



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM SISTEMAS
AGROINDUSTRIAIS**

MARCELO HOLANDA DA CUNHA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO
HIDROALCOOLICO DE PRÓPOLIS PRETA**

**POMBAL – PB
MARÇO DE 2018**

MARCELO HOLANDA DA CUNHA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO
HIDROALCOOLICO DE PRÓPOLIS PRETA**

Trabalho Final apresentado ao Mestrado Profissional em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, *Campus Pombal*, PB, em cumprimento às exigências necessárias ao Título de Mestre, com área de concentração em Ciências e Tecnologia em Sistemas Agroindustriais.

Orientadora: Dra. Alfredina dos Santos Araujo

**POMBAL – PB
MARÇO DE 2018**

C972c

Cunha, Marcelo Holanda da.

Composição química e atividade biológica do extrato hidroalcoólico de própolis preta / Marcelo Holanda da Cunha. □Pombal-PB, 2018.

49 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) □ Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2018.

"Orientação: Profa. Dra. Alfredina dos Santos Araújo".

Referências.

1. Atividade Antifúngica. 2. Atividade Antibacteriana. 3. Compostos Fenólicos. 4. Própolis. I. Araújo, Alfredina dos Santos. II. Título.

CDU 638.1(043)

MARCELO HOLANDA DA CUNHA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO
HIDROALCOOLICO DE PRÓPOLIS PRETA**

Trabalho Final apresentado ao Mestrado Profissional em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, *Campus Pombal*, PB, em cumprimento às exigências necessárias ao Título de Mestre, com área de concentração em Ciências e Tecnologia em Sistemas Agroindustriais.

Orientadora: Dra. Alfredina dos Santos Araújo

Aprovada em 05/03/2018

COMISSÃO EXAMINADORA



Alfredina dos Santos Araújo PPGSA/UFCG/POMBAL
Orientadora



Everton Vieira da Silva – PPGSA/UFCG/POMBAL
Examinador Interno



Antônio Fernandes Filho – UFCG/CAJAZEIRAS
Examinador Externo

**POMBAL – PB
MARÇO DE 2018**

AGRADECIMENTOS

A Deus, e por interseção de NOSSA SENHORA DA GUIA por estar sempre em minha vida representada nas pessoas que ela coloca a minha volta me oferecendo oportunidades e saídas nos momentos que sempre preciso. Muitas foram às passagens e batalhas trilhadas para chegar até aqui. Um desejo a muito perseguido e que só hoje vejo realizado. Um tempo em que louvo e agradeço para entender o quão compassivo é Deus, que em sua glória me fez entender que os discernimentos de suas ações só acontecem no tempo e na hora certa determinada por ele.

A família da qual vim representada por pai, mãe, minha tia e irmãs. E a segunda família que construí representada na pessoa de minha esposa que é o pilar central de minha vida. Este trabalho é para você!

A minha orientadora Prof. Dra. Alfredina dos Santos Araújo, que me deu esta oportunidade, e pelo apoio, incentivo, carinho e amizade. Além de orientar a pesquisa, proporcionou-me um novo olhar científico; soube corrigir-me quando necessário, mas, sobretudo, soube elogiar os progressos e compreender as limitações.

Aos membros da Banca Examinadora pela colaboração e observações deste trabalho.

A Msc. Fernanda Rodrigues, que me orientou em muito pouco tempo, o que muito consegui realizar, sorte e sucesso em sua caminhada.

Um agradecimento todo especial a uma irmã de vida que arrumei nessa aventura, Msc. Bruna Rodrigues de Sousa, um anjo enviado por Deus para iluminar meu caminho na hora mais escura em que me encontrava.

A toda a equipe do Centro Vocacional Tecnológico (CVT), alunos e funcionários pela amizade construída e troca de conhecimentos.

A Coordenação, aos docentes e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais (PPGSA) da Universidade Federal de Campina Grande, que contribuirão de forma direta ou indireta. Sem esquecer-se de Normando Canuto, pessoa vigilante e ativa, um arauto na lembrança de nossas responsabilidades e um excelente orientador administrativo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para conclusão deste mestrado.

Muito obrigada!

RESUMO

Neste trabalho buscou-se investigar a composição química, o efeito antifúngico e antibacteriano do extrato da própolis preta, *in vitro*, em leveduras do gênero *Candida* e bactérias do grupo *Staphylococcus aureus*, respectivamente. A princípio obteve-se as amostras de 06 (seis) espécies de *Candida spp.* e 01(uma) de *Staphylococcus aureus* por doação. Assim como, a própolis proveniente da jurema preta, cedida pelo apiário Edimel. A própolis preta foi extraída e sua composição química foi caracterizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Posteriormente, os extratos hidroalcoólicos da própolis preta foram elaborados por dois métodos, a saber: maceração a quente e Soxhlet, com o intuito de se observar a melhor forma de obter a melhor síntese e seu rendimento do referido extrato. Em seguida, as leveduras do gênero *Candida sp* foram reidratadas e semeadas, enquanto que a bactéria *Staphylococcus aureus* foi replicada. As amostras viáveis foram testadas quanto ao perfil de sensibilidade considerando-o como sensível, sensibilidade dose-dependente e resistente utilizando como método de referência o teste de difusão em disco, de acordo com os documentos M44-A2 e M2-A8 do Clinical and Laboratory Standards Institute, respectivamente. Os resultados evidenciaram que o perfil químico da própolis preta consta de 14 substâncias químicas, e dentre elas, destacam-se as maiores concentrações para o ácido 3,4-dihidroxibenzoico (14,19 mg/mL), a rutina (12,71 mg/mL), o ácido transcinâmico (6,25 mg/mL), sendo esses responsáveis por atividade antioxidante e antibacteriana. Os processos de extração hidroalcoólica da própolis por maceração a quente e por soxhlet, resultaram respectivamente, em 43,6% e 57,6% de rendimento. Sugerindo que a extração por soxhlet apresentou melhor viabilidade, em virtude de redução de tempo e aumento na temperatura frente à maceração a quente. No que concerne, a reidratação e semeaduras das culturas de leveduras do gênero *Candida sp*, 100% das amostras apresentaram crescimento satisfatório para o desenvolvimento dos testes de sensibilidade. No entanto, o extrato hidroalcoólico de própolis preta testado nas concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%) e do álcool etílico a 70%, todos frente ao crescimento das 06 (seis) espécies de *Candida*, que se observaram ser resistentes ao extrato, enquanto para o fluconazol na concentração de 25 mg/mL, marcador antifúngico, foram sensíveis. Já, para o teste de difusão em disco com o extrato hidroalcoólico de própolis preta testado nas concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%), bem como do cloranfenicol na concentração de 30 mg/mL e do álcool etílico a 70%, frente ao crescimento da espécie de *Staphylococcus aureus*, estes apresentaram sensibilidades frente ao marcador antibacteriano e aos extratos. A formação dos halos por *S. Aureus*, indicando a sensibilidade tanto para os extratos hidroalcoólicos da própolis preta, cujos diâmetros foram entre 19 a 25,3 mm, e no marcador (Cloranfenicol) com diâmetro entre 30 a 30,1 mm. Em suma, pode ser afirmado que a própolis preta apresentou atividade antibacteriana para bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, não havendo atividade antifúngica frente as leveduras do gênero *Candida*. Efeito esse relacionado à presença de compostos fenólicos e flavonóides, e que a predominância da concentração desses compostos bioativos, influencia na ação biológica dos microorganismos, estudados neste trabalho, *Candida sp* e *Staphylococcus aureus*, em virtude de ter apresentado inibição e sensibilidade, respectivamente para esses microorganismos.

Palavras-chave: Atividade antifúngica e antibacteriana, compostos fenólicos, própolis.

ABSTRACT

We studied the chemical composition of the black propolis extract, and its *in vitro* antifungal and antibacterial effects against yeasts of the genus *Candida* spp. (six species) and the bacterium *Staphylococcus aureus*. The propolis from *Mimosa hostilis* (Jurema-preta) flowers was provided by the Edimel apiary. Black propolis was extracted, and its chemical composition was measured by High-Performance Liquid Chromatography. Hydroalcoholic extracts of black propolis were done through two methods, hot maceration and Soxhlet, to obtain the best synthesis and yield. The yeasts were rehydrated and sown, whereas the bacterium was replicated. Viable samples were tested for sensitivity profile and classified as: sensitive, dose-dependent, and resistant. For the disc diffusion test, we followed reference methods described in the M44-A2 and M2-A8 documents of the Clinical and Laboratory Standards Institute, respectively for *Candida* spp. and *S. aureus*. The chemical profile of black propolis comprises 14 chemical substances. The compounds with highest concentrations were: protocatechuic acid (14.19 mg/mL), rutin (12.71 mg/mL), and trans-cinnamic acid (6.25 mg/mL), which were responsible for the antioxidant and antibacterial activity. The hydroalcoholic extraction processes of propolis by hot maceration and Soxhlet resulted in yields of 43.6% and 57.6%, respectively. Thus, the Soxhlet extraction showed better viability due to its faster extraction and increase in temperature. After rehydration and sowing, all samples of yeast cultures showed satisfactory growth for the sensitivity tests. All *Candida* species were resistant to the extract of black propolis (at the concentrations of 26.4 mg/mL – 33%; 52.8 mg/mL – 66%; and 79.2 mg/mL – 99%), and to 70% ethanol, whereas they were sensitive to fluconazole at 25 mg/mL, the antifungal marker. The *S. aureus* was sensitive to the extracts at all concentrations and to chloramphenicol at 30 mg/mL, the antibacterial marker. The halos around the discs show the sensitivity of *S. aureus* to both hydroalcoholic extracts of black propolis, whose diameters ranged from 19 to 25.3 mm, while the marker halos ranged from 30 to 30.1 mm. So, the black propolis showed antibacterial activity against *S. aureus* but no antifungal activity against *Candida* spp. The antibacterial activity occurred due to the presence of phenolic and flavonoid compounds. The predominance of these bioactive compounds affects the biological activity of microorganisms.

Keywords: Antifungal and antibacterial activity, phenolic compounds, propolis.

