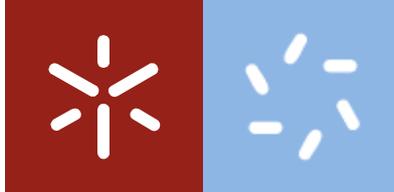




Universidade do Minho
Escola de Ciências

Ana João Pereira Gomes

**Avaliação e caracterização de propriedades
antifúngicas e antioxidantes de própolis
português**



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Ana João Pereira Gomes

**Avaliação e caracterização de propriedades
antifúngicas e antioxidantes de própolis
português**

Dissertação de Mestrado
em Bioquímica Aplicada

Trabalho efetuado sob a orientação do
Professora Doutora Cristina Alexandra de Almeida Aguiar

DECLARAÇÃO

Nome: Ana João Pereira Gomes

Endereço eletrónico: ajgomes@outlook.pt

Telefone: 963747743

Número do cartão de cidadão: 14368949

Título dissertação de Mestrado:

Avaliação e caracterização de propriedades antifúngicas e antioxidantes de própolis português

Orientador:

Professora Doutora Cristina Alexandra de Almeida Aguiar

Ano de conclusão: 2019

Designação do Mestrado: Mestrado em Bioquímica Aplicada

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO

Universidade do Minho, _____/_____/_____

Assinatura: _____

“...À parte disto tenho em mim
todos os sonhos do mundo...”

Álvaro de Campos

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a toda a minha família, especialmente à minha mãe, pai, avó Augusta e avô Acácio e ao meu irmão, por todo o apoio, amor carinho e carradas de paciência. Por sempre acreditarem em mim, por nunca me deixarem desistir, por me darem a oportunidade de sonhar e todas as bases para o concretizar, o meu mais profundo obrigada.

Ao Álvaro, o meu especial obrigada, pelo amor e paciência, por sempre ter estado ao meu lado, e me ensinar o que é realmente importante e o que é realmente gostar. Espero que de agora em diante começa algo ainda melhor.

Gostaria de expressar os mais sinceros agradecimentos à minha orientadora, Professora Cristina Aguiar, por toda a sua incansável ajuda, tempo, muitas vezes escasso, paciência e amizade durante este ultimo ano, e por me ter proporcionado a oportunidade de trabalhar com ela, e entrar no mundo do Própolis. Sem ela, nada disto poderia ter sido possível.

Gostaria ainda de agradecer à professora Ana Cunha e à Ana Sofia, magnífica aluna de doutoramento, por serem parte deste trabalho e por partilharem comigo o seu conhecimento sem reservas. A ti Ana Sofia um obrigada do fundo do coração levo comigo a tua simpatia amizade e conhecimentos transmitidos para a vida.

Um agradecimento especial à Doutora Paula Batista e à doutoranda Fátima Martins, do Instituto Politécnico de Bragança por tão amavelmente me receberem nesta instituição e me ajudarem nos ensaios com os fungos filamentosos, foram uma valiosa ajuda na conclusão deste trabalho.

Um obrigada ainda ao pessoal do LBV desta universidade em especial ao doutorando Luís, pela ajuda e cedências de material para a realização dos ensaios antioxidantes.

Agradeço também a todo o pessoal técnico que trabalha no Departamento de Biologia, por toda a ajuda, que tornou este trabalho mais fácil de realizar, em especial ao Senhor Luís Correia, por toda a animação durante o trabalho, sozinho era capaz de transformar os dias mais difíceis no laboratório em dias bem mais fáceis.

Não poderia de deixar de agradecer ainda a todos os meus colegas de mestrado bem como aos meus colegas de laboratório, em especial à Catarina Passão e Marta Peixoto por todo o suporte e diversão que tivemos ao longo desta jornada.

Por último, gostaria ainda de agradecer aos apicultores, Amadeu Fortunas e Pedro Fernandes por gentilmente fornecerem as amostras de própolis usadas para este trabalho. Bem como a todas as universidades e institutos que amavelmente nos forneceram os fungos filamentosos que testamos neste trabalho.

A todos o meu mais sincero, Obrigada!

**Avaliação e caracterização de propriedades antifúngicas e antioxidantes
de Própolis Português**

Ana João Pereira Gomes

RESUMO

O própolis é um produto de origem natural, resinoso e balsâmico, produzido por abelhas a partir de exsudados recolhidos das plantas que são digeridos parcialmente por enzimas salivares e misturados com cera e outros produtos do metabolismo das abelhas. Este produto é utilizado pelas abelhas para manutenção da integridade estrutural e estado sanitário da colmeia.

Do ponto de vista químico, o própolis é uma mistura complexa de compostos de natureza variada, sendo a sua composição química dependente do ano e, em particular, da vegetação local bem como do modo de recolha, pelo que se torna difícil a sua padronização. Apresenta igualmente uma diversidade de propriedades biológicas - nomeadamente atividade antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, e anti-inflamatória - que têm sido geralmente relacionadas com a presença de alguns compostos como flavonoides, ácidos fenólicos e os seus ésteres.

O própolis português é ainda um produto pouco explorado. Apresenta no entanto propriedades interessantes, que têm suscitado o interesse em caracterizar os seus perfis químicos e de bioatividades, no sentido de avaliar o seu potencial para aplicações diversas. O objetivo deste trabalho prende-se com o estudo de duas amostras de própolis nacional, particularmente no que diz respeito à sua caracterização química e à avaliação do seu potencial antifúngico, visando a possibilidade da utilização deste produto natural em aplicações médicas e cosméticas. O própolis usado neste trabalho foi recolhido em dois apiários - um localizado no Gerês (G) e outro no Pereiro (P), em 2017 - sendo usados para obter os extratos etanólicos (EEs) que foram caracterizados e posteriormente testados nos diferentes ensaios realizados.

G17.EE e P17.EE apresentaram elevado poder antioxidante, distinguindo-se de outros EEs preparados com amostras de própolis da mesma proveniência mas recolhidas em anos diferentes, bem como atividade antimicrobiana contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Estas bioatividades, associadas a uma composição rica em compostos fenólicos, renovam o interesse nestas amostras de própolis para aplicações futuras.

Na avaliação do potencial antifúngico, um dos principais objetivos deste trabalho, pretendeu-se estabelecer um método reprodutível e fiável, preferencialmente rápido, que permitisse revelar e

comparar o efeito dos extratos num painel de fungos filamentosos com interesse clínico. Ambos os métodos estudados - o método de diluição em meio líquido e o método de diluição em placa – poderão ser usados para o efeito, embora o primeiro se revele mais interessante se o tempo de ensaio for um parâmetro a privilegiar e o segundo ofereça vantagens quando se pretende conhecer o comportamento fúngico face aos extratos em análise.

**Evaluation and characterization of antifungal and antioxidant properties
of Portuguese Propolis**

Ana João Pereira Gomes

ABSTRACT

Propolis (bee glue) is a resinous and balsamic substance of natural origins. It is produced by bees from exudates gathered from plants which are partially digested by salivary enzymes and mixed with beeswax and other products of bees' metabolism. This natural product is used by bees for the maintenance of the structural integrity as well as the sanitary status of the beehive.

From a chemical point of view, propolis is a complex mixture of compounds of varied nature. Propolis chemical composition changes according to the year, and particularly, according to the surroundings flora as well as with the harvesting mode, which makes propolis standardization very difficult. It also presents an equally diverse set of biological priorities - mainly antimicrobial, anti-tumour, antioxidant and anti-inflammatory activities which have been generally related to the presence of some compounds such as flavonoids, phenolic acids and their esters.

Portuguese propolis is still a poorly explored product. However, it shows very interesting properties that have developed interest in characterizing its chemical and bioactivity profiles in order to assess its potential for multiple usages. The goal of this work concerns the study of two samples of Portuguese propolis, particularly with regard to their chemical characterization and the evaluation of their antifungal potential, aiming at the possibility of using this natural product in medical and cosmetic applications. The propolis used in in this research work was collected in two different apiaries - one located in Gerês (G), and the other in Pereiro (P), in 2017. In this work these samples were used to obtain ethanolic extracts (EEs) that were characterized and later tested in the different tests performed.

G17.EE e P17.EE showed high antioxidant power, diverging from other EEs prepared with propolis samples from the same source but collected in different years. G17.EE e P17.EE also display antimicrobial activity against bacteria, yeasts and filamentous fungi. These bioactivities, associated to a composition rich in phenolic compounds, renew our interest in these propolis samples for future applications.

In the evaluation of the antifungal potential, one of the main objectives of this work, the goal was to establish a reproducible and reliable method, preferably fast, that would allow to reveal and to compare

the effect of the extracts against a panel of filamentous fungi of clinical interest. Both methods studied - the liquid dilution method and the plate dilution method - may be used for this purpose, although the former is more interesting if the test time is the parameter to be valued whereas the second method offers advantages when the fungal behavior is under analysis..

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XV
ÍNDICE DE TABELAS	XIX
LISTA DE ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XXIII
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Própolis	3
1.1.1. Composição Química e Características Físicas.....	4
1.1.2. Principais Compostos Bioativos no Própolis	6
1.1.3. Propriedades Biológicas do Própolis	7
1.2. Flavonóides, Polifenóis e Orto difenóis	8
1.3. Propriedades Antioxidantes	11
1.3.1.Oxidação Nos Sistemas Biológicos.....	11
1.3.1.1. Formação de Espécies Reativas de Oxigênio	12
1.3.2. Compostos Fenólicos como Agentes Antioxidantes.....	15
1.4- Propriedades Antifúngicas	16
1.4.1 – Resistência a Agentes Microbianos	16
1.4.2. Fungos: Uma Visão Geral	17
1.4.2.1. Morfologia dos Fungos	19
1.4.3. Infecções Fúngicas	21
1.4.3.1- Infecções Cutâneas.....	22
1.4.3.2. Terapêuticas Antifúngicas.....	25
1.4.3.2.1. Aplicação Tópica de Fármacos	26
1.4.4. Fungos Como Possíveis Alvos para Avaliação de Novas Terapêuticas	27
1.5. Problema Biológico e Objetivo Deste Trabalho	28

2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
2.1. Amostras de Própolis e Preparação de Extratos Etanólicos.....	33
2.2. Caracterização Química dos Extratos Etanólicos de Própolis.....	33
2.2.1. Determinação do Teor de Polifenóis Totais.....	33
2.2.2. Determinação do Teor em Flavonoides Totais	34
2.2.3. Determinação do Teor de Orto-Difenóis.....	35
2.3 – Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos Extratos Etanólicos de Propolis	35
2.3.1. Ensaio de Eliminação do Radical 2,2-difenil-1-pirarilidrazil (DPPH•)	35
2.4. Avaliação do Potencial Antimicrobiano dos Extratos Etanólicos de Propolis	36
2.4.1. Microrganismos	36
2.4.2. Meios de Cultura e Condições de Crescimento	38
2.4.3. Avaliação da Atividade Antimicrobiana Contra Bactérias e Leveduras.....	38
2.4.3.1- Preparação de Culturas	38
2.4.3.2- Ensaio para Avaliação da Atividade Antimicrobiana	39
2.4.4. Avaliação da Atividade Antimicrobiana Contra Fungos Filamentosos	39
2.4.4.1 – Método de Diluição em Placa	39
2.4.4.2 Método de Diluição em Meio Líquido	40
2.5. Análise Estatística	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1. Caracterização Química de G17.EE e de P17.EE	45
3.1.1. Teor Total de Polifenóis	45
3.1.2. Teor Total de Flavonóides.....	48
3.1.3. Teor de orto-difenóis.....	50
3.2. Avaliação da Atividade Antioxidante de G17.EE e de P17.EE <i>in vitro</i>	51
3.2.1. Capacidade de captura de radicais livres DPPH•	51
3.3. Avaliação da atividade antimicrobiana de G17.EE e de P17.EE	55
3.3.1. Avaliação da atividade antibacteriana.....	55
3.3.2. Avaliação da Atividade Antifúngica de G17.EE e de P17.EE	58
3.3.2.1. Avaliação da Atividade Antifúngica Contra Leveduras	58
3.3.2. Avaliação da Atividade Antifúngica Contra Fungos Filamentosos – Avaliação do Crescimento do Micélio Fúngico.....	61

3.3.3. Avaliação da Atividade Antifúngica Contra Fungos Filamentosos – Método de Diluição em Meio Líquido.....	73
4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	80
5. BIBLIOGRAFIA.....	86
6. ANEXO.....	111
Anexo I.....	113
7. APÊNDICE.....	115
Apêndice I.....	117

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Principais constituintes gerais do própolis (adaptado de Casaca, 2010).
- Figura 2.** Estrutura química representativa do polifenol resveratrol (retirado de Kim et al., 2019).
- Figura 3.** Estrutura química do ácido benzoico (A) e do ácido cinâmico (B) (retirado de Kim et al., 2019).
- Figura 4.** Estrutura química representativa de um estilbeno: monozol (retirado de Kim et al., 2019).
- Figura 5.** Estrutura básica dos flavonóides (adaptado de Kim et al., 2019).
- Figura 6.** Estrutura básica do orto-difenol (retirado de Kim et al., 2019).
- Figura 7.** Doenças associadas aos radicais livres (adaptado de Bolton et al., 2000).
- Figura 8.** Esquema reacional da produção do radical hidroxila ($\text{HO}\bullet$) através da reação de Haber-Wiss ou Fenton (retirado de Breusegem et al., 2001).
- Figura 9.** Esquema representativo de algumas das principais ações, na célula, que envolvem espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de nitrogénio (RNS) (retirado de Ferreira, 2007).
- Figura 10.** Fungos unicelulares. A- *Saccharomyces cerevisiae* (retirado Aref, 2014). B- *Candida albicans* (retirado de Seddiki et al., 2013).
- Figura 11.** Ilustração de dois tipos de hifa de fungos pluricelulares (adaptado de Esposito e Azevedo, 2010).
- Figura 12.** Esquema representativo do ciclo de vida de fungos dimórficos, dependente da temperatura (adaptado de Talaro e Chess, 2018).
- Figura 13.** Teor de polifenóis totais (TPT) de G17.EE e P17.EE. Os valores são expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/g extrato) e resultam da média \pm DV de 3 ensaios independentes com 3 réplicas cada (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).
- Figura 14.** Teor de flavonóides totais (TFT) de G17.EE e P17.EE. Os valores são expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/g extrato) e resultam da média \pm DV de 3 ensaios independentes com 3 réplicas cada (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).
- Figura 15.** Teor de orto-difenóis (TO) de G17.EE e P17.EE. Os valores são expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/g extato) e resultam da média \pm DV de 3 ensaios independentes com 3 réplicas cada (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).
- Figura 16.** Potencial antioxidante de G17.EE e P17.EE. A capacidade de captura de DPPH \bullet foi expressa em valores de IC50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) e resultam da média \pm DV de 3 ensaios independentes com 3 réplicas cada (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Figura 17. Crescimento de 3 réplicas de *Fusarium spp* (A) e de *Nannizzia gypsy* (B) após inoculação em meio de cultura PDA. Cada réplica corresponde à inoculação/ repicagem de um disco do respetivo micélio, proveniente da mesma cultura original, em três momentos sucessivos (●- 1^a repicagem; ■ - 2^a repicagem; ▲ - 3^a repicagem).

Figura 18. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Fusarium spp.* O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (●), e ainda na presença de 500 mg/ ml (▲) e 100 mg/ mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de G17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

Figura 19. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Trichophyton mentagrophytes*. O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (●), e ainda na presença de 500 mg/ ml (▲) e 100 mg/ mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de G17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

Figura 20. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Microsporium audourii*. O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (●), e ainda na presença de 500 mg/ ml (▲) e 100 mg/ mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de G17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

Figura 21. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Nannizzia gypsy*. O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (●), e ainda na presença de 500 mg/ ml (▲) e 100 mg/ mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de G17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

Figura 22. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Trichophyton saudanense*. O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de

cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (●), e ainda na presença de 500 mg/ ml (▲) e 100 mg/ mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de G17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

Figura 23. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Trichophyton rubrum*. O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (●), e ainda na presença de 500 mg/ ml (▲) e 100 mg/ mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de G17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

Figura 24. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Microsporum canis*. O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (●), e ainda na presença de 500 mg/ ml (▲) e 100 mg/ mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de G17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

Figura 25. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Trichophyton tonsurans*. O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (●), e ainda na presença de 500 mg/ ml (▲) e 100 mg/ mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de G17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

Figura 26. *Trichophyton tonsurans* cultivado em meio Sabouraud (A) e na presença de 500 µg/m (B) e 1000 µg/ml (C) de P17.EE, sendo visível o aparecimento de cor alaranjada no meio suplementado com própolis.

Figura 27. *Fusarium* spp. cultivado em meio Sabouraud (A) e na presença de 1000 µg/ml de G17.EE (B), sendo visível a redução do micélio na placa suplementada com própolis.

Figura 28. Avaliação do crescimento de *Aspergillus terreus* em meio de cultura PDA na ausência de EtOH (■), controlo e na presença de EtOH 0,1 % (v/v) (□); 0,2 % (v/v) (■); 0,3 % (v/v) (■) e

0,7 % (v/v) (■). Os valores resultam da média \pm DV de 3 ensaios independentes com 3 réplicas cada (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Figura 29. Avaliação do crescimento de *Aspergillus terreus* em meio de cultura PDA suplementado com (A) G17.EE nas concentrações de 500 $\mu\text{g/ml}$ (■); 1000 $\mu\text{g/ml}$ (■) e 2000 $\mu\text{g/ml}$ (■) e (B) P17.EE nas concentrações de 500 $\mu\text{g/ml}$ (■); 1000 $\mu\text{g/ml}$ (■) e 2000 $\mu\text{g/ml}$ (■).

Figura 30. Avaliação do crescimento de *Aspergillus fumigatus* em meio de cultura PDA suplementado com (A) G17.EE nas concentrações de 500 $\mu\text{g/ml}$ (■); 1000 $\mu\text{g/ml}$ (■) e 2000 $\mu\text{g/ml}$ (■) e (B) P17.EE nas concentrações de 500 $\mu\text{g/ml}$ (■); 1000 $\mu\text{g/ml}$ (■) e 2000 $\mu\text{g/ml}$ (■).

Figura 31. Percentagem de inibição da D.O. de *Aspergillus terreus*, em meio de cultura PDA suplementado com (A) G17.EE nas concentrações de 500 $\mu\text{g/ml}$ (■); 1000 $\mu\text{g/ml}$ (■) e 2000 $\mu\text{g/ml}$ (■) e (B) P17.EE nas concentrações de 500 $\mu\text{g/ml}$ (■); 1000 $\mu\text{g/ml}$ (■) e 2000 $\mu\text{g/ml}$ (■), acompanhada às 24h, 48h e 72h.

Figura 32. Percentagem de inibição da D.O. de *Aspergillus fumigatus*, em meio de cultura PDA suplementado com (A) G17.EE nas concentrações de 500 $\mu\text{g/ml}$ (■); 1000 $\mu\text{g/ml}$ (■) e 2000 $\mu\text{g/ml}$ (■) e (B) P17.EE nas concentrações de 500 $\mu\text{g/ml}$ (■); 1000 $\mu\text{g/ml}$ (■) e 2000 $\mu\text{g/ml}$ (■), acompanhada às 24h, 48h e 72h.

Figura 33. Crescimento de *Microsporum canis* em meio PDA, após transferência de 5 μl das misturas de esporos com G17.EE 1000 $\mu\text{g/ml}$ (A) ou 2000 $\mu\text{g/ml}$ (B) e das misturas de esporos com P17.EE 1000 $\mu\text{g/ml}$ (C) e ou 2000 $\mu\text{g/ml}$ (D), uma vez terminado o ensaio para avaliação da atividade antifúngica.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Microrganismos isolados nas infecções nosocomiais nos hospitais portugueses (retirados de DGS, 2013).

Tabela 2. Principais infecções fúngicas cutâneas, etiologia e manifestações mais comuns.

Tabela 3. Principais classes de Antifúngicos e modos de ação.

Tabela 4. Estirpes bacterianas usadas como indicadores de suscetibilidade no ensaio para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês e do Pereiro recolhidas em 2017. Todas as espécies foram obtidas da coleção de culturas do Departamento de Biologia.

Tabela 5. Estirpes de leveduras usadas como indicadores de suscetibilidade no ensaio para avaliação da atividade antifúngica dos extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês e do Pereiro recolhidas em 2017. Todas as espécies foram obtidas da coleção de culturas do Departamento de Biologia.

Tabela 6. Fungos Filamentosos usados como indicadores de suscetibilidade no ensaio para avaliação da atividade antifúngica dos extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês e do Pereiro recolhidas em 2017.

Tabela 7. Teores de polifenóis totais, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato), dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Pereiro recolhidas de 2011 a 2017 (P.EEs). Os valores são apresentados na forma de média \pm DV. Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

Tabela 8. Teores de polifenóis totais, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato), dos extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês, recolhidas de 2011 a 2017 (G.EEs). Os valores são apresentados na forma de média \pm DV. Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

Tabela 9. Teores de flavonóides totais, expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/ g extrato), dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Pereiro recolhidas de 2011 a 2017 (P.EEs). Os valores são apresentados na forma de média \pm DV. Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

- Tabela 10.** Teores de flavonóides totais, expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/ g extrato), dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês recolhidas de 2011 a 2017 (G.EEs). Os valores são apresentados na forma de média \pm DV. Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).
- Tabela 11.** Capacidade de captura do radical livre DPPH•, apresentada em valores de IC50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$), dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Pereiro recolhidas entre 2011 a 2017 (P.EEs). Os valores são apresentados na forma de média \pm DV. Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).
- Tabela 12.** Capacidade de captura do radical livre DPPH•, apresentada em valores de IC50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$), dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês recolhidas entre 2011 a 2017 (G.EEs). Os valores são apresentados na forma de média \pm DV. Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).
- Tabela 13.** Capacidade de captura de radicais livres DPPH• dos extratos etanólicos preparados a partir de própolis do Gerês colhido em 2017 e proveniente de apiários diferentes. Os resultados são apresentados na forma de média \pm DV de valores de IC50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).
- Tabela 14.** Atividade antibacteriana dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês (G17.EE) e do Pereiro (P17.EE) recolhidas em 2017. A atividade antibacteriana foi expressa em valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$).
- Tabela 15.** Atividade antifúngica dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês (G17.EE) e do Pereiro (P17.EE) recolhidas em 2017. A atividade antibacteriana foi expressa em valores de MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$).
- Tabela 16.** Taxa específica de crescimento de cada estirpe de fungo filamentosos, apresentada em cm/dia, na ausência e na presença dos extratos etanólicos de própolis recolhido em 2017 nos apiários do Gerês (G17.EE) e do Pereiro (P17.EE). Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).
- Tabela 17.** Tempo de inflexão de cada estirpe de fungo filamentosos, apresentada em dias, na ausência e na presença dos extratos etanólicos de própolis recolhido em 2017 nos apiários do Gerês (G17.EE) e do Pereiro (P17.EE). Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

Tabela 18. Taxa de Inibição do Crescimento de cada estirpe, apresentada em porcentagem, na presença de duas concentrações dos extratos etanólicos de própolis recolhido em 2017 nos apiários de Gerês e Pereiro. A Taxa de Inibição do crescimento foi calculada para cada fungo no momento (tempo, em dias) em que atingiu o crescimento máximo na presença de etanol (controle EtOH) e após 12 dias (tempo mais curto após o qual o primeiro dos fungos em estudo atingiu o crescimento máximo – valores apresentados entre parêntesis).

Tabela 19. Porcentagem de inibição da D.O. para cada estirpe de fungo filamentosos após 72 h na presença dos extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês e do Pereiro recolhidas em 2017.

Tabela 20. Atividade antifúngica dos extratos etanólicos de própolis relativos ao ano de 2017 contra os fungos filamentosos estudados neste trabalho, expressa em termos de valores de MIC₅₀ (µg/ml).

Tabela I.1. Atividade antibacteriana dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês (G17.EE) e do Pereiro (P17.EE) recolhidas nos anos de 2011 a 2015. A atividade antibacteriana foi expressa em valores de MIC (µg/ml).

Tabela I.2. Atividade antifúngica dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês (G17.EE) e do Pereiro (P17.EE) recolhidas nos anos de 2011 a 2015. A atividade antibacteriana foi expressa em valores de MIC (µg/ml).

Tabela A.1. Fungos filamentosos de interesse

LISTA DE ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AG** – Ácido gálico
- ATP** - Adenosina trifosfato
- BHA** - Butil-hidroxi-anisol
- BHT** - Butil-hidroxi-tolueno
- C_{AMP}** – adenosina 3',5'-monofosfato cíclico, do inglês *Cyclic adenosine monophosphate*
- CAPE** - Éter fenílico do ácido cafeico, do inglês *Caffeic acid phenyl ether*
- DPPH•** – Radical DPPH
- DPPH-H** – DPPH na sua forma reduzida
- EAG** – Equivalentes de ácido gálico
- EE** – Extrato etanólico
- EEs** – Extratos etanólicos
- EQ** – Equivalentes de quercetina
- EtOH** – Etanol
- f** – Apiário Felgueiras
- FAO** - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization*
- G** – Gerês
- G.EEs** – Extratos etanólicos de própolis do Gerês
- G17.EE** – Extrato etanólico de própolis do Gerês recolhido no ano de 2017
- H₂O₂** – peróxido de hidrogénio
- HDL** – Lipoproteínas de alta densidade, do inglês *High Density Lipoproteins*
- HO•** - Radical hidroxilo
- IC₅₀** – Metade da concentração máxima inibitória, do inglês *Half Maximal Inhibitory Concentration*
- JECFA** - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
- LB** – Meio de cultura Luria-Bertani
- LBA** – Meio Luria-Bertani com agar
- LDL** - Lipoproteínas de baixa densidade, do inglês *Low Density Lipoproteins*
- MDRs** - Resistência múltipla a fármacos, do inglês *Multiple Drug Resistances*
- MFC** – Concentração mínima fungicida do inglês *Minimum Fungicidal Concentrations*
- MIC** - Concentração mínima inibitória, do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*

O₂ –Oxigénio molecular

O₂^{•-}- Anião superóxido

OMS – Organização Mundial de Saúde

P – Pereiro

P17.EE - Extrato etanólico de própolis do Pereiro recolhido no ano de 2017

PG - Propilgalato

r – Apiário Roca

r.EE – Extrato etanólico produzido com própolis do Gerês recolhido exclusivamente do apiário

Roca

RNS – Espécies reativas de nitrogénio, do inglês *Reactive Nitrogen Species*

ROS- Espécie reativa de oxigénio, do inglês *Reactive Oxygen Species*

rpm – Rotações por minuto

rt.EE - Extrato etanólico produzido com uma mistura de própolis do Gerês proveniente dos apiários Roca e Toutelo

SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida

SLNs – Nanopartículas lipídicas sólidas, do inglês *solid lipid nanoparticles*

t – Apiário Toutelo

t_{1/2} – Tempo de meia vida

tf.EE - Extrato etanólico produzido com uma mistura de própolis do Gerês recolhido nos apiários

Toutelo e Felgueiras

TFT – Teor de flavonóides totais

TPT – Teor de polifenóis totais

WHO – Organização mundial de saúde, do inglês *World Health Organization*

YPD – Meio de cultura Yeast extract Peptone Dextrose

YPDA – Meio de cultura *yeast extract peptone dextrose* com agar

1.1. Própolis

A palavra "própolis" provem do grego [("pro" = em favor de) + ("polis" = cidade)], significando, num contexto geral, em defesa da cidade. No caso das abelhas, considera-se a “defesa da cidade” como a defesa da colmeia, uma vez que usam o própolis na construção das colmeias e na proteção contra predadores. O própolis é também utilizado na reparação de danos, como isolante térmico e na manutenção de um ambiente asséptico que previne infecções microbianas (Burdock, 1998; Chan et al., 2013).

O própolis é uma goma ou resina de composição complexa e de cor verde pardo, castanho ou vermelho, podendo inclusivamente ser negro dependendo da origem botânica. É recolhido pelas abelhas a partir de várias plantas bem como de diferentes partes da mesma (materiais lipofílicos nas folhas, botões florais, mucilagem, látices), sendo este material posteriormente misturado com enzimas salivares (nomeadamente a β -glucosidase) e cera de abelha (Cardoso et al., 2016).

Devido ao seu amplo espectro de propriedades biológicas e farmacológicas, o interesse por este produto de origem natural tem vindo a aumentar em larga escala nos últimos anos (Shi et al., 2012; Silva-Carvalho et al., 2015). No entanto, as suas propriedades são já exploradas desde a mais remota antiguidade. As propriedades antibióticas e fungicidas de própolis eram já conhecidas pelos sacerdotes egípcios e pelos médicos gregos e romanos, assim como por algumas culturas sul americanas (Moreira et al., 2008). Os egípcios usavam esta resina para embalsamar cadáveres (evitando a sua putrefação), os gregos e romanos usavam-na como antisséptico, os Incas utilizavam o própolis como antipirético, enquanto na cultura chinesa era usado como anti-inflamatório e anticancerígeno (Shi et al., 2012; Silva-Carvalho et al., 2015).

Atualmente são atribuídas ao própolis diferentes atividades biológicas, tais como: propriedades antimicrobianas, antitumoral, antioxidantes, hepatoprotetoras e anti-inflamatórias (Silva-Carvalho et al., 2015; Pasupuleti et al., 2017; Zabaïou et al., 2017). São várias as publicações que referem e comprovam estas bioatividades em própolis, como por exemplo a atividade antifúngica (; Moreira et al., 2008; Falcão et al., 2010; Castro et al., 2011), antibacteriana (Koo et al., 2000; Uzel et al., 2005; Falcão et al., 2010; Castro et al., 2011), atividade antioxidante (Banskota et al., 2001; Sheng et al., 2007; Falcão et al., 2010, 2013a), anti- inflamatória (Borrelli et al., 2002b; Sheng et al., 2007; Lotfy et al., 2006; Sforcin, 2007, Moreira et al., 2008; Falcão et al., 2010), anti viral (Sheng et al., 2007; Moreira et al., 2008), anti-tumoral (Grunberger et al., 1998; Borrelli et al., 2002a Sforcin, 2007; Moreira et al., 2008; Valença et al., 2013; Silva-Carvalho et al., 2014), ou imunoestimuladora (Borrelli et al., 2002a; Lotfy et al., 2006), entre outras.

As atividades antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória despertam um especial interesse a nível da comunidade científica. Na última década a incidência de tumores cresceu cerca de 20 %, sendo registados cerca de 12 milhões de novos casos a cada ano (ONG-World Cancer Research Fund, 2018). A

investigação tenta esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como o cancro, aterosclerose e outras doenças relacionadas com a inflamação (Shan et al., 1990; Yangi et al., 2018) A capacidade do própolis neutralizar radicais livres, para além de evitar efeitos causados pelo stresse oxidativo, potencia também a atividade anti-tumoral e anti-inflamatória, acrescentando-lhe utilidade e importância. No entanto, apesar do enorme interesse deste produto natural ao nível biomédico, o própolis não é ainda considerado um agente terapêutico na medicina convencional, em grande parte devido à enorme dificuldade de padronização da sua composição (Bankova, 2005; Silva-Carvalho et al., 2015).

1.1.1. Composição Química e Características Físicas

A composição química, e conseqüentemente as atividades biológicas do própolis, variam com as diferentes espécies de plantas e a vegetação que rodeia as colmeias de onde o própolis é recolhido (Katalinic et al., 2004; Falcão et al., 2010). Características como condições climáticas (Bankova, 2005), a época de colheita (Oliveira et al., 2017), a técnica utilizada para recolher o própolis (Freitas et al., 2018), a espécie de abelha (Pereira, 2012), bem como o método de extração e o solvente usado (Sheng et al., 2007) influenciam a composição química deste produto natural. Dependendo da sua composição química e características, normalmente relacionadas com determinadas origens geográficas, consideram-se atualmente diferentes tipos de própolis: *Populus* spp., *birch*, verde, vermelho, pacífico, canário e Geoprópolis (Fokt et al 2010; Silva-Carvalho et al., 2015; Torres-González et al., 2016).

Entre os vários compostos químicos já identificados em própolis, em número superior a 300 de acordo com a literatura (Marcucci 1995; Castro et al., 2001; Bankova, 2000), encontram-se invariavelmente os flavonoides (flavanonas, flavonas e calconas); os ácidos benzóicos e derivados; álcool de cinamilo, ácido cinâmico e seus derivados; outros ácidos como o ácido cafeico e respetivos derivados; cetonas, e compostos heteroaromáticos; terpénicos; hidrocarbonetos sesquiterpenos e triterpenos; hidrocarbonetos alifáticos; minerais; esteróis e hidrocarbonetos esteróides; açúcares e aminoácidos; ácidos fenólicos, álcoois, aldeídos, ácidos gordos (Castro, 2001; Silva-Carvalho et al., 2015) entre outras substâncias. Novos compostos continuam a ser identificados e caracterizados durante o estudo e análise de novas amostras (Trusheva et al., 2004; Li et al., 2009; Fokt et al., 2010).

O própolis produzido no pacífico, em países como a Indonésia por exemplo, ou no Havai, possui como principal constituinte as flavanonas, que são de igual forma características do própolis de diferentes regiões de África (Kasote et al., 2014). Já em própolis de zonas temperadas, os compostos fenólicos mais comumente presentes são os flavonóides como a pinocembrina, a galangina e crisina e os ácidos fenólicos como o ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido cinâmico (Marcucci et al., 1995; Bankova et al., 2000; Huang et al., 2014). O própolis proveniente de áreas tropicais, como por exemplo do Brasil ou Venezuela, é rico

em fenilpropanóides prenilados e alguns compostos não típicos, como por exemplo o canferol e isosakuranetina (Bankova et al., 2000). O própolis europeu, representante de um própolis de zonas temperadas, designado do tipo “choupo”, e em que as principais fontes vegetais são *Populus alba*, *Populus tremula* e *Populus nigra* (Ristivojević, et al., 2015), exibe como principais constituintes bioativos os flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres (Huang et al., 2014). O própolis português apresenta um perfil muito semelhante a um própolis de regiões temperadas. Contudo, apesar das suas semelhanças com amostras europeias, contém também novos derivados metilados, esterificados e hidroxilados de flavonóides e derivados de pinocembrina/ pinobanksina contendo na sua estrutura uma fração de derivado do ácido fenilpropanóico (Falcão et al., 2010, 2013b, 2014).

Independentemente da elevada variação na composição química específica do própolis nas diferentes regiões do globo, esta permanece relativamente semelhante em termos gerais: cerca de 50 % de resinas vegetais, 30 % de cera, 10 % de óleos essenciais, 5 % de pólen e 5 % de várias outras substâncias (Figura 1).

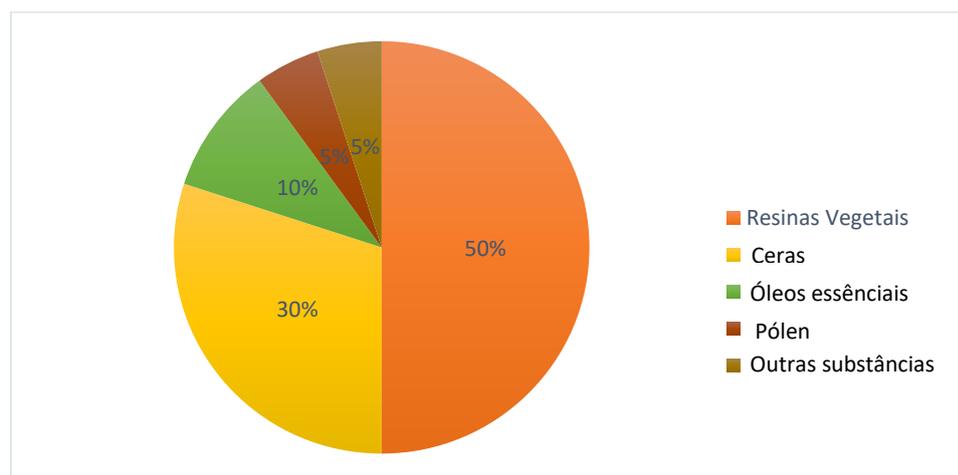


Figura 1. Principais constituintes gerais do própolis (adaptado de Casaca, 2010).

Fisicamente, o própolis apresenta um odor aromático característico e agradável, por vezes pungente e a sua cor pode variar de amarelo-verde, vermelho a castanho-escuro quase preto, dependendo de sua origem e idade (Bankova et al., 2000). O própolis português apresenta, de uma maneira geral, uma cor castanho-âmbar. Quanto à consistência, o própolis é duro e quebradiço quando frio, mas torna-se macio e muito pegajoso quando aquecido (Loutfy, 2006). Pela sua forte interação com as proteínas e óleos da pele, a sua remoção da pele humana é extremamente difícil (Burdock, 1998).

