espécies do gênero nas concentrações de (0,5%, 1,0% e 2,0%), utilizando de vinho branco para construção de seu extrato;

✓ O Extrato de Própolis em baixas concentrações não possuiu efeito citotóxico sobre as cepas estudadas;

✓ Estudos futuros sobre a caracterização dos seus compostos químicos, aperfeiçoamento do produto e ensaios clínicos deverão ser realizados;

✓ Os extratos e frações de própolis vermelhas testados não foram efetivos na inibição dos isolados fúngicos testados, não sendo eficientes no crescente crescimento dos fúngicos testados pelo período de tempo de contato avaliado nesse estudo;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, F.; KASSEM, G. M.; ATTA-ALLA, O. Propolis as a natural descontaminat and antioxidant in fresh oriental suasage. **Veterinária Italiana,** V. 46, n.2, 2010. p. 167-172.

BEISSWENGER, C., HESS, C. E BALS, R. 2012. Aspergillus fumigatus conidia induce interferon-b signalling in respiratory epithelial cells. **European Respiratory Journal**. 2012; 39, pp. 411–418.

BRASIL Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Brasília. DF. 2006. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 10 set. 2019.

BANSKOTA, A. H; TEZUKA, Y; KADOTA, S. Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 561-571, 2001.

BÚFALO, M. C.; FIGUEIREDO, A. S.; SOUSA, J. P. B.; CANDEIAS, J. M. G.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Anti-poliovirus activity of Baccharis dracunculifolia and propolis by cell viability determination and real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**. 2009c; 107, 1669–1680.

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

CONTI, B. J.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M. Chemical composition of the same

Brazilian propolis sample analyzed in 1997 and in 2012: no freezing effect. ***Nat Pr Commun.*** v.10, p.1279–1280, 2015.

DAUGSCH A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical composition and botanical origin. Evid Based Complement Alternat Med. 2008 Dec; 5(4):435- 41**.**

DANTAS, A. P.; OLIVIERI, B. P.; GOMES, F. H. M.; DE CASTRO, S. L. O tratamento de camundongos infectados com Trypanosoma cruzi com própolis promove alterações na resposta imune. **J Ethnopharmacol.** 2006; 103 (2): 187–193.
DEL PALACIO, A.; CUETARA, M. S.; PONTON, J. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. **Rev Iberoam Micol,** 2003a; 20(3), pp. 90-98.

DIMOPOULOS, G.; TSANGARIS, I.; POULAKOU, G.; PANAYIOTIDES, J.; TSAKNIS, G.; ORFANOS, S.; ARMAGANIDES, A. Post-operative Aspergillus mediastinitis in a man who was immunocompetent: a case report, Journal of Medical Case Reports, 2010; 4. pp. 312.

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

GEKKER, G.; HU, S.; SPIVAK, M.; LOKENSGARD, J.R.; PETERSON, P. K. Anti-HIV-1 activ- ity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cellcultures. **Journal of Ethnopharmacology.** 2005; 102, 158–163.

HAVLICKOVA, B.; VIKTOR, A. C.; MARKUS, F. Epidemiological Trends in Skin Mycoses Worldwide. **Mycoses,** 2008; 51, 2-15.

JIANG, Z.; WANG, Y.; JIANG, Y.; XU, Y.; MENG, B. Vertebral osteomyelitis and report and literature review, Journal of International Medical Research, 2013; 41(2), pp.502–510.

ISIDRO, A. Las momias: tipología, historia y patologia. Espanha, Logroño. **Revista espanhola de antropología física**, n. 26, p. 37-62, 2006. Disponível em: http://dialnet.unirioja.es/servlet/revista. Acesso em: 23 out. 2019.

MOKADDAS, E.; BURHAMAH, M. H.; AHMAD, A. S.; KHAN, Z. U. Invasive pulmonary aspergillosis due to Aspergillus terreus: value of DNA, galactomannan and (1A3)-b-D glucan detection in serum samples as an adjunct to diagnosis. **Journal of Medical Microbiology**, 2010; 59, pp. 1519–1523

MURRAY, P. R.; ROSSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia: Médica, 5º edição, Elsevier Editora Ltda, 2006. pp. 770-773

NEDJI, N.; LOUCIF-AYAD, W. Atividade antimicrobiana da própolis da Argélia em patógenos de origem alimentar e sua composição química quantitativa. **Asiático Pac J Trop Dis .** 2014; 4(6): 433–437.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Braz J Pharmacognosy.** v.18, n.2, p.301-307, 2008.

ORSI, R. O.; SFORCIN, J.M.; RALL, V. L. M.; FUNARI, S. R. C.; BARBOSA, L.; FERNANDES, J. R. A. Susceptibility profile of Salmonella against the antibacterial activity of

própolis produced in two regions of Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins,** 2005; 11, 109–116.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Origem botânica e composição química da própolis brasileira. **J. Agric. Food Chem.** 2002; 50: 2502-2506.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. **Fungal Infection Diagnosis and Management**. 3th edition. Victoria, Blackwell Publishing Asia Pty Ltda., 2003.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Pedúnculo de caju como Substrato.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal- RN, 2007.

SANTOS, V. R. Propolis: alternative medicine for the treatment of oral microbial diseases. **Alternative Medicine.** 2012. Disponível em: http://www.intechopen.com/books/alternative-medicine/antifungal-activity-of-propolis-oral-clinical-studies-inhumans. Acesso em: 10 set. 2019.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E W.; NEGRI G.; MESSAGE, D. origin end Chemacal varation of brazilian própolis. **Evidence –basead complementary and alternative medicine**, v.2, n.1, p.33-38, 2005.

SAWICKA, D. *et al.* The anticancer activity of propolis. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, v. 50, n. 1, p. 25-37, 2012.

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

SFORCIN, J. M.; ORSI, R. O; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 98, p. 301-305, 2007.

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

SCHMIDT, E. M.; STOCK, D.; CHADA, F. J. G. *et al.* A comparison between characterization and biological properties of Brazilian fresh and aged propolis. **Biomed Res Int.** 2014, p.1-10, 2014.

TORETI, V. C.; SATO, H. H.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** 2013; 2013:697390.