

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:
CIÊNCIAS MÉDICAS

Autor
Claiison Jodel dos Santos

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE PRÓPOLIS EM *FONSECAEA*
PEDROSOI UTILIZANDO FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS ASSOCIADAS
À ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

Orientador(a): Prof^a. Dr.^a Maria Lúcia Scroferneker

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS MÉDICAS

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE PRÓPOLIS EM *FONSECAEA*
PEDROSOI UTILIZANDO FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS ASSOCIADAS
À ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO**

Autor: Claiison Jodel dos Santos
Orientador(a): Prof^a. Dr.^a Maria Lúcia Scroferneker

Dissertação de Mestrado

2009

“Os sonhos não determinam o lugar onde vamos chegar, mas produzem a força necessária para nos tirar do lugar em que estamos. Sonhemos com as estrelas para que possamos pisar pelo menos na lua. Sonhemos com a lua para que possamos pisar pelo menos nos altos montes. Sonhemos com os altos montes para que possamos ter dignidade quando atravessarmos os vales das perdas e das frustrações. Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática só aprendemos a multiplicar quando aprendemos a dividir, só conseguimos ganhar quando aprendemos a perder, só conseguimos receber, quando aprendemos a se doar...”

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais João e Neli, por acreditarem em meus sonhos e ideais, pela minha vida, pelo exemplo de dedicação e perseverança, pela compreensão, carinho e amor.

Às minhas irmãs Schirle e Scheila, pela compreensão dos meus momentos de angústia e a minha ausência.

À minha namorada e amiga Danielle, pelo apoio, companheirismo e, sobretudo, pelo amor incondicional que me dá forças para superar obstáculos.

À minha orientadora Maria Lúcia Scroferneker, pelo aprendizado, orientação e oportunidade de execução deste trabalho.

Aos professores e amigos Valeriano Antonio Corbellini e Marco Flôres Ferrão, pelo apoio e paciência na transmissão de seus conhecimentos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por ter me proporcionado a realização deste sonho.

À Universidade de Santa Cruz do Sul, pela utilização dos laboratórios de ensino, fundamentais para a concretização deste trabalho.

Ao CNPq, pela ajuda financeira, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, aos professores e secretários, pela atenção e esclarecimentos prestados.

À professora Patrícia Valente, pela oportunidade e confiança no estágio docente.

A todos os colegas do departamento de química e biologia da UNISC, pelo convívio e amizade.

Às colegas do departamento de microbiologia da UFRGS, Tatiane, Daiane, Cheila e Júlia, pelas experiências compartilhadas, pela ajuda e amizade.

A todos que duvidaram de minha capacidade, pois certamente estes serviram de estímulo para a realização deste sonho.

Finalmente, agradeço a Deus por me reservar saúde e proteção, e por me cercar de tantas pessoas maravilhosas.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	04
LISTA DE ABREVIATURAS	05

RESUMO	07
1 INTRODUÇÃO	08
2 REVISÃO DE LITERATURA	09
2.1 Cromoblastomicose.....	10
2.2 Própolis.....	15
2.3 Testes de sensibilidade.....	19
2.4 Espectroscopia no infravermelho.....	23
2.5 Quimiometria.....	26
2.5.1 Ferramentas quimiométricas.....	27
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
5 ARTIGOS	51
ARTIGO 1 - Análise da correlação entre o perfil fitoquímico de própolis e a atividade antifúngica em <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	51
ARTIGO 1 - Analysis of the correlation between the phytochemical profile of propolis and its antifungal activity against <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	67
ARTIGO 2 - Atividade antifúngica <i>in vitro</i> de própolis em <i>Fonsecaea pedrosoi</i> utilizando ferramentas quimiométricas associadas à espectroscopia no infravermelho.....	86
ARTIGO 2 - <i>In vitro</i> antifungal activity of propolis against <i>Fonsecaea pedrosoi</i> using chemometric tools combined with infrared spectroscopy.....	115
6 CONCLUSÕES GERAIS	159
7 CONSIDERAÇÕES GERAIS	161

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATCC - American Type Culture Collection
 ATR - Attenuated Total Reflectance
 CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CFM - Concentração Fungicida Mínima
CIE - Contraimunoelctroforese
CIM - Concentração Inibitória Mínima
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
CMR - Crescimento Micelial Radial
DID - Double Immunodiffusion
DMSO - Dimetil Sulfoxido
DNA - Deoxyribonucleic Acid
DRIFTS - Diffuse Reflectance of Infrared by Fourier Transform Spectroscopy
EEP - Extrato Etanólico de Própolis
ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FDA - Food and Drug Administration
FTIR-ATR - Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance
HCA - Hierarchical Components Analysis
MIC - Minimum Inhibitory Concentration
MOPS - Morpholinepropanesulfonic acid
NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards
NIRS - Near Infrared Reflectance Spectroscopy
PCA - Principal Component Analysis
PCR - Principal Component Regression
PDA - Potato Dextrose Agar
pH - Potencial Hidrogeniônico
PLS - Partial Least Squares
RLM - Regressão Linear Múltipla
RMG - Radial Mycelial Growth
RMSECV - Root Mean Square Error of Cross Validation
RMSEP - Root Mean Square Error of Prediction
RNA - Ribonucleic Acid
RPM - Rotação Por Minuto
RPMI - Roswell Park Memorial Institute
 R^2_{cal} - Coeficiente de Determinação
SEC - Square Error of Calibration
SIMCA - Soft Independent Modeling of Class Analogy