1.1.2. Principais Compostos Bioativos no Própolis

Entre os compostos identificados e caracterizados em própolis os compostos fenólicos são aqueles que apresentam uma maior representatividade. A maioria dos compostos fenólicos identificados pertence a dois grandes grupos: os fenilpropanóides (ácidos hidroxicinâmicos, flavonóides, lignanas, entre outros) e os terpenóides (mono, di, tri e sesquiterpenóides) (Bankova et al., 2000).

Os flavonóides, ácidos aromáticos e ácidos fenólicos são vistos como os componentes que apresentam maior potencial biológico e terapêutico no própolis (Bulman et al., 2011; Cui et al., 2013). Os principais e mais abundantes compostos fenólicos encontrados em própolis são os flavonóides pinocembrina, galangina e crisina e os ácidos fenólicos como o ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido cinâmico (Bankova et al., 2002; Falcão et al., 2012; Huang et al., 2014). A presença de determinados compostos associa-se frequentemente a determinada bioatividade no própolis. Flavonóides como a galangina são comumente associadas ao poder antioxidante dos extratos de própolis (Santos et al., 2002). No entanto estes compostos são também muitas vezes associados ao poder antimicrobiano do própolis (Falcão et al., 2010; Castro et al., 2011). O ácido cafeico e seus derivados como é exemplo o CAPE têm sido igualmente associados às atividades antioxidante e antibacteriana do própolis; no entanto é também associado a outras bioatividades como a anti-inflamatória e antifúngica (Oliveira et al., 2006; Kalogeropoulos et al., 2009; Castro et al., 2011), bem como atividade antitumoral e citotóxica (Sforcin, 2007; Moreira et al., 2008). Destacam-se também compostos como os diterpenóides com atividade citotóxica e derivados do ácido di-O-cafeoilquinico com uma forte atividade anti-hepatotóxica (Pereira, 2012). Flavonóides como o kaempferol, a pinociembrina, pinobanskina e a crisina (Silva-Carvalho et al., 2014), são também relatados e associados a inúmeras bioatividades de própolis, nomeadamente antioxidante (Machado et al., 2016), antibacteriana (Cushnie e Lamb 2006), antifúngica (Medana et al., 2008). O ácido ferulico é também frequentemente identificado em amostras de própolis e associado à sua atividade antibacteriana (Silva-Carvalho et al., 2014).

1.1.3. Propriedades Biológicas do Própolis

Diferentes composições químicas em própolis de diferentes origens poderiam levar a inferir propriedades biológicas distintas; no entanto a investigação tem mostrado que amostras com perfis químicos completamente distintos e de diversas áreas geográficas com climas distintos exibem atividades biológicas por vezes idênticas (Borrelli et al., 2002b). E, apesar da elevada variabilidade na composição química, determinadas propriedades biológicas como a atividade antimicrobiana estão sempre associadas a qualquer própolis (Santos et al., 2002; Cushnie e Lamb, 2006). Tal facto pode estar relacionado com os compostos aos quais se atribui o papel de principais responsáveis por tais atividades biológicas, e onde se destacam flavonóides, ácidos aromáticos, diterpenos, compostos fenólicos e derivados do ácido cinâmico, incluindo ésteres de ácido cafeico (Silva-Carvalho et al., 2015).

A atividade antimicrobiana de própolis tem sido amplamente relatada, nomeadamente a atividade antibacteriana contra várias bactérias patogénicas (Burdock, 1998; Kujumgiev et al., 1999; Koo et al., 2000; Uzel et al., 2005. Falcão et al., 2013b) e a atividade antifúngica (Burdock, 1998; Moreira et al., 2008; Falcão et al., 2013b; Galletti et al., 2017). Estão também reportadas as atividades antiprotozoária (Castro et al., 2011, 2012), antiviral (Sheng et al., 2007; Moreira et al., 2008) como anti-HIV (Castro et al., 2011; Gekker et al., 2005), antioxidante (Banskota et al., 2001b; Borrelli et al., 2002b; Sheng et al., 2007; Falcão et al., 2010, 2013a; Castro et al., 2012), anti-inflamatória (Borrelli et al., 2002b; Sheng et al., 2007; Lotfy et al., 2006; Sforcin, 2007, Moreira et al., 2008; Xuan et al., 2018), anti-tumoral (Grunberger et al., 2010; Sforcin, 2007; Moreira et al., 2008; Valença et al., 2013; Silva-Carvalho et al., 2014), hepatoprotetora (Sheng et al., 2007), anti-neurodegenerativa (Chen et al., 2008), de anestésico local (Moreira et al., 2008), anti-tuberculose (Ali et al., 2018), imunoestimulante (Borrelli et al., 2002a; Lotfy et al., 2006) e citotóxica (Matsuno et al., 1997). Foi também provado que o própolis protege contra a radiação UV, podendo desta forma ser usado na formulação de protetores solares (Gregoris et al. 2011) e que é capaz de inibir a ação da enzima hialuronidase, permitindo retardar o envelhecimento celular (Kim et al., 2005), o que sugere mais aplicações na área da cosmética. Conjugando com a sua atividade antioxidante, pode também ser usado no combate dos primeiros sinais de envelhecimento da pele provocados por radicais livres. Para além de todas as propriedades biológicas estudadas, extratos de própolis foram também testados como conservantes de alimentos devido às suas propriedades bacteriostáticas e bactericidas (Tosi et al., 2007).

O própolis é inegavelmente reconhecido como uma importante fonte de compostos que apresentam propriedades com interesse para diversas aplicações, e é por isso explorado comercialmente em diferentes partes do mundo (Moreira et al., 2008). Assim, encontra-se em produtos farmacêuticos, tais como os destinados à cicatrização de feridas, regeneração tecidual, tratamento de queimaduras,

neurodermatites, úlceras de perna, ou psoríase, entres outros, bem como em produtos cosméticos, ou ainda como suplemento alimentar (Fokt et al., 2010). O crescente interesse por parte dos consumidores face a produtos naturais, nos últimos anos, potenciam o interesse e a investigação neste produto natural (Piccinelli et al., 2013; Kurek-Górecka et al., 2014; Silva-Carvalho et al., 2015; Boisard et al., 2015; Szweda et al., 2015).

1.2. Flavonóides, Polifenóis e Orto difenóis

Nos últimos 10 anos o interesse por moléculas como os polifenóis tem aumentado por parte de investigadores das mais variadas áreas, essencialmente devido às suas propriedades antioxidantes e, conseqüentemente, ao seu possível papel na prevenção de várias doenças associadas ao stresse oxidativo, como o cancro ou doenças neurodegenerativas (Scalbert, 2000; Manach, 2004). Em geral, os polifenóis são substâncias naturais encontradas em produtos de origem natural como as plantas, existindo milhares de polifenóis distintos (Silvester et al., 2018). Para além da sua elevada abundância na dieta, os polifenóis constituem os compostos ativos de uma grande variedade de plantas medicinais, modulando a atividade de várias enzimas e recetores celulares. Os compostos fenólicos são produtos resultantes do metabolismo secundário, provenientes das diferentes reações de defesa das plantas contra as agressões ambientais (Kylli, 2010). Estes compostos fazem parte de um vasto grupo de fitoquímicos derivados de fenilalanina, contendo apenas um ou mais grupos hidroxilo ligados a um anel benzénico (Garcia-Sales et al., 2010). Assim, os polifenóis podem ser quimicamente caracterizados como compostos que possuem um ou mais grupos hidroxilo (-OH) ligados a um anel aromático (Figura 2)

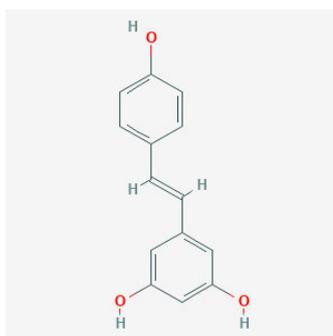


Figura 2. Estrutura química representativa do polifenol resveratrol (retirado de: (Kim et al., 2019).

Com base na sua estrutura química, os polifenóis podem ser divididos e classificados em várias classes distintas. Atualmente existem mais de 10 classes descritas na literatura, sendo as três principais as classes dos ácidos fenólicos, dos flavonoides e dos estilbenos. Cada um destes grupos, por sua vez, possui subclasses com centenas de derivados (Bravo, 1998; Manach et al, 2004).

Os ácidos fenólicos dividem-se em 2 grupos: os ácidos benzóicos e os ácidos cinâmicos (Figura 3). Os vários ácidos são diferenciados também pela substituição no anel benzénico. Os ácidos fenólicos aparecem quase sempre esterificados com outros compostos: nomeadamente, podem ocorrer sob a forma de ésteres do ácido tartárico, ou na forma glicosilada (Clifford, 1999). Os ácidos fenólicos ocorrem naturalmente em muitas espécies de plantas e a sua presença em frutos secos pode atingir elevadas concentrações (Xing et al., 1996).

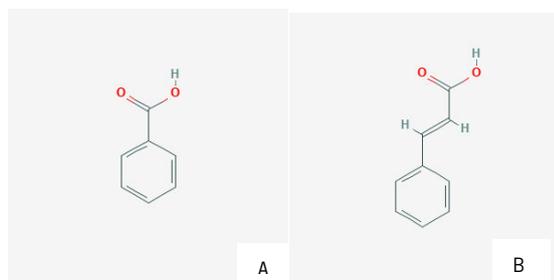


Figura 3. Estrutura química do ácido benzoico (A) e do ácido cinâmico (B) (retirado de: Kim et al., 2019).

Os estilbenos são caracterizados pela existência de dois anéis benzénicos ligados por uma cadeia de etileno (Figura 4). Quase todos os estilbenos possuem duas formas isoméricas, sendo a forma *trans* a mais estável. Vários derivados do estilbeno estão presentes naturalmente nas plantas. Um exemplo é o resveratrol, sintetizado por várias plantas como resposta a agressões/ infeções por agentes patogénicos (bactérias, vírus, fungos e insetos) e na defesa de situações de stresse (Korhammer et al., 1995). Em termos biológicos, este composto é também responsável pela redução da viscosidade do sangue, diminuição dos níveis de lípidos no soro sanguíneo e agregação plaquetária, aumentando a fração de colesterol HDL, que ajuda a remover o colesterol LDL, prevenindo assim a obstrução das artérias e, conseqüentemente, a aterosclerose (Domingues et al., 2017).

Os flavonóides encontram-se numa grande variedade de frutas e vegetais da dieta quotidiana. Encontram-se presentes na sua forma monomérica e também como conjugados (ex. quercetina) facilmente absorvidos pelo organismo. No entanto, a sua concentração é relativamente baixa nos produtos onde se encontram. Por tal razão, a sua ingestão é geralmente baixa, mesmo num indivíduo com uma dieta saudável (Murphy, 2012), aqui residindo também umas das razões para a importância crescente atribuída a estas moléculas.

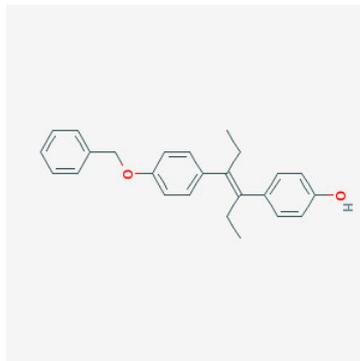


Figura 4. Estrutura química representativa de um estilbeno: monozol (retirado de: Kim et al., 2019)

Quimicamente, todos os flavonóides possuem uma estrutura comum: são compostos tricíclicos com dois anéis aromáticos (anéis A e B; Figura 5) que são combinados por três átomos de carbono que formam o heterociclo oxigenado (anel C; Figura 5). Atualmente, os flavonóides são divididos em seis subclasses com base em diferenças na sua estrutura química (Bravo, 1998).

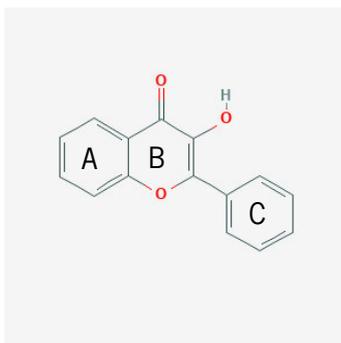


Figura 5. Estrutura básica dos flavonóides (adaptado de Kim et al., 2019)

Os orto-difenóis (Figura 6) são também compostos fenólicos. Resultam de reações de hidroxilação dos monofenóis, procedentes, numa primeira fase, da reação enzimática da polifenoloxidase, enzima responsável pela oxidação de compostos fenólicos. Na presença de oxigénio, esta enzima transforma os compostosfenólicos em quinonas coloridas que participam, posteriormente, nas reações de polimerização que dão origem às melanoidinas, responsáveis pelo aparecimento da cor castanho-escuro em frutas e vegetais (Wong, et al., 1990; Fronk et al., 2015). A hidroxilação dos compostos fenólicos na posição orto do anel B (Figura 2) (originando um orto-difenol) proporciona a estas moléculas uma elevada capacidade antioxidante (Roussos et al., 2009), tornando-as também alvo de elevado interesse na investigação.

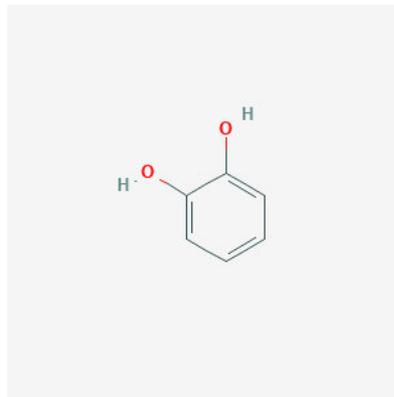


Figura 6. Estrutura básica do orto-difenol (retirado de Kim et al., 2019).

1.3. Propriedades Antioxidantes

1.3.1. Oxidação Nos Sistemas Biológicos

O oxigênio é o terceiro elemento químico mais abundante no universo: constitui cerca de 50 % da massa da crosta terrestre, é o segundo componente mais abundante na atmosfera e o principal componente dos oceanos (Cook et al, 1968). É também indispensável para a produção eficiente de energia tanto em plantas como em animais. Existe no entanto um enorme paradoxo relativo a esta tão abundante molécula, precisamente denominado “paradoxo do oxigênio” (Gilbert, 2000): assim como é indispensável para a sobrevivência da vida na terra, pode causar danos nos seres vivos, quando expostos a concentrações superiores às encontradas na atmosfera. Os seres vivos evoluíram desenvolvendo mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para combater os efeitos desta molécula, bem como de outros agentes oxidantes (Mittler, 2002).

Radicais livres podem ser definidos como qualquer partícula (atômica ou molecular) que possui um elétron desemparelhado numa orbital (atômica ou molecular) externa, com um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) relativamente curto (Corrêa, 2014). São por isso consideradas partículas altamente reativas, capazes de interagir com biomoléculas como por exemplo lípidos das membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos. Radicais livres e outros oxidantes são formados durante processos oxidativos biológicos, como por exemplo a fosforilação oxidativa, a via metabólica responsável pela produção de ATP na mitocôndria. Para além desta produção fisiológica a partir de compostos endógenos, podem ainda ser oriundos do metabolismo de alguns compostos exógenos ao organismo. O problema reside quando o equilíbrio da produção de radicais livre é interrompido, devido a uma produção excessiva ou a uma remoção pouco eficaz dos mesmos (Ferreira, 2007).

A produção excessiva de radicais livres, como por exemplo ROS (espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*), pode levar a danos em várias biomoléculas, para além de servir como um

importante sinalizador intracelular que amplifica respostas inflamatórias (Koolman e Rohm., 1996). Estas espécies estão associadas a uma série de processos degenerativos, e consequentemente a uma série de doenças degenerativas como por exemplo Alzheimer (Smith et al., 2000) ou Parkinson (Bolton et al., 2000). No entanto, muitas outras doenças dos mais variados foros, incluindo doenças associadas à inflamação crónica, têm vindo a ser associadas a ROS (Figura 7). Radicais encontrados em sistemas biológicos incluem moléculas como o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}), radical peroxil (ROO^{\bullet}), radical alcóxila (RO^{\bullet}) e o oxigénio singleto (1O_2). Os ROS não radicalares incluem espécies como o ácido hipocloroso (HClO), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), peróxidos orgânicos, aldeídos, ozono (O_3) e oxigénio molecular (O_2) (Fibach e Rachmilewitz, 2010).

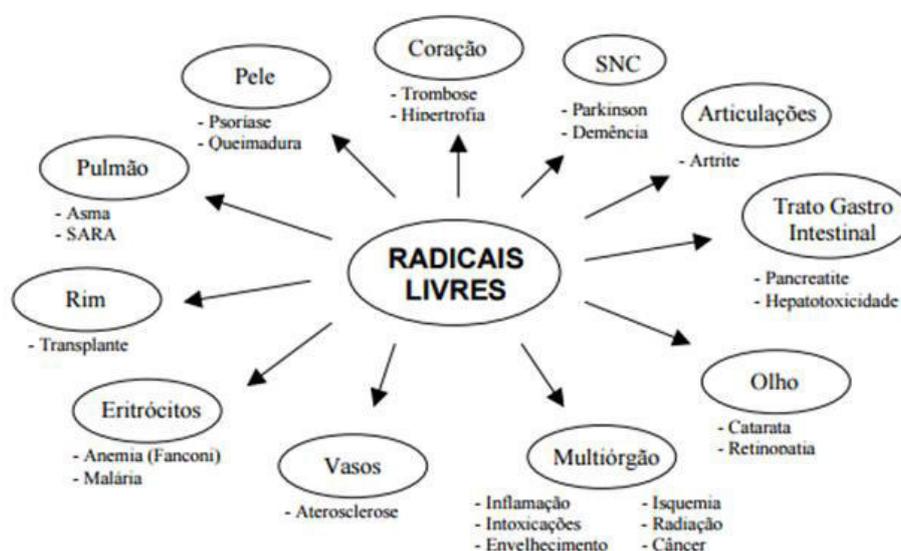


Figura 7. Doenças associadas aos radicais livres (adaptado de Bolton et al., 2000)

1.3.1.1. Formação de Espécies Reativas de Oxigénio

Devido à sua configuração eletrónica ($[He] 2s^2 2p^4$), o oxigénio tem tendência a receber um eletrão de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos. A adição de um eletrão ao oxigénio molecular (O_2) origina a formação do anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que é normalmente considerado um ROS “primário”. Este é principalmente produzido nas mitocôndrias, onde ocorre uma pequena, mas contínua, “fuga” de eletrões da cadeia respiratória. Estes eletrões, ao invés de reduzir o O_2 a moléculas de água, reduzem o O_2 a anião superóxido (Cadenas, 1998). Estima-se que aproximadamente 2 % do consumo mitocondrial total de O_2 resulta na produção de $O_2^{\bullet-}$ (Fibach e Rachmilewitz, 2008). Para além deste mecanismo, o anião superóxido pode ser formado por ação de vários sistemas enzimáticos existentes na célula (Fridovich, 1999).

Não obstante não ser um radical altamente reativo, o anião superóxido pode interagir com outras moléculas e formar outros radicais em geral designados por ROS “secundários”, bastante mais reativos e perigosos para as células, e entre os quais se destacam o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e o radical hidroxilo (HO•) (Halliwell e Gutteridge, 1990). Apesar do seu t_{1/2} bastante curto, o radical hidroxilo é considerado o ROS que mais danos causa nas células, nomeadamente por atacar a molécula de ADN, danificando quer as bases azotadas como o esqueleto de desoxirribose (Halliwell e Gutteridge, 1990).

Um dos mecanismos reacionais mais conhecido e estudado para formação de HO• é a conhecida reação de Fenton, em que iões de ferro livres no organismo podem converter oxidantes relativamente estáveis, como o O₂^{•-}, em poderosos radicais como o HO•. A pH fisiológico, a maior parte do ferro está ligada a quelatos biológicos, encontrando-se por isso na sua forma oxidada, Fe³⁺. De forma a participar na geração de radicais HO•, este terá de ser reduzido a Fe²⁺, que pode então interatuar com H₂O₂, produzido por dismutação enzimática ou espontânea do radical O₂^{•-}, gerando o poderoso radical HO• (Figura 8).

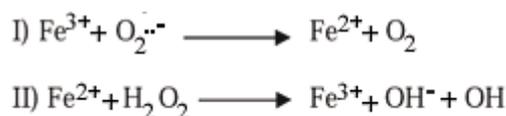


Figura 8. Esquema reacional da produção do radical hidroxila (HO•) através da reação de Haber-Wiss ou Fenton (retirado de Breusegem et al., 2001).

A mitocôndria é a fonte por excelência de ROS, no entanto é também um dos seus principais alvos de ataque, pois a cadeia respiratória é composta por proteínas transmembranares existentes na membrana mitocondrial interna, e a formação de ROS ocorre perto desta membrana. Deste modo, os ROS têm acesso facilitado aos lípidos da membrana, desintegrando-as e permitindo a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares. A este ataque dá-se o nome de peroxidação lipídica, nela ocorrendo uma série de reações em cadeia (Figura 9), que podem provocar danos potencialmente muito superiores aos dos ROS que iniciaram a reação (Mehrotra et al., 1991). A peroxidação lipídica consiste, muito resumidamente, na adição de oxigénio a ácidos gordos polinsaturados das membranas celulares, formando-se desta forma peróxidos lipídicos, que possuem por sua vez um poder de ação maior do que as outras espécies tóxicas primárias de O₂, atingindo facilmente alvos mais distantes (Halliwell e Gutteridge, 1989).

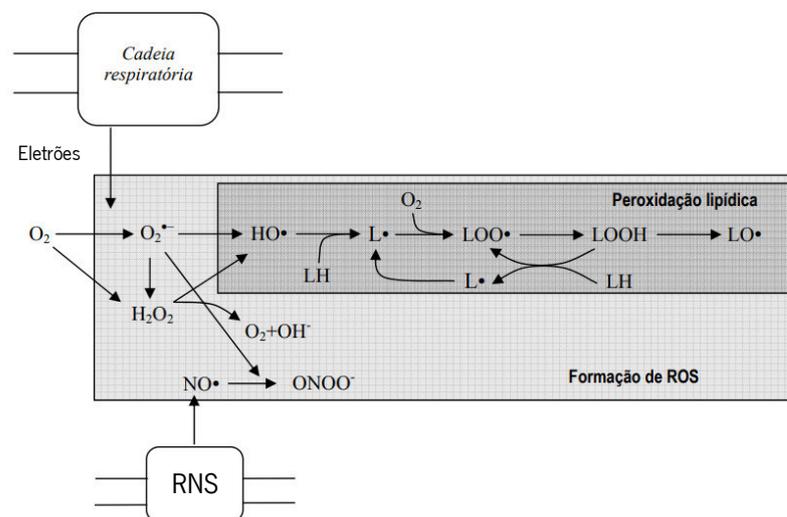


Figura 9. Esquema representativo de algumas das principais ações, na célula, que envolvem espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (adaptado de Ferreira, 2007).

Paralelamente à existência de ROS, existem outros radicais que contêm nitrogênio na sua estrutura, designados por espécies reativas de nitrogênio (RNS). O principal RNS é o óxido nítrico (NO•), radical produzido em tecidos biológicos pela óxido nítrico sintetase (NOS). O óxido nítrico é um radical muito abundante e funciona como molécula de sinalização numa grande variedade de processos fisiológicos, como por exemplo a neurotransmissão (Bergendi et al., 1999; Fridovich, 1999). Em células do sistema imunitário, durante processos inflamatórios, o NO• é produzido conjuntamente com o anião superóxido. Estes dois radicais reagem formando peroxinitrilo (ONOO•), que é um potente agente oxidante e pode provocar fragmentação do ADN e oxidação lipídica (Carr et al., 2000).

Para evitar os danos causados por ROS e RNS, os organismos desenvolveram, como já referido, uma série de mecanismos de defesa potencialmente neutralizadores das ações desses radicais livres. Estes mecanismos antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos, conforme a estrutura do agente antioxidante. Os antioxidantes endógenos podem ainda ser distinguidos de acordo com a forma como atuam, sendo denominados *scavenger* quando atuam transformando um radical livre num outro menos ativo, ou *quencher* se conseguem neutralizar completamente o radical livre através da absorção de toda a sua energia de excitação.

O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, destacando-se a superóxido dismutase, a catalase e a glutathiona peroxidase, que atuam de diversas formas. Este é o primeiro sistema a agir, evitando a acumulação do anião radical superóxido e do peróxido de hidrogênio no organismo (Devi e Prasad, 1998; Mittler, 2002)

A fonte da maioria dos antioxidantes não enzimáticos é a alimentação. Encontram-se principalmente em frutas e legumes, pelo que uma alimentação equilibrada é fulcral para o bom funcionamento dos mecanismos antioxidantes do nosso organismo. Incluem antioxidantes hidrofílicos, como a vitamina C e os catecóis, entre outros, e antioxidantes lipofílicos como as bioflavonas, a vitamina A e a vitamina E. A vitamina C ou ácido ascórbico tem ação *scavenging*, funcionando também como regeneradora da vitamina E (tocoferol). Como é hidrossolúvel, possui maior ação no plasma sanguíneo, enquanto a vitamina E, lipossolúvel, tem maior ação em membranas celulares. A vitamina C tem ação antioxidante através do ascorbato, doando eletrões. Os carotenóides são um grupo de compostos onde se destacam os β -carotenos, precursores da vitamina A, e o licopeno, que dá a cor avermelhada ao tomate, melancia ou uva, por exemplo. Na circulação, junto com as lipoproteínas absorvidas na superfície intestinal, os carotenóides agem como sequestradores de lipoperóxidos, principalmente. Os estrógenos também são considerados antioxidantes pela sua ação como *scavengers*, inibindo a oxidação lipídica das lipoproteínas de baixa densidade) (Mates, 2000; Mittler, 2002; Jurczuk et al., 2004).

Os mecanismos antioxidantes estão em permanente atividade no organismo. No entanto, e em muito devido às condições de vida atual, como o stresse, má nutrição, poluição, consumo de tabaco e álcool, estes mecanismos não são já suficientes para o controlo de radicais livres no organismo humano. A proteção extra contra radicais livres pode ser conseguida através de um aumento da ingestão de antioxidantes via dieta. São muitas as evidências que indicam que alguns alimentos usados na dieta, bem como inúmeras plantas usadas na medicina tradicional, são ricos em antioxidantes, e estes podem ter a maior importância na prevenção de doenças como as indicadas na figura 7 (Cintra e Mancini, 1996; Williamson et al., 1998; Brenna e Pagliarini, 2001).

1.3.2. Compostos Fenólicos como Agentes Antioxidantes

Os processos oxidativos podem ser evitados pela modificação das condições ambientais ou através da utilização de substâncias antioxidantes capazes de impedir ou reduzir as reações oxidativas (Allen e Hamilton, 1983). Os compostos fenólicos exemplificam estas substâncias, sendo capazes de funcionar quer como sequestradores de radicais, quer como quelantes de metais (Shahidi et al., 1992), podendo agir tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários formados por ação destes compostos são produtos relativamente estáveis, essencialmente devido à ressonância do anel aromático característico destes antioxidantes (Nawar, 1985). Deste modo, os compostos fenólicos e alguns dos seus derivados são eficazes para prevenir inúmeros processos oxidativos, como por exemplo a oxidação lipídica.

Na indústria alimentar, o problema da oxidação lipídica dos produtos é atualmente resolvido, na sua maioria, usando sequestradores de radicais livres sintéticos como é o caso do butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), propilgalato (PG), entre uma imensidão de outros compostos. No entanto, cada vez mais estudos demonstram a possibilidade destes antioxidantes sintéticos apresentarem alguns efeitos tóxicos para o organismo (Erich et al., 1986). Perante estas evidências, o Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA da Food and Agriculture Organization (FAO) e World Health Organization (WHO) têm vindo a alterar, nos últimos anos, as doses de ingestão diárias aceitáveis destas substâncias (WHO, 2019). Perante os problemas que a ingestão destas substâncias pode acarretar para a saúde humana, a investigação tem procurado encontrar produtos naturais, com capacidade antioxidante, capazes de substituir os compostos sintéticos ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir as quantidades já usadas nos alimentos. Alguns estudos estão agora centralizados em compostos fenólicos de origem vegetal, pois estes atuam como aceitadores de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia que tais radicais provocam, além de atuarem também nos processos oxidativos catalisados por metais, tanto *in vitro* como *in vivo* (Huang e Ferraro, 1994; Ho et al., 1994; Donnelly e Robinson, 1995; Cintra e Mancini Filho, 1996; Williamson et al., 1998).

1.4- Propriedades antifúngicas

1.4.1 – Resistência a Agentes Microbianos

Agentes antimicrobianos são agentes essenciais para garantir a saúde e o bem-estar humano e animal, bem como a segurança alimentar. Em geral, são vitais na redução do impacto global das doenças infecciosas (Machado et al., 2011).

O aumento considerável de infeções oportunistas, ou nosocomiais, maioritariamente devido ao aumento de indivíduos imunocomprometidos, como por exemplo pacientes portadores de SIDA (síndrome de imunodeficiência adquirida), transplantados ou submetidos a esquemas de quimioterapia para tratamento de cancro, tem levado à disseminação de microrganismos que muitas vezes eram considerados inofensivos, mas que atualmente representam uma verdadeira ameaça à saúde pública (Li et al., 2007). Este aumento no número de infeções está associado a uma diminuição na eficácia dos medicamentos usados no tratamento destes agentes microbianos. Em 2010, estimava-se que entre 10 a 20 % dos pacientes que iniciavam terapia antirretroviral em países desenvolvidos iriam apresentar resistência à mesma, valor que ascenderia a 40 % em pessoas que reiniciavam este tratamento (WHO, 2019).

A evolução de estirpes resistentes é um fenómeno natural, que acontece quando os microrganismos se replicam erradamente ou quando as estirpes trocam características de resistência,

mas o uso, e principalmente o mau uso de fármacos antimicrobianos acelera o aparecimento de tais estirpes resistentes. Este facto é ainda ampliado por práticas inadequadas de controlo de infeções e pobres condições sanitárias (Kollef et al., 1999). A resistência aos medicamentos de primeira linha no tratamento de infeções causadas por *Staphylococcus aureus*, por exemplo, é generalizada. Estima-se que as pessoas infetadas com MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) tenham uma probabilidade 64 % superior de morrer do que as pessoas com uma forma não resistente da infeção (WHO, 2019). *Aspergillus fumigatus*, um dos fungos saprófitas mais onipresentes transportados pelo ar, é atualmente causador das infeções fúngicas com maior distribuição global (Latgé, 1999). A terapia de longo prazo da aspergilose tem levado ao desenvolvimento de resistência nas últimas décadas (Hagiwara et al., 2016). Surpreendentemente, a resistência aos azóis também emergiu em pacientes “virgens” de azoles. Esta observação pode ser explicada por uma segunda rota de desenvolvimento de resistência através da exposição ambiental de *Aspergillus fumigatus* a fungicidas azólicos utilizados no campo. (Berger et al., 2017). A resistência microbiana aos agentes antimicrobianos é atualmente uma ameaça global e é considerada um grave problema de saúde pública pela OMS (Organização Mundial da Saúde), tornando a descoberta de novos agentes antimicrobianos uma necessidade premente (WHO, 2005).

Estratégias antimicrobianas alternativas e novos agentes antimicrobianos são, portanto, urgentemente exigidas e têm levado a reconsiderar o uso de recursos terapêuticos tradicionais, como por exemplo o uso de compostos naturais com propriedades antimicrobianas particularmente encontrados em plantas e produtos vegetais (Machado, 2011).

1.4.2. Fungos: Uma Visão Geral

Os fungos são classificados num reino separado das plantas, animais e bactérias, o reino Fungi, que inclui microrganismos como as leveduras, fungos filamentosos e os amplamente conhecidos cogumelos. Por apresentarem características próprias, tais como não sintetizar clorofila, não possuir celulose na sua parede celular, mas sim quitina e glucanos (exceto alguns fungos aquáticos), e não armazenarem amido como substância de reserva, foram diferenciados das plantas. Estas e outras diferenças mostram que os fungos formam um só grupo de organismos relacionados entre si, denominado Eumycota, e que partilham um ancestral comum (um grupo monofilético) (Lacaz et al., 1998).

Abundantes em todo mundo, estima-se que existam aproximadamente cerca de 1,5 milhões de espécies diferentes, a maioria inconspícua devido ao pequeno tamanho das suas estruturas, e pelos seus modos de vida crípticos no solo, na matéria morta e/ ou como simbioses ou parasitas de plantas, animais e outros fungos (Esposito e Azevedo 2010).

Os fungos desempenham um papel essencial na decomposição da matéria orgânica e também nas trocas e ciclos de nutrientes. São desde há muito tempo utilizados como uma fonte alimentar direta, como no caso dos cogumelos e trufas, como agentes levedantes no pão e na fermentação de vários produtos alimentares, como o queijo. São também usados amplamente na biotecnologia industrial, nomeadamente na produção de antibióticos, ácidos e, mais recentemente, de várias enzimas (De Abreu et al., 2018). Neste campo destacam-se em especial os fungos filamentosos, devido às suas características únicas de resistirem em condições adversas de cultura bem como à capacidade de usarem várias fontes de nutrientes (Lacaz et al., 1998). Os fungos assumem ainda um papel importante como agentes biológicos no controlo de pragas agrícolas (Brandt e Andersen, 2015).

No entanto, apesar dos inúmeros benefícios dos fungos, algumas espécies produzem também compostos bioativos chamados micotoxinas, como alcaloides e policetídeos, que são tóxicos para animais e humanos, sendo responsáveis pelo número crescentes de algumas alergias e infeções. Anualmente, os casos reportados devido a infeções fúngicas, em especial infeções nosocomiais e dermatológicas, tem também vindo a aumentar. Num relatório sobre infeções nosocomiais da corrente sanguínea, da Direção Geral de Saúde (DGS, 2013), os fungos surgem associados a uma percentagem de quase 7 % de infeções nosocomiais (Tabela 1), sendo que a maioria dos casos reportados nesse relatório se mostrou resistente às terapias convencionais.

Tabela 1. Microrganismos isolados nas infeções nosocomiais nos hospitais portugueses. (retirado de DGS, 2013)

Microrganismos isolados	Frequência	Percentagem
<i>E. coli</i>	157	15.83
<i>Staph. aureus</i>	180 (74 - 41,1% MRSA)	18.45
<i>Staph.coagulase negativo</i>	81 (43 <i>Staph. epidermidis</i>)	8.16
<i>Pseudomonas spp</i>	156 (148 <i>Ps. aeruginosa</i>)	15.73
<i>Klebsiella spp</i>	56 (49 <i>Kl. pneumoniae</i>)	5.65
Fungos: Total	69	6.96
<i>Candida albicans</i>	44	
<i>Candida spp</i>	19	
<i>Aspergillus</i>	2	
Outros fungos	4	
<i>Proteus spp</i>	36 (31 <i>P. mirabilis</i>)	3.63
Outros gram negativo	27	2.72
<i>Enterococcus faecalis</i>	51	5.14
<i>Enterococcus faecium</i>	6	0.60
<i>Serratia spp</i>	26 (22 <i>S. marcescens</i>)	2.62
<i>Acinetobacter spp</i>	20 (14 <i>A.baumannii</i>)	2.02
<i>Enterobacter spp</i>	31(20 <i>E. cloacae</i>)	3.12
<i>Streptococcus l</i>	15(4 <i>Str. pneumoniae</i>)	1.51
<i>Morganella morganii</i>	11	1.11
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6	0.60
<i>Legionella</i>	1	0.10
Outros Gram positivo	18	1.81
Outros microrganismos	25	2.52
TOTAL	992	100.00

Staph. – Staphilococcus; E. – Escherichia

As perdas nas colheitas devidas a doenças causadas por fungos ou a deterioração de alimentos têm também atualmente um impacto muito significativo no fornecimento de alimentos e na economia global. A FAO estima que 25 % das culturas do mundo são afetadas por doenças causadas por fungos e/ou pelas suas micotoxinas (Riley et al., 2002).

1.4.2.1. Morfologia dos Fungos

Os fungos podem ser unicelulares, como as leveduras, ou pluricelulares, como por exemplo os cogumelos. Os fungos unicelulares (Figura 10) são constituídos apenas por uma única célula, como o próprio nome indica. Comumente denominados leveduras, apresentam uma forma esférica ou oval, tendo tendência para se agruparem, constituindo colónias. Devido a esta característica crescem e reproduzem-se rapidamente (Lacaz et al., 1998; Esposito e Azevedo, 2010).