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Mimosa hostilis</i> Benth, vulgarmente conhecida como Jurema preta	15
Figura 2 <i>Apis mellifera</i> coletando os insumos para a produção da própolis preta proveniente da Jurema preta.....	16
Figura 3 Pó de própolis preta obtida pelo processo de extração	24
Figura 4 Ampolas de vidro com as espécies de <i>Candida</i> spp. Liofilizadas	26
Figura 5 Levedura do gênero <i>Candida</i> cultivados.....	27
Figura 6 Diluições do extrato hidroalcoólico de própolis preta bruta para as concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%).	28
Figura 7 Discos do extrato hidroalcoólico de própolis preta nas concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%), e do fluconazol na concentração de 25 mg/mL e do álcool etílico a 70%, respectivamente.....	28
Figura 8 Discos do extrato hidroalcoólico de própolis preta nas concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%), e do cloranfenicol na concentração de 30 mg/mL e do álcool etílico a 70%, respectivamente.....	30
Figura 9 Cromatograma do extrato de própolis preta bruta (80mg/mL)	32
Figura 10 Teste de difusão em disco com as cepas das <i>Candida</i> , adotando o extrato hidroalcoólico da própolis preta por (A) método de maceração a quente e (B) por soxhlet. ...	36
Figura 11 Figura em maior aumento da ação resistente das <i>Candidas</i> sobre a própolis preta.	37
Figura 12 Teste de difusão em discos com o extrato hidroalcoólico de própolis preta testado nas concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%), bem como do cloranfenicol a 30 mg/mL e do álcool etílico a 70%, frente ao <i>Staphylococcus aureus</i>	38

Lista de Quadro

Quadro 1 Informações sobre as leveduras do gênero <i>Candida</i> utilizadas na pesquisa de acordo com INCQS/CMRVS/FIOCRUZ.....	23
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Lista de Tabelas

Tabela 1 Critérios de interpretação para determinação da sensibilidade as substâncias avaliadas para os isolados de <i>Candida spp.</i> , pela técnica de difusão em disco.....	29
Tabela 2 Critérios de interpretação para determinação da sensibilidade as substâncias avaliadas para os isolados de <i>Staphylococcus aureus.</i> , pela técnica de difusão em disco	31
Tabela 3 Resultados da CLAE, apresentando os nomes dos compostos químicos, tempo de retenção e concentração dos compostos químicos no extrato de própolis preta bruta (80 mg/mL)	33
Tabela 4 Registro dos tamanhos de halos formados pela <i>S. Aureus</i> ensaiadas de acordo com o extrato hidroalcoólico de própolis preta e ao Cloranfenicol.	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 JUREMA PRETA (<i>Mimosa hostilis</i> Benth).....	15
3.2 PRÓPOLIS	16
3.3 <i>CANDIDA sp</i>	18
3.3.1 Candidíase Vulvovaginal (CVV).....	19
3.3.2 Atividade Antifúngica	20
3.4. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	21
3.4.1 Atividade Antibacteriana.....	22
4 MATERIAIS E METODOS	23
4.1 LOCAL DA PESQUISA	23
4.2 MATERIAIS	23
4.3 MÉTODOS	24
4.3.1 Obtenção do pó de própolis preta para a sua extração	24
4.3.2 Identificação do perfil químico do extrato de própolis preta bruta por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	25
4.3.3 Elaboração do extrato hidroalcoólico da própolis preta	24
4.3.3.1 Por maceração a quente	24
4.3.3.2 Por Soxhlet	25
4.3.4 Reidratação e sementeiras das culturas de leveduras do gênero <i>Candida</i>	26
4.3.4 Repicagem da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	27
4.3.5 Teste de difusão em disco.....	27
4.3.5.1 Para <i>Candidas spp</i> :	27
4.3.5.2 Para <i>Staphylococcus aureus</i>	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Identificação do perfil químico do extrato de própolis preta bruta por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	32
5.2 Rendimentos das Extrações hidroalcoolicas da Própolis Preta	34

5.3 Reidratação e semeadura das leveduras do gênero <i>Candida</i>	35
5.4 TESTES DE DIFUSÃO EM DISCO	35
5.4.1 Determinação da atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico de própolis preta e do fluconazol por difusão em disco	35
5.4.2 Determinação da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis preta e do cloranfenicol por difusão em disco.....	38
6 CONCLUSÃO.....	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

A busca por alternativas para o tratamento convencional em relação ao combate das vulvovaginites, geralmente ocasionadas por leveduras do gênero *Candida* e por bactérias do grupo *Staphylococcus*, nas quais estas também apresentam sinais clínico patológicos semelhantes às *candidas*, vem sendo investigada pela comunidade científica, por apresentar limitações como o alto custo dos fármacos disponíveis nas clínicas, toxicidade elevada, interações medicamentosas, efeitos contraindicados, biodisponibilidade insuficiente do princípio ativo e emergência de cepas resistentes (MALHEIROS, 2002; SHIOZAWA et. al, 2007; ENDO et. al, 2010; RAMOS, 2015).

A opção por novas formas terapêuticas, a exemplo da própolis segue no foco das pesquisas por conter na composição química grupos fenólicos, os quais contribuem para as propriedades terapêuticas, a exemplo do potencial antibacteriano, anti-inflamatório, antiviral, antifúngico e imunomodulatório (BUENO-SILVA et. al., 2016; FREIRES et. al., 2016; GOMES et. al., 2016).

Segundo reporta Shiozawa et. al. (2007) “a microbiota vaginal normal é rica em *Lactobacillus* produtores de peróxido de hidrogênio, precursores de ácido láctico, que acarreta acidez (pH 4,5) do ambiente vaginal, dificultando a proliferação da maioria dos patógenos”. Esta patologia pode surgir em diferentes circunstâncias com gravidez, diabetes, obesidade, corticoterapia, drogas imunossupressoras e o uso de antibióticos. E o seu tratamento preconiza a administração de fármacos por via local, por exemplo, Clotrimazol, e oral tais como Fluconazol, Cetoconazol entre outros. No entanto, de acordo com Ramos (2015) o uso indiscriminado e generalizado de drogas antifúngicas contribui para o desenvolvimento de cepas resistentes a esses medicamentos adotados na terapêutica clínica, e afirma que é uma das causas para inadequação do paciente a terapia medicamentosa disponível.

Dentre elas a *Candida albicans* é ainda a que apresenta maior patogenicidade, principalmente nas lesões da mucosa oral associada ou não a outras bactérias a exemplo dos *Staphylococcus aureus*, que aumentam durante a evolução da doença. São patologias frequentemente encontradas em idosos, principalmente em portadores de prótese, crianças na primeira infância, mulheres viventes de áreas geologicamente muito quentes, pacientes que fizeram uso prolongado de antibióticos, diabéticos e imunossuprimidos, especialmente os acometidos pelo HIV/AIDS (VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

No que concerne ao *Staphylococcus aureus*, este é considerado uma bactéria pertencente ao grupo dos gram-positivos, e está presente na microbiota humana, podendo causar desde um simples processo inflamatório, como espinhas e furúnculos até evoluindo a patologias mais sérias como: endocardites, meningites, pneumonia, choque sépticos entre outras. Sendo, também, encontrado nas fossas nasais ou na pele de neonatos, crianças e adultos, e a partir desses sítios, alcançar outras regiões da pele e das mucosas. Caso as barreiras naturais, isto é, pele e mucosas, estejam comprometidas por trauma ou cirurgia, o *S aureus* pode se alojar no tecido e provocar uma lesão local (ROBERT, CHAMBERS, 2005, VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

Neste sentido, os produtos naturais surgem como forte opção alternativa e viável por fornecer uma nova abordagem medicamentosa para o tratamento de processos patológicos, dentre esses, os infecciosos, visto que revelam propriedades bioativas importantes, advindos da presença de metabólitos secundários como taninos, flavonoides e fenóis (CRAGG; NEWMAN, 2013). E dentre os antibióticos naturais, a própolis se destaca por apresentar conjunto de substâncias benéficas na sua composição, tal como flavonoides, as quais são indicadas como responsáveis pelas ações terapêuticas, e em especial a antifúngica (LUPION, CAMACHO, NEGRI, 2013).

Por sua vez, o território brasileiro é portador de diversas plantas apícolas, em que as abelhas desempenham papel importante para a manutenção da biodiversidade, além de produzir diversos produtos como, mel, própolis, entre outros. As interações entre as abelhas e plantas conferem aos materiais produzidos e coletados por elas uma incorporação de substâncias químicas, provenientes da organização e divisão de tarefas na busca por alimentos e manutenção da colmeia (REIDEL, 2014).

Diante do exposto, e considerando que a própolis é uma resina de coloração e consistência variada, (vermelha, verde, marrom entre outros), coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes da planta, e estas vem evidenciando atividades biológicas contra alguns microorganismos. De modo que, neste trabalho buscou investigar a composição química e o efeito antifúngico e antibacteriano do extrato da própolis preta *in vitro*, em leveduras do gênero *Candida* e bactérias do grupo *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a composição química e o efeito antifúngico e antibacteriano do extrato da própolis preta *in vitro* em levedura do gênero *Candida* e em bactéria do grupo *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar o extrato hidroalcoólico de própolis preta por dois métodos, a saber: maceração a quente e por Soxhlet, comparando qual apresenta melhor rendimento;
- Identificar a composição química do extrato da própolis preta por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Avaliar atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico da própolis preta e do Fluconazol usando o parâmetro do protocolo M44 – A2 do Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI) frente à cepa da *Candida*;
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis preta bruta e do Cloranfenicol usando os parâmetros do protocolo M2 – A8 do Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI) frente à cepa de *Staphylococcus aureus*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Sendo o Brasil, detentor de uma vasta biodiversidade a ser explorada, a exemplo da flora e fauna, é considerado um celeiro de estudos sobre novas substâncias úteis, como princípio ativo para a indústria farmacêutica, agroquímica entre outras (PINTO et. al, 2002). A partir dessas fontes naturais, destaca-se o setor apícola (SFORCIN, 2007; PEREIRA et. al., 2015), com seus extratos vegetais brutos ou frações, que congrega benefícios para a saúde humana, os quais vêm sendo investigados pela comunidade científica, em virtude da natureza ser uma fonte inesgotável a ser desvendada.

3.1 JUREMA PRETA (*MIMOSA HOSTILIS BENTH*)

A jurema preta, Figura 1, também conhecida como calumbi, jurema e espinheiro tem nome botânico da *Mimosa hostilis* Benth. Possuindo outros sinônimos como: *Acacia hostilis* Mart.; *Acacia tenuiflora* Willd.; *Mimosa cabrera* H.Karst.; *Mimosa hostilis* (C.Mart.) Benth.; *Mimosa limana* Rizzini. Considerada uma árvore arbustiva pertencente à família Fabaceae, da ordem das Fabales típica da caatinga, ocorrendo praticamente em quase todo nordeste brasileira, e também encontrada em El Salvador, Honduras, México, Panamá, Colômbia e Venezuela (MAIA-SILVA et. al, 2012).

Figura 1 *Mimosa hostilis* Benth, vulgarmente conhecida como Jurema preta



Fonte: <http://www.naturezabela.com.br/2011/05/jurema-mimosa-hostilis.html>

Por ser uma planta nativa da caatinga é muito bem adaptada para o clima semiárido, possui folhas pequenas alternas, compostas e bipinadas com vários pares de pinas opostas. Possui acúleos e apresenta bastante resistência às secas com grande capacidade de rebrota

durante todo o ano (BENEDITO, 2012). Ressalta-se a importância e a potencialidade da espécie para diversos fins tais como madeireiros, fabricação de carvão de alto valor energético (FARIA, 1984), na alimentação dos caprinos e bovinos (ARAÚJO, ANDRADE, 1983), e fins medicinais (SOUZA et. al, 2008).

Araújo et al.(2008) e Silva (2012) em seus estudos relatam que os constituintes ativos da jurema preta que tem sido descritos, são principalmente os esteroides, terpenoides, flavanoides e taninos. Sendo os taninos considerados um dos responsáveis por atividade contra bactérias, fungos, vírus e protozoários. Em virtude do clima nordestino, a jurema flora quase todo o ano facilitando sua exploração com a produção da própolis. Por sua vez, a literatura oferece raros relatos de suas propriedades farmacológicas exploradas, e em especial com a própolis preta, proveniente da Jurema preta (Figura 2).

Figura 2 *Apis mellifera* coletando os insumos para a produção da própolis preta proveniente da Jurema preta



Fonte: <http://chaves.recpol.org.br/>.

3.2 PRÓPOLIS

A própolis tem atraído o interesse dos pesquisadores nas últimas décadas, devido a várias propriedades biológicas e farmacológicas, mas, sabe-se que durante séculos vem sendo administrada extensivamente sob diferentes formas de uso pela humanidade desde os tempos remotos (SFORCIN, BANKOVA, 2011).