SNV - Standard Normal Variate

TLC - Thin-Layer Chromatography

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

URSS - União das Repúblicas Socialistas Soviéticas

UV - Ultra Violeta

VA - Variância Acumulada

YEPD - Yeast Extract Peptone Dextrose

RESUMO

Neste estudo, foi avaliada a atividade antifúngica *in vitro* de oito amostras de extratos etanólicos de própolis (EEP), provenientes da região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, diante de doze amostras de *Fonsecaea pedrosoi*, através da técnica de microdiluição em caldo, preconizada pelo documento M28-A

do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e diluição em ágar. Através de cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada a caracterização fitoquímica e quantificação de compostos fenólicos totais. Os EEP com melhor atividade antifúngica foram das localidades de Santo Antônio da Patrulha e Candelária. Nas amostras, em geral, foi verificada a presença de produtos com perfil cromatográfico de terpenóides e flavonóides. A quantificação dos compostos fenólicos demonstrou que não há correlação entre a concentração e a atividade antifúngica. Através da utilização da espectroscopia de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFTS) analisou-se o conjunto espectral dos EEP e das amostras de *F. pedrosoi*. Com o auxílio de ferramentas quimiométricas foi possível construir modelos com fatores mais relevantes e um menor número de variáveis, realizado pela análise por componentes principais (PCA) e após, agrupá-las de acordo com sua similaridade, através da análise por agrupamento hierárquico (HCA). Após, foi aplicado o algoritmo de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) que proporcionou a criação de modelos otimizados para previsão da atividade antifúngica.

Unitermos: cromoblastomicose, *Fonsecaea pedrosoi*, própolis, análise fitoquímica, DRIFTS, ferramentas quimiométricas.

1- INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea de aspecto polimórfico, que acomete a pele e o tecido subcutâneo. Caracteriza-se pelo surgimento de lesões descamativas, que evoluem lenta e progressivamente para lesões cutâneas

variadas, podendo espalhar-se pelos tecidos adjacentes, por via hematogênica ou linfática. As interações entre o fungo e o hospedeiro, bem como a resistência imunológica, a quantidade de inóculo e a virulência do fungo, determinam alterações imunopatológicas importantes para controlar sua disseminação (Matte et al., 1997; Lacaz et al., 1998; Gimenes et al., 2005).

Dentre os agentes causadores da cromoblastomicose, estão presentes em nosso meio *Cladophialophora bantiana*, *Phialophora verrucosa*, *Rhinochrysiella aquaspersa*, *Cladosporium carrionii* e *Fonsecaea pedrosoi*, sendo este último o principal agente desta patologia no Brasil. Estes fungos são da família *Herpotrichelaceae*, uma divisão recente da família *Dematiaceae*, também denominados fungos negros, por apresentarem colônias filamentosas de coloração variada entre verde escuro e preto (Caligionne et al., 1999; Gimenes et al., 2005).

Até o presente momento, não se conhece nenhum fármaco ou procedimento completamente eficaz para eliminar o fungo do organismo por ele afetado. Porém, para seu tratamento, temos como opção a remoção cirúrgica ou a farmacoterapia, o que dependerá da extensão e profundidade da lesão. No tratamento farmacológico existem alguns fármacos indicados para o combate dessas doenças, sendo o grupo dos azólicos os antifúngicos de primeira escolha para a terapia (Cucé et al., 1980; Gupta et al., 2002).

Novas alternativas terapêuticas em infecções microbianas têm lançado mão de produtos naturais devido à comprovada eficácia de alguns desses produtos frente a microrganismos nocivos a saúde humana (Sidrim & Moreira, 1999). Um desses produtos é a própolis, cujo potencial antifúngico ainda não tem sido investigado em agentes da cromoblastomicose, o que abre caminho para pesquisas nessa área.

A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas de diversas partes da planta. Sua composição química é bastante complexa e variada e, devido à grande quantidade de substâncias com potencial farmacológico contidas na sua formulação, acredita-se que ela possa ser usada no tratamento de doenças humanas e veterinárias com grande sucesso. Na medicina, a própolis tem sido usada em diversas áreas, com potenciais terapêuticos inclusive contra fungos (Ghisalberti, 1979; Bankova et al. 1998; Park & Ikegaki, 1998; Castro et al., 2007).