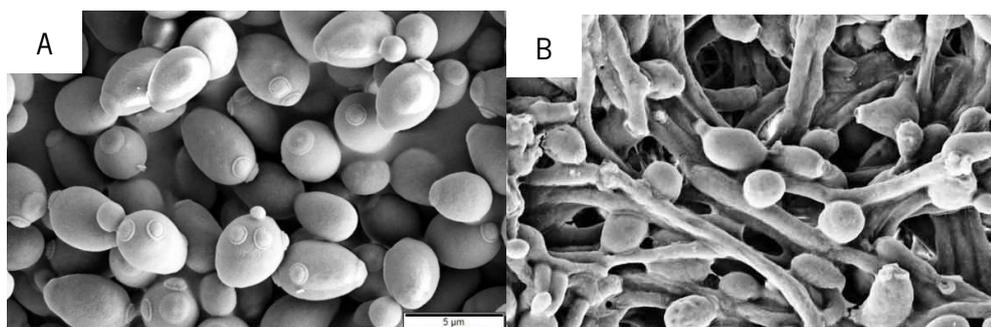


Figura 10. Fungos unicelulares. A- *Saccharomyces cerevisiae*. B- *Candida albicans* (retirado de: A - Aref, 2014 e B- Seddiki et al., 2013)

Os fungos pluricelulares, muitas vezes denominados fungos filamentosos, são constituídos pelo corpo de frutificação, que é responsável pela reprodução do fungo, por meio de células reprodutoras especiais ou esporos, e pelo micélio, que é constituído por um conjunto de filamentos ou hifas (Lacaz et al., 1998; Esposito e Azevedo, 2010). As hifas podem apresentar diferentes tipos de organização, dependendo do tipo de fungo. Fungos mais simples apresentam hifas cenocíticas, hifas com aparência anastomosada (concisa), formadas por um citoplasma estendido e polinucleado. Fungos mais complexos possuem hifas septadas, com células individualizadas, cada uma contendo o seu núcleo, e os pequenos septos separam o filamento internamente em segmentos mais ou menos parecidos. Em cada septo há poros que permitem a passagem de material citoplasmático de um compartimento a outro (Figura11).

O micélio assume tanto a função vegetativa quanto reprodutiva. A primeira confere sustentação, crescimento e obtenção de alimentos aos fungos, e a segunda é responsável pela produção de esporos na

reprodução sexuada, podendo porém a reprodução ocorrer de forma assexuada, seja por gemulação ou fragmentação.

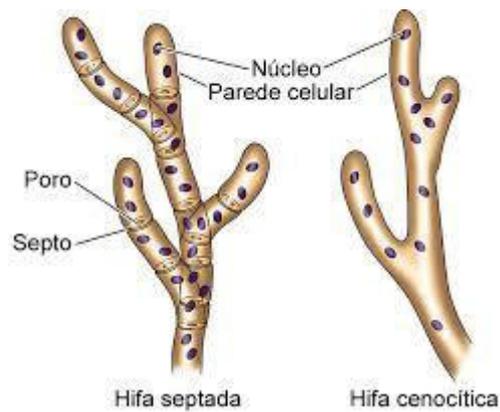


Figura 11. Ilustração de dois tipos de hifa de fungos pluricelulares (adaptado de Esposito e Azevedo, 2010)

Alguns fungos possuem a capacidade de existir quer na forma filamentosa quer como leveduras, sendo denominados fungos dimórficos. Este dimorfismo é bastante comum em fungos patogênicos (Hoog et al., 2000) e está maioritariamente dependente da temperatura. A temperaturas de 37 °C o fungo apresenta-se sob a forma de levedura, a temperaturas de aproximadamente 25 °C apresenta a forma filamentosa (Figura 12). Para além deste importante fator de virulência, também a produção de toxinas, de proteínas de adesão ou a produção de enzimas hidrolíticas são fatores de virulência associados a fungos patogênicos (Hoog et al., 2000; Esposito e Azevedo, 2010).

Um indivíduo saudável possui inúmeros mecanismos de defesa contra a maioria dos fungos nas suas diversas formas, a começar por barreiras fisiológicas como a pele, até ao processo inflamatório (Li et al., 2007). No entanto, em vários casos como em situações de imunodeficiência, o risco de infeção aumenta consideravelmente.

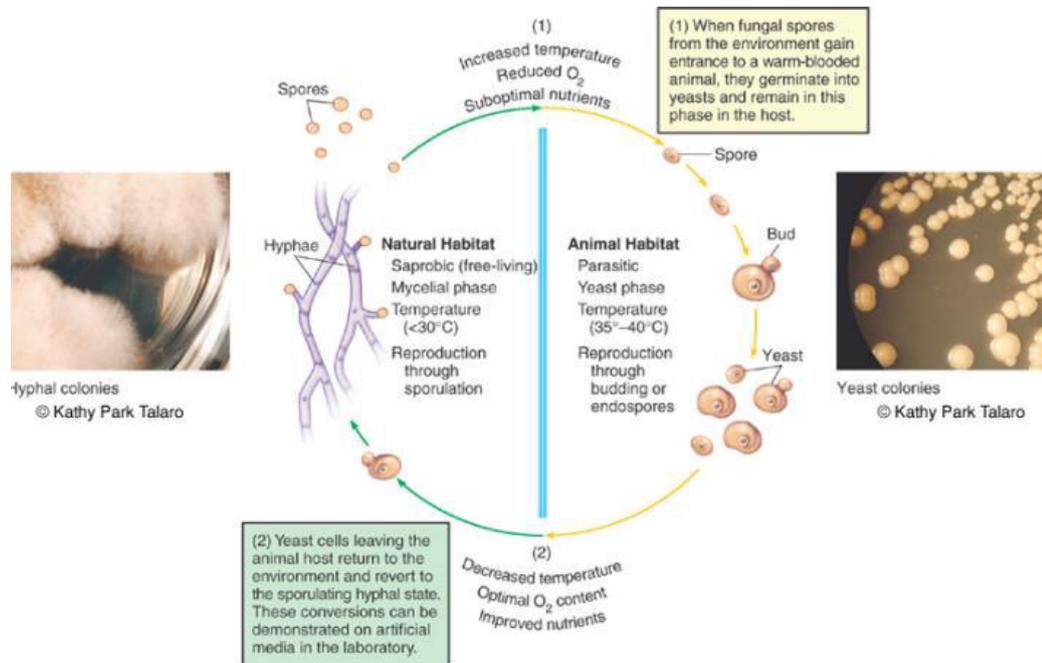


Figura 12. Esquema representativo do ciclo de vida de fungos dimórficos, dependente da temperatura (adaptado de Talaro e Chess, 2018).

1.4.3. Infecções fúngicas

As infecções fúngicas podem ser causadas por fungos patogênicos ou fungos oportunistas, sendo os últimos apenas capazes de causar infecção em hospedeiros imunocomprometidos. Infecções fúngicas matam mais de 1,5 milhões de pessoas/ ano em todo o mundo, sendo que se estima que mais 150 milhões de pessoas estão infetadas com formas graves e impactantes destas doenças nas suas vidas, que podem ser fatais para o paciente (Bongomin et al., 2017).

As infecções fúngicas são classificadas dependendo do grau de envolvimento do tecido e do modo de contágio (Kaur e Kakkar, 2010) em: superficiais (cabelo, unhas e tecido superficial), cutâneas (pele), subcutâneas (derme, tecidos subcutâneos ou estruturas adjacentes) e sistêmicas (infecções profundas nos órgãos internos).

As infecções nosocomiais são uma realidade cada vez mais preocupante - cerca de 15 % dos doentes hospitalizados contraí uma infecção deste tipo (Banerjee, 1991). As infecções fúngicas, nomeadamente as causadas por *Candida* spp. são a terceira causa mais frequente deste tipo de infecções (Sohn et al., 2001). Por exemplo, no caso da *Candia* spp, existem mais de 300 espécies identificadas como causadoras de tais infecções, entre as quais podem ser destacadas *Candida.albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* (Hoog et al., 2000). Estas infecções poderiam ser facilmente combatidas e controladas não fosse a aquisição de resistência aos fármacos, essencialmente devido à ocorrência de mutações dentro da espécie. Esta variabilidade genética é

potenciada por terapêuticas erradas e representa atualmente um fator de risco e preocupação no controle e supressão destas infecções. Para além de *Candida* spp., muitas outras espécies de fungos são consideradas como emergentes na disseminação de infecções deste tipo. Entre os fungos filamentosos encontram-se também exemplos associados à disseminação de infecções deste tipo, nomeadamente algumas espécies dos géneros *Fusarium* e *Scedosporium* (Sohn et al., 2001; Simão, 2011).

1.4.3.1- Infecções cutâneas

A prevalência de infecções fúngicas superficiais e cutâneas tem aumentado rapidamente, afetando atualmente aproximadamente 1 bilhão de pessoas em todo o mundo (Bongomin et al., 2017). No ser humano, as infecções cutâneas e superficiais afetam principalmente áreas do corpo como a pele, cabelo, unhas e olhos, e são principalmente encontradas no tecido subcutâneo e na derme. No entanto, podem ocorrer também na epiderme e podem ainda ter natureza invasiva, consequentemente mais severa (Kaur e Kakkar, 2010).

As infecções fúngicas subcutâneas e dérmicas mais comumente reportadas são provocadas por fungos filamentosos. Entre as infecções com maior incidência encontram-se a tinea pedis (pé de atleta), tinea faciei, tinea manus, tinea cruris, tinea capitis, onicomicoses (infecção fúngica nas unhas) e infecções fúngicas oculares (Krumar et al., 2014). Na tabela que se segue encontram-se as principais manifestações de cada uma das principais infecções cutâneas e a sua etiologia.

Tinea corporis é uma infecção fúngica que geralmente surge no tronco e nas extremidades do corpo humano, principalmente em mulheres. Caracteriza-se por lesões inflamatórias ou não-inflamatórias na pele. Tipicamente, a lesão começa como uma placa eritematosa e escamosa (Tabela 2) que pode piorar rapidamente. As principais estirpes responsáveis por esta infecção são *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton tonsurans* (Adams, 2002; Pires, 2014).

Tabela 2. Principais infecções fúngicas cutâneas, etiologia e manifestações mais comuns. (adaptado de Pires et al., 2014; Shalaby et al., 2016; Nakamura et al., 2015; Choi et al., 2018; (Kim et al., 2010; CDC, 2019)

Infeções fúngicas cutâneas	Manifestações Cutâneas	Etiologia
Tinea corporis		<i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton tonsurans</i>
Tinea pedis		<i>Trichophyton rubrum</i> <i>Epidermophyton spp.</i> <i>Microsporum spp.</i>
Tinea faciei		<i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum.</i>
Tinea manuum		<i>Trichophyton tonsurans</i>
Tinea cruris		<i>Trichophyton rubrum</i>
Tinea capitis		<i>Trichophyton tonsurans</i>
Tinea unguium		<i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton megni</i> <i>Trichophyton tonsurans</i> <i>Trichophyton mentagrophyte</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i>
Infeções fúngicas oculares		<i>Candida spp</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Fusarium spp.</i> <i>Sporothix spp.</i>

Tinea pedis, mais conhecida por pé de atleta, revela-se atualmente a causa mais comum de dermatofitose em humanos (Goldstein et al., 2000). Os sinais e sintomas mais comuns são comichão, pele escamada e vermelhidão do local infetado (Tabela 2). Em casos graves podem aparecer bolhas na pele. Embora o fungo possa infetar qualquer área do pé, em geral cresce entre os dedos. A segunda área mais comum é a planta do pé. O mesmo fungo pode também infetar as unhas ou as mãos (Svejgaard, 1997). *Trichophyton rubrum* é o principal agente etiológico desta infecção; no entanto, algumas espécies de fungos dos géneros *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* são também causadores deste tipo de infecção (Kaushik, 2015).

Tinea faciei, como o próprio nome sugere, é a infecção fúngica que afeta a face, principalmente na região não barba, e caracteriza-se principalmente por manchas de cor vermelha e erupções eritematosas na área afetada (Tabela 2) (Zuber e Baddam, 2001). Os principais fungos causadores desta infecção são *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*.

Tinea manuum tem como principais locais de ocorrência a região palmar, dorsal ou interdigital das mãos ou unhas, raramente ocorrendo nas duas mãos. É caracterizada por eczema, psoríase e formação de calos (Tabela 2). O principal fungo patogénico causador desta infecção é *Trichophyton tonsurans* (Pfaller et al., 2004).

Tinea cruris é um tipo de infecção que afeta geralmente os folículos pilosos, atingindo principalmente a região genital e inguinal, na virilha, zonas onde normalmente se acumula maior calor e humidade; por isso surge geralmente no verão. É caracterizada por manchas eritematosas pruriginosas nas coxas mediais, juntamente com a preservação distinta do pénis e do escroto. O principal agente causador é *Trichophyton rubrum* (Goldstein et al., 2000).

Tinea capitis é uma infecção causada por *Trichophyton tonsurans*, pouco comum em adultos e principalmente encontrada em crianças pré adolescentes (Babel e Baughman, 1989). Caracteriza-se por pápulas, pústulas ou nódulos no couro cabeludo. A inflamação pode ocorrer algum tempo após o contágio e, se não for tratada adequadamente, pode gerar infecção secundária, como descamação, eritema, edema ou alopecia (Ghannoum et al., 2006). É uma infecção transmitida por vetores, que ocorre devido ao contacto direto com uma pessoa infetada ou ao uso de roupas ou pentes contaminados (Elewski, 2000).

Onicomicose, também conhecida como **tinea unguium**, é a infecção fúngica mais comum que afeta as unhas, sendo as unhas dos pés normalmente mais afetadas que as das mãos (Faergemann e Baran, 2003). A onicomicose faz as unhas parecerem brancas e opacas, espessadas e quebradiças. Aqueles com maior risco de desenvolver onicomicose incluem pessoas com diabetes, imunossupressão, idade superior a 60 anos, obesidade, tabagismo, psoríase e predisposição genética, entre outros fatores (Gupta et al. 2004, Kuvandik et al., 2007; Szepletowski e Salomon, 2007). Diferentes fungos são causadores de

diferentes tipos de onicomicoses, entre os principais podem distinguir-se: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton megni*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophyte*, *Aspergillus terreus* e as leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis* que podem causar os quatro tipos de onicomicoses conhecidas (Faergemann e Baran, 2003).

Infeções fúngicas oculares são em geral menos comuns que as de origem bacteriana ou viral. Foi constatado que a ceratite fúngica é a segunda causa mais comum de cegueira nos países em desenvolvimento, o que pode dever-se ao uso disseminado de lentes de contacto, umas das principais causas desta doença em geral associada a *Candida* sp. (Chowdhary e Singh, 2005). Várias regiões do olho podem ser atacadas mas a córnea (ceratite) e o segmento interior do olho (endoftalmite) são as principais regiões atacadas (Whitcher et al. 2001). Os fungos não conseguem penetrar no epitélio córneo do olho, sendo necessária uma lesão ou trauma para conseguirem atravessar essa barreira. Esse tipo de infeção fúngica pós-traumática é causada principalmente por espécies dos géneros *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Sporothrix* (Cha et al., 1997).

1.4.3.2. Terapêuticas Antifúngicas

As terapias antifúngicas atualmente disponíveis incluem fármacos que atuam em alvos bem definidos e se dividem em 4 classes (Tabela 3) (Stary e Sarnow, 1998; Hirschmann, 2009).

Existe atualmente um crescente número de resistências reportadas a estes fármacos (Williams e Lemke, 2002), por isso novos agentes antifúngicos são exigidos. Uma alternativa viável seria por exemplo o uso de compostos naturais com propriedades antifúngicas, compostos que aliem atividade antimicrobiana com uma menor toxicidade para o hospedeiro (Edwards e Filler, 1992; Graybill, 1992; D'Arrigo et al., 2019) a novos mecanismos de ação, que abram novas portas para o tratamento destas doenças. Os compostos de origem vegetal têm apresentado elevado potencial na prevenção e tratamento de doenças infecciosas de origem fúngica, não só pela inibição que causam como por melhorarem a eficácia de antifúngicos comerciais quando aplicados em conjunto (Cleeland e Squires, 1991; Mothana et al., 2018; D'Arrigo et al., 2019).

Tabela 3. Principais classes de Antifúngicos e modos de ação.

Classe Antifúngico	Modo de Ação	Fármacos (exemplos)	Referência
Poliênicos	Ligam-se a esteróis na membrana celular dos fungos, principalmente ao ergosterol, alterando a temperatura de transição da membrana, deixando-a num estado menos fluido	Anfotericina B Nistatina Flucitosina	Goodman e Gilman, 1996 Williams e Lemke, 2002
Azólicos	Inibem a lanosterol 1,4 α -demetilase, enzima que converte lanosterol em ergosterol. A falta de ergosterol na membrana conduz a danos estruturais e funcionais na mesma, inibindo o crescimento	Fluconazol Itraconazol Voriconazol	Korolkovas, 2003
Equinocandinas	Influenciam a síntese de glicanos na parede celular inibindo a enzima 1,3- β -glicano sintase. Podem ser usadas para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas em pacientes imunocomprometidos	Caspofungina Micafungina Anidulafungina	Debono e Robert, 1994
Alilaminas	Inibem a esqualeno epoxidase, enzima necessária à síntese de ergosterol	Terbinafina Butenafina	Debono e Robert, 1994

1.4.3.2.1. Aplicação Tópica de Fármacos

Uma ampla panóplia de agentes antifúngicos tem sido utilizada no controlo de infecções fúngicas dermatológicas. A este nível, o tratamento tópico tem provado ser bastante vantajoso, reservando-se o tratamento oral apenas para quando a infeção apresenta uma extensão muito significativa (Kumar et al., 2013).

A administração de fármacos através da pele pode ser conseguida por duas vias: tópica, havendo uma ação terapêutica local, isto é, o fármaco tem uma ação direta na pele, e transdérmica em que há uma ação terapêutica sistémica (Benson e Watkinson, 2012). Uma das grandes vantagens da administração tópica de fármacos é a sua ação direta no local alvo, necessitando por isso de uma menor quantidade de substância ativa para um mesmo efeito, como tal originando menos efeitos secundários sistémicos no organismo humano. A via tópica apresenta ainda inúmeras outras vantagens, entres as quais podemos realçar (Kulkarni, 2010; Singla et al., 2012): evita o efeito de primeira passagem, aumentando por isso a biodisponibilidade nos tecidos; utiliza fármacos com tempo de semi-vida curtos e com janela terapêutica estreita; possibilita terminar o tratamento quando necessário; melhora a adesão do doente à terapêutica; permite a autoadministração; é de fácil aplicação e tem menor flutuação plasmática e menos riscos associados (interações ou infeções) em relação à administração oral ou intravenosa.

Apesar de todas estas vantagens, a aplicação tópica de fármacos enfrenta ainda dois desafios: primeiro a natureza da barreira *stratum corneum* da pele, que evita a perda de água, eletrólitos e outros constituintes e “impede” (no seu limite) a penetração de moléculas, como as dos fármacos, do meio ambiente e, segundo, a deposição de fármaco dentro da pele deve ser idealmente conseguida com absorção percutânea limitada (Kumar, 2013). Assim, de forma a facilitar a distribuição de fármacos antifúngicos, melhorar a sua biodisponibilidade e por consequência aumentar a eficácia do tratamento, estão atualmente a ser desenvolvidos novos sistemas de libertação de fármacos. Nesta área, podem ser destacadas as nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) como os lipossomas, etossomas, microemulsões, nanopartículas, niossomas, microesferas e sistemas miceliais (Jain et al., 2010).

As SLNs apresentam inúmeras vantagens pois permitem a libertação controlada do princípio ativo - o que evita a absorção sistémica e é uma característica muito útil quando é necessário fornecer o fármaco durante longos períodos de tempo e/ ou quando este produz irritação em altas concentrações. Adicionalmente, exibem boa tolerância *in vivo*, protegem os princípios ativos (Sylvia et al., 2003) e favorecem a entrada dos fármacos na pele (Jenning et al., 2000; Wissing e Muller, 2003), tornando estes sistemas uma alternativa viável para a sua aplicação tópica. A vantagem das SLNs reside na sua matriz lipídica formada por lípidos fisiológicos, que diminuem em muito o risco de toxicidade. O pequeno tamanho destas partículas lipídicas garante um contacto próximo com o *stratum corneum*, podendo desta forma aumentar as propriedades bioadesivas e oclusivas, que são um requisito desejado na aplicação tópica (Wissing e Muller 2001, Gupta, 2011).

1.4.4. Fungos Como Possíveis Alvos para Avaliação de Novas Terapêuticas

Alguns fungos são hoje em dia uma ameaça real à homeostasia do ser humano e animais, e representam uma ameaça real para a saúde. Desta forma, constituem também possíveis alvos para avaliação de novas terapias a aplicar na sua erradicação, a que se acrescenta o facto de muitos deles apresentarem resistência apreciável às terapêuticas já existentes (Williams e Lemke, 2002). Tinea pedis, por exemplo, com taxas de incidência bastantes elevadas em comparação com outras infeções fúngicas tópicas, pode ser tratada com cremes antifúngicos como o miconazol ou clotrimazol (Korting et al. 2007). No entanto, o tratamento tópico falha na maioria dos pacientes, especialmente quando a doença se associa à onicomicose (Hart et al., 1999). A terapêutica oral é usada para condições de doença grave ou extensa, e são necessárias várias doses de diferentes antifúngicos por longos períodos de tempo (Hall et al., 1997), o que torna o tratamento bastante complicado para o paciente, tornando-o menos eficaz.

No caso de infecções por tinea capitis, apenas antifúngicos orais estão disponíveis para uma eliminação adequada (Roberts e Friedlander, 2005). Tópicamente, pode ser tratada com um champô antifúngico contendo cetoconazol ou sulfeto de selênio.

Para o tratamento de onicomicoses, a terapêutica oral é privilegiada à terapêutica tópica devido a uma penetração deficiente do fármaco através do leito ungueal. No entanto, apresenta os problemas dos restantes tratamentos orais, nomeadamente o período de tratamento. No tratamento desta infecção, por exemplo, é frequente usar fármacos como o itraconazol, e uma dose diária de 200 mg por um período de dois a três meses (Evans e Sigurgeirsson, 1999).

Alguns dos fungos que afetam mais comumente animais e humanos, bem como o seu interesse clínico e importância para este trabalho em concreto são apresentados na tabela A1 (Apêndice 1).

1.5. Problema Biológico e Objetivo Deste Trabalho

A resistência a agentes antimicrobianos é atualmente uma ameaça global e é já considerada um grave problema de saúde pública (WHO, 2019), tornando a descoberta de novos agentes antimicrobianos uma necessidade urgente. O rápido aumento e prevalência de uma grande variedade de infecções fúngicas superficiais e cutâneas (Kaur e Kakkar, 2010) faz com que estratégias antimicrobianas alternativas e novos agentes antimicrobianos sejam extremamente necessários. Esta necessidade tem levado a um novo olhar sobre as terapêuticas tradicionais, como por exemplo o uso de compostos naturais com propriedades antimicrobianas (Machado, 2011), numa demanda por novos e inovadores compostos bioativos.

O própolis, como produto de origem natural com inúmeras bioatividades, apresenta um potencial de utilização e possíveis aplicações em indústrias variadas. As suas propriedades biológicas e farmacológicas têm sido alvo de estudo e interesse por parte de vários grupos de investigação e exploradas em diferentes aplicações (Silva-Carvalho et al., 2015; Shatalebi et al., 2016; Khurshid et al., 2017; Mazzarello et al., 2018; Jautová et al., 2018). No entanto, e contrariamente à maioria dos produtos derivados de plantas medicinais, o própolis possui uma enorme variabilidade em termos de composição química, quer em amostras de origens botânicas diferentes, quer em amostras provenientes da mesma origem mas colhidas em épocas diferentes (Katalinic et al., 2004; Bankova, 2005; Falcão et al., 2010). Esta variabilidade, que emerge da caracterização da composição química e das atividades biológicas de inúmeras amostras de própolis oriundas de vários locais do mundo, representa um grande problema para a padronização deste produto natural, e conseqüentemente para o seu uso e aceitação pelas comunidades médica e científica (Bankova et al., 2000; Silva-Carvalho et al., 2015).

O principal objetivo deste trabalho é assim o estudo do própolis português de diferentes origens, particularmente no que diz respeito à sua caracterização química e avaliação das suas atividades

biológicas, em especial a sua atividade antifúngica e atividade antioxidante, a fim de avaliar a possibilidade do seu uso / exploração em aplicações principalmente médicas, mas também cosméticas e nutracêuticas.

As amostras de própolis selecionadas para este estudo são provenientes de dois apiários (Gerês (G) e Pereiro (P)). Ambas têm vindo a ser estudadas e caracterizadas pelo nosso grupo desde o ano 2011, tendo sido mantidas ambas as amostras no presente trabalho por refletirem alguma da diversidade química e biológica que se atribui ao própolis enquanto produto natural. A contínua caracterização e estudo de amostras de própolis nacional contribuirá para a valorização do própolis como um subproduto da colmeia, podendo traduzir-se numa mais-valia para os apicultores e a apicultura nacionais. Apesar de uma produção baixa, os valores de comercialização do própolis bruto são de 50 €/Kg, podendo atingir cerca de 150 €/Kg noutros países (Dias et al., 2012), aumentando os lucros associados a esta atividade tradicionalmente assente na exploração exclusiva do mel.

Neste trabalho foram caracterizadas e estudadas as amostras relativas ao ano de 2017, após extração etanólica. Estes extratos etanólicos (EEs) foram então caracterizados em termos de composição química e testados contra um painel de bactérias, leveduras e fungos filamentosos patogénicos humanos. Os fungos usados ao longo deste trabalho são espécies que na sua maioria parasitam tecidos queratinosos como a pele, unhas e cabelo, causando infeções denominadas dermatofitoses. Várias foram as características que contribuíram para a escolha destes organismos como modelos biológicos: o facto de serem dermatófitos, a sua importância e relevância clínica e o facto de ter ou não ter sido estudado e avaliado o efeito de própolis nestas espécies. O estudo da sua suscetibilidade a própolis poderá permitir perspetivar novas soluções terapêuticas, passando estas por uma possível aplicação tópica do própolis. Esta traria inúmeras vantagens para o paciente, devido à sua ação direta no local alvo, diminuindo a probabilidade de efeitos adversos para o organismo (Kulkarni, 2010).

A atividade antioxidante é outra das principais bioatividades frequentemente encontrada em amostras de própolis, tendo sido igualmente avaliada nas amostras de própolis estudadas neste trabalho. A produção excessiva de radicais livres, como por exemplo ROS pode levar a danos em biomoléculas e amplificar respostas inflamatórias (Koolman e Rohm, 1996). Estas espécies estão associadas a uma série de processos degenerativos e a muitas outras doenças, daí a importância da procura e estudo de novos compostos antioxidantes.

Paralelamente, ensaios para avaliar o teor de polifenóis, de flavonoides e de orto difenóis totais foram realizados, a fim de caracterizar e comparar quimicamente as amostras. Apesar de toda a variabilidade atribuída ao própolis, estas são as moléculas destacadas como os seus principais compostos ativos, portadoras de propriedades de interesse e de possível utilidade para possíveis aplicações em áreas diversas (Scalbert, 2000; Manach, 2004; Jautová et al., 2018).

2.1. Amostras de Própolis e Preparação de Extratos Etanólicos

As amostras de própolis usadas neste trabalho são oriundas de dois apiários distintos do território de Portugal continental. Uma foi amavelmente fornecida pelo apicultor Amadeu Fortunas e provém de um apiário no Gerês (G), mais concretamente localizado na aldeia de Paradela, concelho de Montalegre, distrito de Vila Real (41°45'41.62" N; 7°58'03.34" W). A outra amostra, gentilmente cedida pelo apicultor Pedro Fernandes, é oriunda do apiário Pereiro (P), situado na região da Beira Alta - freguesia do Pereiro, concelho de Pinhel e distrito da Guarda (N 40° 44'57.135", O 7° 0'59.403). Ambas as amostras foram recolhidas no ano de 2017 (G17; P17) e foram usadas para preparar extratos etanólicos (EEs).

Os extratos etanólicos de própolis foram preparados de forma semelhante em ambas as amostras e de acordo com o procedimento já descrito anteriormente (Freitas et al., 2018). Aproximadamente 15 g de própolis bruto foram incubados com 100 ml de etanol absoluto (EtOH) à temperatura ambiente, na ausência de luz, num agitador orbital a 100 rotações por minuto (rpm) durante 24 horas (h). A suspensão resultante foi então filtrada, com recurso a um funil de Buchner e um Kitasato associado a uma bomba de vácuo, reservando-se o filtrado obtido. Os resíduos resultantes foram novamente incubados com 50 ml de EtOH, nas condições atrás descritas. Os dois filtrados resultantes da extração de cada amostra foram misturados num frasco de fundo redondo e procedeu-se à evaporação do solvente num evaporador rotativo (Büchi Rotavapor RE 121) com um banho (Büchi 461) a 40 °C, e a 40 rpm. No final do processo foram obtidos dois extratos etanólicos - G17.EE e P17.EE – tendo sido armazenados ao abrigo da luz e a 4 °C até serem utilizados.

2.2. Caracterização Química dos Extratos Etanólicos de Própolis

2.2.1. Determinação do Teor de Polifenóis Totais

O teor de polifenóis totais (TPT) foi determinado em ambos os extratos (G17.EE e P17.EE) de acordo com uma adaptação do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999; Tiveron et al., 2016). Este método baseia-se em reações de oxidação-redução entre substâncias redutoras e iões metálicos (Silva et al., 2010). O reagente de Folin, de coloração amarela, consiste numa mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico que são reduzidos quando em contacto com substâncias com propriedades redutoras, como os polifenóis. Esta reação dá-se em meio com pH alcalino, meio propício para que estas substâncias redutoras dissociem um protão, induzindo assim a formação do anião fenolato. Este anião é capaz de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu, formando desta forma o óxido de tungsténio e óxido de molibdénio, que possuem coloração azul, detectável na banda do espectro de 760 nm, possibilitando a

quantificação dessas substâncias através de espectrofotometria (Genovese et al., 2003; Huang et al., 2005).

A 10 µl de cada solução de própolis (variando na concentração entre 10 e 200 µg/ml) foram adicionados 50 µl de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10) e 40 µl de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 7,5 % (p/v), numa microplaca. Após 1 h de incubação ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, mediu-se a absorvância a 760 nm num leitor de microplacas (Synergy HT BIOTECH). Para cada concentração de própolis testada foi preparada uma mistura idêntica, com 10 µl de cada solução de própolis e 90 µl de EtOH, usada como branco. Misturas sem própolis, contendo 10 µl de EtOH, 50 µl de reagente de Folin-Ciocalteu e 40 µl de Na₂CO₃, foram utilizadas como controlo. Uma solução de ácido gálico (AG) (1-50 µg/ml) foi usada como padrão. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de G17.EE ou P17.EE (mg AG/ g extrato), como o valor médio de pelo menos três experiências independentes, cada uma com três réplicas.

2.2.2. Determinação do Teor em Flavonoides Totais

O teor de flavonóides totais (TFT) foi determinado nos extratos G17.EE e P17.EE de acordo com o método descrito por Woisky e Salatino (1998), com algumas modificações. Este método baseia-se na reação entre o ião alumínio e os flavonoides. O ião alumínio (Al³⁺) complexa-se com as moléculas de flavonóides da amostra em teste, estabelecendo o complexo estável flavonóide-Al³⁺, de coloração amarela cuja intensidade é proporcional à concentração de flavonóides presente na amostra (Mabry et al., 1970). Esta complexação promove, em espectroscopia, deslocamento batocrómico e intensificação da absorção, podendo esta ser quantificada sem sofrer influência de outros compostos fenólicos presentes na amostra.

Para a determinação do TFT, a 50 µl de cada solução de própolis (variando na concentração entre 50 e 1800 µg/ml) foi adicionado um volume de 50 µl da solução de cloreto de alumínio (AlCl₃) 2 % (p/v) em etanol. Misturas de 50 µl de cada solução de própolis e 50 µl de EtOH foram usadas como brancos. Como controlo usou-se uma mistura de 50 µl de EtOH e 50 µl AlCl₃. Estas misturas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente e na ausência de luz. A absorvância foi posteriormente medida a 420 nm (Synergy HT BIOTECH). Uma solução etanólica de quercetina (Q) (25-200 µg/ml) foi usada como padrão. Os resultados foram expressos em equivalentes de quercetina (EQ) por gramas de G17.EE ou P17.EE (mg QE / g extrato) como o valor médio de pelo menos três ensaios independentes com três réplicas cada.

2.2.3. Determinação do Teor de Orto-Difenóis

O método adotado para determinação do teor de orto-difenóis (TO) em ambos os extratos (G17.EE e P17.EE) foi descrito por Mateos e colaboradores (2001), com algumas modificações. Neste método, o molibdato de sódio reage com as hidroxilas dos orto-difenóis, presentes nas amostras em estudo. Desta reação resulta um produto com coloração alaranjada, que tem absorção máxima a um comprimento de onda de 370 nm (Mateos et al., 2001).

Em microplaca, a um volume de 160 µl de cada solução de extrato (variando na concentração entre 150 e 300 µg/ml) foi adicionado molibdato de sódio a 25 mg/ml (em EtOH 50 %). Esta mistura foi incubada no escuro, à temperatura ambiente, durante 15 minutos (min), após o que se procedeu à leitura da absorvância a 370 nm. Misturas de 160 µl de cada solução de própolis e 40 µl de EtOH foram usadas como brancos. Como controlo usou-se uma mistura de 160 µl de EtOH e 40 µl da solução de molibdato de sódio. Como padrão foi usada uma solução de AG (10-200 µg/ml). Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico por grama de G17.EE e P17.EE (µg EAG/g extrato) como o valor médio de pelo menos três experiências independentes com três réplicas.

2.3 – Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos Extratos Etanólicos de Propolis

2.3.1. Ensaio de Eliminação do Radical 2,2-difenil-1-pirarilidrazil (DPPH •)

Este método baseia-se na transferência de eletrões entre o radical cromatogénico DPPH • (2,2-difenil-1-pirarilidrazil), de cor violeta, e um determinado substrato. O DPPH • é considerado um radical livre, estável em solução, que possui um eletrão de valência não emparelhado que pode ser doado, podendo assim reduzir-se na presença de uma substância com poder antioxidante (Manzocco et al., 1998; Mitra e Uddin, 2014). A redução de DPPH • pode ser seguida por espectrofotometria, uma vez que a formação da forma não radicalar (DPPH-H), quando em contacto com uma substância antioxidante, implica uma diminuição de absorvância que tem um máximo a 518 nm e que é também acompanhada por uma alteração na cor da solução, de violeta para amarelo (Mitra e Uddin 2014).

A capacidade de *scavenging* de DPPH • foi determinada em microplaca, pela adição de 100 µl de uma solução etanólica de DPPH • 0,04 % (p/v) a 50 µl de cada solução de própolis (G17.EE e P17.EE) em concentrações variáveis entre 1 e 50 µg/ml. Após incubação à temperatura ambiente, no escuro, durante 20 min, mediu-se a absorvância a 518 nm. A atividade antioxidante dos extratos por ação *scavenging* de DPPH • foi calculada com recurso à equação:

$$\text{Atividade Antioxidante}(\%) = \frac{A_{\text{controlo}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}}} \times 100$$

Onde A_{controle} é a absorvância da solução de DPPH• sem extrato e A_{amostra} é a absorvância da mistura de G17.EE ou de P17.EE com o radical DPPH•.

Como brancos foram utilizadas misturas de 50 µl de cada solução de própolis e 100 µl de EtOH; como controlo usou-se a mistura de 100 µl da solução de DPPH• e 160 µl de EtOH. Os resultados foram calculados e expressos em valores de IC_{50} , correspondendo à concentração de extrato capaz de reduzir 50 % do radical DPPH•. Foram realizados pelo menos três ensaios independentes com três réplicas. Como padrão foi usada uma solução de AG (0,2-2,5 µg/ml).

2.4. Avaliação do Potencial Antimicrobiano dos Extratos Etanólicos de Propolis

2.4.1. Microrganismos

A atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos em estudo foi testada contra um painel de espécies com interesse clínico e biotecnológico, entre as quais seis bactérias Gram-positivas e uma bactéria Gram-negativa (Tabela 4), duas leveduras (Tabela 5 e ainda um conjunto de fungos filamentosos com elevado interesse clínico, na sua maioria dermatófitos (Tabela 6)

Tabela 4. Estirpes bacterianas usadas como indicadores de suscetibilidade no ensaio para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês e do Pereiro recolhidas em 2017. Todas as espécies foram obtidas da coleção de culturas do Departamento de Biologia.

Bactérias	Tipo do Isolado	Referência
Gram-positivas		
<i>Bacillus subtilis</i>		48886
<i>Bacillus cereus</i>	Sangue	ATCC 7064
<i>Bacillus megaterium</i>	-	932
<i>Propionibacterium acnes</i>	Isolado Clínico	H60803
<i>Staphylococcus aureus</i>	Isolado Clínico (Lesão Humana)	ATCC 6538
<i>MRSA</i>	Isolado Clínico (Aspiração)	M746665/ MRSA
Gram-negativas		
<i>Escherichia coli</i>	-	CECT 423

Tabela 5. Leveduras usadas como indicadores de suscetibilidade no ensaio para avaliação da atividade antifúngica dos extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês e do Pereiro recolhidas em 2017. Todas as espécies foram obtidas da coleção de culturas do Departamento de Biologia.