Segundo relatos de Pereira, Seixas, Aquino Neto, (2002) a própolis era conhecida como “cera preta” por vários povos dentre eles gregos, romanos e egípcios. Sendo, empregada como um medicamento na medicina local e popular em muitas partes do corpo. Para Ghisalberti (1979) e Bankova (2005), os egípcios beneficiaram das propriedades anti-putrefacientes da própolis a fim de embalsamar seus mortos. Esta também foi utilizada como anti-séptico e agente cicatrizante pelos médicos gregos e romanos. Assim como agente antipirético e as farmacopeias de Londres no século XVII, que listou a própolis como uma

droga oficial, e continua atualmente, como um remédio popular disponível sob forma pura ou combinada com outros produtos naturais em cosmética, e, também como um constituinte de alimentos saudáveis.

Na segunda guerra mundial, a própolis foi empregada em várias clínicas soviéticas destinadas a medicina humana e a veterinária, e era bastante aplicada como posologia para o tratamento da tuberculose, observando-se a regressão dos problemas pulmonares e recuperação do apetite (WOISKY; GIESBRECHT; SALATINO, 1994; PEREIRA et. al, 2015).

A própolis, (do grego *pro*: pra, em defesa e *polis*: cidade ou comunidade), é uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletada pelas abelhas a partir dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudados de árvores, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto (BANKOVA, CASTRO; MARCUCCI, 2000; PEREIRA et. al, 2015; FREIRES et. al., 2016). Apresenta-se variavelmente modificada, pois reflete suas origens de manufatura devido ao conjunto do ecossistema de onde ela é recolhida pelas abelhas. Com uma cor variável: amarelada, esverdeada clara, avermelhada ou parda escura. Sabor de suave balsâmico a forte, amargo e picante e sua consistência varia do maleável a ligeiramente rígida, quando em temperatura ambiente e rígida em temperaturas abaixo de 20 °C (PINTO et. al, 2001).

Vários trabalhos têm sido publicados divulgando e revisando as propriedades biológicas da própolis como, por exemplo, anti-inflamatório à até mesmo um grande inibidor cancerígeno. Além de também ser um poderoso fitoterápico empregado nas mais diversas patologias que são: antimicrobiana, antifúngica, antivirótica, antiprotozoário, bactericida e bacteriostática, anestésica, antioxidante, cicatrizante, anti-séptica e hipotensiva, hepatoprotetora, imunoprotetora, antitumoral e anti-HIVas antimicrobianas, antifúngica, antiprotozoária, antioxidante e antiviral (MIORIN, 2003; SFORCIN, 2007).

A literatura científica apresenta, hoje, que existem 10348 trabalhos publicados sobre a própolis nas mais diferentes áreas da ciência, divulgados no banco de dados dos Periódicos CAPES. E no âmbito de patentes tem-se um total de 1426 trabalhos depositados no Escritório Europeu de Patentes (EPO), e 79 trabalhos depositados no Brasil, conforme levantamento no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual - INPI em meados de 2018.

A composição química da própolis decorre de 50-60% de resinas e bálsamos aromáticos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais e até 5% de outras substâncias. Estão presentes ainda, microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês,

magnésio, silício, titânio, bromo, zinco e vitaminas B1, B2, B6, VIT C e E (PEREIRA et. al. 2015; ROBERTO et. al., 2016).

Os flavonóides, juntamente com ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas são considerados os mais importantes compostos antimicrobianos da própolis (CASTALDO; CAPASSO, 2002). A proporção destas substâncias presentes na própolis é variável em função do local e da época de coleta da mesma (STEPANOVIC et. al., 2003). Portanto, a origem geográfica da própolis é importante no controle de qualidade inclusive para sua efetiva aplicação terapêutica (PARK, ALENCAR, AGUIAR, 2002).

Roberto et. al. (2016) argumenta em sua pesquisa que após verificar a relação entre a variabilidade química da própolis e a fonte botânica utilizada pelas abelhas, busca-se identificar a principal fonte botânica para cada tipo de própolis. Park, Ikegaki e Alencar (2000), relatam que há 12 tipos diferentes de própolis brasileiras, conforme seus perfis químicos e regiões de coleta.

Segundo Pereira et al (2015), a maior parte dos trabalhos encontrados na literatura refere-se à própolis verde, e apenas nos últimos anos a própolis vermelha tem sido objeto de estudo por apresentarem ações antibacterianas e antifúngicas. A própolis verde brasileira é produzida por abelhas localizadas no sul do Estado de Minas Gerais e no norte do Estado de São Paulo, e o tipo de própolis tem o exsudado de folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*) como fonte botânica, vulgarmente conhecida como "alecrim-do-campo" (ROBERTO et. al., 2016). Enquanto que, a própolis vermelha brasileira, encontrada em alguns estados brasileiros como Sergipe, Paraíba, Pernambuco e Bahia, possui novos compostos bioativos com atividades biológicas, sendo uma delas a atividade antioxidante (DAUGSCH et. al, 2007; OLDONI et al., 2011).

3.3 CANDIDA

A Candida é uma levedura comensal que está presente na microbiota do corpo humano e animais, preconizando áreas superficiais da pele e tecidos dos tratos bucais, respiratório digestivo e urinário. Estas contam atualmente com cerca de 200 leveduras, sendo 20 espécies responsáveis por processos infecciosos nos seres humanos. Estas espécies são predominantemente leveduras uniformes, se dividindo por brotamento sendo capazes de formar pseudohifas, morfologia denominada dimórfica e polimórfica, possuindo capacidade de formar leveduras, pseudohifas e hifas verdadeiras (WHIBLEY, GAFFEN, 2015).

Dentre as espécies do gênero *Candida* a *Candida albicans* tem sido relatada como a mais acometente, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (LU, LEE, CHIUEH, 2004; PFALLER, DIEKEMA, 2007; SILVA, 2011). Segundo Silva (2011), estas leveduras representam cerca de 8-10% das causas de processos infecciosos sanguíneos nosocomiais em UTI's. Bem como, pessoas submetidas a exposição direta de seus sistemas fisiológicos tais como: pós-operatório crítico e demorado, procedimentos com insumos contaminados, queimaduras, etc. Tudo isso contribui para alteração da superfície celular de nosso organismo que facilita o processo de instalação e infecção por leveduras do gênero *Candida*.

3.3.1 Candidíase Vulvovaginal (CVV)

A candidíase vulvovaginal (CVV) se caracteriza por uma inflamação da vagina provocada pela infecção por *Candida sp.* Sendo um microrganismo responsável por mais de 80% dos casos de candidíase hospitalares (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003). A manifestação pode ocorrer nas mucosas, oral e vaginal, e cerca de 90% das infecções são causadas por espécies do tipo: *Candida albicans*, que corresponde a 50% do total, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (CARDOSO, 2013).

Segundo Dota et al (2011), a CVV é a primeira causa da vulvovaginite na Europa e a segunda nos EUA e Brasil, sendo que representa 20-25% de ocorrência vaginal de natureza infecciosa, e estima-se cerca de 75% das mulheres adultas mostraram pelo menos um episódio desta patologia durante suas vidas. E, em torno de 40 a 50% das pessoas sofrerão novos surtos e 5% atingirá o caráter recorrente.

Para Whibley e Gaffen (2015), as variações fenotípicas entre espécies de *Candida* existem com relação à morfologia, tamanho celular, requisitos de crescimento, composição da parede celular e distribuição de fatores de virulência. Várias espécies deste gênero são dimórficas, ou seja, crescem na forma de leveduras e pseudo-hifas, e *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida tropicalis* são considerados polimórficos, pois possuem a capacidade de formar leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras.

As leveduras de espécies de *Candida* em cultivo são células pequenas e redondas e formam colônias brancas e brilhantes, e, portanto, ao serem submetidas a alterações morfológicas, as colônias podem apresentar células cinza ou opacas, ou mesmo ambas. E, além das diferenças morfológicas, podem diferenciam-se quanto à expressão gênica, reprodução e virulência (TAO et al., 2014).

Bittencourt (2008), relata que as pacientes acometida da *Candida sp*, podem ou não apresentar sintomas, tais como, corrimento espesso e esbranquiçado, prurido, avermelhamento da parte exterior da vagina e irritação ao urinar. A patogenicidade de *Candida spp.*, relaciona-se a fatores a exemplo da virulência como habilidade de crescimento a 37 °C, pH fisiológico, tamanho celular, plasticidade fenotípica, adesão às células dos hospedeiros, formação de biofilmes, tropismo e a produção de enzimas extracelulares, proteinases, fosfolipases e lipase.

Sobel, Faro e Force (1998) enfatizam que a prescrição dos exames laboratoriais são citológicos e culturas, por onde o diagnóstico pode ser estabelecido. Em alguns casos a *Candida* pode ser encontrada na vagina, sem causar sintomas, fazendo parte da sua microbiota normal. Isto é relativo devendo estar a paciente com a sua imunidade em bons padrões de referência (HURLEY, 1981; OLIVEIRA; SOARES, 2007).

Os efeitos terapêuticos advindos da própolis são atribuídos à presença de compostos fenólicos. Sendo que os flavonoides são considerados os principais componentes químicos na própolis (BANKOVA et. al., 2005). Logo, a literatura científica reporta estudos com o uso da própolis no controle de fungos e leveduras patogênicos ao homem, comprovando-se a sua eficácia (FERNANDES CORREIA, 2016; HAGHOOST et.al, 2016).

3.3.2 Atividade Antifúngica

Estudos reportam sobre a eficácia de varias atividade utilizando à própolis, dentre elas a atividade antifúngica da própolis contra a *C. albicans* (RAMOS, MIRANDA, 2007; SHOKRI, KROSRAVI, YALFANI, 2011; BUENO-SILVA et al, 2016). Para D'Auria et al. (2003) a própolis inibe a atividade da enzima extracelular fosfolipase e prejudica a adesão das células fúngicas das células epiteliais.

Estudos de Metzner et al (1977) citado por Fernandes Correia (2016) comprovou o efeito fungicida da própolis sobre *Candida*, *Sacharomyces* e *Cryptococcus*, e relacionou este efeito a presença de flavanoides pinocembrina.

Bittencourt et al (2014) testou a atividade antimicrobiana da própolis vermelha sergipana frente à *Candida albicans*, e desenvolveu formulações semi-sólidas de uso vaginal contendo este principio ativo e verificou o potencial antifúngico, concluindo que o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha inibiu o crescimento *Candida albicans* - in vitro e apresentou ação fungicida mínima de 647,5 µg/mL. Observou ainda que, dentre as bases estudadas, a que melhor se destacou físicoquimicamente para a incorporação e veiculação do

ativo, apresentando o melhor excipiente na ação antifúngica da própolis vermelha foi o creme Lanette® ($16,33 \pm 0,58$).

3.4. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Staphylococcus aureus pertencente à família Micrococcae, possui 33 espécies de gênero, dentro delas, 17 podendo ser isoladas de material biológico humano. Esse gênero que faz parte do ambiente comensal do homem trás maior interesse, em virtude de ser o principal causador de infecções oportunistas ou não das áreas hospitalares (CASSETTARI, STRABELL, MEDEIROS, 2005).

De acordo com Carvalho et. al. (2005), Alexandre Ogston estudou essa bactéria que se apresenta na forma de cocos Gram e catalase positivo, medindo aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não esporulados e geralmente não encapsulados, podendo apresentar-se em diversas formas, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupadas irregularmente, com aspecto semelhante a um cacho de uvas.

As cepas de *S. aureus* crescem em meios comuns, caldo ou ágar simples, pH igual a 7, e temperatura entre 35-37 °C. Formando colônias arredondadas, lisas e brilhantes, apresentando cores que vão do acinzentado ao dourado bem leve, após 18-24 horas, podendo-se observar crescimento entre 24 – 48 horas, após incubação. Essa espécie se desenvolve também na presença de 7,5% de NaCl, que estimula a produção de coagulase, enzima que caracteriza a espécie (KONEMAN et. al, 2001).