Paralelamente, faz-se necessária a utilização de ferramentas estatísticas mais potentes que permitam fazer uma previsão da suscetibilidade de fungos a diferentes agentes antifúngicos constituídos por misturas complexas de produtos naturais, como a própolis, e que conseqüentemente, possam facilitar a avaliação de suas propriedades antifúngicas frente a estes microrganismos. A quimiometria consiste de um conjunto de técnicas que promovem a obtenção de informação útil de um conjunto complexo de dados, englobando planejamento experimental, pré-processamento de dados, estatística e análise multivariada (Wold & Sjöstrom, 1998).

Neste sentido, a quimiometria aliada à espectroscopia no infravermelho é uma técnica recente utilizada na classificação e identificação de microrganismos, que possibilita análises mais rápidas e menos trabalhosas, utilizando uma quantidade pequena de amostras e com minimização da geração de resíduos. Os métodos multivariados utilizados na quimiometria são muito adequados, pois permitem a análise de várias amostras presentes ao mesmo tempo. A espectroscopia no infravermelho aliado a ferramentas quimiométricas apresentam potencial para chegar a estes objetivos de uma maneira racional e otimizada (Natanello et al., 2005).

Diante deste contexto, apresenta-se a importância da avaliação de novas possibilidades terapêuticas baseadas na utilização da própolis, com intuito de encontrar possíveis efeitos contra estes agentes, buscando doses terapêuticas de um produto natural a ser utilizado isoladamente ou em associação com outros antifúngicos a fim de gerar menores efeitos adversos e melhores respostas frente a patologia para pacientes com uso crônico de antifúngicos azólicos.

2- REVISÃO DE LITERATURA

Os fungos dematiáceos têm a propriedade de digerir as proteínas da epiderme, causando várias lesões de pele, desde pequenas manchas avermelhadas até severas erupções que podem abrir caminho para a disseminação desses fungos, causando a proliferação das lesões, podendo comprometer parcial ou totalmente alguns órgãos (Espinel-Ingroff et al., 1986).

2.1- Cromoblastomicose

A cromoblastomicose foi descrita pela primeira vez no ano de 1911, em São Paulo, na Santa Casa de Misericórdia, por José Maria Gomes e Alexandrino de Moraes Pedroso. É conhecida também como dermatite verrucosa ou cromomicose (denominação incorreta) (Lacaz et al., 1991; Fuchs & Pecher, 1992).

É uma doença de distribuição cosmopolita, com maior incidência nas regiões tropicais e subtropicais de clima quente e úmido da América Latina, África, Ásia e Austrália. No Brasil, especificamente no Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e estados da região Amazônica essa doença chega a ser endêmica (Matte et al., 1997; Silva et al., 1999; Ogawa et al., 2003; Marques et al., 2006).

Essa infecção micótica crônica evolui de forma lenta, acometendo a pele e o tecido subcutâneo do homem e dos animais. A grande maioria das lesões é causada por fungos da família *Herpotrichelaceae*, que vivem no solo ou em vegetais em decomposição (Sidrim & Moreira, 1999; Caligiorne, et al., 1999). *Fonsecaea pedrosoi* foi isolado de algumas fontes como os espinhos da planta *Mimosa pudica* (Salgado et al., 2004) e do coco Babaçu (*Orbignya phalerata Martius*) (Marques et al., 2006).

A patologia é causada por diferentes fungos dematiáceos, gênero e espécies de fungos pigmentados; dentre as espécies principais estão *Rhinochrysiella aquaspersa*, *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea compactum*, *Phialophora verrucosum*, e *Fonsecaea pedrosoi* (Iwatsu et al., 1979; Gimenes et al., 2005), sendo este último o fungo mais frequentemente isolado das lesões e o principal agente etiológico da cromoblastomicose no Brasil (Matte et al., 1997; Marques et al., 2006).

Em 1997 foram estudados 1.323 casos em Madagascar, acompanhados desde 1985, onde foram descritos dois ecossistemas bem definidos nesta infecção: um no norte do país, causado por *Fonsecaea pedrosoi* e, outro no sul, por *Cladophialophora carrionii* (Esterre et al., 2000).

Na Colômbia, *Fonsecaea pedrosoi* demonstrou ser o principal agente etiológico da cromoblastomicose (Cardona-Castro & Agudelo-Flórez, 1999). No Japão também foram isolados alguns fungos dematiáceos, sendo *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladophialophora bantiana*, *Wangiella dermatitidis* e *Exophiala jeanselmei* os principais agentes etiológicos da cromoblastomicose naquele país (Iwatsu et al., 1979; Iwatsu et al., 1980).