Microrganismos	Tipo de Isolado	Referência
Leveduras		
<i>Candida albicans</i>	Isoaldo Clínico (lesão de pele humana)	53B
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laboratorial	BY4741/Y00000

Tabela 6. Fungos Filamentosos usados como indicadores de suscetibilidade no ensaio para avaliação da atividade antifúngica dos extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês e do Pereiro recolhidas em 2017.

Microrganismos	Tipo de Isolado	Referência
Fungos Filamentosos		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ambiental	-
<i>Aspergillus terreus</i>	Ambiental	-
<i>Fusarium sp.</i>	Ambiental	-
<i>Microsporum audourii</i>	n.c.	ACT
<i>Microsporum canis</i>	n.c.	-
<i>Nannizzia gypse</i>	n.c.	SAB
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Ambiental	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	n.c.	-
<i>Trichophyton sudanense</i>	n.c.	-
<i>Trichophyton tonsurans</i>	n.c.	-

2.4.2. Meios de Cultura e Condições de Crescimento

Ao longo deste trabalho as bactérias foram cultivadas em meio LB [0,5 % (p/v) extrato de levedura, 1 % (p/v) triptona, 1 % (p/v) NaCl] e as leveduras foram cultivadas em meio YPD [extrato de levedura 1 % (p/v), peptona 1 % (p/v), glucose 2 % (p/v)]. Para manutenção, as leveduras foram cultivadas em placas contendo meio sólido YPDA e as bactérias em meio LBA (respetivamente YPD ou LB suplementados com 2 % (p/v) agar) e depois conservadas a 4 °C até utilização ou até se executar nova repicagem. A incubação decorreu durante 48 h a 30 °C no caso das leveduras, ou durante 24 h a 37 °C para as bactérias.

Por sua vez, os fungos filamentosos foram cultivados em meio PDA [0,4 % (p/v) amido de batata, dextrose 2 % (p/v), agar 1,5 % (p/v)] ou meio Sabouraud [4 % (p/v) D(+)-glucose, peptona 1% (p/v), agar 1,5 % (p/v)]. Para determinação da atividade dos EEs contra fungos filamentosos foi ainda usado meio Sabouraud líquido [4 % (p/v) D(+)-glucose, peptona 1% (p/v)].

Para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana, leveduras e bactérias foram cultivadas em meio YPD ou meio LB, respetivamente, com uma relação ar/ líquido de 5/1 e incubadas a 30 ou 37 °C, respetivamente, num agitador orbital, a 200 rpm, até se ter atingido o meio da fase exponencial de crescimento. Na avaliação da atividade antimicrobiana usaram-se os meios LBA ou YPDA suplementados com os diferentes extratos etanólicos de própolis nas concentrações de 100, 200, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 µg/ml. Como controlo do ensaio, foram feitos meios YPDA e LBA e ainda meios YPDA e LBA aos quais foi adicionado um volume de EtOH equivalente ao volume da maior concentração de EE de própolis usada no ensaio. Todas as placas foram conservadas ao abrigo da luz e a 4 °C até utilização.

Na avaliação da atividade antifúngica contra fungos filamentosos usaram-se os meios PDA ou Sabouraud suplementados com os diferentes EEs de própolis nas concentrações de 500 e 1000 µg/ml. Os mesmos meios, preparados de acordo com a respetiva receita e na ausência de EE, ou contendo um volume de EtOH equivalente ao volume da maior concentração de própolis usada no ensaio, foram usados como controlos. Todas as placas foram conservadas ao abrigo da luz e a 4 °C até utilização.

2.4.3. Avaliação da Atividade Antimicrobiana Contra Bactérias e Leveduras

2.4.3.1- Preparação de Culturas

Para estudar o efeito de G17.EE e P17.EE nas estirpes de bactérias (Tabela 4) e leveduras (Tabela 5) selecionadas, procedeu-se primeiramente à preparação de pré-inóculos dessas estirpes indicadoras de suscetibilidade, usando os meios e condições adequadas a cada tipo de microrganismo, e já descritos (YPD a 30 °C para leveduras ou LB a 37 °C no caso das bactérias). Após crescimento durante a noite, com 200 rpm de agitação, os inóculos foram diluídos em meio de cultura adequado para uma D.O.₆₀₀

(densidade ótica a 600 nm) de 0,1 e incubados novamente nas mesmas condições a fim de se garantirem dois tempos de duplicação, no mínimo, e se atingir o meio da fase exponencial do crescimento ($D.O_{600}$ entre 0,4 e 0,6), para posterior realização dos ensaios de viabilidade.

2.4.3.2- Ensaio para Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A atividade de G17.EE e P17.EE foi avaliada através do método de diluição em placa, usando meios de cultura apropriados e onde previamente se procedeu à incorporação de cada um dos extratos etanólicos nas concentrações a estudar (secção 2.4.2). Este procedimento permitiu a determinação de valores de MIC (do inglês, *minimum inhibitory concentration* ou concentração mínima inibitória), isto é, a concentração mais baixa capaz de inibir o crescimento do microrganismo testado, com base na presença ou ausência de crescimento do microrganismo na presença dos EEs de própolis.

Após preparação das culturas microbianas a usar, como atrás se descreveu (secção 2.4.3.1), retiraram-se gotas de 5 μ l de cada estirpe e colocaram-se à superfície dos meios suplementados com as diferentes concentrações de cada EE. A metodologia foi repetida em meios idênticos na ausência de própolis e em meio suplementado com etanol no máximo volume de extrato usado, servindo estes como controlos. Após incubação (a 30 °C durante 48 h ou a 37 °C durante 24 h para leveduras ou bactérias, respetivamente), a determinação do valor de MIC foi efetuada por observação da presença/ ausência de crescimento na presença de cada concentração de cada um dos dois EEs de própolis. Para determinação dos valores de MIC, foram realizados três ensaios independentes com três réplicas cada.

2.4.4. Avaliação da Atividade Antimicrobiana Contra Fungos Filamentosos

2.4.4.1 – Método de Diluição em Placa

A atividade antifúngica de G17.EE e P17.EE contra fungos filamentosos foi avaliada através da observação e medição do crescimento do micélio fúngico na presença de cada EE das amostras de própolis (G17 e P17), previamente incorporados em meio sólido apropriado. Um disco de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro contendo micélio de cada uma das diferentes espécies em estudo foi inoculado no centro de placas de petri contendo diferentes concentrações (500 μ g/ml e 1000 μ g/ml) dos EEs de própolis. Placas de Petri idênticas, mas sem extratos (controlo), ou contendo EtOH 100 % em vez de EE (controlo EtOH), foram inoculadas com discos de micélios de cada uma das estirpes estudadas, em simultâneo. A incubação decorreu na ausência de luz e à temperatura ambiente. Todas as placas de Petri foram inspeccionadas diariamente e, após observação das primeiras evidências de crescimento, o diâmetro da colónia fúngica para cada estirpe foi medido e registado. Posteriormente, com os valores obtidos, foi

calculada a taxa específica de crescimento de cada estirpe na ausência e na presença dos dois EEs, recorrendo à equação de Gompertz (Tjørve, 2017), que descreve uma função do tipo sigmoideal que permite caracterizar quantitativamente o crescimento através dos parâmetros coeficiente da taxa de crescimento (K_G) e tempo de inflexão (T_i). A equação é descrita pela equação:

$$W(t) = A \exp(-\exp(-k_G(t - T_i)))$$

Onde $W(t)$ representa o valor esperado de crescimento fúngico em função do tempo (dias), t representa o tempo, A representa a assintota superior, K_G simboliza o coeficiente da taxa de crescimento (que afeta o declive) e T_i representa o tempo de inflexão. Tendo em conta os parâmetros obtidos pela equação de Gompertz e a equação que se segue, foi então calculada a taxa específica de crescimento para cada estirpe.

$$\text{Taxa específica de crescimento} = \frac{A \times k_G}{e}$$

Os resultados referentes à taxa específica de crescimento de cada estirpe foram expressos em cm/ dia como o valor médio de pelo menos três experiências independentes com duas réplicas.

Devida à impossibilidade de adaptação do modelo matemático ao crescimento de um dos fungos testados e de forma a verificar a influência do extrato em todos os fungos em teste, foi calculada uma taxa de inibição de crescimento radial, no dia a que cada fungo atingiu no controlo o diâmetro máximo permitido e ao 12º dia (dia a qual os fungos de crescimento mais rápido atingiram o máximo de diâmetro permitido), através da equação (Reyes-Cilpa et al., 1997):

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Crescimento micelial na placa controlo} - \text{Crescimento micelial na placa suplementada}}{\text{Crescimento micelial na placa controlo}} \times 100$$

Foi ainda realizada uma análise comparativa dos diferentes fungos (nomeadamente comportamento, coloração, textura, presença/ ausência de estruturas reprodutoras, etc.) recorrendo-se essencialmente à observação visual direta e ao registo fotográfico.

2.4.4.2 Método de Diluição em Meio Líquido

A atividade antifúngica de G17.EE e P17.EE contra fungos filamentosos foi ainda avaliada com recurso ao método de diluição em meio líquido. Esta metodologia foi estabelecida inicialmente e

reportada no livro M38-A do Clinical and Laboratory Standards Institute (Wayne, 2002) e adaptada posteriormente para dermatófitos por Fernández-Torres et al. (2002) e Barros et al. (2006).

Numa fase inicial, usando *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus terreus* e ambos os EEs, procedeu-se a uma otimização de uma séria de parâmetros (temperatura e agitação, volume de EtOH a usar, concentrações de extrato e tempo de incubação) e a adaptação dos mesmos por forma a estabelecer o ensaio a usar para a avaliação do potencial antifúngico dos EEs de própolis contra os fungos de crescimento irregular em meio sólido. Posteriormente, e quando os parâmetros estavam já estabelecidos, para efeitos comparativos o ensaio foi aplicado a toda a coleção de fungos filamentosos em estudo.

Procedeu-se à raspagem do micélio dos fungos filamentosos a estudar e à sua ressuspensão em solução Tween 80 0,25 % (v/v). O número de esporos obtidos foi estimado após contagem numa câmara de Neubauer e o inóculo a usar foi ajustado para uma concentração final de 5×10^4 esporos/ml em meio Sabouraud líquido. Aliquotas de 195 μ l desta suspensão de esporos foram dispensadas em poços de microplacas, qual aos quais se adicionaram 5 μ l de cada EE de própolis nas diferentes concentrações a testar (500, 1000 e 2000 μ g/ml). A incubação decorreu a 30 °C, por um período de aproximadamente 72 h e a D.O. foi lida periodicamente, a 530 nm. Posteriormente foi calculada a percentagem de inibição da D.O., em comparação com as situações controlo (controlo EtOH - esporos cultivados na ausência de EEs de própolis mas na presença de etanol), nos diferentes tempos do ensaio. Os valores de MIC₅₀, para os dois EEs, contra cada uma das espécies estudadas, foram extrapolados através da representação das percentagens de inibição de D.O. em função da concentração de cada EE. O MIC₅₀ corresponde assim à concentração de G17.EE ou de P17.EE que causam uma redução de D.O. igual a 50 %. Foram realizados no mínimo três ensaios independentes com quatro réplicas cada.

Para determinar a mínima concentração fungicida (MFC) procedeu-se à inoculação de 5 μ l do conteúdo de cada poço, após 72 h, numa placa de PDA ou Sabouraud e posterior incubação a 30 °C por um período de 48 h.

2.5. Análise Estatística

Todos os ensaios que permitiram a caracterização química dos EEs (determinação dos teores de polifenóis e flavonóides), assim como o ensaio que permitiu avaliar a sua capacidade antioxidante e os ensaios que permitiram avaliar o potencial antibacteriano das amostras, foram analisados estatisticamente com recurso ao programa GraphPad Prism 5. As diferenças entre os resultados foram avaliadas usando a análise de variância (ANOVA) para comparar mais do que duas médias, e o teste Tukey para comparar todas as médias entre si. Foi ainda usada a análise t-test quando comparadas apenas duas médias. Quando os valores destes testes apresentam um valor de $p < 0,05$, indica que os resultados obtidos para

os dois EEs apresentam diferenças estatisticamente significativas. Esta análise foi expressa através de um sistema de notação alfabética, sendo que dois EEs com a mesma letra não serão significativamente diferentes.

3.1. Caracterização Química de G17.EE e de P17.EE

3.1.1. Teor Total de Polifenóis

Como referido, o teor de polifenóis totais (TPT) foi determinado neste trabalho com recurso ao método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999; Tiveron et al., 2016), com algumas adaptações. Como se pode observar na figura 13, G17.EE apresenta um TPT ($177,9 \pm 3,338$ mg EAG/ g extrato) superior ao de P17 EE ($155,1 \pm 4,063$ mg EAG/ g extrato).

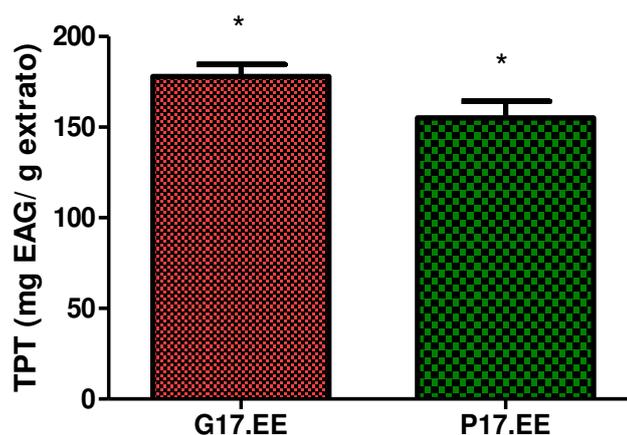


Figura 13. Teor de polifenóis totais (TPT) de G17.EE e P17.EE. Os valores são expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/g extrato) e resultam da média \pm DV de 3 ensaios independentes com 3 réplicas cada (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Esta variação era já expectável uma vez que os dois extratos são oriundos de localidades bem diferenciadas geograficamente, com vegetação e condições climáticas distintas, corroborando a amplamente descrita influência, na composição química do própolis, de fatores como o tipo de vegetação envolvente (Katalinic et al., 2004; Falcão et al., 2010), condições climáticas distintas (Falcão et al., 2010), ou as condições de recolha (Sheng et al., 2007). Na zona envolvente do apiário do Pereiro encontra-se maioritariamente vegetação como a azinheira, pinheiro bravo, carvalho e sobreiro (Agência Regional de Energia e Ambiente do Interior, 2007), já na zona circundante ao apiário do Gerês encontra-se a urze, o castanheiro, silvas e algumas árvores de fruto (informação fornecida pelo apicultor). As duas amostras de própolis estudadas diferem também nas condições de produção e recolha: de acordo com os apicultores responsáveis, o própolis do Pereiro é recolhido por raspagem das colmeias, na altura da sua limpeza, enquanto o própolis do Gerês é produzido em grades e a sua recolha é realizada a partir das mesmas, após arrefecimento.

Comparando o TPT de P17.EE com os teores de vários extratos etanólicos de própolis do Pereiro (P. EEs) preparados entre os anos de 2011 a 2016 (A. Freitas, resultados não publicados) (Tabela 7),

verifica-se que o TPT de tais extratos é invariavelmente mais elevado que o teor apresentado pelo extrato da amostra recolhida em 2017. Esta diferença entre extratos é corroborada estatisticamente, sendo o TPT de P17.EE semelhante apenas ao encontrado em P12.EE.

Tabela 7. Teores de polifenóis totais, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato), dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Pereiro recolhidas de 2011 a 2017 (P.EEs). Os valores são apresentados na forma de média \pm DV. Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

P. EEs	TPT (mg EAG/ g extrato)	Autores
P11.EE	237,8 \pm 2,07 ^b	(A. Freitas, resultados não publicados)
P12.EE	178,3 \pm 6,66 ^{a,c}	
P13.EE	217,6 \pm 6,61 ^{b,d}	
P14.EE	174,4 \pm 4,27 ^c	
P15.EE	262,2 \pm 4,27 ^e	
P16.EE	223,8 \pm 245 ^{b,d}	
P17.EE	155, \pm 4,063 ^a	

De forma a avaliar a eventual influência de condições meteorológicas nos TPT apresentados pelos EEs nos diferentes anos, foram analisados os boletins meteorológicos de Portugal continental referentes aos anos de 2011 a 2017 (IPMA, 2019). Os anos de 2012 e 2017 foram reportados como anos com valores de temperatura média do ar bastante elevada e valores de pluviosidade bastante abaixo da média, sendo o ano de 2012 considerado um ano de seca meteorológica, condições que se vão refletir na vegetação local e possivelmente traduzir-se num TPT inferior nas amostras nos anos em causa. No entanto, e após análise dos restantes anos, verificou-se que 2015 foi de igual forma um ano de seca meteorológica, com valores de temperatura média do ar bastante elevados em relação à média. Assim, sem retirar a importância que as condições meteorológicas possam ter tido na variação dos TPT, não poderão ser indicados como a única causa de tais diferenças, considerando o TPT mais elevado de P15.EE.

Fazendo uma análise idêntica para G.EEs, isto é, comparando os resultados obtidos para os TPT de G17.EE com os dos extratos etanólicos de própolis proveniente do mesmo apiário (G. EEs) mas preparados a partir de amostras recolhidas entre os anos de 2011 e 2016 (A. Freitas, resultados não publicados) (Tabela 8), constatam-se valores mais elevados nos EEs preparados com própolis recolhido em 2012, 2013 e 2015 e teores mais baixos em G11.EE, G14.EE e G16.EE.

Tabela 8. Teores de polifenóis totais, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/ g extrato), dos extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês, recolhidas de 2011 a 2017 (G.EEs). Os valores são apresentados na forma de média \pm DV. Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

G. EEs	TPT (mg EAG/ g extrato)	Autores
G11.EE	142,9 \pm 1,89 ^b	(A. Freitas, resultados não publicados)
G12.EE	212,2 \pm 9,23 ^c	
G13.EE	205,8 \pm 3,51 ^{c,d}	
G14.EE	165,4 \pm 4,16 ^{a,e}	
G15.EE	207,9 \pm 7,48 ^{c,d}	
G16.EE	185,69 \pm 12,05 ^{a,e}	
G17.EE	177,9 \pm 3,34 ^a	(este trabalho)

Moreira et al. (2008) reportaram TPT de 329 \pm 0,01 e 151 \pm 0,01 mg EAG/ g extrato em extratos etanólicos de amostras de própolis oriundas da região de Bornes e do Fundão, respetivamente, revelando diferenças mais acentuadas para este parâmetro estas duas amostras de própolis de origem nacional. Em EEs de própolis da Polónia foram registados TPT de 150,8 mg EAG/ g extrato (Czarny et al., 2017), Bojic et al. (2018) reportaram valores de TPT de 136,14 mg EAG/ g extrato em EEs de própolis da Croácia e teores entre 104,6 e 286,9 mg EAG/g extrato foram reportados para própolis originário de diferentes partes da Hungria (Molnár et al., 2017). Assim, os TPT encontrados em G.EEs e P.EEs situam-se dentro da gama dos valores reportados quer para própolis português quer para outras amostras de própolis europeu.

O própolis europeu, onde o própolis em estudo neste trabalho se inclui, apresenta em geral TPT bastante mais elevados que amostras de própolis de outras origens. Schmidt et al. (2014) referiram teores entre 108,9 \pm 3,2 e 147,4 \pm 4,1 mg EAG/ g extrato etanólico de própolis brasileiro; já Andrade et al. (2017) mencionaram TPT um pouco inferiores, entre 55,74 \pm 0,48 e 91,32 \pm 0,49 mg EAG/ g extrato, em diferentes EE de própolis do nordeste do Brasil. Mas a variabilidade é uma vez mais uma característica de própolis no que diz respeito a este parâmetro: em própolis da Tailândia, por exemplo, foi descrito um TPT de 31,2 mg EAG/ g, enquanto 299,0 mg EAG/ g extrato foi o teor encontrado num EE de própolis da China (Kumazawa et al., 2014). Em termos comparativos, os teores de substâncias fenólicas mais elevados apresentados nas amostras em estudo faz antever a presença de características/ propriedades únicas nos extratos e com elevado interesse para futuros estudos e possíveis aplicações.

3.1.2. Teor Total de Flavonóides

O teor de flavonóides totais (TFT) de P17.EE e G17.EE foi determinado neste trabalho de acordo com o método descrito por Woisky e Salatino (1998), com algumas modificações. À semelhança do que se observou para o TPT, é também G17.EE que apresenta um TFT superior ($36,76 \pm 1,142$ mg EAG/ g extrato) ao de P17 EE ($24,76 \pm 1,401$ mg EAG/ g extrato) (Figura 14).

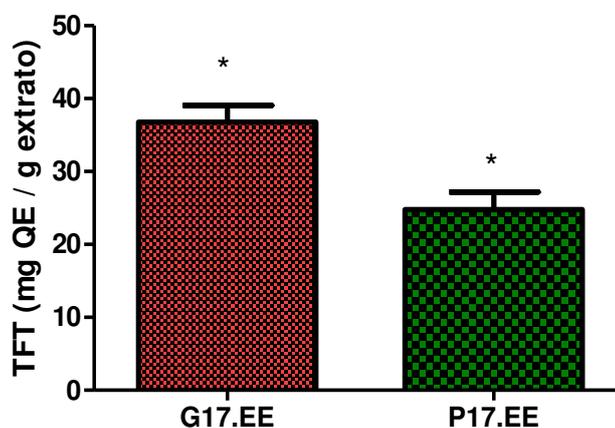


Figura 14. Teor de flavonóides totais (TFT) de G17.EE e P17.EE. Os valores são expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/g extrato) e resultam da média \pm DV de 3 ensaios independentes com 3 réplicas cada (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Comparando o TFT de P17.EE com os teores dos vários extratos etanólicos preparados a partir de amostras de própolis do Pereiro (P. EEs) colhidas entre 2011 e 2016 (A. Freitas, resultados não publicados) (Tabela 9), verificam-se teores mais elevados que o apresentado pelo extrato em 2017. Constata-se ainda bastante variabilidade neste parâmetro pois apenas os EEs preparados com própolis recolhido em 2012 e 2014 se não revelam diferentes.

Tabela 9. Teores de flavonóides totais, expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/ g extrato), dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Pereiro recolhidas de 2011 a 2017 (P.EEs). Os valores são apresentados na forma de média \pm DV. Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

P. EEs	mg EQ/ g extrato	Autores
P11.EE	$54,3 \pm 2,42^b$	(A. Freitas, resultados não publicados)
P12.EE	$43,4 \pm 0,75^c$	
P13.EE	$32,38 \pm 1,51^d$	
P14.EE	$33,37 \pm 1,95^b$	
P15.EE	$78,39 \pm 1,66^e$	
P16. EE	$62,08 \pm 0,51^f$	
P17.EE	$24,76 \pm 1,401^a$	

Comparativamente aos TFT de outros G.EEs (A. Freitas, resultados não publicados) (Tabela 10), G17.EE apresenta um teor bastante semelhante, sendo apenas estatisticamente diferentes dos valores exibidos pelos extratos preparados com amostras de própolis recolhidas em 2011, 2014 e 2015. Desta forma, e apesar da variação encontrada no TPT, o própolis do Gerês parece ter um perfil de flavonoides mais constante que o própolis do Pereiro ao longo dos anos. Esta constância poderá eventualmente estar relacionada com o modo de produção/recolha do própolis do Gerês, que é feita utilizando grades, e também com o facto do apiário se localizar no Parque Nacional Peneda Gerês, local de vegetação mais controlada e onde a intervenção do homem é limitada o que não acontece no local do apiário de Pereiro.

Tabela 10. Teores de flavonóides totais, expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de extrato (mg EQ/ g extrato), dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês recolhidas de 2011 a 2017 (G.EEs). Os valores são apresentados na forma de média \pm DV. Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

G.EEs	mg EQ/ g extrato	Autores
G11.EE	31,46 \pm 0,87 ^b	(A. Freitas, resultados não publicados)
G12.EE	34,58 \pm 2,69 ^{a,b,c}	
G13.EE	32,59 \pm 0,79 ^{a,b,c,d}	
G14.EE	31,02 \pm 1,34 ^{b,c,d,e}	
G.15.EE	51,66 \pm 0,87	
G16. EE	32,72 \pm 2,38 ^{a,b,c,d,e}	
G17.EE	36,76 \pm 1,14 ^a	

Os TFT registados para os diferentes EEs encontram-se dentro da gama dos valores publicados para amostras de própolis nacional como o própolis de Beja, Coimbra e Bragança (Silva et al., 2012). No entanto, para outras amostras de própolis europeu têm sido descritos, em geral, TFT bastante mais elevados. Kumazawa et al (2004) reportaram um TFT de 220 \pm 2,5 mg EQ / g extrato em EE de própolis oriundo da Bulgária, por exemplo, e teores entre 128 e 178 \pm 2 μ g EQ / mg extrato foram descritos em amostras de própolis polacas (Kurek-Górecka et al., 2012). Deste modo, e neste parâmetro, G17.EE e P17.EE parecem ser mais semelhantes a algum própolis brasileiro (TFT entre 29,67 e 186,96 mg EQ / g extrato) (Andrade et al., 2017; Devequi-Nunes et al., 2018), assim como ao própolis de Africa do Sul, com 50,8 \pm 0.8 μ g EQ / mg extrato (Kumazawa et al., 2004), por exemplo.

Face à variada gama de teores apresentadas pelos diferentes EE nas diferentes partes do Mundo, há a necessidade de estabelecer padrões de qualidade do própolis, existindo já alguns países do Mundo que estabeleceram determinados parâmetros como por exemplo a maior quantidade de flavonoides, no entanto face à variabilidade obtida nas diferentes partes do mundo, o problema da padronização acentua-

se. Havendo por isso uma necessidade cada vez maior de definir parâmetros globalmente muito em parte devido ao facto de este obter ação terapêutica sobre muitas das suas substâncias, e não ter princípios ativos definidos, provando muitas vezes que nem sempre o teor de determinadas substância comprova o verdadeiro poder da mesma.

3.1.3. Teor de orto-difenóis

O teor de orto-difenóis (TO), determinado através do método descrito por Mateos et al. (2001), é superior em G17.EE: $467,3 \pm 9,250$ mg EAG/g extrato face a $303,2 \pm 5,563$ mg EAG/g P17.EE (Figura 15)

Esta variação também não surpreende em EEs de amostras de própolis oriundas de localidades de geografia, vegetação e condições ambientais distintas, que já revelaram perfis químicos diferentes em compostos fenólicos (Figuras 13 e 14) e uma vez que os orto-difenóis são também eles compostos fenólicos.

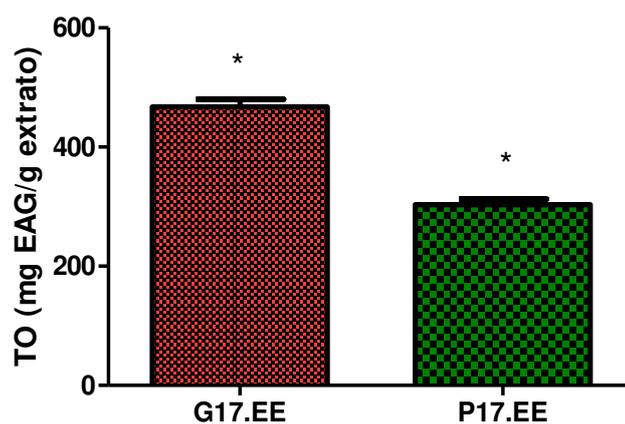


Figura 15. Teor de orto-difenóis (TO) de G17.EE e P17.EE. Os valores são expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/g extato) e resultam da média \pm DV de 3 ensaios independentes com 3 réplicas cada (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A ausência de informação sobre o TO em G.EEs e P.EEs s impossibilita a comparação com os teores obtidos para os EEs de própolis do Gerês e do Pereiro estudados neste trabalho. A literatura também é omissa no que a este teor diz respeito para outros extratos de própolis, inviabilizando comparação entre amostras de origem diferente. Comparando porém os valores obtidos para G17.EE e P17.EE com os teores encontrados noutros produtos de origem natural, registam-se teores mais elevados – superiores por exemplo aos encontrados em extratos de polpa de camarinha ($21,8$ mg - $23,4$ mg EAG/100 g) (Andrade, 2016) e em polpa de pera fresca ou desidratada (respetivamente $666,2 \pm 26,4$ e $634,8 \pm 78,5$ mg EAG/100 g) (Santos et al., 2014). Assim, comparativamente, G17.EE e P17.EE parecem apresentar TO elevados, e estes compostos aparentam ser um dos principais constituintes de ambos os estratos. Sroka

e Cisowski (2003) descreveram que os compostos fenólicos com função orto possuíam importante atividade antirradicalar, pelo que a análise destes compostos reveste-se de extrema importância nas restantes amostras de própolis, para melhor se concluir qual o verdadeiro impacto da presença de ortodifenóis nas propriedades e atividades dos extratos.

3.2. Avaliação da Atividade Antioxidante de G17.EE e de P17.EE *in vitro*

3.2.1. Capacidade de captura de radicais livres DPPH •

A capacidade *scavenging* do radical livre e estável DPPH • (2,2-difenil-1-pirarilidrazil) foi avaliada nos extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês e do Pereiro recolhidas em 2017 (Figura 16). De acordo com os resultados obtidos, o potencial antioxidante de G17.EE ($IC_{50} = 3,61 \pm 0,193 \mu\text{g/ml}$) é semelhante ao de P17 EE ($IC_{50} = 3,81 \pm 0,204 \mu\text{g/ml}$), apesar das diferenças em termos de composição química (Figuras 13 e 14), o que poderá corroborar a ideia de que os extrato de própolis mantêm e partilham algumas das suas atividade biológicas apesar de apresentarem diversidade química (Borrelli et al., 2002b).

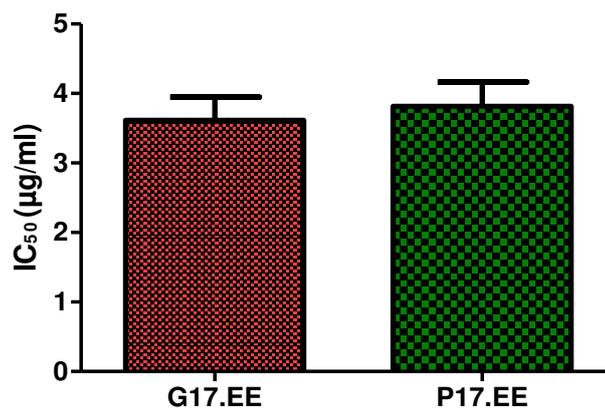


Figura 126. Potencial antioxidante de G17.EE e P17.EE. A capacidade de captura de DPPH • foi expressa em valores de IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) e resultam da média \pm DV de 3 ensaios independentes com 3 réplicas cada (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Consultando a literatura para esta bioatividade em EEs de própolis, e tendo em conta metodologias comparáveis, encontram-se valores de IC_{50} entre 26,33 e 143,09 $\mu\text{g/ml}$ (Žižić et al., 2013) em amostras de própolis da Sérvia. Em termos de própolis de origem nacional foram descritos valores de IC_{50} de 27 ± 10 e $31 \pm 10 \mu\text{g/ml}$ em amostras originárias do Algarve (Miguel et al., 2010) e de $52 \pm 0,003 \mu\text{g/ml}$ e de $6,22 \mu\text{g/ml}$ em própolis do Fundão e Bornes, respetivamente (Moreira et al., 2008). Em 2012, amostras de própolis de Bornes apresentaram um valor de $72 \pm 0,003 \mu\text{g/ml}$ (Paula et al., 2012). G17.EE e P17.EE

apresentam assim melhor potencial antioxidante que os extratos de própolis do Algarve e do Fundão, mas capacidade antioxidante semelhante aos EEs de própolis recolhido de Bornes em 2008.

Comparando as amostras em estudo com própolis de tipos diferentes, constata-se uma vez mais a variabilidade que a este produto natural se atribui: por exemplo própolis originário da Malásia exhibe valores de IC_{50} de $79,90 \pm 11,75 \mu\text{g/ml}$ (Nna et al., 2018), em própolis brasileiro foram referidos valores de IC_{50} entre $89,90 \pm 0,02$ e $371,12 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ (Devequi-Nunes et al., 2018). Assim, o potencial antioxidante é variável em própolis de várias partes do mundo e inclusive em amostras de uma só proveniência geográfica, como se verificou na diferença de potencial antioxidante no caso dos extratos provenientes de Bornes dos diferentes anos, salientando a necessidade de análise de cada amostra para a sua caracterização. No contexto apresentado, G17.EE e P17.EE parecem possuir capacidade antioxidante bastante promissora, e como tal terem algum interesse para possíveis aplicações que envolvam esta bioatividade.

Os maiores teores de substâncias fenólicas totais de G17.EE (Figura 13 e Figura 14) poderiam antecipar uma maior capacidade antioxidante dada a associação de tais compostos a esta atividade (Molyneux, 2004). No entanto, apesar do IC_{50} de G17.EE ser ligeiramente inferior ao IC_{50} apresentado pelo P17.EE, a diferença na capacidade antioxidante dos dois extratos não é estatisticamente significativa. Assim, não será o TPT, ou o TFT, que influenciam diretamente o poder antioxidante destes extratos de própolis, que poderá estar antes associado à presença ou não de determinados compostos. Miguel e colaboradores (2010) não encontraram correlação entre os TPT e a atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos de própolis oriundo do Algarve e recolhido em diferentes estações do ano.

A capacidade antioxidante de G17.EE e P17.EE é também superior à dos EEs de amostras de própolis oriundas da mesma proveniência mas colhidas em vários anos (Tabela 11 e Tabela 12), entre si também bastantes distintos no que diz respeito a esta bioatividade.

Como G17.EE e P17.EE apresentam teores de substâncias fenólicas inferiores a alguns dos teores de extratos de anos anteriores, e apresentam uma elevada capacidade antioxidante, não se deduz uma relação direta entre os TPT, TFT (Tabelas 9 e 10) e o poder antioxidante dos EEs, apesar de ser comumente aceite que esta bioatividade está associada a esses compostos. Alguns estudos comprovam a ligação entre os teores de compostos fenólicos e poder antioxidante, mostrando uma correlação positiva entre o teor de substâncias fenólicas e o maior poder antioxidante de própolis (Duthie et al., 2000; Mihai et al., 2011, Fabris et al., 2013).

Tabela 11. Capacidade de captura do radical livre DPPH • , apresentada em valores de IC50 (µg/ml), dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Pereiro recolhidas entre 2011 a 2017 (P.EEs). Os valores são apresentados na forma de média ± DV. Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % (p <0,05)).

Extratos de Própolis	IC50 (µg/ ml)	Autores
P. EEs		
P11.EE	14,7 ± 2,7 ^b	(C. Araújo, comunicação pessoal)
P12.EE	22,0 ± 0,4 ^c	
P13.EE	15,2 ± 2,3 ^b	
P14.EE	20,3 ± 0,3 ^c	
P15.EE	10,3 ± 1,7 ^d	(Moreira, 2017)
P17.EE	4,10 ± 0,4 ^a	(este trabalho)

Tabela 12. Capacidade de captura do radical livre DPPH • , apresentada em valores de IC50 (µg/ml), dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês recolhidas entre 2011 a 2017 (G.EEs). Os valores são apresentados na forma de média ± DV. Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % (p <0,05)).

Extratos de Própolis	IC50 (µg/ ml)	Autores
G.EEs		
G11.EE	14,7 ± 1,7 ⁱ	Freitas et al., (2018)
G12.EE	14,41 ± 3,8 ^g	
G13.EE	25,24 ± 0,3 ^h	
G14.EE	16,47 ± 4,3 ^{f,g}	
G.15.EE	10,7 ± 5,4 ⁱ	(Moreira, 2017)
G16.EE	5,46 ± 0,3 ^e	(A. Freitas, resultados não publicados)
G17.EE	3,62 ± 0,3 ^e	(este trabalho)

O maior potencial antioxidante dos EEs estudados face a G.EEs e a P.EEs suscitou interesse em angariar mais alguma informação sobre as amostras. Não havendo nada a assinalar de acordo com o apicultor do Pereiro, apurou-se no entanto que a amostra do Gerês de 2017 não corresponde exatamente à amostra de própolis equivalente e colhida em anos anteriores. Tais amostras (G11 a G16) resultam de uma mistura de própolis provenientes de três apiários distintos - (Toutelo (t), Felgueiras (f) e Bogalho (b) - locais esses relativamente próximos mas de localização diferente e com condições de vegetação e altitude distintas. Em 2017, um incêndio destruiu as colmeias do apiário Bogalho. Os apiários Toutelo e Felgueiras possuem vegetação circundante em tudo semelhante, na qual se destaca a urze, o castanheiro, prados e algumas árvores de fruto; no apiário Bogalho por sua vez, encontra-se urze, castanheiro e silvas. Após a extinção das colmeias de Bogalho, o apicultor cedeu, como amostra de 2017, mas sem o nosso

conhecimento, própolis proveniente exclusivamente de um novo apiário - Roca (r) - localizado numa zona de vegetação idêntica à do apiário Bogalho.