De modo comensal, possui grande resistência, à dessecação e ao frio, podendo ser transportados e viver em grãos de poeira. O homem é o seu principal meio de cultura, pois habita por quase todo o sistema fisiológico, desde as arvores respiratórias, passando por intestinos até sobrevivendo sobre sua própria pele. As narinas são seu maior campo de colonização, cerca de 40%. Então, se torna evidente que as pessoas do âmbito hospitalar, funcionam como verdadeiros meios de cultura para esta bactéria. Tendo em vista que ao encontrar um espaço epitelial comprometido por traumas ou procedimentos cirúrgicos venham alojar-se causando processos infecciosos com grau de evolução, que vão desde ao processo natural da barreira imunológica da pele até ao processo invasivo pela falha do sistema imunológico do paciente, estando esse comprometido ou por causa de alguma cepa resistente (CAVALCANTI, 2005).

3.4.1 Atividade Antibacteriana

Gomes et al (2016), verificou a atividade antibacteriana *in vitro* da própolis vermelha, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), e observou que o extrato alcoólico de própolis apresentou atividade antimicrobiana com CIM variando de 2,25 a 18,9 mg/mL para as bactérias Gram-positivas e 4,5 a 18,9 mg/mL para as bactérias Gram-negativas, sendo as bactérias provenientes de bovinos e caninos as mais resistentes, e concluiu que a própolis vermelha tem ação bactericida, em função da espécie da bactéria e da procedência animal.

Bastos et al (2008) em seus estudos revelaram que a própolis vermelha brasileira possui uma ação biológica antibacteriana melhor quando comparado aos resultados dos extratos norte americanos. Para Dausch et al (2007), as amostras de própolis vermelha oriundas da região nordeste possui uma alta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Em concentrações próximas a 2,5 µg/ml.

Segundo Alencar et al. (2007) observaram que tanto o extrato etanólico e como a fração clorofórmica da própolis brasileira, apresentaram uma potente atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Castro et. al (2007), afirma que a atividade antibacteriana da própolis pode estar relacionada diretamente à presença de compostos fenólicos e flavonoides, onde a maior concentração desses compostos bioativos determina uma maior atividade antibacteriana.

Ferreira (2017) argumenta na sua redação que o “estudo mais antigo da atividade antibacteriana da própolis foi realizada por Kivalkina na década de 1940 demonstrando que a própolis utilizada possuía atividade bacteriostática contra *Streptococcus*, contra o bacilo da febre tifóide, e algumas outras bactérias. Em outro exemplo o uso da própolis inibiu completamente o crescimento de *Staphylococcus aureus*, incluindo a estirpe MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina). Também inibindo o crescimento de *Escherichia coli* parcialmente, indicando assim um efeito preferencial em cocos e bacilos Gram-positivos”.

4 MATERIAIS E METODOS

Esta é uma pesquisa experimental que assume caráter exploratório e descritivo, com abordagem quali-quantitativa e em escala de laboratório.

4.1 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia do Centro de Vocação Tecnológica (CVT) e no Laboratório de Química, ambos, do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar (CCTA), da Universidade Federal de Campina Grande, campus Pombal, PB.

O experimento foi realizado entre novembro de 2017 a fevereiro de 2018, em escala laboratorial no CVT/UFMG.

4.2 MATERIAIS

A própolis utilizada nesse experimento foi adquirida na cidade de João Pessoa-PB no Apiário EDIMEL.

Já as leveduras do gênero *Candida* utilizadas na pesquisa foram obtidas por doação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, onde as mesmas fazem parte da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária. Os dados sobre cada espécime da pesquisa estão expostas no Quadro 1.

Quadro 1 Informações sobre as leveduras do gênero *Candida* utilizadas na pesquisa de acordo com INCQS/CMRVS/FIOCRUZ

Nº de acesso no INCQS*	Nº de acesso na ATCC [^]	Microrganismo	Fonte de isolamento
INCQS 40042	ATCC 13803	<i>C. tropicalis</i>	Espécime clínico humano
INCQS 40135	ATCC 62894	<i>C. fumata</i>	Ponta de cateter intravenoso
INCQS 40178	ATCC 60193	<i>C. albicans</i>	Colo do útero humano
INCQS 40304	ATCC 96139	<i>C. orthopsilosis</i>	Cateter para aferir pressão venosa
INCQS 40305	ATCC 96144	<i>C. parapsilosis</i>	Mão humana
INCQS 40329	ATCC 96143	<i>C. metapsilosis</i>	Espécime clínico humano

Fonte: Elaborado pelo autor com dados extraídos do INCQS/CMRVS/FIOCRUZ (2017). *Número de identificação da cepa no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; ^ Número de identificação da cepa no American Type Culture Collection.

Para a amostra de bactéria de *Staphylococcus aureus*, esta foi cedida pelo Laboratório de Microbiologia do Centro de Formação de Professores (CFP) da Universidade Federal de Campina Grande.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Obtenção do pó de própolis preta para a sua extração

A extração da própolis preta foi realizada no laboratório de análises físico-químicas do CVT e no laboratório de química, ambos da UFCG, seguindo a metodologia proposta por Dausch et al. (2007), com modificações. A própolis preta bruta foi congelada a -18 °C por 24 horas e macerada de modo mecânico em liquidificador industrial de alta rotação (Vithory), para obtenção do pó de própolis preta, Figura 3.

Figura 3 Pó de própolis preta obtida pelo processo de extração



Fonte: autoria própria.

4.3.2 Elaboração do extrato hidroalcoólico da própolis preta

4.3.2.1 Por maceração a quente

Para esta extração foram utilizadas 8 g da própolis preta bruta em 100 mL de álcool etílico a 70%, o material foi incubado em banho-maria estático a 50 °C por 30 minutos com agitação manual a cada 5 minutos. Em seguida, a solução ficou em maceração por 48 horas à temperatura ambiente, sendo submetidas a agitações manuais periódicas a cada 2 horas com o intuito de evitar precipitação das ceras e melhor extração dos componentes da própolis no álcool etílico a 70%. A amostra foi filtrada a vácuo e centrifugada a 3.500 rpm por 10 minutos, a 1 °C em centrífuga refrigerada NT 815. O sobrenadante foi levado para rota evaporação a 48 °C , a fim de evaporar todo o solvente, e concentrar o extrato hidroalcoólico

de própolis preta bruta. O material foi pesado e o rendimento da extração calculado em relação à massa inicial utilizada e expresso em porcentagem.

4.3.2.2 Por Soxhlet

Aproximadamente 8 g de própolis bruta foram acondicionados em cartucho preparado com papel filtro, previamente seco em estufa a 105 °C, por 1 hora, e pesado. Aproximadamente 150 mL de álcool etílico 70% foram adicionados ao balão destinado ao solvente. O sistema foi mantido sob refluxo, por aproximadamente 3 horas a 60 °C (WOISKY, SALATINO, 1998). Após resfriamento, o extrato foi vertido em um balão de fundo chato e o sobrenadante foi levado para rota evaporação, em que se obteve o extrato hidroalcoólico de própolis preta bruta.

Após evaporação do solvente, obteve-se o concentrado do extrato, sendo o material pesado e o rendimento da extração calculado em relação à massa inicial utilizada e expresso em porcentagem.

4.3.3 Identificação do perfil químico do extrato de própolis preta bruta por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O perfil químico do extrato de própolis preta bruta foi determinado pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência desenvolvida em colaboração com o Laboratório de Combustíveis e Materiais da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.

A metodologia utilizada para esta análise seguiu o protocolo descrito por Zhao, Dong, Sun (2009), com adaptações para analisar os compostos fenólicos presentes no extrato foi, usado o módulo de separação (LC-20 AT, Shimadzu Corporation, Japão) equipado com uma coluna de 18 cadeias de Carbono em fase reversa (SUPELCOSIL™ LC-PAH CLAE Column, 250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e um detector UV-VISÍVEL (Rheodyne, EUA).

A amostra foi aluída em um sistema gradiente que consistiu nas seguintes fases móveis: solvente A (2% de ácido acético, v/v) e solvente B (acetonitrila: metanol, 2:1, v/v), em fluxo constante de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e o volume de injeção foi de 20 µL.

Os picos dos compostos fenólicos foram monitorizados a 280 nm e os espectros de absorção de UV-VIS foram registrados em linha a partir de 200 para 600 nm durante a análise por CLAE.

Os compostos fenólicos foram identificados por meio da comparação dos tempos de retenção com os padrões de ácidos fenólicos e flavonoides, sendo quantificados em concentrações de mg/mL. Os cromatogramas foram registrados em software tipo LabSolutions Data System.

4.3.4 Reidratação e sementeiras das culturas de leveduras do gênero *Candida*

As amostras obtidas conforme descritas no item 4.2, foram transportadas liofilizadas até o CVT/UFCG em ampolas de vidro seladas a vácuo (Figura 4), mantidas em caixa UN 3373, embalagem própria para o transporte de material biológico classe B. No laboratório de microbiologia do CVT/UFCG as ampolas foram preparadas para o processo de reidratação, em condições assépticas. Estas foram desinfetadas com álcool etílico a 70%, e a parte superior da ampola foi aquecida pela chama do bico de Bunsen, e resfriada com algumas gotas de solução salina (NaCl 0,85g/L), promovendo a quebra do vidro por choque térmico. Posteriormente, com o auxílio de uma micropipeta, 500 µL de água deionizada foram ressuspensos com o sedimento, homogeneizando-os.

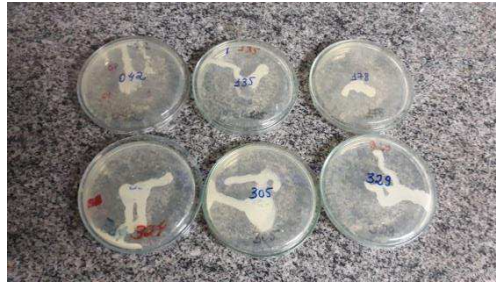
Figura 4 Ampolas de vidro com as espécies de *Candida* spp. Liofilizadas



Fonte: autoria própria.

A suspensão formada foi semeada por esgotamento com o auxílio de uma alça de Drigasky na superfície de placas de Petri, contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose, acrescido de cloranfenicol (50 mg/L) e incubado a 35 °C em estufa de cultivo por 72 horas. Após o surgimento das colônias, foram realizadas análises por exame direto com azul de metileno para identificação da morfologia das espécies (Figura 5). Em seguida, as amostras foram mantidas a temperatura de 35 °C até o final do experimento. Ressalta-se que, devido às amostras já terem sido identificadas em nível de espécie, não foi realizado nenhum teste taxonômico confirmativo dos isolados clínicos de *Candida* spp.

Figura 5 Levedura do gênero *Candida* cultivados



Fonte: autoria própria.

4.3.4 Repicagem da bactéria *Staphylococcus aureus*

De posse da amostra de bactéria de *Staphylococcus aureus*, fez-se a repicagem partindo de uma alíquota dessa bactéria em meio de cultura Ágar Mueller-Hinton (Difco), suplementado com 2% de glicose (Difco) e 0,5ul/mL de azul de metileno (Neon). Posteriormente, foram encubados em estufa a 35 °C por 48 horas. Após a encubação, seguiu-se para a etapa de teste de difusão em disco.