O fato de pertencerem a gêneros e espécies diferentes tem demonstrado resposta bem variada aos antifúngicos sistêmicos em isolados clínicos de tecido animal contaminado por esses agentes etiológicos, justificando a necessidade de uma boa caracterização do fungo (Cardona-Castro & Agudelo-Flórez, 1999).

A penetração do fungo no tecido subcutâneo do hospedeiro ocorre geralmente por implantação de conídios e fragmentos de hifas que podem estar contidos em material orgânico como pedaços de plantas, galhos, tocos, solo ou detritos, causando assim, a lesão inicial. (Matte et al., 1997; Nimrichter et al., 2004). No hospedeiro essas estruturas do fungo, que são as formas infectantes, aderem às células epiteliais e se diferenciam em células escleróticas, estabelecendo assim, a doença (Corbellini et al., 2006; Gimenes et al., 2006). A inalação de esporos e a disseminação hematogênica têm sido descritas como uma possível via de disseminação da doença (Howard et al., 1991).

A camada externa da epiderme consiste em células mortas que são continuamente substituídas pelas células localizadas abaixo. O principal constituinte químico desta camada externa é uma proteína, a queratina. A pele íntegra é uma barreira eficaz contra as infecções, porém, abrasões na pele podem facilitar os dematiáceos a iniciar a infecção (Neder, 1992; Sidrim & Moreira, 1999).

Geralmente essa penetração ocorre em trabalhadores rurais do sexo masculino, com idade entre 30 e 60 anos, sendo os membros inferiores os locais frequentemente afetados unilateralmente. Os fatores que contribuem para a infecção são muitos, dentre eles a temperatura da pele, a quantidade de fragmentos dos fungos durante a exposição e o mais importante, a umidade (Sampaio & Rivitti, 1998; Sidrim & Moreira, 1999).

As lesões causadas por essas espécies de fungos são caracterizadas por irritação, formação de escamas, vermelhidão local, inchaço e inflamação das bordas. Iniciam-se com uma grande variação de pigmentação na pele relacionada à produção de corpos escleróticos pretos ou marrom-escuros nos tecidos. As lesões iniciais são pápulas ou nódulos que evoluem tornando-se verrucosas. Da confluência dessas lesões verrucosas, resultam placas (Gimenes et al., 2006).

Com a progressão periférica, a parte central torna-se cicatricial, podendo ulcerar-se. A evolução é lenta e crônica, permanecendo a infecção localizada num membro ou segmento. O estado geral não é afetado, porém as lesões podem

interferir na capacidade física do indivíduo infectado (Sidrim & Moreira, 1999; Gimenes et al., 2006). Após esses estágios da infecção, a disseminação da lesão estende-se pelos vasos devido às constantes fissuras da ferida. Sangramento e dor são os sintomas mais referidos (Sampaio & Rivitti, 1998; Lacaz et al., 2002).

Modelos de cromoblastomicose desenvolvidos em grupos de ratas grávidas apresentaram resultados em períodos curtos, aumentando a disseminação do fungo pelos órgãos e tecidos ao longo do tempo. Nos primeiros dias ocorreram diarreia e paralisia dos membros seguida de paralisia total. Ao final de um mês eram visíveis nódulos escuros e exsudatos contendo fungos em várias regiões do corpo do animal, como patas, cauda e orelhas (Borelli, 1972).

Outro modelo de cromoblastomicose foi desenvolvido em grupos de ratos BALB/c que em exames histológicos de diversos órgãos analisados, foram observados que o cérebro, coração, rins e glândulas adrenais são as estruturas mais severamente infectadas, onde apresentaram lesões intensas, granulomatosas e nódulos escuros com material purulento em excesso (Nishimura & Miyaji, 1981).

Muitos desses patógenos dematiáceos têm suas formas e crescimento variáveis, dependentes das condições de habitat e de como são isolados. *Fonsecaea pedrosoi* é considerado um fungo polimórfico, pois apresenta mais de duas formas de desenvolvimento, como os conídios, hifas ou micélios considerados as formas saprofíticas, e os corpos escleróticos ou células muriformes isolados ou ligados às hifas, que são considerados a forma patogênica (Alviano et al., 1992; Silva et al., 2002).

O exame direto de pus ou secreção da lesão ou o exame histológico permitem visualizar corpos arredondados, cor de charuto, isolados ou agrupados (corpos fumagóides), multiplicando-se por septação sem brotamento (Sidrim & Moreira, 1999; D'ávila et al., 2002).