Tendo sido constatado que o perfil de G17.EE se distanciava do comportamento habitual de G.EEs, caracterizado por exibir bastante constância (Freitas et al., 2018), o apicultor passou a acrescentar própolis de Roca à amostra gentilmente cedida em 2018 (apiários t, f e b). Simultaneamente, providenciou novas amostras de própolis correspondentes a diferentes combinações de misturas de própolis dos vários apiários do Gerês para estudo. Na análise dos EEs destas misturas de própolis recolhidas no mesmo ano (2017) verificou-se uma melhor capacidade antioxidante nas misturas em que Roca está presente (Tabela 13).

Tabela 13. Capacidade de captura de radicais livres DPPH• dos extratos etanólicos preparados a partir de própolis do Gerês colhido em 2017 e proveniente de apiários diferentes. Os resultados são apresentados na forma de média \pm DV de valores de IC₅₀ (μ g/ ml). Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

Extratos etanólicos de própolis de apiários do Gerês	IC ₅₀ (μ g/ml)	Autores
G17.EE (G17-r.EE)	3,61 \pm 0,19 ^a	(este trabalho)
G17- rt. EE	7,11 \pm 0,76 ^b	(A. Freitas, resultados não publicados)
G17- tf. EE	20,85 \pm 0,12 ^c	

Assim, a presença de própolis do apiário Roca parece influenciar o poder antioxidante dos extratos, sendo este consideravelmente superior quando está presente nas misturas. Este novo apiário e a sua caracterização revestem-se assim de particular interesse para estudo, no sentido de verificar se as suas características influenciam efetivamente as propriedades apresentadas pelos extratos e a possível exploração do seu própolis para aplicações antioxidantes.

A capacidade de eliminação de radicais livres das formulações de própolis parece estar associada à presença de determinados compostos fenólicos, como a apigenina, tectocrisina, crisina, galangina, pinocembrina, genkwanina, kaempferol, pilloin, calcona de pinostrobin, ácido clorogénico, ácido cafeico e seus derivados e artepilina C (Kumazawa et al., 2004; Orsolíc et al., 2006; Chen et al., 2009; Mihai et al., 2011; Yang et al., 2011; Boisard et al., 2014; Sun et al., 2015, Machado et al., 2016). Alguns dos compostos associados à capacidade de captura de radicais livres foram também identificados em G.EEs e P.EEs. Freitas et al. (2018) identificaram apigenina, kaempferol, galangina e éster isoprenílico do ácido cafeico em G.EEs de amostras de própolis recolhidas entre 2011 e 2014. E em P10.EE foram identificados

flavonoides como a crisina, pinobanksin e ácidos fenólicos como o ácido cafeico e seus ésteres derivados (Silva-Carvalho et al., 2014). Embora a presença destes compostos em G.EEs e P11.EE pareça validar o potencial antioxidante do própolis do Gerês e do Pereiro, a análise de P17.EE e G17.EE será sempre indispensável para avaliar a presença destes e/de outros compostos que expliquem a sua elevada atividade antioxidante.

Diferentes mecanismos podem ser responsáveis pelas propriedades antioxidantes de ácidos fenólicos e flavonoides, por sua vez intimamente relacionadas com a estrutura química destes compostos, muito em parte relacionados com a elevada capacidade de doação de átomos de H dos grupos hidroxila aromáticos aos radicais livres e à capacidade da sua estrutura aromática suportar um eletrão desemparelhado, devido à deslocalização em torno do sistema π – eletrão (Duthie et al., 2000). A atividade destes compostos naturais contra radicais livres pode também ser feita por inibição da atividade de algumas enzimas (por exemplo, xantina oxidase, proteína cinase C, ácido oxídico ascórbico, ciclooxigenase, lipoxigenase, e cAMP fosfodiesterase), sendo inibida a produção de espécies oxidantes (Kurek-Górecka et al., 2014). Diminuem também a atividade de enzimas que participam na peroxidação lipídica, como por exemplo a fosfolipase A2 (Silva et al., 2002), têm influência protetora sobre os antioxidantes endógenos, como o ácido ascórbico, ou o tocoferol (Cos et al., 2002), e aumentam a absorção de ascorbato, que é usado para transformar ROS em formas inertes (Pietta, 2000).

3.3. Avaliação da atividade antimicrobiana de G17.EE e de P17.EE

3.3.1. Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos EEs das amostras de própolis estudadas neste trabalho foi avaliada com recurso ao método de diluição em placa, sendo os valores de MIC (Tabela 13) estimados para cada par extrato-bactéria (Tabela 4), por observação da menor concentração de extrato para a qual se não observou crescimento microbiano.

Tabela 14. Atividade antibacteriana dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês (G17.EE) e do Pereiro (P17.EE) recolhidas em 2017. A atividade antibacteriana foi expressa em valores de MIC ($\mu\text{g/ml}$).

Bactérias	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	G17.EE	P17.EE
Gram-positivas		
<i>Bacillus subtilis</i>	50	50
<i>Bacillus cereus</i>	50	100
<i>Bacillus megaterium</i>	50	100
<i>Propionibacterium acnes</i>	500	200
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	500
<i>Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA)</i>	>2000	>2000
Gram-negativas		
<i>Escherichia coli</i>	>2000	>2000

G17.EE e P.17.EE apresentam potencial antimicrobiano semelhante, nos ensaios executados e condições testadas. Em ambos os casos as bactérias Gram-positivas revelaram maior suscetibilidade aos extratos em estudo do que as bactérias Gram-negativas. G17.EE exibiu o maior efeito antibacteriano contra as bactérias Gram-positivas do género *Bacillus* (MIC= 50 $\mu\text{g/ml}$). A bactéria Gram-positiva MRSA, bem como a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* revelaram ser as mais resistentes e para elas não foi determinado um valor de MIC neste trabalho (MIC> 2000 $\mu\text{g/ml}$). Por sua vez, P17.EE foi igualmente mais ativo contra bactérias do género *Bacillus*, embora com espectro diferenciado contra diferentes espécies, (MIC= 50 $\mu\text{g/ml}$ contra *Bacillus subtilis* e de 100 $\mu\text{g/ml}$ contra *Bacillus cereus* ou *Bacillus megaterium*). Apesar de menos ativo para estas duas espécies bacterianas, P17.EE é mais ativo que G17.EE contra *Propionibacterium acnes* (MIC=200 $\mu\text{g/ml}$). MRSA e *Escherichia coli* revelaram-se também as bactérias menos suscetíveis a P17.EE.

Os resultados obtidos contra bactérias Gram-positivas corroboram de um modo geral o que tem sido descrito para própolis, relativamente a uma maior atividade contra bactérias deste tipo (Ramanauskienė et al., 2009; Silva et al., 2012; El-Guendouz et al., 2018; Freitas et al., 2018). A explicação mais plausível para a menor sensibilidade demonstrada pelas bactérias Gram-negativas parece residir na presença da sua membrana externa que inibe e/ou retarda a penetração do própolis em concentrações mais baixas, mas este efeito ainda não está totalmente explicado. Outra possível razão pode

ser a presença de bombas de resistência a múltiplas drogas (MDRs), que expulsam as toxinas anfipáticas através da membrana externa (Tegos et al. 2002)

Silva et al. 2012 reportaram, em amostras de própolis nacional, valores de MIC de 590 µg/ml contra *Staphylococcus aureus* e de 3190 µg/ml contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. Em estudos feitos em EEs de própolis de Espanha, à semelhança do que ocorreu com as amostras analisadas neste estudo, não foram encontrados valores de MIC para *Escherichia coli* (Bonvehí e Gutiérrez, 2012). El-Guendouz et al. (2018) obtiveram valores de MIC de 360 µg/ml em estudos com própolis de Marrocos para *Staphylococcus aureus*. No entanto, nas concentrações testadas, não obtiveram valores de MIC contra MRSA. Rahman et al. (2010) mostraram que EEs de própolis africano inibiam as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em concentrações de 3500 e 5410 µg/ml, respetivamente. Ruffato et al. (2018) reportaram valores de MIC de 28,3, 454 e 227 µg/ml para EEs de própolis brasileiro contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, e *Pseudomonas aeruginosa*, respetivamente, enquanto Hajime et al. (1994) reportaram 15,6 µg/ml como o MIC de própolis brasileiro contra *Bacillus cereus*.

A variabilidade entre amostras de própolis de diferentes origens e mesmo entre amostras com origens semelhantes está novamente patente nesta sua bioatividade. As diferenças de espectro de atividade antibacteriana podem ser devidas à composição complexa e variável do própolis e, consequentemente, explicadas pelos compostos ativos aí presentes, que podem diferir em quantidade e qualidade (Santos et al., 2002). No entanto, também é importante salvaguardar que diferentes técnicas são frequentemente utilizadas para determinar os valores de MIC e suscetibilidade microbiana a própolis, sendo testados também diferentes gamas de concentrações, bem como estirpes, mesmo da mesma espécie, dificultando a comparação entre os resultados de diferentes trabalhos.

Não sendo este o principal objetivo deste trabalho, a avaliação desta atividade nos EEs em estudo permite a sua caracterização preliminar e a comparação com outros EEs de própolis da mesma proveniência, mas preparados com amostras recolhidas ao longo de diferentes anos de estudos. Assim, tendo em conta os valores de MIC dos EEs estudados e os determinados para outros G.EEs (Anexo I tabela I1), verifica-se que a atividade de G17.EE se mantém bastante semelhante ao longo dos anos. Freitas et al. (2018) tinham já reportado e salientado um espectro de atividade antibacteriana bastante constante em G.EEs, particularmente contra bactérias do género *Bacillus*, independentemente do ano da colheita do própolis. No caso do P17.EE verifica-se também uma constância de resultados face ao espectro de outros P.EEs anteriormente estudados (Anexo I tabela I1), embora o extrato em estudo se revele mais ativo (MIC de 50 µg/ml para *Bacillus subtilis* e MIC = 100 µg/ml para *Bacillus cereus* e *Bacillus megaterium*, face a MICs de 500 µg/ml em P.EEs de anos anteriores).

Alguns dos compostos já identificados em G.EEs foram anteriormente relacionadas com a atividade antimicrobiana de própolis. Compostos como a pinocembrina, ácido ferúlico, galangina, quercetina, ácido cafeico e CAPE (éster fenil-etílico do ácido cafeico), estão presentes em G.EEs preparados com amostras de própolis recolhidas entre 2011 e 2014 (Freitas et al., 2018). Silva-Carvalho e colaboradores (2014) identificaram em P11.EE compostos igualmente ligados à atividade antibacteriana como por exemplo os flavonoides pinocembrina e crisina, e ácidos fenólicos como o ácido ferúlico e o ácido cafeico (Santos et al., 2002; Cushnie e Lamb 2006; Patel et al., 2014; Boisard et al., 2015). A análise de G17.EE e P17.EE será sempre indispensável para identificar a presença destes ou de outros compostos que expliquem os resultados obtidos.

As diferenças entre as atividades antibacterianas observadas podem ser consequência da complexa e variada composição dos extratos de própolis, onde podem existir diferentes compostos ativos (Santos et al., 2002). Adicionalmente, a atividade antimicrobiana poderá resultar de sinergismos entre diferentes compostos presentes em própolis. Estudos efetuados com frações de própolis revelaram por exemplo que estas não possuíam qualquer efeito antimicrobiano, mas que esse efeito antimicrobiano era novamente observado quando as frações se juntavam outra vez (Marcucci, 1996).

Quanto ao modo de ação, Mirzoeva et al. (1997) investigaram o efeito de EEs de própolis na fisiologia de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, propondo que o própolis bem como alguns dos seus componentes como o ácido cinâmico e flavonóides afetam a permeabilidade da membrana bacteriana interna a iões, dissipando o potencial de membrana, inibindo a motilidade bacteriana e afetando a membrana citoplasmáticas. Compostos como o ácido cafeico, ácido cinâmico e o ácido benzóico atuam muito provavelmente na parede ou membrana celular dos microrganismos, provocando danos estruturais (Mirzoeva et al., 1997; Scazzocchio, 2005; Velasquez e Gómez, 2017). Uzel et al., 2005 referiram também que estes compostos provavelmente inibem também a RNA-polimerase bacteriana.

3.3.2. Avaliação da Atividade Antifúngica de G17.EE e de P17.EE

3.3.2.1. Avaliação da Atividade Antifúngica Contra Leveduras

A caracterização dos extratos passou também pela avaliação da sua atividade contra leveduras, para a sua caracterização preliminar e comparação com outros EEs de própolis que o nosso grupo tem vindo a estudar nos últimos anos. Este estudo serviria ainda para avaliar se uma eventual diferença no espectro contra leveduras se refletiria, depois, numa maior ou menor atividade contra os fungos filamentosos.

A atividade antifúngica contra leveduras foi também avaliada com o método de diluição em placa. Os valores de MIC estimados para cada par extrato-levedura (Tabela 15), encontram-se descritos na tabela que se segue, tendo o valor de MIC sido igualmente determinado por observação da menor concentração de extrato para a qual se não observou crescimento microbiano.

Tabela 15. Atividade antifúngica dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês (G17.EE) e do Pereiro (P17.EE) recolhidas em 2017. A atividade antibacteriana foi expressa em valores de MIC ($\mu\text{g/ml}$).

Levedura	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	G17.EE	P17.EE
<i>Candida albicans</i>	>2000	>2000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1500	1500

A atividade antifúngica de G17.EE e de P17.EE contra as leveduras usadas como indicadoras de suscetibilidade é em tudo semelhante. Ambos os EEs são mais ativos contra *Saccharomyces cerevisiae* (MIC= 1500 $\mu\text{g/ml}$) que contra a levedura *Candida albicans* (MIC>2000 $\mu\text{g/ml}$). Comparando estes resultados com os resultados obtidos para os mesmos extratos preparados a partir de amostras recolhidas das colmeias entre 2011 a 2016 (Anexo I tabela I2), P17.EE parece ser menos ativo contra as leveduras testadas enquanto para G17.EE se observa o comportamento particular já descrito para o própolis do Gerês por Freitas e colaboradores (2018), aqui traduzido numa constância extensiva também à atividade antifúngica contra leveduras. De uma maneira geral, ambos os extratos apresentam mais eficácia antibacteriana que atividade contra leveduras.

Silva et al. (2012) reportaram em extratos hidroalcoólicos de própolis nacional valores de MIC de 13190 $\mu\text{g/ml}$ na levedura *Candida albicans* enquanto Falcão et al. (2013b) descrevem EE valores de 32 $\mu\text{g/ml}$ contra a mesma levedura. Já em EEs de própolis da Polónia foi obtido um MIC de 1400 $\mu\text{g/ml}$ para a mesma levedura (Popova et al., 2017), enquanto extratos de própolis originários do Norte de Espanha exibem MICs entre 500-1500 $\mu\text{g/ml}$ (Bonvehí e Gutiérrez, 2012). Valores de MIC de 500 $\mu\text{g/ml}$ foram reportados quando testados compostos isolados de própolis brasileiros contra *Saccharomyces cerevisiae* (Aga et al., 1994) e EEs de própolis iraniano revelaram um MIC de 1250 $\mu\text{g/ml}$ contra *Candida albicans*. Assim, em comparação com outros extratos, G17.EE e P17.EE demonstram um menor poder fungicida, exceto relativamente aos extratos hidroalcoólicos estudados por Silva et al. (2012), o que poderá ser justificado pelo maior rendimento de extração de compostos fenólicos em extratos etanólicos que,

conseqüentemente, se traduzirá numa maior atividade antibacteriana (Koo et al., 2000; Adelman et al., 2005).

O menor poder fungicida de ambos os extratos em contraste com o seu elevado poder antioxidante poderá ser justificado pela composição dos extratos. G.EEs e P.EEs poderão ser mais ricos em compostos antioxidantes que em compostos com atividade antifúngica. A atividade antifúngica de própolis contra leveduras é atribuída principalmente a derivados fenólicos como por exemplo a flavanona pinocembrina, o flavonol galangina e o CAPE. Estes compostos foram encontrados por Freitas et al. (2018) e Silva-Carvalho et al. (2014) nas suas análises químicas de G.EEs (2011 a 2014) e P11.EE, respetivamente. No entanto, uma análise aos compostos presentes em G17.EE e P17.EE será sempre necessária, para provar a presença desses mesmos compostos e/ ou averiguar a de outros, em especial em P.EEs uma vez que existe uma maior flutuação entre resultados de bioatividades (Marques, 2015), *a priori* indicativa de uma maior variabilidade na composição dos extratos dos diferentes anos.

D'Auria et al. (2003) sugeriram que o própolis tem seu efeito na atividade extracelular da fosfolipase (inibindo a enzima através de compostos oxidados) modulando a transdução de sinal, no tráfico membranar e possivelmente a proliferação celular, modulando posteriormente a capacidade de adesão ao epitélio do hospedeiro. A capacidade de adesão às paredes epiteliais, por diferentes mecanismos (receptores específicos no hospedeiro; forças electrostáticas; agregação celular e hidrofobicidade de superfície), é um dos principais mecanismos de virulência apresentados por leveduras (Ghannoum et al., 1999; Cotter e Kavanagh, 2000). Estudos mostram que o ácido cinâmico é capaz de alterar a hidrofobicidade da superfície celular fúngica (Guzman, 2014)

Outro importante mecanismo de patogenicidade é a formação de tubo germinativo e hifas (Kimura e Pearsall, 1980), que aumentam a capacidade de aderência das leveduras aos tecidos bem como ao acrílico e aumentam a capacidade de invasão do hospedeiro, aumentando a resistência a fagócitos devido ao aumento das suas dimensões físicas (Samaranayake e Samaranayake, 2001). Castro (2012) reportou o papel do própolis na inibição da transição dimórfica, observando que este composto inibe não só essa transição como o crescimento de todos os morfotipos (levedura, hifa, e pseudohifa) em *Candida albicans*. Observou ainda que o própolis é capaz de induzir uma resposta de morte celular apoptótica em *Saccharomyces cerevisiae*, verificando que o citocromo c, mas não a endonuclease G Nuc1p e o gene da metacaspase YCA1 estão envolvidos na morte celular mediada por própolis. Através do perfil transcripcional de *Saccharomyces cerevisiae* exposta a própolis, observou que genes envolvidos na cadeia de transporte de eletrões, da acidificação vacuolar, da regulação negativa da transcrição do promotor da RNA polimerase II, da regulação da macroautofagia associada com a proteína alvo para vacúolo e da resposta celular à privação de nutrientes, eram afetados na presença do própolis. Os estudos de Castro

(2012) indicaram que a sensibilidade ao própolis é dependente da função mitocondrial e que a acidificação vacuolar e autofagia são importantes para a morte causada por própolis em leveduras.

3.3.2. Avaliação da Atividade Antifúngica Contra Fungos Filamentosos – Avaliação do Crescimento do Micélio Fúngico

Numa primeira fase, e porque todos os fungos filamentosos testados neste trabalho foram amavelmente cedidos por outros laboratórios, procedeu-se à sua repicagem para obter as culturas necessárias. O crescimento microbiano em placa foi acompanhado, medindo-se periodicamente o diâmetro do micélio até final do crescimento. Com este estudo preliminar foi possível determinar um perfil, quer de crescimento quer de características de cada fungo individualmente, para conhecer cada estirpe e permitir que posteriormente qualquer alteração ao seu comportamento habitual fosse mais facilmente detetada. Nesta fase, constatou-se que cada fungo crescia melhor e mais rapidamente em repicagens sucessivas, como se pode observar na figura 17 para dois dos fungos cultivados, a título de exemplo, pelo que se decidiu executar um mínimo de três repicagens sucessivas de cada estirpe, antes de qualquer ensaio, para que ficassem “adaptadas” às condições laboratoriais.

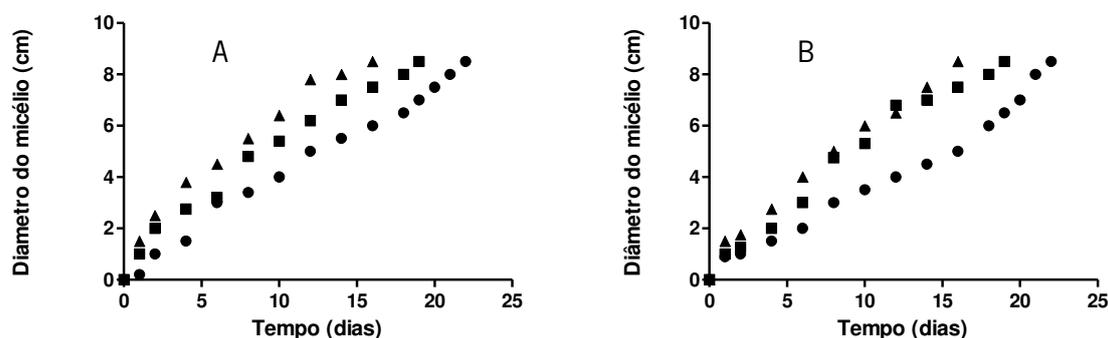


Figura 17. Crescimento de 3 réplicas de *Fusarium spp.* (A) e de *Nannizzia gypsy* (B) após inoculação em meio de cultura PDA. Cada réplica corresponde à inoculação/ repicagem de um disco do respetivo micélio, proveniente da mesma cultura original, em três momentos sucessivos (● - 1^a repicagem, ■ - 2^a repicagem; ▲ - 3^a repicagem).

No final deste processo de “domesticação”, verificou-se que todos os fungos apresentavam um crescimento relativamente lento, com exceção de *Fusarium spp.* e *Trichophyton mentagrophytes*. Foi ainda observado que *Aspergillus terreus* e *Aspergillus fumigatus* não cresciam radialmente como os restantes fungos, aparecendo manchas de crescimento por toda a superfície da placa, o que obrigou a uma manipulação ainda mais cautelosa dos mesmos. Por esta razão, estes dois fungos revelaram não ser bons modelos para o ensaio escolhido para avaliar a atividade antifúngica, tendo sido necessário recorrer ao método de diluição em meio líquido e à otimização de vários dos seus parâmetros para esse efeito.

A atividade antimicrobiana de G17.EE e de P17.EE contra fungos filamentosos foi de seguida determinada, observando-se e registando-se o crescimento de cada micélio na ausência e na presença de 500 µg/ml e de 1000 µg/ml de cada EE (Figuras 18 a 25).

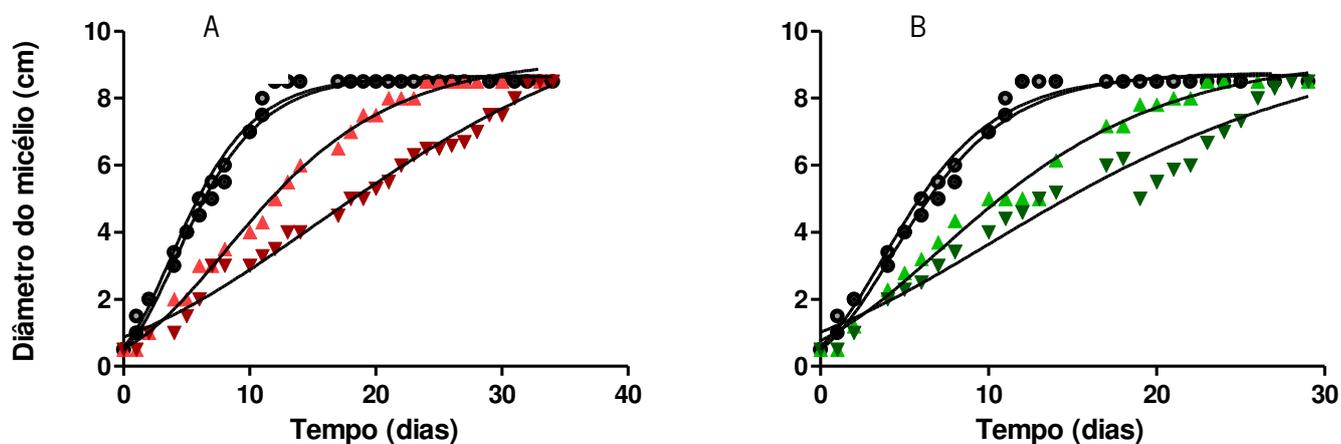


Figura 18. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Fusarium spp.* O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (●), e ainda na presença de 500 mg/ ml (▲) e 100 mg/ mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de P17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

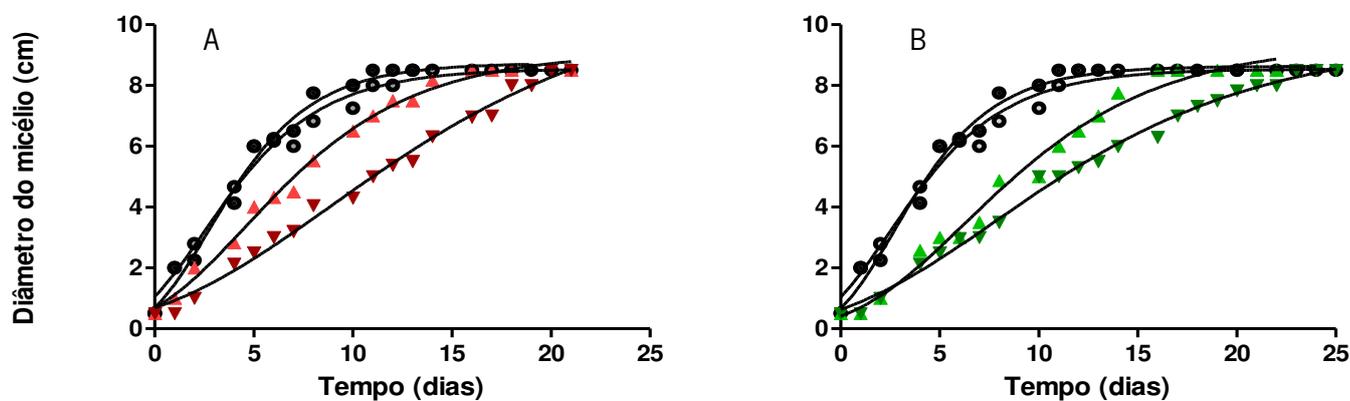


Figura 19. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Trichophyton mentagrophytes*. O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (●), e ainda na presença de 500 mg/ ml (▲) e 100 mg/ mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de P17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

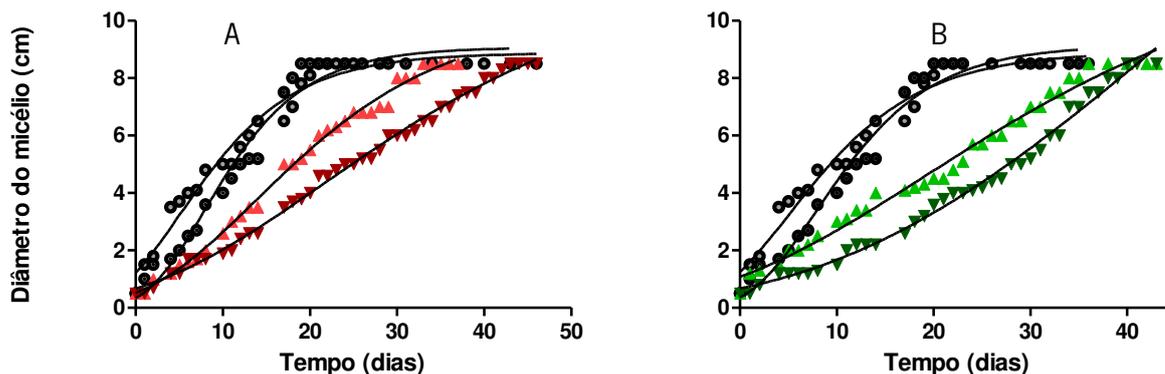


Figura 20. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Microsporium audourii*. O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (●), e ainda na presença de 500 mg/ ml (▲) e 100 mg/ mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de G17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

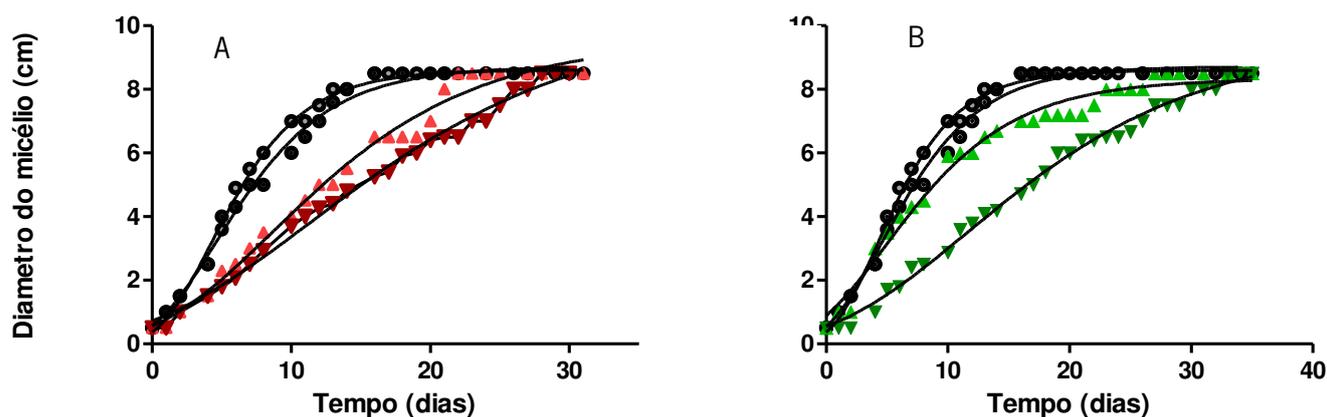


Figura 21. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Nannizzia gypsy*. O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (●), e ainda na presença de 500 mg/ ml (▲) e 100 mg/ mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de G17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

No geral, constata-se que os dois extratos influenciam o crescimento dos vários micélios fúngicos, um efeito variável nas diferentes estirpes, mas dependente da concentração. A única exceção a este comportamento foi registada em *Trichophyton sudanense* (Figura 22.B), e na presença de P17.EE pois, após 30 dias, observa-se um maior poder de inibição da concentração de 500 µg/ml face à maior concentração em estudo.

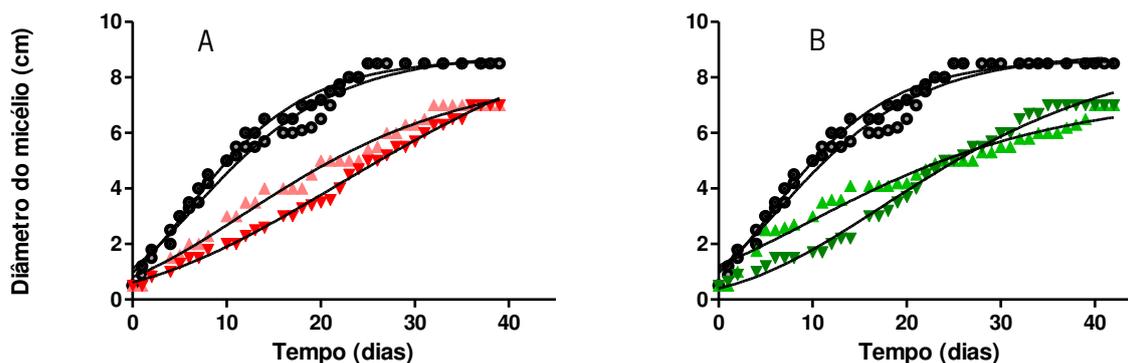


Figura 22. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Trichophyton sudanense*. O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (●), e ainda na presença de 500 mg/ml (▲) e 100 mg/mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de P17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

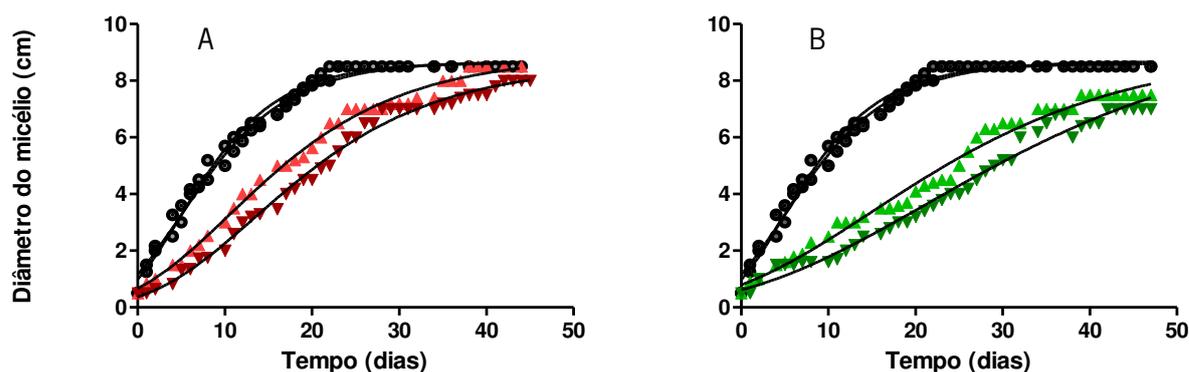


Figura 23. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Trichophyton rubrum*. O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (●), e ainda na presença de 500 mg/ml (▲) e 100 mg/mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de P17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

Alguns dos fungos não alcançam o crescimento máximo possível (limites da placa) na presença dos extratos. Foi o caso de *Microsporum canis* (Figura 24), *Trichophyton rubrum* (Figura 23), *Trichophyton sudanense* (Figura 22) e *Trichophyton tonsurans* (Figura 25). *Microsporum canis* atingiu 6,5 cm e 7 cm de diâmetro na presença de 500 µg/ml e de 1000 µg/ml de G17.EE, respetivamente. Na presença de P17.EE atingiu um diâmetro de 7,5 cm na concentração 500 µg/ml e de 6,5 cm na concentração 1000 µg/ml. Por sua vez, *Trichophyton rubrum* atingiu o diâmetro total na presença de 500 µg/ml de G17.EE, enquanto na concentração superior atingiu 8 cm apenas. O diâmetro máximo também não foi atingido na

presença de qualquer das concentrações de P17.EE. *Trichophyton saudanense* apresentou o mesmo diâmetro (7 cm) em ambas as concentrações dos dois extratos estudados. *Trichophyton tonsurans* exibiu um diâmetro máximo de 8 cm na presença de 500 µg/ml quer em G17.EE quer em P17.EE, e 6,5 cm e 7 cm nas concentrações mais elevadas de G17.EE e de P17.EE, respetivamente. Em todas as situações controlo, isto é, os fungos em meio de cultura apenas, ou na presença do solvente do extrato, atingiram o máximo de crescimento permitido: 8,5 cm.

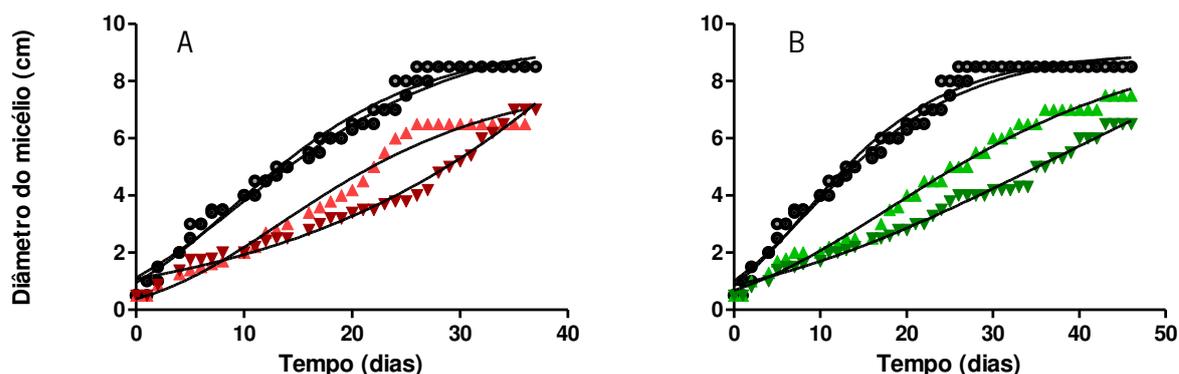


Figura 24. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Microsporium canis*. O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (○), e ainda na presença de 500 mg/ ml (▲) e 100 mg/ mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de G17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

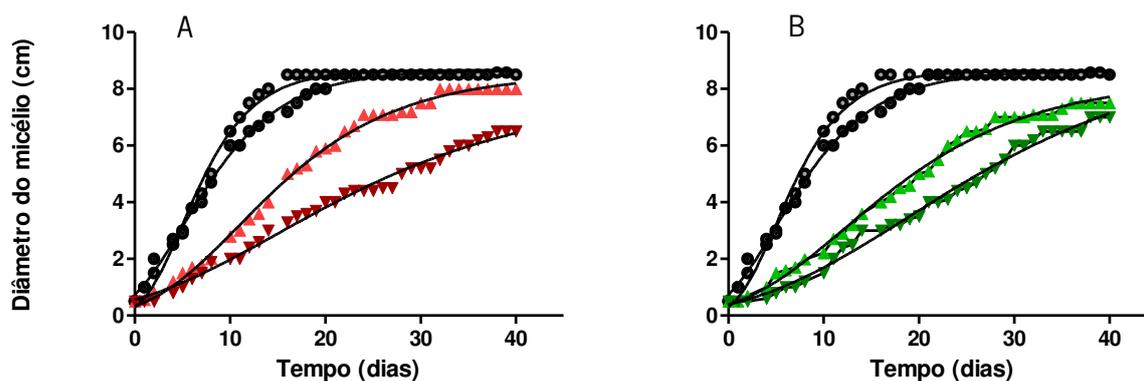


Figura 25. Efeito de G17.EE (A) e de P17.EE (B) no crescimento de *Trichophyton tonsurans*. O crescimento do micélio fúngico foi acompanhado e medido ao longo do tempo no meio de cultura do ensaio (●), na presença do solvente dos EEs, usado como controlo (○), e ainda na presença de 500 mg/ ml (▲) e 100 mg/ mL (▼) de G17.EE assim como de 500 mg/ mL (▲) e 100 mg/ ml (▼) de G17.EE. Os resultados são apresentados na forma de média de 3 ensaios independentes.