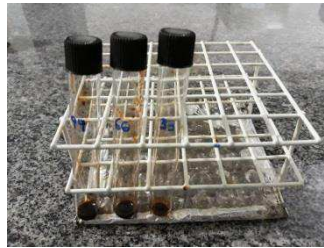
4.3.5 Teste de difusão em disco

4.3.5.1 Para *Candidas spp*:

A sensibilidade das leveduras frente às substâncias avaliadas seguiu o protocolo M44-A2 (CLSI, 2009) e foi determinada pela técnica de difusão em disco, que foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia do CVT/UFMG. O meio de cultura utilizado foi o Ágar Mueller-Hinton (Difco) suplementado com 2% de glicose (Difco) e 0,5ul/mL de azul de metileno (Neon) com pH 7,2 a 7,4 e as substâncias avaliadas foram o Fluconazol (Cimed) na concentração de 25 mg/mL e o extrato hidroalcoólico de própolis preta em concentrações variando de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%).

Para o desenvolvimento da técnica de sensibilidade em difusão em disco, o extrato hidroalcoólico de própolis preta bruta foi diluído nas concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%) (Figura 6), onde com o auxílio de uma micropipeta calibrada (Digpet), foi retirada a quantidade de 20µL do extrato hidroalcoólico de própolis preta bruta acrescentando ao mesmo álcool etílico a 70% para promover a diluição.

Figura 6 Diluições do extrato hidroalcoólico de própolis preta bruta para as concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%).



Fonte: autoria própria.

O medicamento convencional fluconazol (Cimed) também foi diluído para produção dos discos. Inicialmente, o medicamento oral se apresentava na concentração inicial de 150 mg/mL, onde após a diluição em água destilada para medicamento (Isofarma), a concentração foi transformada para 25 mg/mL.

Os discos foram confeccionados em papel de filtro medindo 6 mm de diâmetro, onde foram previamente autoclavados e armazenados até a data da sua produção. Antes do início do teste, os discos de papel foram separados em placas de Petri e com o auxílio de um micropipeta foram embebidos de 20 μ L do extrato hidroalcoólico de própolis preta nas concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%) em cada. Este processo também ocorreu para produção dos discos do antifúngico fluconazol (Cimed), na concentração de 25 mg/mL, em que foi utilizado como controle positivo e com o álcool etílico a 70%, que foi utilizado como controle negativo (Figura 7).

Figura 7 Discos do extrato hidroalcoólico de própolis preta nas concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%), e do fluconazol na concentração de 25 mg/mL e do álcool etílico a 70%, respectivamente.



Fonte: autoria própria.

Para desenvolvimento dos testes em disco de difusão as *Candidas spp* foram reativadas, semeadas em meio SDA (Difco) e incubadas a 35 °C por 24 horas.

As suspensões das *Candidas spp* isoladas foram preparadas em solução salina (NaCl 0,85 g/L), e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland entre 88 a 92% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530 nm, garantindo, que a concentração do inóculo estivesse entre 1×10^6 a 5×10^6 células por mL.

Posteriormente, foram realizados semeios com a solução descrita acima com *Candida spp*, em placas contendo o meio Ágar Mueller-Hinton (Difco) suplementado com 2% de glicose (Difco) e 0,5 ul/mL de azul de metileno (Neon) pela técnica de esgotamento com swab, cobrindo todo o meio com estrias; 15 minutos após este processo, os discos embebidos com as substâncias a serem testadas foram distribuídos na placa com o auxílio de uma pinça previamente esterilizada.

Após o posicionamento dos discos, as placas foram colocadas em geladeira por 15 minutos para promover o início da difusão do extrato hidroalcoólico de própolis preta no meio e, concomitantemente, foram incubadas de modo invertido a 35 °C em estufa microbiológica por 48 horas para determinação da sensibilidade das amostras.

O tamanho do halo de inibição foi medido com paquímetro e correlacionado com a escala de sensibilidade para fluconazol (Cimed) presente nos documentos M44-A2 (2009, CLSI) para leveduras de *Candida sp*. Como não existe uma escala de sensibilidade para produtos naturais, no entanto, autores como Portilho et al. (2013), consideram uma escala de até 50% em referência ao fluconazol.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados, expressos em mm, foram calculados pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas duas repetições. Os pontos de corte para interpretação dos resultados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Critérios de interpretação para determinação da sensibilidade as substâncias avaliadas para os isolados de *Candida spp.*, pela técnica de difusão em disco

Substância avaliada	Sensível (S)	Sensibilidade Dose dependente (SDD)	Resistente (R)
Fluconazol	≥ 19 mm	15-18 mm	≤ 14 mm
Extrato hidroalcoólico de própolis verde	$\geq 9,5$ mm	8-9 mm	≤ 7 mm

Fonte: Elaborado pelo autor com dados extraídos do CLSI (2009) e PORTILHO et al. (2013).

4.3.5.2 Para *Staphylococcus aureus*

A sensibilidade das bactérias frente às substâncias avaliadas seguiu o protocolo M2-A8 (CLSI, 2009) e foi determinada pela técnica de difusão em disco, que foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia do CVT/UFMG. O meio de cultura utilizado foi o Ágar Mueller-Hinton (Difco) suplementado com 2% de glicose (Difco) e 0,5ul/mL de azul de metileno (Neon) com pH 7,2 a 7,4 e as substâncias avaliadas foram o Cloranfenicol na concentração de 30 mg/mL e o extrato hidroalcoólico de própolis preta em concentrações variando de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%).

Para o desenvolvimento da técnica de sensibilidade em difusão em disco, o extrato hidroalcoólico de própolis preta bruta foi diluído nas concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%), onde com o auxílio de uma micropipeta calibrada (Digpet), foi retirada a quantidade específica do extrato hidroalcoólico de própolis preta bruta acrescentando ao mesmo álcool etílico a 70% para promover a diluição.

O medicamento cloranfenicol também foi diluído para produção dos discos. Inicialmente, o medicamento oral se apresentava na concentração inicial de 50 mg/mL, onde após a diluição em água destilada a concentração foi transformada para 30 mg/mL.

Os discos foram confeccionados em papel de filtro medindo 6 mm de diâmetro, onde foram previamente autoclavados e armazenados até a data da sua produção. Antes do início do teste, os discos de papel foram separados em placas de Petri e com o auxílio de um micropipeta foram embebidos de 20 µL do extrato hidroalcoólico de própolis preta nas concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%) em cada. Este processo também ocorreu para produção dos discos do antibacteriano Cloranfenicol, na concentração de 30 mg/mL, em que foi utilizado como controle positivo e com o álcool etílico a 70%, que foi utilizado como controle negativo (Figura 8).

Figura 8 Discos do extrato hidroalcoólico de própolis preta nas concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%), e do cloranfenicol na concentração de 30 mg/mL e do álcool etílico a 70%, respectivamente



Fonte: autoria própria.

Para desenvolvimento dos testes em disco de difusão de *Staphylococcus aureus* foram reativadas, semeadas em meio SDA (Difco) e incubadas a 35 °C por 24 horas. Para as suspensões dos *Staphylococcus aureus*, estas foram preparadas em solução salina (NaCl 0,85 g/L), e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland entre 90 a 92% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 625 nm, garantindo, que a concentração do inóculo estivesse entre 1×10^6 a 5×10^6 células por mL.

Posteriormente, foram realizados semeios com a solução descrita acima, em placas contendo o meio Ágar Mueller-Hinton (Difco) suplementado com 2% de glicose (Difco) e 0,5 ul/mL de azul de metileno (Neon) pela técnica de esgotamento com swab, cobrindo todo o meio com estrias; 15 minutos após este processo, os discos embebidos com as substâncias a serem testadas foram distribuídos na placa com o auxílio de uma pinça previamente esterilizada.

Após o posicionamento dos discos, as placas foram colocadas em geladeira por 15 minutos para promover o início da difusão do extrato hidroalcoólico de própolis preta no meio e, concomitantemente, foram incubadas de modo invertido a 35 °C em estufa microbiológica por 48 horas para determinação da sensibilidade das amostras.

O tamanho do halo de inibição foi medido com paquímetro e correlacionado com a escala de sensibilidade para Cloranfenicol presente nos documentos M2-A8 (2005, CLSI) para bactérias. Como não existe uma escala de sensibilidade para produtos naturais, no entanto, autores como Portilho et al. (2013), consideram uma escala de até 50% em referência ao Cloranfenicol.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados, expressos em mm, foram calculados pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas duas repetições. Os pontos de corte para interpretação dos resultados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 Critérios de interpretação para determinação da sensibilidade as substâncias avaliadas para os isolados de *Staphylococcus aureus.*, pela técnica de difusão em disco

Substância avaliada	Sensível (S)	Sensibilidade Dose dependente (SDD)	Resistente (R)
Cloranfenicol	≥ 27 mm	19-26 mm	≤ 18 mm
Extrato hidroalcoólico de própolis verde	≥ 10 mm	8-9 mm	≤ 7 mm

Fonte: Elaborado pelo autor com dados extraídos do CLSI (2005) e PORTILHO et al. (2013).

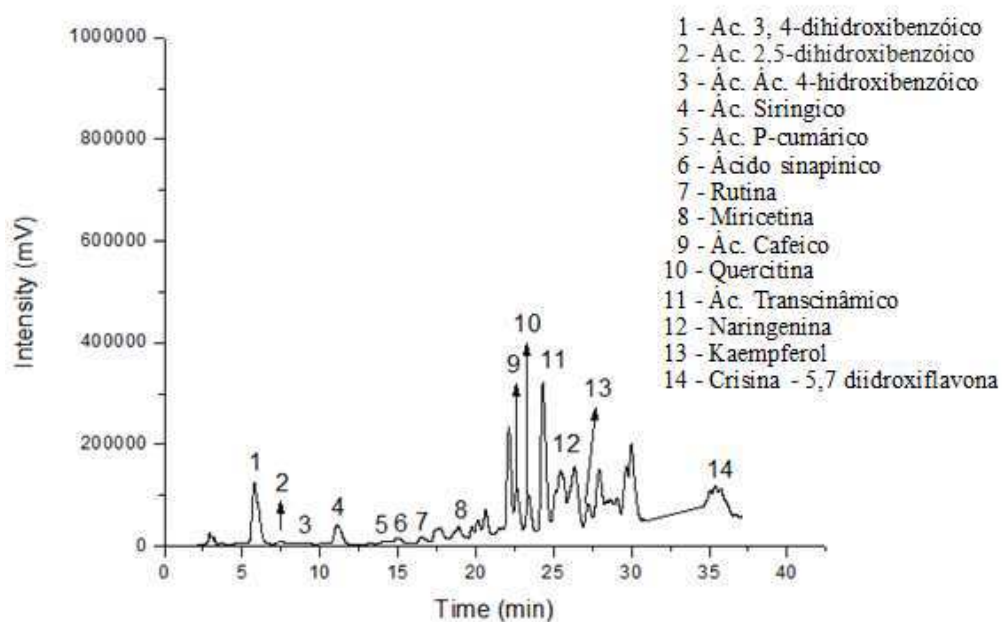
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS PRETA BRUTA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A literatura científica evidencia que mais de trezentas substâncias tem sido identificada em amostras de própolis, das quais se destacam: os flavonoides (galangina, crisina, tectocrisina, pinocembrina, canferol e quercetina), além dos aldeídos aromáticos (vanilina e isovanilina), cumarinas, ácidos fenólicos (ácido caféico, ferúlico, cinâmico e cumárico), ácidos orgânicos (ácido benzóico), ácidos e ésteres alifáticos e aromáticos, açúcares, alcoóis, ácidos graxos, aminoácidos, esteroides, cetonas, chalconas e diidrochalconas, terpenoides e proteínas. Dentre estas classes de substâncias, destacam-se a dos flavonoides e a dos ácidos fenólicos, com inúmeras atividades biológicas descritas para a própolis, segundo Salgueiro e Castro (2016).