Os achados macromorfológicos das colônias de cada espécie apresentam, na maioria das vezes, pouca ou nenhuma característica diferencial. Assim, temos *Fonsecaea pedrosoi* como agente produtor de colônias de maturação lenta (14 dias) com textura aveludada, de tom marrom-escuro, verde-oliva ou negro; seu relevo pode ser plano ou levemente rugoso, não sendo observado pigmento difusível no meio. Ao exame direto do cultivo encontram-se hifas septadas, de coloração marrom-clara (Sidrim & Moreira, 1999).

Exames histopatológicos da cromoblastomicose apresentam reações tissulares cutâneas, caracterizadas por uma reação granulomatosa constituída por macrófagos, células gigantes, linfócitos, plasmócitos e neutrófilos, com presença de microabcessos, granulomas e fibroblastos. O fungo apresenta-se como células castanhas, redondas ou poliédricas, de parede espessa (corpos fumagóides), isoladas ou agrupadas (Sidrim & Moreira, 1999; Machado et al., 2004).

Os testes sorológicos são aplicados para identificar anticorpos específicos frente a antígenos de *Fonsecaea pedrosoi*, tendo sido várias metodologias empregadas para identificação sorológica. São feitas reações de imunodifusão dupla (*Double Immunodiffusion* - DID), contraimunoeletroforese (CIE) e teste imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* - ELISA) para avaliar a resposta imune humoral na cromoblastomicose causada por *Fonsecaea pedrosoi*. Apesar de serem pouco aplicados, pois necessitam de estudos na padronização de técnicas e antígenos específicos para essa avaliação, essas reações sorológicas podem ser ferramentas úteis no auxílio do diagnóstico desta infecção, quando a cultura do agente não for possível (Vidal et al., 2003).

O tratamento da cromoblastomicose depende da extensão e gravidade da lesão. A doença pode causar lesões severas na pele, pois origina verrugas secas que brotam em sequência, traumatizando assim o tecido subcutâneo, deixando marcas lesivas que somente serão possíveis retirá-las através de tratamento cirúrgico. Também podem ser utilizados os métodos de aplicação de laser de dióxido de carbono, criocirurgia, termoterapia e, por fim, a amputação do membro, quando for o caso (Cardona-Castro et al., 1996; Sidrim & Moreira, 1999).

O tratamento farmacológico para a cromoblastomicose é indicado quando a lesão atinge formas extensas, onde não é possível o tratamento cirúrgico. Os antifúngicos podem ser divididos em duas categorias: os que agem na membrana celular e os que atuam intracelularmente, interrompendo diversos processos vitais, como síntese de DNA, RNA ou proteínas (Rang et al., 1997).

Os fármacos derivados dos azóis formam um grupo de agentes antimicóticos sintéticos com amplo espectro de atividade. Bloqueiam a síntese de ergosterol, o principal esterol da membrana das células fúngicas, interagindo com a enzima que converte lanosterol em ergosterol. A consequente depleção do ergosterol altera a fluidez da membrana, e isto interfere na ação das enzimas associadas à

membrana, gerando um efeito inibitório da replicação fúngica (Rang et al., 1997; Korolkovas, 2004).

Os principais fármacos derivados dos azóis são: cetoconazol, econazol, fluconazol, miconazol e itraconazol. Estes compostos possuem ação antifúngica que alteram a permeabilidade da membrana celular, o que inibe o crescimento ou causa a morte do fungo (Cucé et al., 1980; Silber et al., 1983; Sidrim & Moreira, 1999; Ogawa et al., 2003; Gimenes et al., 2006).

O itraconazol é um derivado triazólico que possui absorção variável e sofre intenso metabolismo hepático. Sua meia-vida é de aproximadamente 36 horas e é excretado pela urina. Tem como efeitos adversos distúrbios gastrointestinais, cefaléia e tonturas. Raramente hepatite, hipocalcemia, hipertensão e impotência. Já foram relatadas reações cutâneas alérgicas, incluindo a Síndrome de Stevens-Johnson (Rang et al., 1997; Gimenes et al., 2006).

Gupta et al., (2002) relataram que o itraconazol pode ser associado com terbinafina em regime alternado semanalmente em terapia de pacientes jovens (8-23 anos) com cromoblastomicose causada por *Fonsecaea pedrosoi*. Esse grupo de pacientes que se mostrava resistente à monoterapia convencional apresentou uma redução ou até resolução das lesões com a terapia alternada.

O tratamento da cromoblastomicose é dependente do agente etiológico e do antifúngico selecionado, quando for o caso (Sampaio & Rivitti, 1998). Nas infecções causadas por *Cladosporium carrionii* é indicado tratamento com itraconazol 400mg/dia, por vários meses. Quando causadas por *Fonsecaea pedrosoi*, indica-se o uso de itraconazol 200mg/dia associado com flucitosina na dosagem de 150mg/kg/dia por vários meses. Em casos de resistência, indica-se eventualmente anfotericina B, 25mg em dias alternados associada com flucitosina na dosagem de 150mg/kg/dia, de 2 a 3 meses. Pode indicar-se também tiabendazol, 2-3g/dia, por vários meses.