Recolhidos todos os dados relativos às medições dos diâmetros dos micélios dos diferentes fungos filamentosos em estudo (Tabela 4) foi aplicada a equação de Gompertz (Tjørve, 2017) para caracterizar, quantitativamente, o seu crescimento (Tabela 16)

Tabela 16. Taxa específica de crescimento de cada estirpe de fungo filamentoso, apresentada em cm/dia, na ausência e na presença dos extratos etanólicos de própolis recolhido em 2017 nos apiários do Gerês (G17.EE) e do Pereiro (P17.EE). Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

Fungos Filamentosos cultivados em	Taxa específica de crescimento (cm/dia)					
	Meio de cultura	EtOH	G17.EE		P17.EE	
	controlo	control o EtOH	500 µg/ml	1000 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
<i>Fusarium sp.</i>	0,87 ^a	0,85 ^a	0,46 ^b	0,26 ^c	0,45 ^b	0,30 ^d
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,96 ^a	1,11 ^b	0,70 ^c	0,46 ^d	0,65 ^e	0,45 ^f
<i>Microsporium audourii</i>	0,44 ^a	0,51 ^a	0,06 ^b	0,02 ^c	0,21 ^d	0,27 ^e
<i>Nannizzia gypsy</i>	0,86 ^a	0,72 ^b	0,44 ^c	0,34 ^d	0,59 ^e	0,31 ^f
<i>Trichophyton tonsurans</i>	0,79 ^a	0,57 ^b	0,09 ^c	0,03 ^d	0,28 ^e	0,21 ^f
<i>Trichophyton rubrum</i>	0,51 ^a	0,47 ^a	0,08 ^b	0,05 ^b	0,20 ^c	0,18 ^c
<i>Trichophyton saudanense</i>	0,37 ^a	0,44 ^b	0,05 ^c	0,03 ^c	0,17 ^d	0,22 ^d
<i>Microsporium canis</i>	0,36 ^a	0,32 ^a	-	-	0,19 ^b	0,15 ^b

A taxa específica de crescimento nas duas situações controlo deste ensaio não apresentaram diferenças significativas nas espécies *Fusarium sp.*, *Microsporium audourii*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporium canis*. No entanto, no caso de *Trichophyton mentagrophytes*, *Nannizzia gypsy*, *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton saudanense*, a diferença existente entre os controlos foi significativa. *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton saudanense* exibem uma taxa de crescimento superior no controlo suplementado com EtOH face ao controlo sem esta suplementação. Efeitos semelhantes foram já reportados em outros trabalhos, onde em baixas concentrações o EtOH estimulou o crescimento de leveduras (Van Uden, 1985) e outros microrganismos (Ingram e Buttke, 1984), podendo o EtOH atuar a nível da membrana celular, estimulando o influxo de glicose (não verificado em leveduras) ou o efluxo de metabolitos capazes de acidificar o pH intracelular.

No caso de *Nannizzia gypsy* e *Trichophyton tonsurans* observou-se a situação inversa, sentindo-se um efeito de inibição do EtOH no crescimento das espécies em questão. Anteriormente, em prévios trabalhos do grupo, foi otimizado o volume de EtOH a usar, de modo a não interferir com o crescimento

do fungo filamentosso então usado como modelo (C. Passão, comunicação pessoal). Ainda assim, este ensaio mostra que o etanol, mesmo nas condições previamente otimizadas, poderá exercer ainda influência - quer de inibição quer de estimulação de crescimento microbiano em diferentes modelos biológicos. Embora tenha sido o controlo suplementado com EtOH a situação experimental utilizada para efeitos de comparação entre extratos e concentrações, estes resultados apontam para a necessidade de futuramente se repetir a otimização do volume de EtOH a utilizar, para cada estirpe, de modo a garantir que os efeitos observados nos microrganismos em estudo se devem exclusivamente ao extrato.

A taxa específica de crescimento de todos os fungos foi afetada na presença de ambos os EEs testados, revelando-se de um modo geral dependente da concentração. Este comportamento pode ser observado em todos os fungos testados excepto em *Microsporium audourii*. *Trichophyton mentagrophytes*, *Nannizzia gypsy* e *Trichophyton tonsurans* apresentam diferenças significativas nas taxas específicas de crescimento na presença de todas as concentrações dos extratos em estudo (Tabela 16). O mesmo não acontece em *Trichophyton rubrum* ou em *Trichophyton saudanense*, fungos que mostram ser igualmente afetados por ambas as concentrações testadas. Com efeito, não se registam diferenças significativas entre 500 e 1000 µg/ml, quer de G17.EE, quer de P17.EE, apesar de *Trichophyton saudanense* apresentar maior crescimento na concentração 1000 µg/ml em P17.EE (Figura 22).

Microsporium audourii exibe menor taxa de crescimento na concentração 500 µg/ml do que na maior concentração testada de P17.EE no final do seu crescimento (Figura 20). Tal poderia ser justificado por uma diminuição da eficácia dos extratos, por exemplo por mecanismos de degradação de compostos (por exemplo oxidação), não existindo compostos bioativos disponíveis para continuar a ação antifúngica do EE. No entanto, ensaios futuros serão necessários para compreender qual a verdadeira influência da concentração de P17.EE no crescimento deste fungo.

A redução do crescimento não dependente da concentração, como observado no caso de *Trichophyton rubrum* (Figura 23, Tabela 16) ou para *Trichophyton saudanense* (Figura 22, Tabela 16) na presença de ambos os EEs e em todas as concentrações poderá constituir um aspeto favorável do extrato para possíveis aplicações médicas, perspetivando-se situações de menor toxicidade para o doente pois com uma menor concentração se obtém um efeito semelhante. No entanto, outros estudos serão sempre requeridos, eventualmente até para definir menores concentrações eficazes de extrato e ainda estudos de dose-ação para avaliar o efeito dose-resposta, para além naturalmente dos que esclareçam qual o mecanismo de ação dos EEs.

Um outro comportamento merece ser referido: o do fungo *Fusarium* spp., para o qual se não encontram diferenças significativas entre o seu crescimento na presença da menor concentração testada (500 µg/ml) de ambos os extratos. Assim, G17.EE e P17.EE na concentração de 500 µg/ml parecem

exercer o mesmo efeito no crescimento desta espécie. Este resultado poderia levar a inferir que os dois extratos possuem igual atividade, no entanto tal não é verificado nas restantes espécies em estudo.

Outros dos parâmetros fornecidos pela equação de Gompertz (Tjørve, 2017) é o tempo de inflexão (Ti) em dias, que é apresentado na tabela 17. Podemos definir o Ti como o tempo (dias) onde a velocidade de crescimento atinge o pico máximo começando a diminuir posteriormente. Na presença dos EEs é visível que o Ti aumenta de uma maneira dependente da concentração, traduzindo assim um efeito inibidor dos EEs.

Pela análise da tabela podemos concluir que em todos os controlos atingiram esse tempo aproximadamente no mesmo dia, aproximadamente no 9º dia. Não foi o caso de *Microsporum audourii* que apenas atingiu o Ti ao 27º dia quando na presença de 1000 µg/ml de P17.EE. Em todas as espécies se verifica que o valor de Ti aumenta na presença dos EEs e que esse aumento depende da concentração de EE, o que pode significar que nestas espécies o extrato exerceu o seu efeito inibitório desde o início, numa fase inicial do crescimento fúngico.

Tabela 17. Tempo de inflexão de cada estirpe de fungo filamentosos, apresentada em dias, na ausência e na presença dos extratos etanólicos de própolis recolhido em 2017 nos apiários do Gerês (G17.EE) e do Pereiro (P17.EE). Letras distintas indicam resultados significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

Fungos Filamentosos cultivados em	Tempo de inflexão (d)					
	Meio de cultura	EtOH	G17.EE		P17.EE	
	controlo	control o EtOH	500 µg/ml	1000 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
<i>Fusarium sp.</i>	8,65 ^a	8,60 ^a	9,01 ^b	11,42 ^c	9,20 ^d	10,32 ^e
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	8,58 ^a	8,63 ^a	8,98 ^b	10,92 ^c	9,04 ^b	9,53 ^d
<i>Microsporum audourii</i>	8,88 ^a	9,07 ^a	10,18 ^b	11,71 ^c	12,45 ^d	27,39 ^e
<i>Nannizzia gypsy</i>	8,57 ^a	8,63 ^a	9,07 ^b	9,69 ^c	8,45 ^d	9,46 ^e
<i>Trichophyton tonsurans</i>	8,61 ^a	8,63 ^a	8,55 ^b	7,86 ^c	8,33 ^d	9,33 ^e
<i>Trichophyton rubrum</i>	8,60 ^a	8,64 ^a	8,89 ^b	8,55 ^c	9,13 ^d	9,89 ^e
<i>Trichophyton saudanense</i>	8,93 ^a	8,71 ^b	8,27 ^c	11,18 ^d	7,43 ^e	9,11 ^f
<i>Microsporum canis</i>	8,91 ^a	9,04 ^a	-	-	9,61 ^b	14,88 ^c

Não foram encontrados estudos comparativos que recorressem à equação de Gompertz como modelo que permite caracterizar quantitativamente o crescimento do micélio fúngico. No entanto este

modelo mostrou possuir bastante potencial, podendo vir a ser considerado uma nova ferramenta de análise para estudos deste tipo. A sua grande vantagem reside na obtenção de informação extra relativamente ao comportamento das estirpes na presença dos extratos, durante um longo período, o que pode ser bastante vantajoso para um melhor conhecimento e caracterização do efeito desses extratos. O valor de Ti obtido com este modelo permite inferir mais alguma informação sobre o modo de ação dos extratos. Não foi possível no entanto calcular a taxa específica de crescimento de *Microsporium canis* na presença de G17.EE, dada a impossibilidade de enquadrar o crescimento do fungo no modelo utilizado, apesar de se verificar que o fungo é afetado de igual forma por ambas as concentrações de P17.EE. Para contornar esta dificuldade e mais facilmente avaliar também a influência dos extratos, optou-se por calcular uma taxa de inibição de crescimento para todos os fungos em estudo (Tabela 18). Esta taxa de inibição foi calculada com base no diâmetro dos micélios fúngicos na presença dos EEs em estudo, após o período de tempo necessário para que cada fungo atingisse o seu crescimento máximo. Simultaneamente, calculou-se o mesmo parâmetro para todos os fungos após um tempo fixo, correspondente ao número de dias em que o primeiro fungo atingiu o seu crescimento máximo (neste caso 12 dias, para *Fusarium spp.* e *Trichophyton mentagrophytes*).

Tabela 18. Taxa de Inibição do Crescimento de cada estirpe, apresentada em percentagem, na presença de extratos etanólicos de própolis recolhido em 2017 nos apiários de Gerês e Pereiro. A Taxa de Inibição do crescimento foi calculada para cada fungo no momento (tempo, em dias) em que atingiu o crescimento máximo na presença de etanol (controlo EtOH) e após 12 dias (tempo mais curto após o qual um fungo do painel atingiu o crescimento máximo – valores apresentados entre parêntesis).

Fungos Filamentosos	Crescimento (dias)	Taxa de Inibição do Crescimento (%)			
		G17.EE		P17.EE	
		500 µg/ml	1000 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
<i>Fusarium sp.</i>	12	41,8	58,82	41,18	45,88
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	12	11,76	36,47	23,53	37,65
<i>Microsporium audourii</i>	20 (12)	35,29 (36)	52,94 (60)	47,06 (32)	57,65 (56)
<i>Nannizzia gypsy</i>	16 (12)	23,53 (29)	37,65 (38)	17,65 (14)	44,70 (46)
<i>Trichophyton tonsurans</i>	20 (12)	30,59 (48)	52,94 (63)	41,18 (55)	58,82 (63)
<i>Trichophyton rubrum</i>	23 (12)	25,23 (32)	35,29 (49)	47,06 (49)	55,29 (66)
<i>Trichophyton saudanense</i>	25 (12)	36,47 (42)	41,18 (62)	41,18 (40)	41,18 (66)
<i>Microsporium canis</i>	26 (12)	23,53 (40)	52,94 (46)	35,71 (48)	52,94 (56)

Através deste parâmetro é possível analisar e comprovar o efeito de G17.EE e de P17.EE nos fungos em análise. O efeito de cada EE e da sua concentração na atividade antifúngica é porventura até mais visível analisando e comparando este parâmetro, quer no tempo em que cada fungo atinge o seu crescimento máximo, quer após um período definido para todos os fungos. Considerando a primeira situação, e a concentração de EE mais baixa, 500 µg/ml, os fungos que sofreram maior inibição foram *Microsporium audourii* e *Trichophyton rubrum*, em ambos os casos face a P17.EE (inibição de 47,06 %), enquanto o fungo menos suscetível foi *Trichophyton mentagrophytes* em resposta a G17.EE (35,29 % de inibição). Para esta concentração, o extrato mais ativo é claramente P17.EE, embora os resultados careçam de uma análise estatística. Em relação à concentração de EE mais elevada, *Fusarium* spp. e *Trichophyton tonsurans* foram os fungos mais afetados, ambos com uma inibição de crescimento de 58,82 %, embora em resposta a diferentes extratos: respetivamente G17.EE e P17.EE. Já *Trichophyton rubrum* revelou-se o fungo menos afetado pela concentração mais elevada de extrato, com 11,76 % de inibição de crescimento por G17.EE.

Fusarium spp sofreu igual influência de G17.EE e P17.EE na concentração de 500 µg/ml, corroborando os resultados obtidos quando calculada a taxa específica de crescimento (Tabela 16). *Trichophyton saudanense*, que exibiu taxas específicas de crescimento semelhantes em ambas as concentrações de P17.EE (Tabela 16), mostra aqui também idêntica taxa de inibição (Tabela 18). *Microsporium canis* apresentou também igual efeito para 1000 µg/ml de G17.EE e de P17.EE.

Microsporium audourii e *Trichophyton saudanense* apresentaram, à semelhança da maioria dos fungos em estudo, uma inibição da taxa de crescimento dependente da concentração. No entanto quando adaptadas ao modelo que nos fornece a taxa de crescimento específico para cada fungo, *Microsporium audourii* e *Trichophyton saudanense* apresentaram uma taxa de crescimento inversa à concentração. Aqui poderá residir a vantagem, acima mencionada da informação relativa à taxa específica de crescimento, pois nestes casos (Figura 20 e Figura 22) o comportamento destas espécies na presença de P17.EE sofreu alterações após o período de tempo necessário ao controlo ter atingido o limite máximo permitido pela placa.

Foi ainda calculada a taxa de Inibição do Crescimento, após um tempo de crescimento correspondente ao número de dias em que a espécie de crescimento mais rápido atinge o máximo diâmetro permitido pela placa (dia 12), foram observadas taxa de inibição do crescimento bastante semelhantes às calculadas anteriormente. Não foi possível no entanto determinar um padrão de inibição entre o 12º dia e o dia do crescimento máximo dos controlos pois diferentes espécies em diferentes concentrações apresentaram valores de taxa de inibição variáveis. No entanto há uma ligeira tendência de aumento do valor da taxa assumida pelos diferentes fungos. Com excepção de *Microsporium audourii* em

P17.EE, *Nannizzia gypsy* em P.17.EE na concentração de 500 µg/ml e *Microsporium canis* na concentração de 500 µg/ml no extrato G17.EE.

No 12º dia de crescimento as espécies com maior taxa de inibição e portanto mais suscetíveis foram *Trichophyton tonsurans* em ambas as concentrações e EEs testados e *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton sudanense* apenas em P17.EE na concentração de 1000 µg/ml.

Em própolis da Argentina (16 mg/ml) foram descritas taxas de inibição para *Fusarium* spp. entre 59,1 e 63,1 % (Quiroga et al., 2006), valores semelhantes aos aqui obtidos mas para concentrações de própolis superiores às de G17.EE e P17.EE. Já Siqueira et al. (2008) relataram uma inibição total do crescimento de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton mentagrophytes* na presença de própolis vermelho do Brasil em concentrações inferiores às neste trabalho testadas, no entanto num ensaio distinto. Assim, neste contexto, G17.EE e P17.EE apresentam um perfil semelhante ao própolis da Argentina, não podendo no entanto ser comparado com os valores dos extratos brasileiros. Para própolis de origem portuguesa apenas foram encontrados valores para fungos fitopatogênicos como *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* spp.: na máxima concentração testada (1 mg/ml), o própolis de diferentes regiões de Portugal apresentou taxas de inibição bastante satisfatórias (80 %) em ambos os fungos (Loebler et al., 2018).

Silva-Carvalho et al. (2014) identificaram em P10.EE a pinocembrina, pinobanksina 3-acetato e a crisina, compostos associados por muitos autores à atividade antifúngica do própolis (Burdock 1998; Cushnie e Lamb 2006). Também em G.EEs Freitas et al. (2018) identificaram pinobanksina, crisina, pinocembrina, galangina e alguns ácidos fenólicos, como o ácido cafeico, compostos igualmente associados a essa bioatividade (Medana et al., 2008; Falcão et al., 2010, 2012). Estes resultados não dispensam a análise e caracterização química de G17.EE e P17.EE para conhecer a sua composição. Ainda assim, e dada a consistência na composição química demonstrada até aqui por G.EEs, poderá especular-se a presença dos compostos atrás referidos na amostra G17.EE estudada neste trabalho. Maior cautela deverá ser tida no caso dos P.EEs atendendo às maiores flutuações observadas nas bioatividades estudadas (Tabelas 11, Anexo1: tabela I.1 e I.2) e nos teores de compostos fenólicos (Tabelas 7 e 9)

O mecanismo de ação antifúngica dos flavonóides e outros oxocompostos α,β -insaturados resulta provavelmente da reação da dupla ligação vinílica com grupos sulfonila nas enzimas que interferem na síntese da parede celular fúngica, causando danos funcionais e estruturais na mesma (Scazzocchio et al., 2005). A inibição de enzimas pelos compostos fenólicos oxidados evita a possível adesão fúngica ao epitélio do hospedeiro, diminuindo a patogenicidade dos mesmos (Mason e Wasserman, 1987).

Paralelamente a este ensaio de avaliação da atividade antifúngica, foi feita uma análise comparativa dos diferentes fungos, nomeadamente em termos de coloração, textura, presença ou ausência

de estruturas reprodutoras. Em *Trichophyton tonsurans* e *Microsporium audourii* detetou-se o aparecimento de uma cor alaranjada nos meios suplementados com ambos os extratos e concentrações de própolis, à exceção de *Microsporium audourii* em G17.EE 500 µg/ml (Figura 26), o que pode ser devido a oxidação de compostos presentes no própolis em contacto com o fungo, eventualmente devido à sua ação quando em contacto com os microrganismos. Mason e Wasserman (1987) propuseram que um dos possíveis mecanismos de inibição de patogenicidade de fungos seria a inibição de enzimas através de compostos oxidados, evitando assim adesão fúngica às células epiteliais do hospedeiro.



Figura 26. *Trichophyton tonsurans* cultivado em meio Sabouraud (A) e na presença de 500 µg/m (B) e 1000 µg/ml (C) de P17.EE, sendo visível o aparecimento de cor alaranjada no meio suplementado com própolis.

Em *Fusarium*. spp e também em *Microsporium audourii* observou-se uma redução acentuada da densidade do micélio na presença dos diferentes EEs e em todas as concentrações testadas (Figura 27), que não impediu ao fungo de atingir o diâmetro máximo mas comprometendo o volume do micélio. A diminuição do volume de micélio e consequente diminuição de estruturas reprodutoras poderá representar uma diminuição da virulência do fungo uma vez que estas estruturas aumentam a capacidade de adesão dos microrganismos aos tecidos aumentando a capacidade de invasão ao hospedeiro (Samaranayake e Samaranayake, 2001).



Figura 27. *Fusarium spp.* cultivado em meio Sabouraud (A) e na presença de 1000 µg/ml de G17.EE (B), sendo visível a redução do micélio na placa suplementada com própolis.

3.3.3. Avaliação da Atividade Antifúngica Contra Fungos Filamentosos – Método de Diluição em Meio Líquido

Como já referido, o tipo de crescimento dos fungos *Aspergillus terreus* e *Aspergillus fumigatus* impossibilita a aplicação do método descrito na secção anterior para avaliar o seu crescimento e levou a equacionar a aplicação do método de diluição em meio líquido para testar o efeito de G17.EE e P17.EE contra estes fungos. Para o efeito, optou-se pelo método aprovado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (Wayne, 2002) para avaliação de suscetibilidade de fungos filamentosos, embora a falta de padronização do método tenha levado alguns autores (Fernández-Torres et al., 2002; Barros et al., 2006) a implementar várias modificações. Algumas dessas alterações referem-se às estruturas fúngicas usadas no inóculo (esporos e/ou fragmentos de hifas), o tamanho do inóculo (10^3 ou 10^4 estruturas fúngicas/ ml), período (3 a 10 dias) e temperatura de incubação (28 a 35 °C) (Norris et al., 1999; Jessup et al., 2000; Fernández-Torres et al., 2002; Ghannoum et al., 2004; Handan, 2005; Barros et al., 2006). Tendo em conta esta variabilidade e a necessidade de padronizar o ensaio decidiu-se, numa primeira fase, testar e otimizar alguns parâmetros, como o volume de EtOH e as concentrações de EEs a testar, a temperatura, a agitação e o tempo do ensaio, utilizando como modelos os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus terreus*.

O meio de cultura é um parâmetro importante no sucesso do ensaio. Santos e Hamdan (2005) constataram que diferentes meios de cultura (RPMI 1640, Mc Veigh e Morton e Sabouraud) influenciavam a determinação dos valores de MIC para *Trichophyton rubrum*, tendo sido RPMI 1640 o meio considerado mais apropriado, face ao meio Sabouraud, por exemplo, usado no presente trabalho. As discrepâncias de resultados entre réplicas, referidas por Santos e Hamdan (2005), foram também encontradas no presente trabalho e requereram um maior número de ensaios independentes.

A temperatura foi testada juntamente com o parâmetro agitação, realizando-se o ensaio a 30 e a 37 °C, para além da temperatura ambiente, em qualquer das situações experimentais com e sem agitação. Norris et al. (1999) tinham verificado que a temperatura não era um fator preponderante no crescimento de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton tonsurans*, quando procedeu à avaliação das condições de crescimento ótimas para determinação da suscetibilidades destes dermatófitos contra antifúngicos comerciais. No presente trabalho, concluiu-se existir a temperaturas mais elevadas, uma redução assinalável do volume dos poços - verificando-se nas situações com agitação uma redução ainda mais acentuada deste mesmo volume, por vezes detetável num conteúdo ressequido, em alguns poços - e por vezes também, nestas condições, a formação de precipitados (não apresentado), provavelmente de própolis. Depois de analisar todas as condições, ficou definida a temperatura de 30 °C, sem agitação, como a condição experimental mais adequada ao ensaio.

O volume de EtOH foi outro dos parâmetros que teve que ser ajustado por se ter verificado que influenciava o crescimento dos próprios fungos (Tabela 15). Nesse sentido, um inóculo de esporos foi testado na presença de EtOH mostrando ser possível usar até uma concentração de 5 µg/ml sem comprometer o seu crescimento (Figura 28).

O volume de etanol não tem vindo a ser reportado na literatura como uma variável que exerça influência nos resultados obtidos nas diferentes atividades biológicas estudadas, sendo antes apresentado como importante no rendimento das extrações etanólicas. Adelman (2005) reportou maior rendimento de compostos fenólicos em extratos etanólicos assim como maior atividade antimicrobiana e antioxidante. Koo et al. (2000) referiram uma influência idêntica de EEs de própolis na atividade anti-inflamatória face a extratos aquosos. Para além de um maior rendimento na extração de compostos fenólicos com etanol, o volume de EtOH a usar pode influenciar os resultados obtidos para a atividade antifúngica (Figura 28), o que não surpreenderá dada a reconhecida atividade antimicrobiana do próprio etanol (McDonnell e Russel, 1999), o que requer que o volume a usar na diluição dos extratos tenha que ser ajustado em cada ensaio, e para cada estirpe.

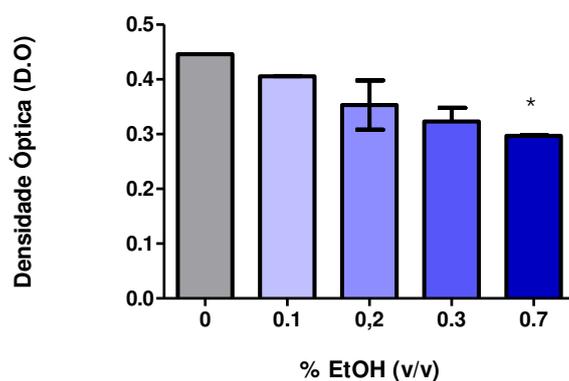


Figura 28. Avaliação do crescimento de *Aspergillus terreus* em meio de cultura PDA na ausência de EtOH (■, controlo) e na presença de EtOH 0,1 % (v/v) (□); 0,2 % (v/v) (□); 0,3 % (v/v) (□) e 0,7 % (v/v) (■). Os valores resultam da média \pm DV de 3 ensaios independentes com 3 réplicas cada (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Após determinação do volume de EtOH a usar, foi ajustada a concentração de EEs a testar. Neste ensaio em particular, o reduzido volume de EtOH levou à preparação de soluções *stock* de EEs com concentrações muito elevadas o que, na prática, levou a que os poços que albergavam o inóculo fúngico alterassem de imediato a sua cor aquando da colocação dos EEs, aparentando turbidez. Este detalhe não só impossibilitou a determinação dos valores de MIC ou MFC por observação visual mas afetou a leitura da D.O.. Na tentativa de contornar tal situação, foram preparadas misturas com meio Sabouraud (em igual

volume ao usado no inóculo) e EEs nas diferentes concentrações em teste, a usar como brancos. À leitura da D.O. nos diferentes poços-teste passou a retirar-se o valor de D.O. obtido para os respectivos brancos.

O parâmetro tempo do ensaio foi também padronizado. Vários autores (Norris et al., 1999; Fernández-Torres et al., 2003, 2006) referem que o período de incubação para testar a suscetibilidade antifúngica de dermatófitos varia entre 3 a 7 dias. Face aos resultados obtidos na otimização realizada com *Aspergillus terreus* (Figura 29) e *Aspergillus fumigatus* (Figura 30), o tempo de ensaio definido foi 3 dias, tempo findo o qual apresentavam já uma redução considerável da D.O., tendo este mesmo resultado sido validado para cada um dos fungos filamentosos testados, após realização de um ensaio.

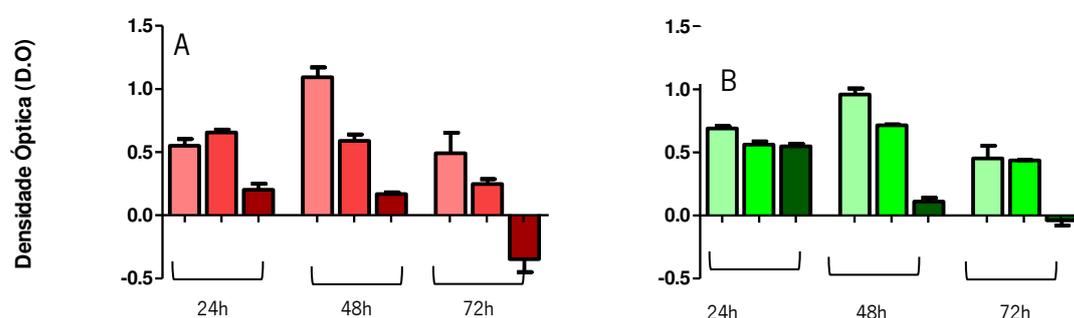


Figura 29. Avaliação do crescimento de *Aspergillus terreus* em meio de cultura PDA suplementado com (A) G17.EE nas concentrações de 500 µg/ml (■); 1000 µg/ml (■) e 2000 µg/ml (■) e (B) P17.EE nas concentrações de 500 µg/ml (■); 1000 µg/ml (■) e 2000 µg/ml (■). A D.O. foi lida após 24h, 48h e 72h de incubação.



Figura 30. Avaliação do crescimento de *Aspergillus fumigatus* em meio de cultura PDA suplementado com (A) G17.EE nas concentrações de 500 µg/ml (■); 1000 µg/ml (■) e 2000 µg/ml (■) e (B) P17.EE nas concentrações de 500 µg/ml (■); 1000 µg/ml (■) e 2000 µg/ml (■). A D.O. foi lida após 24h, 48h e 72h de incubação.

A percentagem de inibição foi ainda calculada inicialmente nos dois fungos modelos em todos os tempos de medição de D.O. (24, 48 e 72 h) (Figura 31 e Figura 32), comprovando-se de um modo geral um efeito inibitório dependente do tempo e da concentração.

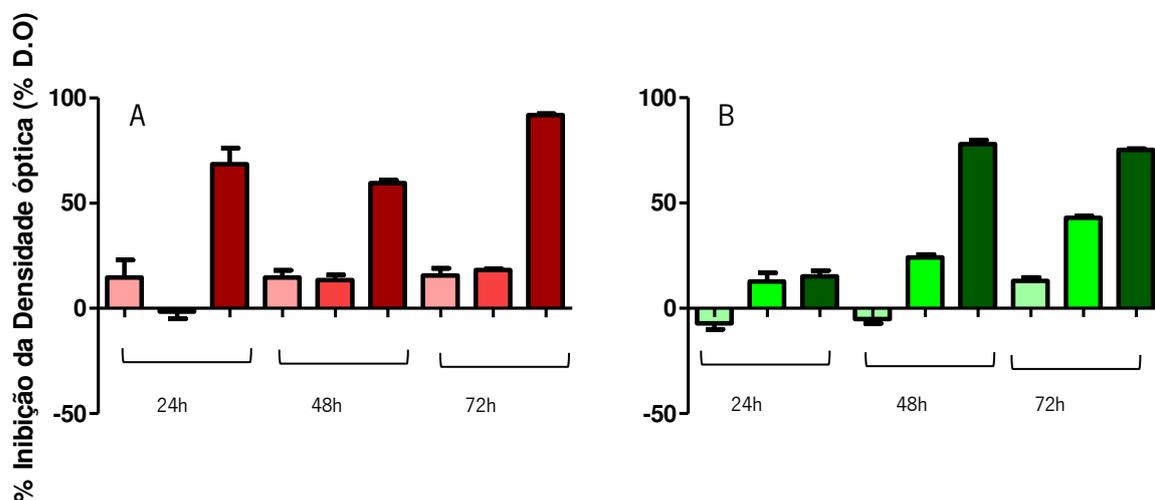


Figura 31. Percentagem de inibição da D.O. de *Aspergillus terreus*, após 24h, 48h e 72h em meio de cultura PDA suplementado com (A) G17.EE nas concentrações de 500 µg/ml (■); 1000 µg/ml (■) e 2000 µg/ml (■) e (B) P17.EE nas concentrações de 500 µg/ml (■); 1000 µg/ml (■) e 2000 µg/ml (■).

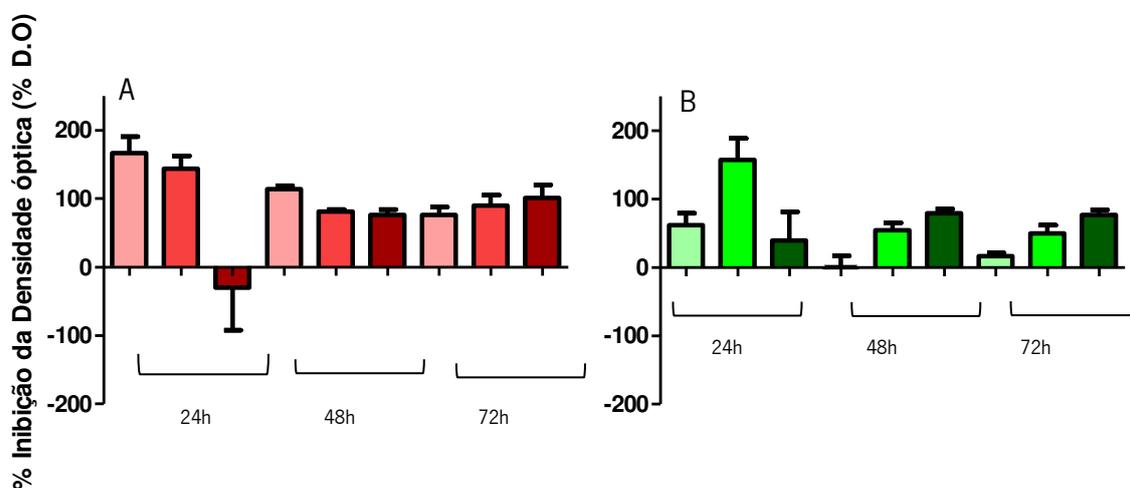


Figura 32. Percentagem de inibição da D.O. de *Aspergillus fumigatus*, após 24h, 48h e 72h em meio de cultura PDA suplementado com (A) G17.EE nas concentrações de 500 µg/ml (■); 1000 µg/ml (■) e 2000 µg/ml (■) e (B) P17.EE nas concentrações de 500 µg/ml (■); 1000 µg/ml (■) e 2000 µg/ml (■),acompanhada às 24h, 48h e 72h.

Com todos os parâmetros definidos e otimizados, aplicou-se então o ensaio a todos os fungos filamentosos em estudo. A percentagem de inibição da densidade ótica foi calculada ao 3º dia para cada um dos fungos em estudo, por ser o dia em que esse efeito foi mais expressivo (Figuras 31 e 32) estando os resultados expressos na tabela 19,

Tabela 19. Percentagem de inibição da D.O. para cada estirpe de fungo filamentoso após 72 h na presença dos extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês e do Pereiro recolhidas em 2017

Fungos Filamentosos	% de inibição de D.O.					
	G17.EE			P17.EE		
	500 µg/ml	1000 µg/ml	2000 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml	2000 µg/ml
<i>Aspergillus fumigatus</i>	53,05	71,18	134,7 1	49,0	61,18	109,3 4
<i>Aspergillus terreus</i>	16,27	21,67	92,11	15,17	45,20	77,89
<i>Fusarium sp.</i>	-6,71	48,25	78,84	-5,82	13,68	66,06
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	-9,25	75,31	86,10	3,06	76,13	80,36
<i>Microsporum audourii</i>	36,93	53,21	56,07	28,37	41,00	84,53
<i>Nannizzia gypse</i>	-7,33	33,42	96,72	6,39	78,76	95,65
<i>Trichophyton tonsurans</i>	6,71	44,91	78,25	5,82	16,68	66,06
<i>Trichophyton rubrum</i>	16,35	32,58	93,17	12,07	46,48	91,34
<i>Trichophyton saudanense</i>	-9,57	3,91	95,45	3,32	43,41	86,20
<i>Microsporum canis</i>	25,71	38,39	86,07	14,83	19,73	96,55

Uma vez representadas as percentagens de inibição de D.O. em função da concentração, calculou-se por extrapolação o valor do MIC₅₀ para os dois EEs contra cada uma das espécies estudadas. O MIC₅₀ corresponde assim à concentração de G17.EE e de P17.EE que causam uma redução de D.O. igual a 50%. Os valores de MIC₅₀ estimados para cada espécie encontram-se descritos na tabela 20,

Todos os fungos testados apresentaram suscetibilidade a ambos os extratos, obtendo-se um valor de MIC para cada par EE-fungo. A espécie que apresentou mais susceptibilidade a ambos aos EEs foi *Aspergillus fumigatus*, seguida de *Nannizzia gypsey* em P17.EE. O MIC₅₀ dos EEs contra as restantes estirpes foi bastante semelhante com exceção de *Fusarium sp.*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* que mostram serem menos sensíveis a P17.EE

Tabela 20. Atividade antifúngica dos extratos etanólicos de própolis relativos ao ano de 2017 contra os fungos filamentosos estudados neste trabalho, expressa em termos de valores de MIC₅₀ (µg/ml).