Para tanto, a análise cromatográfica do extrato de própolis preta bruta detectou a presença e quantificou 14 compostos (Figura 9), identificado dentre eles: o ácido 3,4-dihidroxibenzoico, rutina, ácido transcimâmico, miricetina, kampferol, quercitina, naringenina entre outros, sendo os encontrados em maiores concentrações.

Figura 9 Cromatograma do extrato de própolis preta bruta (80mg/mL)



Fonte: Software tipo LabSolutions Data System.(2017).

Os principais compostos químicos presentes no extrato de própolis, são reconhecidos na literatura por apresentarem significativas propriedades anti-inflamatória, cicatrizante, anestésica, anticarcinogênica, antiviral, antioxidante e fitotóxica têm sido atribuídas à própolis e aos seus constituintes (SFORCIN, BANKOVA, 2011). Logo, o perfil cromatográfico com as suas respectivas concentrações, correspondente a cada composto químico presente na amostra do extrato da própolis preta obtida nesta pesquisa, seguem exposto na Tabela 3.

Tabela 3 Resultados da CLAE, apresentando os nomes dos compostos químicos, tempo de retenção e concentração dos compostos químicos no extrato de própolis preta bruta (80 mg/mL)

Nome dos compostos químicos	Tempo de retenção (min)	Concentração do extrato de própolis preta bruta (mg/mL)
Ác. 3,4-dihidroxibenzoico	5,772	14,19
Rutina	7,568	12,71
Ác. 2,5-Dihidroxibenzoico	8,492	0,80
Ác. <i>p</i> -cumárico	10,114	0,35
Ác. 4-hidroxibenzoico	14,167	0,41
Ác. siringico	14,98	2,55
Ác. Cafeico	16,544	3,48
Quercitina	18,892	5,54
Miricetina	22,62	6,09
Ác. Transcinâmico	23,392	6,25
Ácido sinapínico	24,313	3,56
Naringenina	25,445	5,35
Kaempferol	27,223	5,71
5,7 diidroxiflavona	35,733	1,90

Fonte: Elaborado pelo autor com dados extraídos dos resultados da pesquisa (2017).

Pode ser constatado na Tabela 3, os compostos químicos que apresentaram maiores concentrações na própolis preta foram o ácido 3,4-dihidroxibenzoico (14,19 mg/mL), a Rutina (12,71 mg/mL), o ácido transcinâmico (6,25 mg/mL), sendo esses responsáveis por atividade antioxidante e antibacteriana (OLIVEIRA et al., 2016).

Também, foram detectadas presenças de compostos flavanoides tais como: a miricetina, kaempferol, quercitina, crisina e naringerina, as quais atuam como à captura/eliminação de radicais livres, quelação de metais e inibição da peroxidação lipídica, que são responsáveis pelos danos oxidativos de lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, sendo consideradas agentes antioxidantes (BACH, 2017).

Para Matsubara e Rodrigues-Amaya (2006) em seu estudo afirma que o sistema eco botânico do nordeste, apresenta excelentes fontes flavanoicas (quercitina, miricertina e kaemferol) em diversos tipos de plantas, tais como: as erva cidreira (*Cymbopogon citratus*), hortelã (*Mentha piperita* L.), boldo (*Peumus boldus*), Erva doce (*Foeniculum vulgare*) e Camomila (*Matricaria chamomilla*), e estas atuam em ações antiinflamatória, antimicrobiana e antiparasitária.

Simões et. al. (2004) também constata estudando a própolis verde brasileira, proveniente de São Paulo e Minas Gerais, que a concentração de flavanoides é mais elevada, e significativa, em relação à própolis oriunda da Europa, America do Norte e Asia.

5.2 RENDIMENTOS DAS EXTRAÇÕES HIDROALCOOLICAS DA PRÓPOLIS PRETA

A busca por um método de extração que seja eficiente, prático e que gere baixo custo benefício, é um ponto a ser considerado quando se trata de compostos bioativos, Visto que, deve ser observado parâmetro como solvente, tempo e temperatura, segundo Carvalho et al (2001).

Neste sentido, o rendimento calculado para os processos de extração hidroalcoólica da própolis por maceração a quente e por soxhlet foram, respectivamente, 43,6% e 57,6%. Resultados estes com diferença significativa de 14%. Sugerindo que a extração por soxhlet apresentou melhor eficiência, em virtude de redução de tempo e aumento na temperatura.

Tal observação pode ser corroborada com outros autores, tais como: Oliveira et. al (2016) e Cunha et. al. (2004) em que estudaram a influencia das técnicas extrativas no cálculo de rendimento em compostos bioativos, constatando que o uso do Soxhlet reduz o tempo de extração e aumenta o rendimento. Cunha et. al (2004) também observou que não há na maceração diferenças entre extratos macerados na presença ou ausência de luz em relação ao rendimento, conteúdo fenólico ou composição.

5.3 REIDRATAÇÃO E SEMEADURAS DAS LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA*

Com relação à reidratação e semeadura das culturas de leveduras do gênero *Candida*, 100% das amostras apresentaram crescimento satisfatório para o desenvolvimento dos testes de sensibilidade. A microscopia das amostras foi positiva para a morfologia das espécies de *Candida spp.* Após crescimento visível, cada espécie de levedura foi semeada em seu meio a ser testado quanto a sua atividade frente ao extrato de própolis preta e suas diluições.

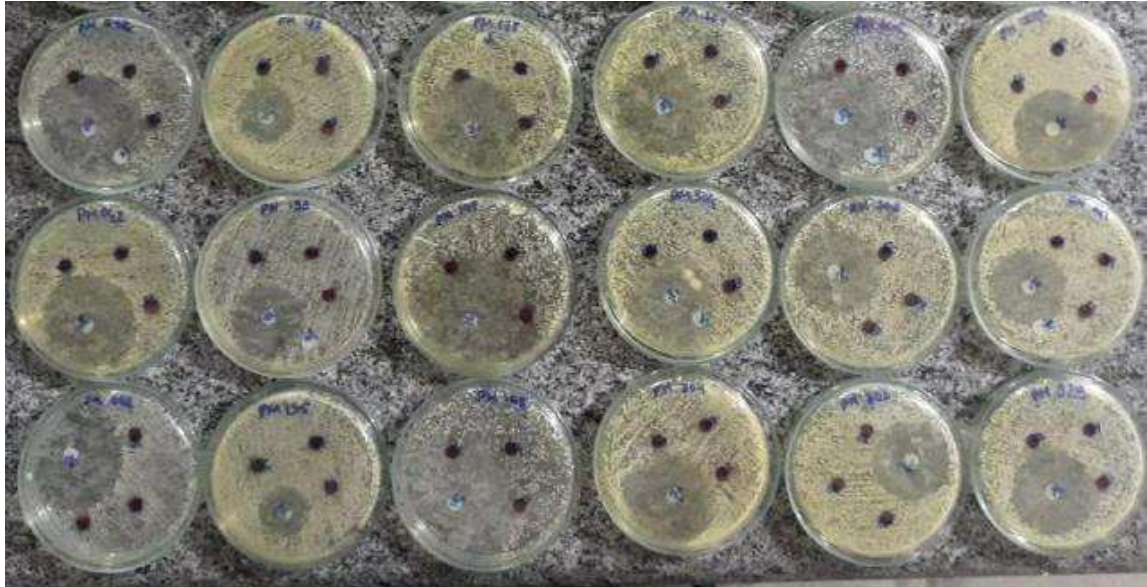
5.4 TESTES DE DIFUSÃO EM DISCO

5.4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS PRETA E DO FLUCONAZOL POR DIFUSÃO EM DISCO

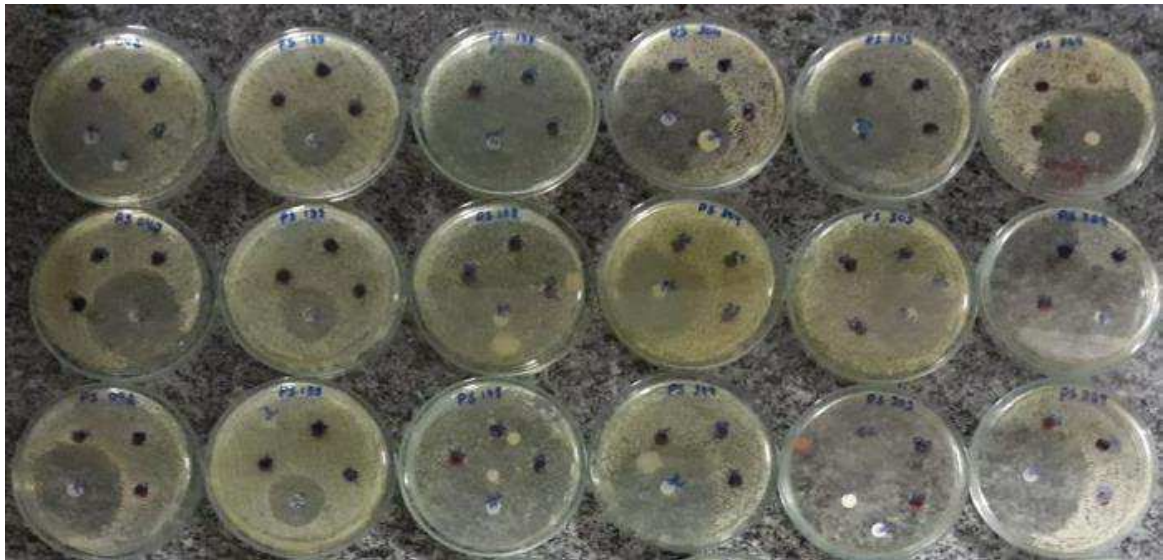
De acordo com os resultados para o teste de difusão em disco (Figura 10), o extrato hidroalcoólico de própolis preta foi testado nas concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%), bem como do fluconazol na concentração de 25 mg/mL e do álcool etílico a 70%, todos frente ao crescimento das espécies de *Candida*, a seguir: *C. tropicalis* (ATCC 13803), *C. fumata* (ATCC 62894), *C. albicans* (ATCC 60193), *C. orthopsilosis* (ATCC 96139), *C. parapsilosis* (ATCC 96144) e *C. metapsilosis* (ATCC 96143). E, por sua vez foram observados que as *Candidas* em relação ao extrato hidroalcoólico da própolis preta e do álcool etílico a 70% mostraram-se resistentes, enquanto para o marcador antifúngico fluconazol foram sensíveis.

Ressalta-se que os testes de difusão em disco foram realizados com os extratos hidroalcoólicos da própolis preta obtida tanto por método de maceração (Figura 10a) como por soxhlet (Figura 10b), e os resultados foram iguais.

Figura 10 Teste de difusão em disco com as cepas das *Candida*, adotando o extrato hidroalcoólico da própolis preta por (A) método de maceração a quente e (B) por soxhlet.



(A)

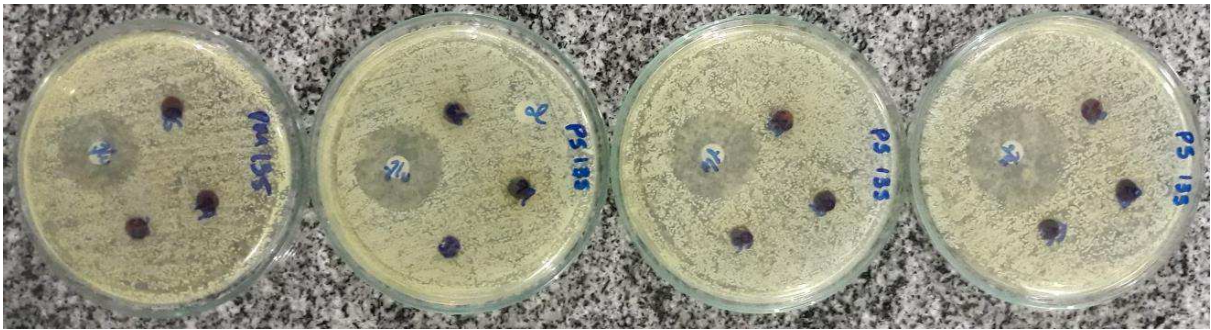


(B)

Fonte: autoria própria.