2.2- Própolis

A palavra própolis, em sua origem grega significa: *pro* (defesa) combinado com *polis* (cidade), em defesa da cidade, afinal, ela é usada na colméia para vedar frestas, o que garante a proteção contra microrganismos (Maaret, 2001).

Além de vedar frestas reduzindo a entrada de ventos frios e impedindo também a entrada de fungos e bactérias, é usada como material de construção no interior da colméia, soldando favos, quadros e envernizando o interior dos

alvéolos. Alguns insetos invasores como outras abelhas e besouros, quando mortos, também são recobertos com a própolis, para deixar imune a colméia, evitando assim a putrefação (Junior et al., 2001).

Entretanto, ela vem sendo utilizada desde alguns séculos passados pela humanidade, administrada sob diversas formas. Seu emprego já era descrito por assírios, gregos, romanos, incas, egípcios, chineses e tibetanos. No Egito antigo servia como material para embalsamar mortos (Sforcin et al., 1995; Pereira et al., 2002).

Praticamente todas as civilizações antigas com as suas terapias milenares conheceram e utilizaram os produtos das abelhas como valiosos recursos na sua medicina, contendo em seus escritos antigos, centenas de receitas onde entram principalmente mel, própolis, larvas de abelhas e, às vezes, as próprias abelhas, para curar ou prevenir enfermidades. Alguns textos referem-se à própolis como “O bálsamo de Gileade” sendo usada para curar feridas e atingia altos preços naquela época (Park et al., 1998).

Na África do Sul, no final do século XIX, era utilizada como cicatrizante durante a guerra. Na antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS) foi usada na medicina humana e veterinária, principalmente no tratamento da tuberculose (Pereira et al., 2002).

Nas duas últimas décadas têm-se observado um interesse cada vez maior sobre os produtos obtidos de abelhas da espécie *Apis mellifera*, como o mel, geléia real (destinada à rainha), apitoxina (veneno da abelha), pólen e própolis, onde tem grande aceitação devido as suas propriedades terapêuticas, originando um novo ramo na medicina alternativa, denominado apiterapia (Park et al., 1998).

Nos últimos anos, a própolis têm sido bastante utilizada na medicina naturalista e veterinária, tornando-se uma matéria-prima valiosa para a indústria farmacêutica e alimentícia. A própolis nacional tem excelente qualidade por causa do clima e da flora e é reconhecida como o mais eficiente medicamento natural já descoberto no ocidente. As abelhas preferem climas tropicais como o do Brasil e o da Nova Zelândia, e assim, esses países ocupam as principais posições no mundo no roteiro de produção da própolis (Bankova et al., 2000; Junior et al., 2001; Park et al., 2002).

Dotada de múltiplas atividades terapêuticas, responsáveis por grande popularidade em países da Europa oriental e, particularmente, em asiáticos, como

Japão, Coréia do Sul e China, a própolis representa para os apicultores brasileiros uma valiosíssima fonte de renda devido à exportação para estes países (Nothenberg, 1997; Kumazawa et al., 2002).

A própolis é uma substância resinosa, coletada pelas abelhas, de diversas partes da planta como broto, florais e exsudatos resinosos. Sua composição química é bastante complexa e variada, estando intimamente relacionada com a ecologia da flora (época, vegetação e área de coleta). A composição química da própolis se diferencia conforme a vegetação e o clima de cada região, sendo que as mais comuns têm colorações verde, preta ou marrom (Ghisalberti, 1979; Bankova et al. 1998; Park & Ikegaki, 1998; Russo et al., 2002; Castro et al., 2007).

A própolis bruta encontra-se no estado sólido, sendo dura a 15°C e maleável a partir dos 30°C. Suas propriedades físico-químicas como cor, odor e faixa de fusão variam de uma amostra para a outra. Devido à grande diversidade de espécies vegetais brasileiras visitadas pelas abelhas, ocorre uma variação de seus princípios ativos (Sforcin et al., 1995; Orsi et al., 2000).

Algumas espécies de vegetais produtores de própolis, identificadas aqui no Brasil são o alecrim-do-campo, assa-peixe, aroeira e eucalipto. De modo geral, a própolis contém em torno de 60% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 5% de óleos essenciais e o restante de grãos de pólen e outros micro-elementos que são misturados às secreções salivares da abelha que contém uma enzima, a 13-glicosidase, acarretando na hidrólise dos flavonóides glicosilados em suas formas livres, chamadas agliconas (Ghisalberti, 1979; Bankova et al. 1998; Park & Ikegaki, 1998).

Seus efeitos terapêuticos têm sido atribuídos aos diversos compostos fenólicos que a compõem como: flavonóides (considerados os principais compostos), ácidos, aldeídos, álcoois e cetonas (Park et al., 1998; Kumazawa et al., 2002).