Estirpes	MIC ₅₀ (µg/ml)	
	G17.EE	P17.EE
<i>Aspergillus fumigatus</i>	515,53	605,80
<i>Aspergillus terreus</i>	1291,19	1263,58
<i>Fusarium sp.</i>	1358,14	1694,25
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1079,91	1687,76
<i>Microsporium audourii</i>	1283,19	1133,03
<i>Nannizzia gypsy</i>	1313,58	974,81
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1314,91	1659,52
<i>Trichophyton rubrum</i>	1215,65	1171,37
<i>Trichophyton saudanense</i>	1441,04	1272,43
<i>Microsporium canis</i>	1165,36	1275,22

Em amostras de própolis oriundas da República Checa e Eslováquia foram descritos MICs para *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton mentagrophytes* de 88,4 e 111.4 µg/ml respectivamente (Buchta et al., 2011). Boisard et al. (2015) descreveram em própolis francês MIC₈₀ > 250 µg/ml para a espécie *Aspergillus fumigatus*. *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton mentagrophytes* quando testados com própolis brasileiro mostraram valores de MIC₅₀ de 64, 512 e 512 µg/ml respectivamente (Siqueira et al., 2009). Mais recentemente em outras amostras oriundas do Brasil, Galletti et al. (2017) reportaram valores de MIC₅₀ de 1093,75 para *Fusarium* spp. Mannani et al. (2011) reportaram em própolis Iraniano valores de MIC de 0,025 µg/ml contra *Microsporium canis*. Também em própolis Iraniano, mais recentemente foram reportados MICs 0.2-488.2 µg/ml para *Microsporium canis* (Khosravi et al., 2014). Em própolis argentino foi determinado um MIC₅₀ de 61,25 e 31,25 µg/ml contra os dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* (Aguero et al., 2010). Falcão et al. (2013b) descreveram valores de MIC₅₀ de 14.5 e > 64 µg/ml para amostras de própolis português contra as espécies *Trichophyton rubrum* e *Aspergillus fumigatus*., respectivamente.

Os valores de MIC₅₀ obtidos neste trabalho, comparativamente com outros EEs, em especial EEs de própolis português, são bastante mais elevados, embora o potencial antifúngico de G17.EE e P17.EE pareça ir de encontro ao reportado em amostras de própolis brasileiro para a estirpe *Fusarium* spp. Dadas as características deste ensaio, será importante testar outras concentrações de G17.EE e P17.EE, com

incrementos entre si inferiores, para obtenção de valores de MIC mais precisos e rigorosos, como já referido.

Para detetar os valores de MFC, após os três dias decorridos do ensaio, procedeu-se à inoculação do conteúdo de cada poço em placas de PDA, incubadas posteriormente a 30 °C por um período de 72 h. Após este período foi sempre observado crescimento como mostrado no caso de *Microsporium canis*, na figura que se segue. Não foram detetados neste trabalho valores de MFC para qualquer das estirpes em estudo.

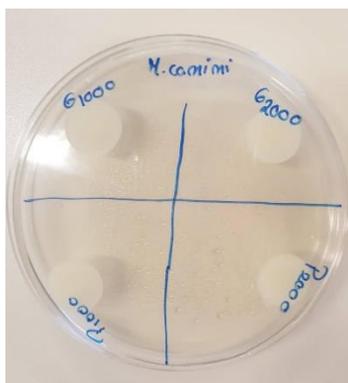


Figura 33. Crescimento de *Microsporium canis* em meio PDA, após transferência de 5 µl das misturas de esporos em G17.EE 1000 µg/ml (A) ou 2000 µg/ml (B) e das misturas de esporos com P17.EE 1000 µg/ml (C) e ou 2000 µg/ml (D) uma vez terminado o ensaio para avaliação da atividade antifúngica.

4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O própolis português, em particular as amostras recolhidas nas localidades de Pereiro e Gerês, tem vindo a revelar bioatividades de interesse, e conseqüentemente um potencial de utilização para possíveis aplicações em várias indústrias. As amostras estudadas no presente trabalho, recolhidas em 2017, corroboram esta informação que tem vindo a ser recolhida anualmente, desde 2011, para amostras de própolis dos mesmos apiários. Os resultados obtidos no âmbito deste trabalho contribuem adicionalmente para a valorização do própolis nacional, um produto da colmeia frequentemente negligenciado e inclusivamente descartado pelos apicultores portugueses.

A caracterização química de G17.EE e P17.EE em termos de TFP e TPT permitiu validar também a proclamada variabilidade que diferentes amostras podem apresentar, quer em termos de origem geográfica quer mesmo numa amostra de uma única origem, proveniente de colheitas diferentes. O TO, parâmetro que até aqui ainda não tinha sido avaliado em amostras de própolis, parece ser bastante expressivo em G17.EE e P17.EE e seria interessante determinar o teor destes compostos nos G.EEs e P.EEs que têm vindo a ser estudados, para avaliar a presença dos orto-difenois e a sua importância em termos da composição química e bioatividades de própolis.

Apesar da variabilidade observada ao nível da caracterização química preliminar de G17.EE e P17.EE, a capacidade antioxidante dos dois extratos é semelhante. A variabilidade química do própolis, entre amostras de diferentes proveniências ou mesmo em amostras da mesma proveniência mas de colheitas diferentes, constitui o maior entrave à exploração biotecnológica do própolis. Ainda assim, nem sempre a variabilidade apresentada por diferentes extratos se traduz necessariamente em perfis de bioatividades distintos, como constatado neste trabalho. Apesar dos flavonoides e outros compostos fenólicos serem considerados os compostos ativos em própolis, nem todos os compostos quantificados serão bioativos, da mesma forma que outros compostos não quantificados por estes métodos poderão estar também implicados nas bioatividades dos extratos. Assim, apesar da determinação destes teores – TFT e TPT - ser importante numa fase de caracterização preliminar das amostras, possivelmente não serão estes os parâmetros mais adequados para fundamentar uma padronização do própolis. Saliente-se no entanto que a legislação brasileira exige um mínimo de 0,5 % (m/m) de compostos fenólicos e um mínimo de 5 % (m/m) de compostos fenólicos em amostras de própolis para garantir a qualidade do própolis (Brasil, 2001).

A elevada capacidade de captura do radical DPPH• por parte de G17.EE e P17.EE sugere um forte potencial antioxidante, tornando estes EEs em concreto particularmente atrativos para aplicações dependentes desta bioatividade, desde a indústria alimentar com os conservantes alimentares, à farmacêutica com suplementos antioxidantes ou mesmo fármacos direcionados para doenças associadas

aos radicais livres (Bolton et al., 2000; Smith et al., 2000), e até na cosmética com formulações anti envelhecimento (Michniak-Kohn et al., 2017)

Em relação à atividade antimicrobiana contra bactérias e leveduras, G17.EE e P17.EE exibirem espectros de atividade relativamente idênticos, face ao leque de estirpes estudadas, apresentando valores de MIC idênticos. Elevada atividade antibacteriana, em especial contra bactérias Gram-positivas formadoras de esporos, como as do género *Bacillus*, foi detetada em ambos os EEs, um comportamento já observado em G.EEs (Freitas ...) mas não em P.EEs de anos anteriores. Este aparente espectro peculiar de ação dos extratos deverá no entanto ser validado, testando outras bactérias formadoras de esporos, como por exemplo bactérias do género *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina*, entre outras.

A ação antifúngica contra leveduras apresentou também valores idênticos em ambos os EEs estudados, embora esta atividade pareça menos evidente que a antibacteriana, como aliás tem vindo a ser descrito para própolis de um modo geral (Freitas et al., 2018). Seria importante porém alargar o painel de leveduras indicadoras de suscetibilidade para melhor caracterizar e comparar esta propriedade biológica em G.EEs, mas particularmente em P.EEs, onde maior variabilidade tem sido detetada em amostras recolhidas em diferentes anos (Marques, 2015; Oliveira, 2015; Moreira, 2017)

Na atividade contra fungos filamentosos destaca-se a maior suscetibilidade da espécie *Microsporum audouirii*. *Microsporum audouirii* é um fungo antropofílico que causa infeções não inflamatórias do couro cabeludo e da pele, principalmente em crianças. É o principal agente causador das epidemias de tinea capitis na Europa e na América do Norte, no entanto é atualmente menos comum (Hoog et al., 2016). Outras espécies que apresentaram também suscetibilidade aos EEs estudados foram *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton rubrum* e *Aspergillus fumigatus*. O primeiro é um fungo antropofílico, reconhecido como o principal causador de onicomicoses em todo o mundo. Aproximadamente 80-93% das dermatofitoses crónicas em todo o mundo são causadas por este fungo. Causa frequentemente infeções crónicas de pele, unhas e raramente couro cabeludo (Yue et al., 2015). *Aspergillus fumigatus*, reconhecido como o principal patógeno dentro do género *Aspergillus* (Lacaz, 1991), é mais frequentemente encontrado em ambiente hospitalar e é principalmente perigoso para os doentes imunocomprometidos (Paula et al., 2007). Provoca aspergilose em humanos, uma das infeções com maiores índices de mortalidade, chegando a atingir 85 % mesmo após a administração de terapêutica antifúngica. Tendo em conta o tipo de infeções causadas por estes fungos e os resultados obtidos, o desenvolvimento de uma possível formulação tópica para tratamento ou coadjuvante afigura-se uma perspetiva aliciante para dar continuidade a este trabalho. Outro tipo de fungos filamentosos, em especial dermatófitos como por exemplo *Acremonium falciforme*, *Madurella grisea*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton interdigitale*,

Epidermophyton floccosum poderiam ser acrescentados ao painel de indicadores fúngicos de suscetibilidade, dada a sua importância (Apêndice 1, Tabela A1).

Um contributo importante neste trabalho reside na avaliação de uma nova bioatividade – a atividade contra fungos filamentosos - nas amostras de própolis que têm vindo a ser estudadas pelo grupo e no desenvolvimento e otimização dos métodos para esse efeito. Dois métodos foram explorados, permitindo obter informação diferente acerca do efeito de um EE e também do comportamento do fungo que lhe é suscetível. A equação de Gompertz, proposta pela primeira vez no nosso grupo (A. Cunha, comunicação pessoal) para descrever o crescimento dos fungos filamentosos, demonstra algumas vantagens por se tratar de um teste quantitativo e multiparamétrico e foi aplicada aos fungos testados no método de diluição em placa. No entanto, a par de alguns casos onde esta modelação não pode ser aplicada, este método exigiu tempos de ensaio longos que poderão comprometer os resultados na medida que o meio de cultivo pode perder nutrientes e outras propriedades necessárias ao crescimento do fungo, bem como ocorrer o esgotamento dos compostos ativos ou degradação dos mesmos. O método de diluição em placa revelou-se um teste simples e de fácil execução e permite avaliar o efeito dos EEs num período de tempo relativamente curto, afigurando-se por isso mais vantajoso. Contudo, tendo em conta a necessidade de otimização de vários dos parâmetros contemplados neste trabalho, será necessário testar diferentes extratos com diferentes espécies de microrganismos para comprovar a sua validade.

Uma análise química mais profunda de G17.EE e P17.EE com identificação dos principais compostos e posterior isolamento será sempre requerida para caracterizar as amostras de própolis e determinar quais os compostos que efetivamente são bioativos, averiguando adicionalmente a ocorrência de sinergismos ou antagonismos entre eles. O isolamento de compostos bioativos poderá inclusivamente abrir novas perspetivas de investigação que não implicam a utilização dos extratos.

- Adams, B. B.** (2002). Tinea corporis gladiatorum. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 47(2), 286-290.
- Adelmann, J.** (2005). Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante.
- Aga, H., Shibuya, T., Sugimoto, T., Kurimoto, M., e Nakajima, S.** (1994). Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(5), 945-946.
- Agência** Regional de Energia e Ambiente do Interior. Disponível em <http://www.enerarea.pt/>. Acesso em Janeiro 2019.
- Aguero, M. B., Gonzalez, M., Lima, B., Svetaz, L., Sanchez, M., Zacchino, S. e Tapia, A.** (2009). Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) exudates: phytochemical characterization and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 194-201.
- Ali, M. T., Blicharska, N., Shilpi, J. A., e Seidel, V.** (2018). Investigation of the anti-TB potential of selected propolis constituents using a molecular docking approach. *Scientific reports*, 8(1), 12238.
- Allen, J. C., e Hamilton, R. J.** (1983). *Rancidity in foods* (No. LC-0004). Applied Science Publishers.
- Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L., e Narain, N.** (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International*, 101, 129-138.
- Andrade, S. D. C.** (2016). Estudo das propriedades físico-químicas e avaliação de compostos bioativos em camarinhas ('*Corema album*'LD Don) (Doctoral dissertation).
- Aref, R.** (2014). Comparative analysis of repressor interaction with pleiotropic corepressors Sin3 and Cyc8 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação de Doutorado. Universidade de Heidelberg, Heidelberg, Alemanha.
- Ates, A., Ozcan, K., e Ilkit, M.** (2008). Diagnostic value of morphological, physiological and biochemical tests in distinguishing *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes* complex. *Sabouraudia*, 46(8), 811-822.
- Babel, D. E., e Baughman, S. A.** (1989). Evaluation of the adult carrier state in juvenile tinea capitis caused by *Trichophyton tonsurans*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 21(6), 1209-1212.
- Banerjee, S. N., Emori, T. G., Culver, D. H., Gaynes, R. P., Jarvis, W. R., Horan, T.** e National Nosocomial Infections Surveillance System. (1991). Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980–1989. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S86-S89.
- Bankova, V.** (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117.

- Bankova, V., de Castro, S. L., e Marcucci, M. C. (2000).** Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, *31*(1), 3-15.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., e Kadota, S. (2001).** Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, *15*(7), 561-571.
- Barros, M. E., de Assis Santos, D. e Hamdan, J. S. (2006).** In vitro methods for antifungal susceptibility testing of Trichophyton spp. *Mycological Research*, *110*(11), 1355-1360.
- Belkum, A., Fahal, A., e van de Sande, W. W. (2013).** Mycetoma caused by *Madurella mycetomatis*: a completely neglected medico-social dilemma. In *Hot Topics in Infection and Immunity in Children IX* (pp. 179-189). Springer, New York, NY.
- Benson, H. A., e Watkinson, A. C. (Eds.). (2012).** *Topical and Transdermal Drug Delivery: Principles and Practice*. John Wiley e Sons.
- Bergendi L., Benes L., Durackova Z. e Ferencik M. (1999).** Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Science*, *65*:1865-74
- Berger, S., El Chazli, Y., Babu, A. F., e Coste, A. T. (2017).** Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a consequence of antifungal use in agriculture? *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1024.
- Boisard, S., Le Ray, A. M., Landreau, A., Kempf, M., Cassisa, V., Flurin, C., e Richomme, P. (2015).** Antifungal and antibacterial metabolites from a French poplar type propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*.
- Bojic, M., Antolić, A., Tomičić, M., Debeljak, Ž, e Maleš, Ž. (2018).** Propolis ethanolic extracts reduce adenosine diphosphate induced platelet aggregation determined on whole blood. *Nutrition Journal*, *17*(1), 52.
- Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., e Monks, T. J. (2000).** Role of quinones in toxicology. *Chemical research in toxicology*, *13*(3), 135-160.
- Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R., e Denning, D. (2017).** Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *Journal of Fungi*, *3*(4), 57.
- Bonvehí, J. S., e Gutiérrez, A. L. (2012).** The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(4), 1351-1358.
- Borrelli, F., Izzo, A. A., Di Carlo, G., Maffia, P., Russo, A., Maiello, F. M. e Mascolo, N. (2002a).** Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia*, *73*, S38-S43.
- Borrelli, F., Maffia, P., Pinto, L., Ianaro, A., Russo, A., Capasso, F., e Ialenti, A. (2002b).** Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, *73*, S53-S63.

- Brandl, J., e Andersen, M. R.** (2015). Current state of genome-scale modeling in filamentous fungi. *Biotechnology Letters*, *37*(6), 1131-1139.
- Bravo, L.** (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, *56*(11), 317-333.
- Brasil, SeCRETARIA DE Agricultura e Abastecimento- Coordenadoria de Defesa Agropecuária.** Dispínivel em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/resolucao-saa-30-de-24-09-2001,92.html>. Acesso em Janeiro 2019
- Brenna, O. V., e Pagliarini, E.** (2001). Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(10), 4841-4844.
- Buchta, V., Černý, J., e Opletalová, V.** (2011). In vitro antifungal activity of propolis samples of Czech and Slovak origin. *Open Life Sciences*, *6*(2), 160-166.
- Bulman, Z., Le, P., Hudson, A.O., Savka, M.A.** (2011). A novel property of propolis (bee glue): Antipathogenic activity by inhibition of N-acyl-homoserine lactone mediated signaling in bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*. 138: 788-797.
- Burdock, G. A.** (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, *36*(4), 347-363.
- Cafarchia, C., De Laurentis, N., Milillo, M. A., Losacco, V., e Puccini, V.** (1999). Antifungal activity of Apulia region propolis. *Parassitologia*, *41*(4), 587-590.
- Caliari, V.** (2014). Influência da variedade de uva, do método de elaboração e envelhecimento sobre borras na composição química e sensorial de espumantes.
- Cardoso, S. M., Silva, A. M. S.** (2016) Chemistry, Biology and Potential Applications of Honeybee Plant-Derived Products. Consultado em Dezembro, 2018, em <https://ebooks.benthamscience.com/book/9781681082370>. Acedido Dezembro 2018
- Carr, A. C., McCall, M. R., e Frej, B.** (2000). Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *20*(7), 1716-1723.
- Castro, P. A. D.** (2012). Identificação dos mecanismos de letalidade da própolis em *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Castro, P. A., Savoldi, M., Bonatto, D., Barros, M. H., Goldman, M. H. S., Berretta, A. A., e Goldman, G. H.** (2011). Molecular characterization of propolis-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, *10*(3), 398-411.

- Castro**, P. A., Savoldi, M., Bonatto, D., Malavazi, I., Goldman, M. H. S., Berretta, A. A., e Goldman, G. H. (2012). Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* exposed to propolis. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 194.
- Castro**, S. L. (2001). Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Annu Rev Biomed Sci*, 3, 49-83.
- CDC**. Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL). Disponível em <https://phil.cdc.gov/>. Acessado em Dezembro 2018
- Cha**, S. B. (1990). Microbiota fúngica conjuntival de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).
- Chan**, G. C. F., Cheung, K. W., e Sze, D. M. Y. (2013). The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clinical reviews in allergy e immunology*, 44(3), 262-273.
- Chan**, J. F., Lau, S. K., Yuen, K. Y., e Woo, P. C. (2016). *Talaromyces* (*Penicillium*) *marneffeii* infection in non-HIV-infected patients. *Emerging microbes e infections*, 5(3), e19.
- Choi**, E., Huang, J., Chew, K. L., Jaffar, H., e Tan, C. (2018). Pustular tinea manuum from *Trichophyton erinacei* infection. *JAAD Case Reports*, 4(6), 518-520.
- Chowdhary**, A., e Singh, K. (2005). Spectrum of fungal keratitis in North India. *Cornea*, 24(1), 8-15.
- Cintra**, R. M. G., e Mancini Filho, J. (1996). Antioxidant activity of spices in different systems. In *Biennial Meeting International Society for Free Radical Research* (Vol. 8, p. 90).
- Cleeland**, R., e Squires, E. (1991). Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. *Antibiotics in laboratory medicine*, 3, 739-787.
- Clifford**, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 362-372.
- Cook**, G.A. e Lauer, C.M. (1968). Oxygen. Clifford A. Hampel. The Encyclopedia of the Chemical Elements. Nova York: Reinhold Book Corporation. 499–512. 68-29938
- Corrêa**, C. (2014). Radicais livres. *Revista de Ciência Elementar*, 2(01),0057
- Cotter**, G., Doyle, S., e Kavanagh, K. (2000). Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunology e Medical Microbiology*, 27(2), 163-169.
- Cui**, K., Lu, W., Zhu, L., Shen, X. e Huang, J. (2013). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an active component of propolis, inhibits *Helicobacter pylori* peptide deformylase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 435: 289-294.
- Cushnie**, T. T., e Lamb, A. J. (2006). Errata for “Antimicrobial activity of flavonoids”[Int. J. Antimicrob. Agents 26 (2005) 343–356]. *International journal of antimicrobial agents*, 27(2), 181.

- Czarny, A., Kulbacka, Julita, Nowakowska, Danuta, Gancarz, Roman e Wilk, Kazimiera A. (2017).** Antimicrobial activity, cytotoxicity and total phenolic content of different extracts of propolis from the west pomeranian region in Poland. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 74(2), 715-722
- D'Arrigo, M., Bisignano, C., Irrera, P., Smeriglio, A., Zagami, R., Trombetta, D., e Mandalari, G. (2019).** In vitro evaluation of the activity of an essential oil from *Pistacia vera* L. variety Bronte hull against *Candida* sp. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 6.
- D'auria, F. D., Tecca, M., Scazzocchio, F., Renzini, V., e Strippoli, V. (2003).** Effect of propolis on virulence factors of *Candida albicans*. *Journal of chemotherapy*, 15(5), 454-460.
- De Abreu, J. A. S., ROVIDA, A. F. D. S., e PAMPHILE, J. A. (2018).** Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. *Revista UNINGÁ Review*, 21(1).
- Sousa, J. P., Bueno, P. C., Gregório, L. E., da Silva Filho, A. A., Furtado, N. A., de Sousa, M. L., e Bastos, J. K. (2007).** A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 30(16), 2656-2665.
- Debono, M., e Gordee, R. S. (1994).** Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annual review of microbiology*, 48(1), 471-497.
- Decker, E. A., Crum, A. D., e Calvert, J. T. (1992).** Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(5), 756-759.
- Demange, C., Contet-Audonneau, N., Kombila, M., Miegerville, M., Berthonneau, M., De Vroey, C., e Percebois, G. (1992).** *Microsporium gypseum* complex in man and animals. *Journal of medical and veterinary mycology*, 30(4), 301-308.
- Deng, S., de Hoog, G. S., Badali, H., Yang, L., Najafzadeh, M. J., Pan, B., e Liao, W. (2013).** In vitro antifungal susceptibility of *Cladophialophora carrionii*, agent of human chromoblastomycosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC-02114.
- Devequi-Nunes, D., Machado, B. A. S., de Abreu Barreto, G., Silva, J. R., da Silva, D. F., da Rocha, J. L. C. e Umsza-Guez, M. A. (2018).** Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PloS one*, 13(12), e0207676.
- Dias, Luís G., Pereira, Ana Paula e Estevinho, Leticia M. (2012).** Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 50(12), 42464253

- Domingues**, R. H. M., Dutra, L. A., Ferreira, F. D., Passarelli, M., Nakandakare, E. R., Chin, C. M., e Santos, J. L. (2017). Síntese de (E)-dimetoxi-estilbenos com atividade preventiva a aterosclerose in vitro. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 38.
- Donnelly**, J. K., e Robinson, D. S. (1995). Invited review free radicals in foods. *Free radical research*, 22(2), 147-176.
- Duthie**, G., e Crozier, A. (2000). Plant-derived phenolic antioxidants. *Current opinion in lipidology*, 11(1), 43-47.
- Edwards Jr**, J. E., e Filler, S. G. (1992). Current strategies for treating invasive candidiasis: emphasis on infections in nonneutropenic patients. *Clinical infectious diseases*, 14(Supplement_1), S106-S113.
- Ehgartner**, D., Herwig, C., e Fricke, J. (2017). Morphological analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* using flow cytometry—the fast alternative to microscopic image analysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(20), 7675-7688.
- Elewski**, B. E. (2000). Tinea capitis: a current perspective. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(1), 1-20.
- El-Guendouz**, S., Aazza, S., Lyoussi, B., Bankova, V., Popova, M., Neto, L., e Miguel, M. D. G. (2018). Moroccan Propolis: A Natural Antioxidant, Antibacterial, and Antibiofilm against *Staphylococcus aureus* with No Induction of Resistance after Continuous Exposure. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.
- Evans**, E. G. V., e Sigurgeirsson, B. (1999). Double blind, randomised study of continuous terbinafine compared with intermittent itraconazole in treatment of toenail onychomycosis. *Bmj*, 318(7190), 1031-1035.
- Fabris**, S., Bertelle, M., Astafyeva, O., Gregoris, E., Zangrando, R., Gambaro, A., e Stevanato, R. (2013). Antioxidant properties and chemical composition relationship of Europeans and Brazilians propolis. *Pharmacology e Pharmacy*, 4(01), 46.
- Faergemann**, J., e Baran, R. (2003). Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. *British Journal of Dermatology*, 149, 1-4.
- Falcão**, S. I., Freire, C., e Vilas-Boas, M. (2013a). A proposal for physicochemical standards and antioxidant activity of Portuguese propolis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(11), 1729-1741.
- Falcão**, S. I., Tomás, A., Vale, N., Gomes, P., Freire, C., e Vilas-Boas, M. (2013b). Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. *Industrial Crops and Products*, 49, 805-812.

- Falcão, S. I., Vale, N., Cos, P., Gomes, P., Freire, C., Maes, L., e Vilas-Boas, M. (2014).** In vitro evaluation of Portuguese propolis and floral sources for antiprotozoal, antibacterial and antifungal activity. *Phytotherapy research*, 28(3), 437-443.
- Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R., e Cardoso, S. M. (2010).** Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(2), 887-897.
- Fernández-Torres, B., Cabanes, F. J., Carrillo-Munoz, A. J., Esteban, A., Inza, I., Abarca, L., e Guarro, J. (2002).** Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes. *Journal of clinical microbiology*, 40(11), 3999-4003.
- Fernández-Torres, B., Carrillo-Muñoz, A., Inza, I., e Guarro, J. (2006).** Effect of culture medium on the disk diffusion method for determining antifungal susceptibilities of dermatophytes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(6), 2222-2224.
- Fernández-Torres, B., Inza, I., e Guarro, J. (2003).** In vitro activities of the new antifungal drug eberconazole and three other topical agents against 200 strains of dermatophytes. *Journal of clinical microbiology*, 41(11), 5209-5211.
- Ferreira, I. C., e Abreu, R. (2007).** Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, 32-39.
- Fibach, E., e Rachmilewitz, E. A. (2010).** The role of antioxidants and iron chelators in the treatment of oxidative stress in thalassemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1202(1), 10-16.
- Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A. M., Cunha, A., e Aguiar, C. (2010).** How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 481-493.
- Freitas, A. S., Cunha, A., Cardoso, S. M., Oliveira, R., e Almeida-Aguiar, C. (2018).** Constancy of the bioactivities of propolis samples collected on the same apiary over four years. *Food Research International*.
- Fridovich, I. (1999).** Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893(1), 13-18.
- Fronk, P., Hartmann, H., Bauer, M., Solem, E., Jaenicke, E., Tenzer, S., e Decker, H. (2015).** Polyphenoloxidase from Riesling and Dornfelder wine grapes (*Vitis vinifera*) is a tyrosinase. *Food chemistry*, 183, 49-57.
- Galletti, J., Tobaldini-Valerio, F. K., Silva, S., Kioshima, É. S., Trierveiler-Pereira, L., Bruschi, M., e Estivalet Svidzinski, T. I. (2017).** Antibiofilm activity of propolis extract on *Fusarium* species from onychomycosis. *Future microbiology*, 12(14), 1311-1321.

- Galvagno, M. A., Forchiassin, F. E., Esposito, E., e Azevedo, J. L. (2010).** Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., e Fernández-Gutiérrez, A. (2010).** Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12), 8813-8826.
- Gekker, G., Hu, S., Spivak, M., Lokensgard, J. R., e Peterson, P. K. (2005).** Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of ethnopharmacology*, 102(2), 158-163.
- Genovese, M. I., Santos, R. J., Hassimotto, N. M. A., e Lajolo, F. M. (2003).** Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39(3), 67-69.
- Ghannoum, M. A., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M. A., Rinaldi, M. G., Lee-Yang, W., e Warnock, D. W. (2004).** Intra-and interlaboratory study of a method for testing the antifungal susceptibilities of dermatophytes. *Journal of clinical microbiology*, 42(7), 2977-2979.
- Ghannoum, M. A., Wraith, L. A., Cai, B., Nyirady, J., e Isham, N. (2008).** Susceptibility of dermatophyte isolates obtained from a large worldwide terbinafine tinea capitis clinical trial. *British Journal of Dermatology*, 159(3), 711-713.
- Gilbert, D. L. (2000).** Fifty years of radical ideas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 1-14.
- Goldstein, A. O., Smith, K. M., Ives, T. J., e Goldstein, B. (2000).** Mycotic infections. Effective management of conditions involving the skin, hair, and nails. *Geriatrics (Basel, Switzerland)*, 55 (5), 40-2.
- Goodman e Gilman. (1996).** *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9 edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana editores.
- Graybill, J. R. (1992).** Future directions of antifungal chemotherapy. *Clinical infectious diseases*, 14(Supplement_1), S170-S181.
- Gregoris, E., Fabris, S., Bertelle, M., Grassato, L., e Stevanato, R. (2011).** Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. *International journal of pharmaceutics*, 405(1-2), 97-101.
- Grunberger, D., Banerjee, R., Eisinger, K., Oltz, E. M., Efros, L., Caldwell, M., e Nakanishi, K. (1988).** Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*, 44(3), 230-232.
- Guarro, J. (2013).** Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases*, 32(12), 1491-1500.
- Gupta, A. K., Cooper, E. A., Ryder, J. E., Nicol, K. A., Chow, M., e Chaudhry, M. M. (2004).** Optimal management of fungal infections of the skin, hair, and nails. *American journal of clinical dermatology*, 5(4), 225-237.

- Gupta**, M., Tiwari, S., e Vyas, S. P. (2013). Influence of various lipid core on characteristics of SLNs designed for topical delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis. *Pharmaceutical development and technology*, 18(3), 550-559.
- Guzman**, J. D. (2014). Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. *Molecules*, 19(12), 19292-19349.
- Hagiwara**, D., Watanabe, A., Kamei, K., e Goldman, G. H. (2016). Epidemiological and genomic landscape of azole resistance mechanisms in *Aspergillus* fungi. *Frontiers in microbiology*, 7, 1382.
- Hall**, M., Monka, C., Krupp, P., e O'sullivan, D. (1997). Safety of oral terbinafine: results of a postmarketing surveillance study in 25 884 patients. *Archives of dermatology*, 133(10), 1213-1219.
- Halliwell** B. e Gutteridge J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186:1-85.
- Halliwell**, B., e Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Hart**, R., Bell-Syer, S.E. e Crawford, F. (1999). Systematic review of topical treatments for fungal infections of the skin and nails of the feet. *BMJ*, 319 : 79 – 82 .
- Hedayati**, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P., e Denning, D. W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153(6), 1677-1692.
- Hirschmann**, J.V. (2009). Fungal, bacterial, and viral infections of the skin. *ACP Medicine*. 1-15
- Ho**, C. T., Osawa, T., Huang, M. T., e Rosen, R. T. (Eds.). (1994). *Food phytochemicals for cancer prevention II: Teas, spices, and herbs*. American Chemical Society.
- Hoog**, G.S., Guarro, J., Figueras M.J., Gene J. (2016) *Atlas of clinical Fungi*, 3 edição. Holanda: CBS Utrecht.
- Huang**, D., Ou, B., e Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Huang**, M. T., Ferraro, T., e Ho, C. T. (1994). Cancer chemoprevention by phytochemicals in fruits and vegetables: an overview. In *ACS symposium series*.
- Huang**, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., e Hu, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632.
- Ingram**, L. e Butike, T.M. (1984). Effects of alcohols on Micro-organisms. *Advanced in Microb*, 25. 254-300.
- IPMA**, 2019. Disponível em <http://www.ipma.pt/pt/>, Acesso em Janeiro 2019.
- Isla**, M. I., Paredes-Guzman, J. F., Nieva-Moreno, M. I., Koo, H., e Park, Y. K. (2005). Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(4), 1166-1172.

- Jain, S., Khare, P., Gulbake, A., Bansal, D., e Jain, S. K. (2010).** Design and development of solid lipid nanoparticles for topical delivery of an anti-fungal agent. *Drug delivery*, 17(6), 443-451.
- Jautová, J., Zelenková, H., Drotarová, K., Nejdková, A., Grünwaldová, B., e Hladiková, M. (2018).** Lip creams with propolis special extract GH 2002 0.5% versus aciclovir 5.0% for herpes labialis (vesicular stage). *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 1-9.
- Jenning, V., Gysler, A., Schäfer-Korting, M., e Gohla, S. H. (2000).** Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 49(3), 211-218.
- Jessup, C. J., Warner, J., Isham, N., Hasan, I., e Ghannoum, M. A. (2000).** Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*, 38(1), 341-344.
- John, D., Irodi, A., e Michael, J. S. (2016).** Concurrent infections of conidiobolus coronatus with disseminated tuberculosis presenting as bilateral orbital cellulitis. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(4), ND01.
- Jurczuk, M. 1., Brzóska, M. M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Gałazyn-Sidorczuk, M., e Kulikowska-Karpińska, E. (2004).** Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food and chemical toxicology*, 42(3), 429-438.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Mourtzinou, I. e Karathanos, V. T. (2009).** Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116: 452-461
- Kane, J. U. L. I. U. S., e Smitka, C. A. T. H. E. R. I. N. E. (1978).** Early detection and identification of *Trichophyton verrucosum*. *Journal of clinical microbiology*, 8(6), 740-747.
- Kasote, D., Suleman, T., Chen, W., Sandasi, M., Viljoen, A., e van Vuuren, S. (2014).** Chemical profiling and chemometric analysis of South African propolis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 55, 156-163.
- Katalinic, V., Radić, S., Ropac, D., Mulić, R., e Katalinić, A. (2004).** Antioxidative activity of propolis from Dalmatia (Croatia). *Acta medica Croatica: casopis Hrvatske akademije medicinskih znanosti*, 58(5), 373-376.
- Kaur, I.P., Kakkar, S. (2010).** Tropical delivery of antifungal agents. *Expert Opin Drug Deliv*, 7, 1303 – 1327.
- Kaushik, N., Pujalte, G.G. e Reese, S.T. (2015).** Superficial Fungal Infections. Primary care. 42 (4): 501–

- Khaled, J. M., Golah, H. A., Khalel, A. S., Alharbi, N. S., e Mothana, R. A. (2015).** Dermatophyte and non dermatophyte fungi in Riyadh City, Saudi Arabia. *Saudi journal of biological sciences*, 22(5), 604-609.
- Khosravi, A. R., Shokri, H., e Sohrabi, N. (2014).** Potential effects of Trachyspermum copticum essential oil and propolis alcoholic extract on Mep3 gene expression of Microsporum canis isolates. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 24(3), e101-e107.
- Khurshid, Z., Naseem, M., Zafar, M. S., Najeeb, S., e Zohaib, S. (2017).** Propolis: a natural biomaterial for dental and oral healthcare. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*, 11(4), 265.
- Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, Li Q, Shoemaker BA, Thiessen PA, Yu B, Zaslavsky L, Zhang J, Bolton EE. PubChem (2019) update: improved access to chemical data. Nucleic Acids Res. 2019 Jan 8; 47(D1):D1102-1109. doi:10.1093/nar/gky1033. [PubMed PMID: 30371825]**
- Kim, D., e Lockey, R. (2010).** Dermatology for the allergist. *World Allergy Organization Journal*, 3(6), 202.
- Kim, K. T., Yeo, E. J., Han, Y. S., Nah, S. Y., e Paik, H. D. (2005).** Antimicrobial, anti-inflammatory, and anti-oxidative effects of water-and ethanol-extracted Brazilian propolis. *Food Science and Biotechnology*, 14(4), 474-478.
- Kimura, L. H., e Pearsall, N. N. (1980).** Relationship between germination of Candida albicans and increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 28(2), 464-468.
- Klich, M. A. (2002).** Identification of common Aspergillus species. *Centraalbureau voor schimmelcultures*.
- Kollef, M. H., Sherman, G., Ward, S., e Fraser, V. J. (1999).** Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest*, 115(2), 462-474.
- Koo, H., Gomes, B. P. F. A., Rosalen, P. L., Ambrosano, G. M. B., Park, Y. K., e Cury, J. A. (2000).** In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. *Archives of oral biology*, 45(2), 141-148.
- Koolman, J., Röhm, K. H., Wirth, J., e Robertson, M. (2005).** *Color atlas of biochemistry* (Vol. 2). Stuttgart: Thieme.
- Korhammer, S., Reniero, F., e Mattivi, F. (1995).** An oligostilbene from Vitis roots. *Phytochemistry*, 38(6), 1501-1504.
- Korolkovas A. (2011).** *Dicionário Terapêutico Guanabara*. 17 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Korting, H. C., Kiencke, P., Nelles, S., e Rychlik, R. (2007).** Comparable efficacy and safety of various topical formulations of terbinafine in tinea pedis irrespective of the treatment regimen. *American journal of clinical dermatology*, 8(6), 357-364.

- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., e Popov, S. (1999).** Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of ethnopharmacology*, 64(3), 235-240.
- Kulkarni, V.S. (2009).** *Handbook of Non-invasive Drug delivery Systems*. 1 edição. USA:Elsevier Inc.
- Kulkarni, V.S. (2010).** *A new platform for topical drug delivery*. 1 edição. Inglaterra: British Library Cataloguing in Publication Data
- Kumar, L., Verma, S., Bhardwaj, A., Vaidya, S., e Vaidya, B. (2014).** Eradication of superficial fungal infections by conventional and novel approaches: a comprehensive review. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 42(1), 32-46.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., e Nakayama, T. (2004).** Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food chemistry*, 84(3), 329-339.
- Kumazawa, S., Murase, M., Momose, N., e Fukumoto, S. (2014).** Analysis of antioxidant prenylflavonoids in different parts of *Macaranga tanarius*, the plant origin of Okinawan propolis. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7(1), 16-20.
- Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M., e Świerczek-Zięba, G. (2014).** Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*, 19(1), 78-101.
- Kuvandik, G., Çetin, M., Genctoy, G., Horoz, M., Duru, M., Akcali, C., e Kaya, H. (2007).** The prevalence, epidemiology and risk factors for onychomycosis in hemodialysis patients. *BMC infectious diseases*, 7(1), 102.
- Kylli, P. (2010).** Berry phenolics: isolation, analysis, identification, and antioxidant properties.
- Kyriakidis, N., Waight, E. S., Day, J. B., e Mantle, P. G. (1981).** Novel metabolites from *Penicillium crustosum*, including penitrem E, a tremorgenic mycotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(1), 61-62.
- Lacaz, C. D. S., Porto, E., Heins-Vaccari, E., e Melo, N. T. D. (1998).** Guia de identificação fungos, actinomicetos, algas de interesse médico. In *fungos Guia de identificação, actinomicetos, algas de interesse médico*.
- Latgé, J. P. (1999).** *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 12(2), 310-350.
- Li, F., Awale, S., Zhang, H., Tezuka, Y., Esumi, H., e Kadota, S. (2009).** Chemical constituents of propolis from Myanmar and their preferential cytotoxicity against a human pancreatic cancer cell line. *Journal of Natural Products*, 72(7), 1283-1287.
- Li, L., Redding, S., e Dongari-Bagtzoglou, A. (2007).** *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. *Journal of dental research*, 86(3), 204-215.

- Loebler**, M., Sánchez, C., Santos, M., Vasilenko, P., Duarte, P. e Gonçalves, A.M.C. (2018). Aplicação de extratos de própolis para conservação pós-colheita de morangos. *Iniave*. Disponível em http://www.iniav.pt/fotos/editor2/aplicacao_de_extratos_de_propolis.pdf.
- Silva**, M., Silva Costa, R., dos Santos Santana, A., e Bello Koblitz, M. G. (2010). Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3).
- Lotfy**, M. (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev*, 7(1), 22-31.
- Lu**, L. C., Chen, Y. W., e Chou, C. C. (2003). Antibacterial and DPPH free radical-scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11(4), 277-282.
- Luangsa-ard**, J., Houbraeken, J., van Doorn, T., Hong, S. B., Borman, A. M., Hywel-Jones, N. L., e Samson, R. A. (2011). *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS microbiology letters*, 321(2), 141-149.
- Mabry**, T.J. et. al. The systematic identification of flavonoids. Springer: Berlin, 1970. p.51-2. (1970)
- Machado**, T. F., Borges, M. D. F., e Bruno, L. M. (2011). Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos. *Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, CE*.
- Manach**, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., e Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- Mannani**, R., Zia, M., Mahmoudi, M., e Manshaei, M. (2012). In vitro antifungal activity of Iranian propolis against *Microsporum canis*, *M. gypseum* and *M. nanum*. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 2(2), 119-123.
- Manzocco**, L., Anese, M., e Nicoli, M. C. (1998). Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *LWT-Food Science and Technology*, 31(7-8), 694-698.
- Marcucci**, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(2), 83-99.
- Mason**, T. L. (1987). Inactivation of red beet β -glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry*, 26(8), 2197-2202.
- Mateos**, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Rios, J. J., León-Camacho, M., Alcudia, F., e Cert, A. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2185-2192.
- Mates**, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1-3), 83-104.

- Matsuno, T.,** Matsumoto, Y., Saito, M., e Morikawa, J. (1997). Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 52(9-10), 702-704.
- Mazzarello, V.,** Donadu, M. G., Ferrari, M., Piga, G., Usai, D., Zanetti, S., e Sotgiu, M. A. (2018). Treatment of acne with a combination of propolis, tea tree oil, and Aloe vera compared to erythromycin cream: two double-blind investigations. *Clinical pharmacology: advances and applications*, 10, 175.
- McDonnell, G.,** e Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical microbiology reviews*, 12(1), 147-179.
- Medana, C.,** Carbone, F., Aigotti, R., Appendino, G., e Baiocchi, C. (2008). Selective analysis of phenolic compounds in propolis by HPLC-MS/MS. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 19(1), 32-39.
- Mehrotra, S.,** Kakkar, P., e Viswanathan, P. N. (1991). Mitochondrial damage by active oxygen species in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 10(5), 277-285.
- Michniak-Kohn, B.,** e Leonardi, G. R. (2017). An overview about oxidation in clinical practice of skin aging. *Anais brasileiros de dermatologia*, 92(3), 367-374.
- Miguel, M. G.,** Nunes, S., Dandlen, S. A., Cavaco, A. M., e Antunes, M. D. (2010). Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3418-3423.
- Mihai, C. M.,** Mărghitaș, L. A., Dezmirean, D. S., e Bărnăuțiu, L. (2011). Correlation between polyphenolic profile and antioxidant activity of propolis from Transylvania. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), 100-103.
- Mirzoeva, O. K.,** Grishanin, R. N., e Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological research*, 152(3), 239-246.
- Mitra, K.,** e Uddin, N. (2014). Total phenolics, flavonoids, proanthocyanidins, ascorbic acid contents and in-vitro antioxidant activities of newly developed isolated soya protein. *Discourse Journal of Agriculture and Food Sciences*, 2(5), 160-168.
- Mittler, R.** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Molnár, S.,** Mikuska, K., Patonay, K., Sisa, K., Daood, H. G., Némedi, E., e Kiss, A. (2017). Comparative studies on polyphenolic profile and antimicrobial activity of propolis samples selected from distinctive geographical areas of Hungary. *Food Science and Technology International*, 23(4), 349-357.

- Molyneux**, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2), 211-219.
- Moreira**, L., Dias, L. G., Pereira, J. A., e Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical toxicology*, 46(11), 3482-3485.
- Mothana**, R. A., Khaled, J. M., Noman, O. M., Kumar, A., Alajmi, M. F., Al-Rehaily, A. J., e Kurkcuoglu, M. (2018). Phytochemical analysis and evaluation of the cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from three *Plectranthus* species grown in Saudi Arabia. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 237.
- Murphy**, M. M., Barraji, L. M., Herman, D., Bi, X., Cheatham, R., e Randolph, R. K. (2012). Phytonutrient intake by adults in the United States in relation to fruit and vegetable consumption. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112(2), 222-229.
- Nakamura**, S., Yamada, T., Umemoto, N., Nakamura, T., Wakatabi, K., Iida, E., e Demitsu, T. (2015). Cheek and periorbital peculiar discoid lupus erythematosus: rare clinical presentation mimicking tinea faciei, cutaneous granulomatous disease or blepharitis. *Case reports in dermatology*, 7(1), 56-60.
- Nawar**, W.W. (1984) *Lipids*. FENNEMA, O.R. Food Chemistry. 2.ed. New York : Marcel Dekker, 1985.139-244.
- Nna**, V. U., Bakar, A. B. A., Lazin, M. R. M. L. M., e Mohamed, M. (2018). Antioxidant, anti-inflammatory and synergistic anti-hyperglycemic effects of Malaysian propolis and metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food and chemical toxicology*, 120, 305-320.
- Norris**, H. A., Elewski, B. E., e Ghannoum, M. A. (1999). Optimal growth conditions for the determination of the antifungal susceptibility of three species of dermatophytes with the use of a microdilution method. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 40(6), S9-S13.
- Nunes**, L. C. C., Galindo, A. B., Deus, A. D. S. O. D., Rufino, D. A., Randau, K. P., Xavier, H. S., e Rolim Neto, P. J. (2009). Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(2B), 524-529.
- O'Donnell**, K., Ward, T. J., Robert, V. A., Crous, P. W., Geiser, D. M., e Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43(5), 583-595.
- Oliveira**, A. C. P., Shinobu, C. S., Longhini, R., Franco, S. L. e Svidzinski, T. I. E. (2006). Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 101: 493-497.

- Oliveira, A. V., Ferreira, A. L., Nunes, S., Dandlen, S. A., Miguel, M. D. G., e Faleiro, M. L. (2017).** Antibacterial activity of propolis extracts from the south of Portugal. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 30(1).
- ONG-World Cancer Research Fund. (2018).** Disponível em <https://www.wcrf.org/>
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., e Gan, S. H. (2017).** Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Paula, V. B. (2012).** *Caraterização química e biológica do própolis da "serra de Bornes" por TLC* (Doctoral dissertation, Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária).
- Pereira, A., Seixas, F. R. M. S., e de Aquino Neto, F. R. (2002).** Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim. Nova*, 25(2), 321-326.
- Pereira, H. (2013).** Genotoxic, phytotoxic and protective effects of Portuguese própolis. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Bio-empresendorismo em Plantas Aromáticas e Medicinais. Departamento de Biologia. Universidade do Minho.
- Pfaller, M. A., Messer, S. A., Boyken, L., Tendolkar, S., Hollis, R. J., e Diekema, D. J. (2004).** Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. *Journal of clinical microbiology*, 42(7), 3142-3146.
- Piccinelli, A. L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R. P., e Rastrelli, L. (2013).** Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(21), 5080-5088.
- Pietta, P. G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
- Pires, C. A. A., Cruz, N. F. S. D., Lobato, A. M., Sousa, P. O. D., Carneiro, F. R. O., e Mendes, A. M. D. (2014).** Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. *Anais brasileiros de dermatologia*, 89(2), 259-264.
- Popova, M., Giannopoulou, E., Skalicka-Woźniak, K., Graikou, K., Widelski, J., Bankova, V., e Chinou, I. (2017).** Characterization and biological evaluation of propolis from Poland. *Molecules*, 22(7), 1159.
- DGS – Programa de Prevenção e controlo de Infecções e resistência aos antimicrobianos (2017).** Disponível em: https://www.sns.gov.pt/wp-content/uploads/2017/12/DGS_PCIRA_V8.pdf. Acesso em: Dezembro 2018.

- Prohic, A., Jovovic Sadikovic, T., Krupalija-Fazlic, M., e Kuskunovic-Vlahovljak, S. (2016).** Malassezia species in healthy skin and in dermatological conditions. *International journal of dermatology*, 55(5), 494-504.
- Quiroga, E. N., Sampietro, D. A., Soberón, J. R., Sgariglia, M. A., e Vattuone, M. A. (2006).** Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *Journal of applied Microbiology*, 101(1), 103-110.
- Rahman, M. M., Richardson, A., e Sofian-Azirun, M. (2010).** Antibacterial activity of propolis and honey against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *African Journal of Microbiology Research*, 4(18), 1872-1878.
- Ramanauskiene, K., Inkeniene, A. M., Savickas, A. R. Ū. N. A. S., Masteikova, R., e Brusokas, V. A. L. D. E. M. A. R. A. S. (2009).** Analysis of the antimicrobial activity of propolis and lysozyme in semisolid emulsion systems. *Acta Pol Pharm*, 66(6), 681-688.
- Reyes-Chilpa, R., Quiroz-Vázquez, R. I., Jiménez-Estrada, M., Navarro-Oca a, A., e Cassani-Hernández, J. (1997).** Antifungal activity of selected plant secondary metabolites against Coriolus versicolor. *Journal of Tropical Forest Products*, 3, 110-113.
- Rezaei-Matehkolaei, A., Makimura, K., de Hoog, G. S., Shidfar, M. R., Satoh, K., Najafzadeh, M. J., e Mirhendi, H. (2012).** Multilocus differentiation of the related dermatophytes Microsporum canis, Microsporum ferrugineum and Microsporum audouinii. *Journal of medical microbiology*, 61(1), 57-63.
- Riley, M. B., Williamson, M. R., e Maloy, O. (2002).** Plant disease diagnosis. *The plant health instructor*.
- Ristivojević, P., Trifković, J., Andrić, F., e Milojković-Opsenica, D. (2015).** Poplar-type Propolis: Chemical Composition, Botanical Origin and Biological Activity. *Natural product communications*, 10(11), 1869-1876.
- Roberts, B. J., e Friedlander, S. F. (2005).** Tinea capitis: a treatment update. *Pediatric annals*, 34(3), 191-200.
- Roussos, P. A., Denaxa, N., e Damvakaris, T. (2009).** Strawberry fruit quality attributes after application of plant growth stimulating compounds. *Scientia Horticulturae*, 119(2), 138-146.
- Rufatto, L. C., Luchtenberg, P., Garcia, C., Thomassigny, C., Bouttier, S., Henriques, J. A. P. e Moura, S. (2018).** Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. *Microbiological Research*, 214, 74-82.
- Samaranayake, Y. H., e Samaranayake, L. P. (2001).** Experimental oral candidiasis in animal models. *Clinical microbiology reviews*, 14(2), 398-429.

- Santos, C. R., Arcenio, F., Carvalho, E. S., Lúcio, E. M. R. A., Araújo, G. L., Teixeira, L. A. e Rocha, L.** (2003). Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13, 71-74.
- Santos, D. A., e Hamdan, J. S.** (2005). Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. *Journal of Clinical microbiology*, 43(4), 1917-1920.
- Santos, H. F. D., Campos, J. F., Santos, C. M. D., Balestieri, J. B. P., Silva, D. B., Carollo, C. A. e dos Santos, E. L.** (2017). Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. *International journal of molecular sciences*, 18(5), 953.
- Santos, S. C., Guiné, R. P., e Barros, A.** (2014). Effect of drying temperatures on the phenolic composition and antioxidant activity of pears of Rocha variety (*Pyrus communis* L.). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 8(2), 105-112.
- Scalbert, A., e Williamson, G.** (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Scazzocchio, F., D'auria, F. D., Alessandrini, D., e Pantanella, F.** (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological research*, 161(4), 327-333.
- Schmidt, E. M., Stock, D., Chada, F. J. G., Finger, D., Christine Helena Frankland Sawaya, A., Eberlin, M. N., e Torres, Y. R.** (2014). A comparison between characterization and biological properties of Brazilian fresh and aged propolis. *BioMed research international*, 2014.
- Seddiki, S. M. L., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Badsai-Amir, S., Taleb, M., e Kunkel, D.** (2013). Assessment of the types of catheter infectivity caused by *Candida* species and their biofilm formation. First study in an intensive care unit in Algeria. *International journal of general medicine*, 6, 1.
- Sforcin, J. M.** (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of ethnopharmacology*, 113(1), 1-14.
- Shahidi, F., Janitha, P. K., e Wanasundara, P. D.** (1992). Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science e nutrition*, 32(1), 67-103.
- Shalaby, M. F. M., El-din, A. N., e El-Hamd, M. A.** (2016). Isolation, identification, and in vitro antifungal susceptibility testing of dermatophytes from clinical samples at Sohag University Hospital in Egypt. *Electronic physician*, 8(6), 2557.
- Shan, X., Aw, T. Y., e Jones, D. P.** (1990). Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacology e therapeutics*, 47(1), 61-71.

- Shatalebi**, M. A., Safaeian, L., Baradaran, A., e Alamdarian, M. (2016). Preparation and evaluation of a hair wax containing propolis and Eruca sativa seed oil for hair growth. *Advanced biomedical research*, 5.
- Sheng**, J., Zhou, J., Wang, L., Xu, J., e Hu, Q. (2007). Antioxidant activity of ethanol and petroleum ether extracts from Brazilian propolis. *European Food Research and Technology*, 225(2), 249.
- Shi**, H., Yang, H., Zhang, X., e Yu, L. (2012). Identification and quantification of phytochemical composition and anti-inflammatory and radical scavenging properties of methanolic extracts of Chinese propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(50), 12403-12410.
- Silva**, F. R. G., Matias, T. M. S., Souza, L. I. O., Matos-Rocha, T. J., Fonseca, S. A., Mousinho, K. C., e Santos, A. F. (2018). Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities of the red propolis Alagoas. *Brazilian Journal of Biology*, (AHEAD).
- Silva**, J. C., Rodrigues, S., Feás, X., e Estevinho, L. M. (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1790-1795.
- Silva-Carvalho**, R., Baltazar, F., e Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015
- Silva-Carvalho**, R., Miranda-Gonçalves, V., Ferreira, A. M., Cardoso, S. M., Sobral, A. J., Almeida-Aguiar, C., e Baltazar, F. (2014). Antitumoural and antiangiogenic activity of Portuguese propolis in in vitro and in vivo models. *Journal of Functional Foods*, 11, 160-171.
- Silvester**, A. J., Aseer, K. R., e Yun, J. W. (2018). Dietary polyphenols and their roles in fat browning. *The Journal of nutritional biochemistry*.
- Simão**, A. G. (2011). Infecções por Tinea capitis em meios desfavorecidos da periferia de Lisboa-Estudo em crianças do Bairro de Santa Filomena, Concelho da Amadora (Doctoral dissertation, IHMT).
- Singleton**, V. L., Orthofer, R., e Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
- Siqueira**, A. B. S., Gomes, B. S., Cambuim, I., Maia, R., Abreu, S., Souza-Motta, C. M. e Porto, A. L. F. (2009). Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. *Letters in applied microbiology*, 48(1), 90-96.
- Smith**, M. A., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Raina, A. K., e Perry, G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1502(1), 139-144.

- Soares, M. M. S. R., e Cury, A. E. (2001). In vitro activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with tinea pedis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(2), 130-134.
- Sohn, A. H., Garrett, D. O., Sinkowitz-Cochran, R. L., Grohskopf, L. A., Levine, G. L., Stover, B. H., e Jarvis, W. R. (2001). Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: results from the first national point-prevalence survey. *The Journal of pediatrics*, 139(6), 821-827.
- Sroka, Z., e Cisowski, W. (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 41(6), 753-758.
- Stary, A., e Sarnow, E. (1998). Fluconazole in the treatment of tinea corporis and tinea cruris. *Dermatology*, 196(2), 237-241.
- Summerbell, R. C., Gueidan, C., Schroers, H. J., De Hoog, G. S., Starink, M., Rosete, Y. A., e Scott, J. A. (2011). Acremonium phylogenetic overview and revision of Gliomastix, Sarcocladium, and Trichothecium. *Studies in mycology*, 68, 139-162.
- Svejgaard, E. (1997). Recalcitrant dermatophyte infection. *DermatolTher.* 3 ,75
- Szepietowski, J. C., e Salomon, J. (2007). Do fungi play a role in psoriatic nails?. *Mycoses*, 50(6), 437-442.
- Szweda, P., Gucwa, K., Kurzyk, E., Romanowska, E., Dzierżanowska-Fangrat, K., Jurek, A. Z. e Milewski, S. (2015). Essential oils, silver nanoparticles and propolis as alternative agents against fluconazole resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* clinical isolates. *Indian journal of microbiology*, 55(2), 175-183.
- Talaro, K. P., e Chess, B. (2018). *Foundations in microbiology*. McGraw-Hill.
- Tegos G, Stermitz FR, Lomovskaya O, Lewis K (2002) Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3133–3141
- Tiveron, A. P., Rosalen, P. L., Franchin, M., Lacerda, R. C. C., Bueno-Silva, B., Benso, B., e de Alencar, S. M. (2016). Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of South Brazilian organic propolis. *PLoS One*, 11(11), e0165588.
- Tjørve, K. M., e Tjørve, E. (2017). The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLoS one*, 12(6), e0178691.
- Torres-González, A., López-Rivera, P., Duarte-Lisci, G., López-Ramírez, Á., Correa-Benítez, A., e Rivero-Cruz, J. F. (2016). Analysis of volatile components from *Melipona beecheii* geopropolis from Southeast Mexico by headspace solid-phase microextraction. *Natural product research*, 30(2), 237-240.

- Tosi, E. A., Re, E., Ortega, M. E., e Cazzoli, A. F. (2007). Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food chemistry*, 104(3), 1025-1029.
- Trusheva, B., Popova, M., Naydenski, H., Tsvetkova, I., Rodriguez, J. G., e Bankova, V. (2004). New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapia*, 75(7-8), 683-689.
- Uzel, A., Önçağ, Ö., Çoğulu, D., e Gençay, Ö. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological research*, 160(2), 189-195.
- Valença, I., Morais-Santos, F., Miranda-Gonçalves, V., Ferreira, A. M., Almeida-Aguiar, C., e Baltazar, F. (2013). Portuguese propolis disturbs glycolytic metabolism of human colorectal cancer in vitro. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 184.
- Van Breusegem, F., Vranová, E., Dat, J. F., e Inzé, D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, 161(3), 405-414.
- Van Uden, N. (1985). Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. In Annual reports on fermentation processes (Vol. 8, pp. 11-58). *Elsevier*.
- Velasquez, B. D., e Gómez, S. P. M. (2017). Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos obtenidos de abejas *Apis mellifera*. *R/AA*, 8(1), 185-193.
- Velegraki, A., Cafarchia, C., Gaitanis, G., Iatta, R., e Boekhout, T. (2015). Malassezia infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. *PLoS pathogens*, 11(1), e1004523.
- Veraldi, S., Grancini, A., Venegoni, L., Merlo, V., Guanziroli, E., Menicanti, C. e Tortorano, A. (2016). Mycetoma caused by *Aspergillus nidulans*. *Acta dermato-venereologica*, 96(1), 118-119.
- Wayne, P. A. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard. *CLSI document M27-A2*.
- Weitzman, I., Gordon, M. A., Henderson, R. W., e Lapa, E. W. (1984). *Phialophora parasitica*, an emerging pathogen. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 22(4), 331-339.
- Whitcher, J. P., Srinivasan, M., e Upadhyay, M. P. (2001). Corneal blindness: a global perspective. *Bulletin of the world health organization*, 79, 214-221.
- WHO (2019) The FAO Nutrition/WHO Chronic food consumption database. Disponível a partir de: <https://www.who.int/foodsafety/databases/en/>. Acedido em Janeiro, 2018
- Williams DA e Lemke TL. (2007). Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 11 edição. Philadelphia : Williams e Wilkins
- Williamson, G., Faulkner, K., e Plumb, G. W. (1998). Glucosinolates and phenolics as antioxidants from plant foods. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 7(1), 17-21.

- Wissing**, S. A., e Müller, R. H. (2001). A novel sunscreen system based on tocopherol acetate incorporated into solid lipid nanoparticles. *International journal of cosmetic science*, 23(4), 233-243.
- Wissing**, S. A., e Müller, R. H. (2003b). The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity–in vivo study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56(1), 67-72.
- Woisky**, R. G., e Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of apicultural research*, 37(2), 99-105.
- Wong**, M. K., DIMICK, P. S., e HAMMERSTEDT, R. H. (1990). Extraction and high performance liquid chromatographic enrichment of polyphenol oxidase from Theobroma cacao seeds. *Journal of food Science*, 55(4), 1108-1111.
- Xing**, Y., e White, P. J. (1996). Antioxidants from cereals and legumes in natural antioxidants chemistry, health effects and applications.
- Xuan**, H., Yuan, W., Chang, H., Liu, M., e Hu, F. (2018). Anti-inflammatory effects of Chinese propolis in lipopolysaccharide-stimulated human umbilical vein endothelial cells by suppressing autophagy and MAPK/NF- κ B signaling pathway. *Inflammopharmacology*, 1-11.
- Yangi**, B., Cengiz Ustuner, M., Dincer, M., Ozbayer, C., Tekin, N., Ustuner, D. e Entok, E. (2018). Propolis Protects Endotoxin Induced Acute Lung and Liver Inflammation Through Attenuating Inflammatory Responses and Oxidative Stress. *Journal of medicinal food*. 21(11):1096-1105
- Yue**, X., Li, Q., Wang, H., Sun, Y., Wang, A., Zhang, Q., e Zhang, C. (2015). An ultrastructural study of *Trichophyton rubrum* induced onychomycosis. *BMC infectious diseases*, 15(1), 532.
- Zabaiou**, N., Fouache, A., Trousson, A., Baron, S., Zellagui, A., Lahouel, M., e Lobaccaro, J. M. A. (2017). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and physics of lipids*, 207, 214-222.
- Žižić**, J. B., Vuković, N. L., Jadrantin, M. B., Anđelković, B. D., Tešević, V. V., Kacaniova, M. M., e Marković, S. D. (2013). Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 3001-3009.
- Zuber**, T. J., e Baddam, K. (2001). Superficial fungal infection of the skin: where and how it appears help determine therapy. *Postgraduate medicine*, 109 (1), 117-132.

Anexo I

Compilação de informação relativa à caracterização biológica dos extratos etanólicos de própolis do Pereiro e do Gerês preparados a partir de amostras recolhidas no período compreendido entre os anos de 2011 e 2016

Tabela I.1. Atividade antibacteriana dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês (G.EEs) e do Pereiro (P.EEs) recolhidas entre os anos de 2011 e 2016. A atividade antibacteriana foi expressa em valores de MIC ($\mu\text{g/ml}$).

Extratos de Própolis	MIC ($\mu\text{g/ml}$)							Autores		
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>			
P. EEs	P11.EE	500	-	-	-	>750	-	-	Marques (2015); Oliveira (2015)	
	P12.EE	500	-	-	-	500	-	-		
	P13.EE	200	-	-	-	750	-	-		
	P14.EE	100	-	-	-	500	-	-		
	P15.EE	500	-	-	200	750	>1250	>1205		Moreira (2017)
	P16.EE	200	200	500	200	500	>1000	>1000		Alves (2017)
G. EEs	G11.EE	50	50	50	-	200	>2000	>2000	Freitas (2015)	
	G12.EE	50	50	50	-	200	>2000	>2000		
	G13.EE	50	50	50	-	200	>2000	>2000		
	G14.EE	50	50	50	-	200	>2000	>2000		
	G.15.EE	50	50	50	50	750	>1250	>1250	Gonçalves (2017)	
	G16.EE	50	50	50	100	750	>2000	>10000		

B. subtilis – Bacillus subtilis; *B. cereus* – Bacillus cereus; *B. megaterium* – Bacillus megaterium; *P. acnes* - Propionibacterium acnes; MRSA - Staphylococcus aureus resistente à metilina; *E. coli* - Escherichia coli. - não testado

Tabela I.2. Atividade anti-fúngica dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês (G.EEs) e do Pereiro (P.EEs) recolhidas entre os anos de 2011 e 2016. A atividade antibacteriana foi expressa em valores de MIC ($\mu\text{g/ml}$).

Extratos de Própolis	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		Autores	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
P. EEs	P11.EE	750	Marques (2015)	
	P12.EE	>1000		
	P13.EE	750	Oliveira (2015)	
	P14.EE	750	>750	
	P15.EE	500	500	Moreira (2017)
	P16.EE	750	500	Alves (2017)
G.EEs	G11.EE	>2000	Freitas (2015)	
	G12.EE	>2000		
	G13.EE	>2000		
	G14.EE	>2000		
	G15.EE	>1500	1000	Gonçalves (2017)
	G16.EE	>1000	>1000	

Apêndice I

Fungos filamentosos de Interesse Clínico

Tabela A.1. Fungos filamentosos com interesse clínico

Fungo	Doenças	Hospedeiro	Observações	Referências
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Aspergilose	Homem (imunocomprometidos e imunocompetentes) Animais	Elevada prevalência em isolados clínicos e resistência elevada a azóis. Causa 90% de aspergilose invasiva, e taxa de mortalidade 50-95%.	Lacaz, 1991
<i>Aspergillus flavus</i>	Produção de aflatoxinas que contaminam as culturas alimentares, como milho, amendoim e nozes. Aflatoxicose aguda ou crônica.	Homem Plantas	Juntamento com <i>A. fumigatus</i> é um dos principais causadores de Aspergilose	Hedayati et al. 2007 Hoog et al. 2015
<i>Aspergillus terreus</i>	Aspergilose bronco-pulmonar invasiva ou alérgica, cutânea, oftálmica. Onicomiose e micoses disseminadas. Infecções oportunistas.	Humanos	Resistência à anfotericina B. Infecções por <i>A. terreus</i> resultam numa taxa de mortalidade superior à de infecções por <i>Aspergillus spp.</i>	Hoog et al. (2016) Klich (2002)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Doença invasiva sistêmica em doentes com alterações imunológicas crônicas	Humanos Animais	Repostados como não suscetível a própolis.	Veraldi et al., 2016
<i>Acremonium falciforme</i>	Eumicetoma Onicomiose Peritonite. Endocardite. Pneumonia. Infecção subcutânea.	Humanos Animais	Infecções não muito comuns. Destaca-se entre os fungos emergente em doentes imunocomprometidos, os quais estão, geralmente associados a um pior prognóstico.	Summerbell et al. 2011
<i>Penicillium crustosum</i>	Produz uma neurotoxina que em geral causa tropeço em cavalos e gado.	Animais	Produz uma neurotoxina chamada penitrem A, esta inibe canais de potássio em músculos lisos. Os maxi-canais visados têm sua maior densidade nas células cerebelares de Purkinje	Kyriakidis et al., 1981
<i>Trichophyton rubrum</i>	Tinea cruris. Tinea pedis. Onicomiose e dermatofitose	Humanos	Aproximadamente 80-93% das infecções dermatófitas crônicas em muitas partes do mundo desenvolvido são causadas por <i>T. rubrum</i> .	Yue et al., 2015

<i>Phialophora parasitica</i>	Infeção sistêmica	Humanos	Fungo emergente entre populações de imunocomprometidos, os quais estão, geralmente associados a um pior prognóstico.	Weitzman et al., 1984
<i>Penicillium marneffeii</i> (<i>Talaromyces marneffeii</i>)	Peniciliose, com infecção dos pulmões (pneumonia)	Humanos	É a única espécie Dimorfa termicamente conhecida De <i>Penicillium</i> spp, pode por isso causar uma infecção sistêmica letal (peniciliose) com febre e anemia semelhante à criptococose disseminada.	Chan et al., 2016
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Infeções em pacientes imuno comprometidos, na sua maioria devido à introdução de corpos estranhos, ou implantes de lentes intra-oculares	Humanos	As pesquisas da última década sugerem que pode ser um patógeno emergente tanto em adultos imunocomprometidos como em adultos imunocompetentes.	Luangsa-ard et al., 2011
<i>Microsporum audouinii</i>	Dermatofitoses em crianças.	Humanos	Principal responsável das epidemias de tinea capitis no Europa e América do Norte, atualmente menos comum	Hoog et al. 2016 Rezaei-Matehkolaei et al., 2012
<i>Malassezia furfur</i>	Hipo pigmentação no tronco e em outras partes do corpo humano.	Humanos	Gênero de fungos relacionados, classificados como leveduras, encontrados de forma natural na superfície da pele de muitos animais, incluindo humanos.	Velegraki et al., 2015
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Alérgeno humano. As principais proteínas alergénicas são as proteases vacuolares e as serino-proteases alcalinas.	Humanos	Alérgeno humano. As principais proteínas alergénicas são as proteases vacuolares e as serino-proteases alcalinas.	Ehgartner et al., 2017

<i>Malassezia globosa</i>	Caspa. Dermatite seborreica e Pitiríase versicolor	Humanos	Géner de fungo geralmente classificado como uma levedura, vive em comensalidade no organismo humano encontrado essencialmente no couro cabeludo humano.	Arendrup et al. 2014
<i>Madurella grisea</i>	Eumicetoma	Humanos	É um dos agentes patogênicos mais comuns associados ao eumicetoma.	Belkum et al., 2013
<i>Fusarium solani</i>	Doença disseminada. Osteomielite. Infecções da pele.	Plantas Humanos	Metade das doença humanas que envolvem <i>Fusarium</i> sp. é causada pela estripe <i>F. solani</i> , esta está envolvido na maioria dos casos de fusariosis sistêmica e infecções da córnea.	Guarro, 2013 O'Donnell et al. 2015
<i>Conidiobolus coronatus</i>	Zigomicose rinofacial	Humanos Animais	Atraso no diagnóstico, e consequente maior extensão da lesão, tornam o tratamento mais difícil, em função de baixa resposta terapêutica.	John et al., 2016
<i>Cladophialophora carrionii</i>	Cromomicose	Humanos	Causa apenas um subconjunto menor de casos de cromoblastomicose, principalmente em locais mais secos, como Madagascar, Austrália e noroeste da Venezuela, que são abundantes com plantas habitadas pelo fungo	Deng et al., 2013
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Tinea pedis. Tinea cruris, Tinea corporis. Onicomicoses.	Humanos Animais	É o único patógeno das duas espécies do gênero <i>Epidermophyton</i> . Infecta geralmente as camadas queratinosas não-vivas da epiderme.	Khaled et al., 2015

<i>Exophiala dermatitidis</i>	Onicomicoses. Otite externa. Infecções oculares causadoras de queratite. Tende a estar associada à fibrose cística.	Humanos	Onicomicoses. Otite externa. Infecções oculares causadoras de queratite. Tende a estar associada à fibrose cística.	Khaled et al., 2015
<i>Malassezia pachydermatis</i>	Dermatite seborreica. Otite em animais.	Animais e Humanos	Intimamente relacionado com a espécie <i>Malassezia furfur</i> . É um fungo comensal, pode ser encontrado dentro da microflora de mamíferos saudáveis, como seres humanos, gatos e cães	Prohi et al., 2016
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Dermatofitoses especialmente Tinea capitis, Tinea corporis tinea favosa	Animais e Humanos em especial trabalhadores rurais	Principal causador de Tinea corporis, Tinea fáceis e Tinea unguium	Ates et al., 2008
<i>Trichophyton concentricum</i>	Tines imbricata	Humanos	Infecções entre os europeus são raras. A distribuição é restrita às ilhas do Pacífico da Oceania, Sudeste Asiático e América Central e do Sul.	Khaled et al., 2015
<i>Nannizzia gypsea</i>	Dermatofitoses	Animais Humanos, em especial crianças e trabalhadores rurais durante o tempo húmido e quente	Geralmente produz uma única lesão inflamatória na pele ou no couro cabeludo. Pêlos invadidos mostram uma infecção por ectotrix, mas não fluorescem sob a luz ultravioleta de Wood.	Demange et al., 1992

Trichophyton soudanense	Tinea capitis. Dermatofitoses.	Humanos	Causa de tinea capitis em África. Pêlos invadidos mostram uma infecção endotrix, mas não fluorescem sob a luz ultravioleta de Wood. A distribuição é principalmente na África, com casos importados agora reportados da Europa, Brasil, Austrália e EUA.	Hoog <i>et al.</i> 2016
Trichophyton tonsurans	Tinea capitis.	Humanos	É causa comum de tinea capitis em aborígenes australianos e afro-americanos. Pêlos invadidos mostram uma infecção endotrix e não fluorescem sob a luz ultravioleta de Wood.	Hoog et al., 2016
Trichophyton violaceum	Tinea capitis. Dermatofitoses.	Humanos	A distribuição é mundial, particularmente no Oriente Próximo, Europa Oriental, Rússia e Norte da África. Pêlos invadidos mostram uma infecção endotrix e não fluorescem sob a luz ultravioleta de Wood	Hoog et al. 2016
Microsporum canis	Tinea capitis em humanos. Dermatofitoses em animais de estimação	Humanos Animais	Distribuição mundial. Causa condições clínicas frequentemente caracterizadas por alopecia multifocal, escamação e lesões circulares em muitas espécies animais, incluindo humanos. eficácia de medicamentos e protocolos de tratamento é variável, com falha do tratamento em até 40% dos pacientes, possivelmente devido a fenômenos de resistência.	Rezaei-Matehkolaei et al., 2012
Trichophyton Verrucosum	Tineas em animais, principalmente gado. Em humanos causa comumente tinea no couro cabeludo, barba e zonas expostas.	Animais Humanos	Distribuição mundial. As infecções em humanos resultam do contato direto com o gado geralmente são altamente inflamatórias envolvendo o couro cabeludo, barba ou áreas expostas do corpo. Pêlos invadidos mostram uma infecção por ectotrix	Kane e Smitka, 1978