A Figura 11 ilustra uma melhor visualização da ação da levedura sobre o álcool etílico a 70%, revelando a não interferência do seu crescimento.

Figura 11 Figura em maior aumento da ação resistente das *Candidas* sobre a própolis preta.



Fonte: autoria própria.

Lindal e Taegson, (1993), observou que a quercitina, possui importante papel na ação da fosfolipase A2, mediador que impede sinalizadores de inflamação. Agregada a rutina, ambos, desempenha importante papel anti-inflamatório, já que inibe a atividade da ciclooxigenase (COX) e da lipooxigenase. Fator este que diminui a liberação da isoforma indutível da Cox. E, portanto, essas duas substâncias podem diminuir a ação antifúngica. A sua atividade antibacteriana principalmente com relação às bactérias gram positivas é potencializada, se a rutina for combinada com ácidos aromáticos e seus ésteres, principalmente na sua composição.

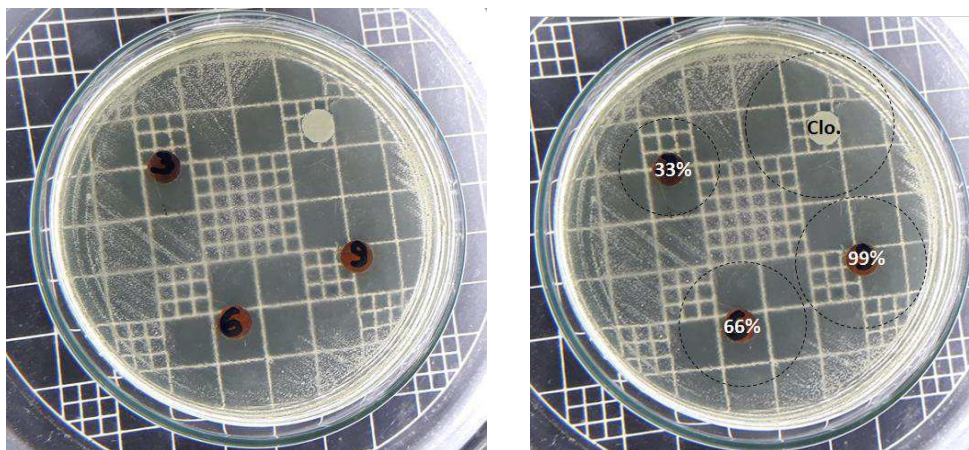
Silici et al. (2005) afirmam que dentro de um mesmo apiário existem diferentes espécies de abelhas, que produzem própolis com composições variadas, e, estudou ainda, quatro tipos de abelhas: *Apis melífera caucásica*, *Apis melífera anatolica* e *Apis melífera carnica*, em a relação a sua atividade antifúngica e dentre elas a *Apis melífera caucásica* foi a que apresentou menor efeito antifúngico.

Neste contexto, esses estudos corroboram com os resultados encontrados neste trabalho, visto que a *candida* mostrou-se resistente sobre a ação do extrato hidroalcoólico da própolis preta, derivada da jurema preta.

5.4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS PRETA E DO CLORANFENICOL POR DIFUSÃO EM DISCO

A Figura 12, expõem os teste de difusão em disco com o extrato hidroalcoólico de própolis preta testado nas concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%), bem como do cloranfenicol na concentração de 30 mg/mL e do álcool etílico a 70%, frente ao crescimento da espécie de *Staphylococcus aureus*, que apresentaram sensibilidades frente ao marcador antibacteriano e aos extratos.

Figura 12 Teste de difusão em discos com o extrato hidroalcoólico de própolis preta testado nas concentrações de 26,4 mg/mL (33%), 52,8 mg/mL (66%) e 79,2 mg/mL (99%), bem como do cloranfenicol a 30 mg/mL e do álcool etílico a 70%, frente ao *Staphylococcus aureus*.



Fonte: autoria própria.

Neste estudo foi evidenciada a formação dos halos por *S. Aureus*, Tabela 4, indicando sensibilidade aos extratos hidroalcoólicos da própolis preta, e no marcador (Cloranfenicol). Os diâmetros dos halos formados para o extrato hidroalcoólico de própolis preta foram entre 19 a 25,3mm, enquanto para o cloranfenicol foi entre 30 a 30,1 mm.

Tabela 4 Registro dos tamanhos de halos formados pela *S. Aureus* ensaiadas de acordo com o extrato hidroalcoólico de própolis preta e ao Cloranfenicol.

Espécie	Extrato hidroalcoólico de própolis preta			Cloranfenicol
	26,4mg/mL(33%)	52,8mg/mL(66%)	79,2mg/mL(99%)	30mg/mL
<i>S. Aureus</i>	21,3 mm	22,4 mm	25,3 mm	30,1 mm
<i>S. Aureus</i>	19 mm	23 mm	25 mm	30 mm
<i>S. Aureus</i>	21 mm	23 mm	25 mm	30 mm

Fonte: autoria própria.

Pinto et al. (2001) em experimento realizado com o extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite, obteve halos de inibição de *S. aureus* com diâmetros que variaram 8,66 e 11,16 mm (média = 9,66 mm). Nunes (2009) obteve diâmetros dos halos de inibição de *Staphylococcus aureus* variando entre 7 a 14 mm, para a própolis vermelha, enquanto que Ribeiro (2011) encontrou halos medidos de inibição de *Staphylococcus aureus* com média de diâmetros de 4 mm para o extrato de própolis vermelha e 5,5 mm para o extrato de própolis verde.

Por conseguinte, essa análise dos tamanhos de halos promovida por comparação com o extrato hidroalcoólico da própolis vermelha e verde, nos confirma que os resultados obtidos com a própolis preta foram relativamente superiores. Pode ser analisado ainda, que as atividades antimicrobianas dos extratos de própolis frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus*, pois este é do gênero Gram-positivo, possuem atuação favorável na inibição desse micro-organismo. Em virtude, esta atividade obter presença de flavonoides, ésteres aromáticos e ácidos que atuam na estrutura da parede celular desse microrganismo (ALENCAR et al., 2007; DAUGSCH et al., 2007).

Correlacionando também, os resultados obtidos neste trabalho com Endo (2015), Alencar et. al (2007), pode ser confirmado ainda que as amostras de própolis provenientes de diferentes regiões contem concentrações de flavonoides totais variadas. E, sugere-se que, a composição química da própolis, especialmente em relação ao teor de flavonoides totais é dependente de uma variedade de fatores, os quais agem na membrana ou parede celular da bactéria, inibindo seu crescimento.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados expressos e discutidos anteriormente, pode ser concluído que a literatura científica evidencia poucos relatos sobre a própolis preta e seu extrato hidroalcoólico, sendo mais abordadas outras própolis, tais como: a vermelha e verde. Logo, a própolis preta apresenta limitada a comparação e arguição com outros autores. Visto que, este estudo buscou conhecer tanto a composição química da própolis preta, como a ação farmacológica do seu extrato hidroalcoólico frente a 06 (seis) espécies de *Candida sp*, e 01 (uma) de *Staphylococcus aureus*.

A composição química da própolis preta apresentou 14 compostos, a exemplo dos flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos orgânicos, ésteres alifáticos e aromáticos, entre outros. Destacando-se as maiores concentrações para o ácido 3,4-dihidroxibenzoico (14,19 mg/mL), a Rutina (12,71 mg/mL), o ácido transcinâmico (6,25 mg/mL), sendo esses responsáveis pelas atividades biológicas conferidas a referida própolis.

Os processos de extração hidroalcoólica da própolis preta por maceração a quente e por soxhlet, resultaram respectivamente, em 43,6% e 57,6% de rendimento. Constatando, que a extração por soxhlet apresentou melhor viabilidade, sendo positivo em virtude de redução de tempo, aumento na temperatura e de redução do reagente extrator frente à maceração a quente.

Os testes de difusão em disco para a *Candida sp*, evidenciaram que essas em relação ao extrato hidroalcoólico da própolis preta e do álcool etílico a 70% mostraram-se resistentes, enquanto para o marcador antifúngico fluconazol foi sensível. E, portanto, não apresenta potencial para as atividades farmacológicas, antifúngica, não podendo ser utilizado como terapia alternativa para o tratamento da candidíase, atuando em conjunto com os fármacos convencionais. A presença da substância quercitina em baixas concentrações, pode ter corroborado na inibição da atividade antifúngica.

Por outro lado, os testes de difusão em disco para a cepa de *Staphylococcus aureus*, revelaram crescimento da espécie, ou seja, esta apresentou sensibilidade frente ao marcador antibacteriano (Cloranfenicol), aos extratos hidroalcoólicos da própolis preta. Comprovando, excelente efeito antibacteriano, acredita-se essa atividade tenha sido potencializada, com a presença da rutina com ácidos aromáticos e seus ésteres, principalmente na sua composição.

Em suma, embora a própolis preta não tenha apresentada ação antifúngica, ela se faz presente em nosso arsenal eco botânico contra outras patologias, que associadas ou não a

outros medicamentos, é apresenta um forte potencial e promissor para novas pesquisas e desenvolvimentos de fármacos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, S M; OLDONI, T L C; CASTRO, M L; CABRAL, I S R; COSTA-NETO, C M; CURY, J A; ROSALEN P L; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **J Ethnopharmacol**, v.113, p.278-83, 2007.

ARAÚJO, M. S. E ANDRADE, G. C. Métodos para superar a dormência tegumentar em sementes de jurema-preta (*Mimosa hostilis* Benth.). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 6/7, p. 26-32, Jun./Dez. 1983.

ARAÚJO, T. A. de S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C. de; ALBUQUERQUE, U. P de. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n 1,p. 72-80, 2008.

BACH, F **Avaliação do potencial nutricional, antioxidante e antibacteriano de cogumelos comestíveis**. 2017. 135 p. Tese. Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

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

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

BASTOS, EMAF; SIMONE, M; JORGE, DM; SOARES, AEE; SPIVAK, M. In vitro study of day antimicrobial activity of brasilian própolis against paenipacillus bacillus larvae. **jornal of invertebrates pathology**, Marcelini, V.97, n3, p. 273 – 281, 2008.

BENEDITO, C. P. **Biometria, germinação e sanidade de sementes de jurema-preta (*Mimosa Tenuiflora* Willd.) e juremabranca (*Piptadenia stipulacea* Benth.)** 2012. 95p. Tese Doutorado. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, RN.

BITTENCOURT, F. O. **Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha**. 2008. 74p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente), Universidade Tiradentes, Aracaju – SE.

BITTENCOURT, F. O.; PADILHA, F. F.; SIQUEIRA, A. L.; DANTAS, C. G.; MENDONÇA, L. S.; ARAÚJO, Y. L. F. M; ARAÚJO, E. D.; CARDOSO, J. C. Avaliação da atividade antifúngica de formulações semisólidas contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v.10, p.104-501, 2014.

BUENO-SILVA, B; FRANCHIN, M.; ALVES, C. de F.; DENNY, C.; COLON, D. F.; CUNHA, T. M.; ALENCAR, S. M.; NAPIMOGA, M. H.; ROSALEN, P. L. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory processo. **Phytomedicine**, v.23, nº 13, p. 1583-1590, 2016.