Dentre os flavonóides já encontrados em amostras de própolis, estão os seguintes grupos: flavonas, flavonóis, flavanonas e di-hidroflavonóis. O melhor indicador da origem botânica da própolis é a análise da sua composição química comparada com a provável fonte vegetal. A determinação da origem geográfica e, principalmente, a origem vegetal, aliada à fenologia da planta hospedeira, se faz importante no controle de qualidade e até mesmo na padronização das amostras

de própolis para uma efetiva aplicação terapêutica (Ghisalberti, 1979; Bankova et al., 1998; Park & Ikegaki, 1998).

Dependendo da origem, a própolis chega a conter mais de 400 substâncias químicas com funções ainda desconhecidas na fisiologia humana. Amostras de própolis coletadas de colméias em uma região da Argentina, por exemplo, apresentaram características exclusivas da sua região, como coloração marrom-escuro, odor aromático e sabor picante (Chaillou et al., 2002).

Devido à grande quantidade de substâncias contidas na própolis, como vitaminas B1, B2, B6, C e E, elementos minerais como prata, césio, mercúrio, lantânio, antimônio, cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício, além de diversas substâncias de estruturas químicas distintas, pertencentes às classes álcoois, aldeídos, ácidos alifáticos, ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, flavonóides, ésteres carboidratos, éter, ácidos graxos, cetonas, terpenóides, esteróides e açúcares, ela pode ser usada no tratamento de doenças humanas e veterinárias com grande sucesso. Na medicina, tem sido usada em diversas áreas, como dermatologia, otorrinolaringologia, ginecologia, gastroenterologia e outras (Almeida & Menezes, 2002).

Seus potenciais terapêuticos e profiláticos devem-se ao grande número de enzimas, sendo as principais: amilases, catepsinas, lipases, pepsina e tripsina. Na indústria farmacêutica e alimentícia ela vem sendo amplamente utilizada em várias preparações, tais como pastilhas, cremes dentais, comprimidos, pós, gomas de mascar, chocolates, loções, cremes faciais, tinturas, pomadas, soluções, spray bucal, cápsulas, desodorantes e xampus (Park et al., 1998).

A própolis tem propriedade antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória, imunomodulatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, antineoplásica, anticariogênica e antifúngica. Devido a essas características, ela é considerada o maior medicamento natural descoberto de todos os tempos (Orsi et al., 2000; Sforcin et al., 2000; Silici & Kaftanoglu, 2003; Vargas et al., 2004).

A atividade antibiótica de uma amostra de própolis foi verificada contra várias bactérias gram-positivas e gram-negativas, comprovando grande poder antibiótico. Isto se deve a grande quantidade dos flavonóides galangina e pinocembrina que são considerados agentes antimicrobianos (Park et al., 2000; Havsteen, 2002). Um outro trabalho utilizando extrato etanólico em diferentes

concentrações inibiu a enzima hialuronidase, responsável por muitos processos inflamatórios conhecidos (Ghisalberti, 1979; Bankova et al., 1998; Park & Ikegaki, 1998).

A atividade antioxidante está ligada, no corpo humano, ao processo de envelhecimento, mutação do material genético e a degradação do tecido vivo. Os compostos responsáveis por essa ação deletéria são os radicais livres. A composição química da própolis, formada essencialmente por compostos fenólicos, leva a crer que seja um excelente agente antioxidante, pois a inibição desses radicais livres já foi comprovada (Orsi et al., 2000; Sforcin et al., 2000).

Como anestésico, há relatos sobre seu efeito, indicando que o extrato de própolis foi capaz de produzir tal efeito em córneas de coelhos. O extrato etanólico de própolis foi relatado ser mais potente que a cocaína até cinco vezes, usada como anestésico e utilizada na prática dental em 1953, na URSS (Ghisalberti, 1979; König, 1985).

Como antifúngico, a ação antimicótica deve-se ao ácido cinâmico e ao flavonóide crisina. Relatos indicam que a formulação de própolis com propilenoglicol tiveram ação inibitória sobre 17 cepas de fungos dermatófitos igual ou superior a algumas medicações antifúngicas utilizadas contra alguns desses fungos (Park et al., 2000).

A ação antifúngica de amostras de própolis coletada ao norte da Argentina também foi testada, onde foram isolados dois flavonóides, galangina e pinocembrina, os quais tiveram sua atividade comparada a antifúngicos sintetizados, cetoconazol e clotrimazol. As amostras fúngicas utilizadas foram de vários gêneros, como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, onde os flavonóides isolados apresentaram atividade antifúngica semelhante aos antifúngicos sintetizados (Quiroga et al., 2006).