CARDOSO, T. S. **Papel do ATP na infecção de Macrófagos por *Candida albicans***. 2013. 42p. Dissertação em Bioquímica, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal. Disponível em:

https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/26087/1/Tese_Tom%C3%A9%20Silva%20Cardoso.pdf. Acesso em nov. 2016.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v.73, suppl.1, p. S1 – S6, 2002.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. Staphylococcus aureus bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality ? **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 70-6, 2005

CARVALHO, J.C.T. et. al. **Compostos fenólicos simples e heterosídeos**. Farmacognosia, Florianópolis. 3ed, 443-457p, 2001.

CARVALHO, C. et al. Monitoramento microbiológico seqüencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **J Pediatr**, v. 81, n. 1, p. 29-33, 2005.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na Atividade Antibacteriana e Composição Fenólica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 15121516, 2007.

CAVALCANTI, S. et al. Prevalence of Staphylococcus aureus introduced into intensive care units of a university hospital. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 5663, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: approved standard M44-A2. 2ª ed. Wayne: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Approved Standards M2-A8. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 8.ed. Approved Standard. Wayne (PA): **NCCLS**; 2005.

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

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1830, p. 3670–3695, 2013.

CUNHA, I. B. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, F. M.; SHIMIZU, M. T.; MARCUCCI, M. C.; DREZZA, F. T.; POVIA, G. S.; CARVALHO, P. O. Factors that Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 15, n 6, p. 964-970, 2004

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian Red Propolis - Chemical Composition and Botanical Origin. **eCAM Advance Access published**, July 7, p.1, 2007.

D'AURIA, F.D. et al. Effect of propolis on virulence factors of *Candida albicans*. **J Chemother**. v. 15, p. 454-460, 2003.

DOTA, K. F. D.; CONSOLARO, M. E. L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BRUSCHI, M. L. Antifungal activity of Brazilian própolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011. p. 1-8, 2011.

ENDO, E. H.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Res. Microbiol.**, v. 161, p. 534-540, 2010.

ENDO, M. M. **Efeito Antibacteriano de Extrato de Própolis Vermelha e Verde em Canais Radiculares Infectados por *Enterococcus faecalis***. 2015. 79p. Dissertação. Mestrado em Odontologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

FERREIRA, V. U. **Caracterização química, atividades antioxidante, antileucêmica e antimicrobiana da própolis âmbar sul brasileira**. 2017. 68p. Dissertação. Mestrado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, RS.

FERNANDES CORREIA, A. **avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas do cerrado brasileiro sobre isolados clínicos de *Candida spp.*** 2016. 95 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

FREIRES, I. A.; QUEIROZ, V. C. P. P.; FURLETTI, V. F.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M DE; DUARTE, M. C. T.; ROSALEN, P. L. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida spp.* **Journal de Mycologie Médicale**, v.26, p.122-132, 2016.

GHISALBERTI, E. L., Propolis: A review. **Bee World**, v. 60, n.2, p. 59–84, 1979.

GOMES, M. F. F.; ÍTAVO, C. C. B. F.; LEAL, C. R. B.; ÍTAVO, L. C. V; LUNAS, R. C. Atividade antibacteriana in vitro da própolis preta. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 36, n.4, p. 279-282, 2016.

HAGHDOOST, N. S.; SALEHI, T. Z.; KHOSRAVI, A.; SHARIFZADEH, A. Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of *Candida albicans*. **Journal de Mycologie Médicale**. 2016. Article in press.

HURLEY, R.; Recurrent *Candida* infection. **Clin Obstet Gynaecol**, 8º ed; p. 209-214; 1981

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS). FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE REFERÊNCIA EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA (CMRVS). **Catálogo de fungos disponíveis para doação**. 2017. Disponível em: <file:///C:/Users/NOTEBOOK/Downloads/LISTA%20FUNGOS-2016.PDF. Acesso em: 11 set. 2017.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 11, parte 1.

LINDHAL, M.; TAGESSON, C. Selective Inhibition of group II Phospholipase A2 by quercetin. **Inflammation**, v. 17, n. 5, 1993.

LUPION, G. C. A.; CAMACHO, D. P.; NEGRI, M. Avaliação in vitro do extrato da própolis como possível fonte de tratamento para Candidíase Vulvovaginal. **Braz. J. Surg. Clin. Res.** v. 4, n. 2, p.11-16, set – nov, 2013.

LU JJ, LEE SY, CHIUEH TS. In vitro antifungal susceptibility testing of Candida blood isolates and avaluation of the E-test method. **J Microbiol Immunol Infect.** 37:335- 42, 2004.

MAIA-SILVA, C; SILVA, C.I DA; HRNCIR, M.; QUEIROZ, R. T DE;-FONSECA, V. L. I. **Guia de plantas: visitadas por abelhas na Caatinga.** Fortaleza, CE, Editora Fundação Brasil Cidadão, 2012. ISBN 978-85-98564-05-0. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/203/ arquivos/livro_203.pdf. Acesso em 01 Mar 2018.

MALHEIROS, A. F. A. **Vulvovaginite na Infância.** 2002. 61p. Monografia em Ginecologia Infanto-puberal. Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** [online]. v.26, n.2, p.380-385.2006. ISSN 0101-2061.

MIORIN, P. L. **Composição química e atividade antibacteriana do mel e da própolis de *Apis mellifera* e *Tetragonisca angustula* com *Staphylococcus aureus*.** 2003. p.150. Tese. Doutorado em Microbiologia. ICB, São Paulo, 2003.

NUNES, E F V. **Estudo da Própolis como inibidor de Microrganismos.** 2009. 59p. Trabalho de Conclusão de Curso – Fundação Educacional do Município de Assis, Assis, 2009.

OLDONI, T. L.C.; CABRAL, I.C.R.; D'ARCEA, M.A.B.R.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKIC, M.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v.77, p. 208–213, 2011.

OLIVEIRA, E. H.; SOARES, L. F. Prevalência de Vaginites infecciosas através da Citologia Clínica: Um estudo no Laboratório Central de Saúde Pública do Piauí. **RBAC**, v. 39, n. 1; p. 33-35; 2007.

OLIVEIRA, V.B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C.F.; PAULA, C.S.; DUARTE, A.F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de dicksonia sellowiana (presl.). Hook dicksoniaceae, **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.230-239, 2016.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Classification of Brazilian propolis by physicochemical method and biological activity. **Mensagem Doce.** v. 58, n. 58, p. 2-7, 2000.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **J Agr Food Chem**, v.50, p. 2502-2506, 2002.

PEREIRA, A. dos S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. de. PRÓPOLIS: 100 ANOS DE PESQUISA E SUAS PERSPECTIVAS FUTURAS. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PEREIRA, D. S.; FREITAS, C. I. A.; FREITAS, M. O.; MARACAJÁ, P. B.; DA SILVA, J. B. A.; SILVA, R. A. da; SILVEIRA, D. C da. Histórico e principais usos da própolis apícola. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 11, n. 2, p. 01-21, abr – jun, 2015.

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

PFALLER, M A; DIEKEMA, DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clean. Microbiol. Rev.** v 20, n1, p.133 – 63, 2017.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. de A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E. de; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, p.278-283, 2001.

PORTILHO, D. R.; MELO, I. A.; GUERRA, R. C.; BATISTA, H. L.; FERNANDES, C. H.C. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. **Revista Científica do ITPAC**, v. 6, n. 2, s.p., 2013.

RAMOS, M. A. dos S. **Caracterização biológica e prospecção terapêutica do extrato metanólico incorporado ou não em sistema nanoestruturado para aplicação no tratamento da candidíase vulvovaginal**. 2015. 165p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Araraquara, 2015.

RAMOS, A. F. N, MIRANDA, J. L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. **J Venom Anim Toxins**, v. 13, p. 697-710, 2007.

REIDEL, R. V. B. **Potencial antifúngico e antibiofilme de diferentes tipos de própolis brasileiras sobre isolados patogênicos de espécies de *Candida não-albicans***. 2014. 107p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2014.

RIBEIRO, M. P. **Atividade Antimicrobiana do Extrato de Própolis Vermelha e Verde Frente ao Microrganismo *Staphylococcus aureus***. 2011. 56p. Monografia. Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA, Assis, SP.

ROBERTO, M. M.; MATSUMOTO, S. T.; JAMAL, C. M.; MALASPINA, O.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by in vitro study with HTC cells. **Toxicology in Vitro**, v.33, p. 9-15, 2016.

ROBERT, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of Staphylococcus aureus infections of the skin and soft tissue. **Intern Med J**, v. 35, p. 97S-105S, 2005.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Quim. Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, 2016.

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

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

SHOKRI H, KHOSRAVI AR, YALFANI R. Antifungal efficacy of propolis against fluconazole-resistant *Candida glabrata* isolates obtained from women with recurrent vulvovaginal candidiasis. **Int J Gynaecol Obstet**, v.114, p.158-159, 2011.

SHIOZAWA, P; CECHI, D.; FIGUEIREDO, M. A. P.; SEKIGUCHI, L. T.; BAGNOLI, F.; LIMA, S. M. R. R. Tratamento da candidíase vaginal recorrente: revisão atualizada. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 48-50, 2007.

SILVA, H. M. **Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes transplantados de medula óssea**. 2011. 53p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiana, GO.

SILVA, V. A da. **Avaliação citotóxica e genotóxica de *Minosa tenuiflora* (Wild) Poir. (Mimosaceae)**. 2012. 91p. Dissertação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, PB.

SILICI, S., KOC, N.A., AYANGIL, D. e CANKAYA, S. Antifungal Activities of Propolis Collected by Different Races of Honeybees Against Yeasts Isolated From Patients With Superficial Mycoses. **Journal of pharmacological sciences**, v. 102, n. 3, p. 371-376, 2005.

SIMÕES, L. M. C.; GREGORIO, L. E.; DA SILVA FILHO, A. A.; DE SOUZA, M. L., AZZOLINI, A E C S.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIN, Y .M. Effect of brazilian green própolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **J. ethnopharmacol**, v. 94, p. 59-65, 2004.

SOBEL, J. D.; FARO, S.; FORCE, R. W.; Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **Am J Obstet Gynecol**, v.178, p.203-211, 1998.

SOUZA, R.S.O.; ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; AMORIM, E. L. C. Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd] Poir.): A review of its Tradicional Use, Phytochemistry and Pharmacology. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**. v.51, n.5, 937-947, 2008.

STEPANOVIC, S.; ANTIC, N.; DAKIC, I.; SVABIC-VLAHOVIC, M. In vitro antimicrobial activity of própolis and synergism between própolis and antimicrobial drugs. **Microbiol Res**, v.158, n.4, p.353-357, 2003.

TAO, L.; DU, H.; GUAN, G.; DAI, Y.; NOBILIE, C. J.; LIANG, W.; CAO, C.; ZHANG, Q.; ZHONG, J.; HUANG, G. Discovery of a "white-gray-opaque" tristable phenotypic switching system in *Candida albicans*: roles of non-genetic diversity in host adaptation. **PLoS Biology**, v. 12, n. 4, p. 1-14, 2014

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**, v. 47, p. 381-7, 2005.

ZHAO, G.; DONG, X.; SUN, Y. Ligands for mixed-mode protein chromatography: Principles, characteristics and design. **Journal of Biotechnology**, v. 144, p. 3-11, 2009.

WHIBLEY, N.; GAFFEN, S. L. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to nonalbicans *Candida* species. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 42-52, 2015.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

WOISKY, R. G.; GIESBRECHT, A.M; SALATINO, A. Actividade Antibacteriana de uma formulação preparada a partir de Própolis de *Apis mellífera L.* Actas del **IV Congreso Iberoamericano de Apicultura. I Foro Expo-Comercial Internacional de Apicultura**. Rio Cuarto. Córdoba. Argentina. p. 213-216, 1994.