A atividade antifúngica *in vitro* do extrato etanólico de própolis foi verificada frente a uma amostra padrão do fungo *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112. Foram testadas várias concentrações do extrato, as quais apresentaram resultado fungistático e fungicida, demonstrando na ocasião, seu potencial antifúngico (Fernandes et al., 2007).

Silici & Koc (2006) utilizaram três métodos para avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do extrato etanólico de própolis, comparando com a atividade do itraconazol. Foram testadas quinze amostras de fungos (*Candida albicans* e

glabrata, *Trichosporon sp.* e *Rhodotorula sp.*) isoladas de pacientes portadores de micoses superficiais, onde a própolis apresentou resultados promissores. Segundo os autores, os métodos de diluição em ágar e difusão em disco demonstraram ser convenientes para avaliar a atividade da própolis.

Embora a própolis seja um produto natural, a mesma não deve ser utilizada indiscriminadamente. Existem relatos de que pessoas propensas a terem alergias podem também apresentar tais sintomas com o seu uso, tanto tópico quanto oral. A partir da revisão, não foi encontrado para a própolis brasileira nenhum estudo que aponte qualquer de seus componentes como agente alergênico. Já para a própolis européia, tal propriedade tem sido atribuída para derivados do ácido cafeico (Marcucci, 1995; Park et al., 2000; Castaldo & Capasso, 2002).

As amostras brasileiras têm composição bastante distinta das originárias de outros países. Por isso o grande interesse no comércio desta resina, especialmente por países do oriente (Marcucci, 1995). Apesar dos estudos descritos na literatura terem se concentrado sobre a própolis produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, são conhecidas aproximadamente 20.000 espécies de abelhas. Destas, em torno de 1.000 produzem própolis. No Brasil, estima-se que existam entre 350 a 600 espécies nativas. Pereira et al. (2003) compararam a atividade antimicrobiana da própolis produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera* e *Tetragonisca angustula*, onde a composição química foi bastante semelhante, assim como sua atividade antimicrobiana.

2.3- Testes de sensibilidade

A preocupação e busca de testes que orientem para a melhor terapêutica de pacientes com micoses cutâneas e subcutâneas, levaram especialistas a realizarem experimentos com agentes etiológicos desde a década de 80 (Granade & Artis, 1980; Venugopal & Venugopal, 1994; Korting et al., 1995). Inicialmente, o conceito de Concentração Inibitória Mínima (CIM) era irrelevante, pois não existia terapêutica alternativa à anfotericina B. Com a introdução da 5-fluorocitosina e dos azólicos, a determinação da CIM surge como um auxílio importante para a definição de um tratamento adequado.

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer microrganismo que cause um processo infeccioso que requeira terapia antimicrobiana, sempre que sua sensibilidade não possa ser predita de maneira confiável com base na

identificação do organismo. Os testes de sensibilidade são indicados, com maior frequência, quando se acredita que o organismo causador da infecção pertence a uma espécie capaz de demonstrar resistência aos agentes antimicrobianos normalmente utilizados (Jorgensen et al., 1994).

Infecções fúngicas estão associadas a tratamentos mais difíceis e prolongados que infecções bacterianas, visto que os organismos fúngicos multiplicam-se mais lentamente e muitas vezes infectam tecidos ou órgãos que apresentam dificuldades para o acesso de fármacos antifúngicos, resultando em concentrações abaixo das faixas terapêuticas estabelecidas. Assim como nas infecções bacterianas, os fungos também desenvolvem mecanismos de resistência aos fármacos, o que resulta em falhas terapêuticas associadas ao aumento da prevalência de micoses. Os mecanismos de resistência incluem a produção de enzimas que inativam o fármaco, a alteração dos alvos de ação do fármaco e modificação da permeabilidade da membrana externa ou efluxo do fármaco (Neely & Ghannoum, 2000; Liu et al., 2003; Müller et al., 2007).

Diante destes agravos, tornou-se imprescindível o aperfeiçoamento das metodologias laboratoriais para determinação das suscetibilidades *in vitro* dos diferentes patógenos frente aos agentes antifúngicos disponíveis para uso clínico. Estes testes também podem ser utilizados para descoberta de novos fármacos e estudos epidemiológicos (Rex et al., 2001).

A avaliação da eficácia de um determinado antifúngico pode ser realizada *in vitro* por meio de testes de sensibilidade que visam identificar amostras resistentes. Os métodos utilizados geralmente para avaliação da atividade antifúngica são adaptações de outros usados, anteriormente, para bactérias, tais como: diluição em ágar, difusão em disco e diluição em caldo (Granade & Artis, 1980; Méis et al., 2000).

A diluição em ágar, também chamada de diluição em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é colocado em contato com uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo com a concentração da substância testada (Pinto et al., 2003). A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco, até a margem onde há crescimento de microrganismos. Passos et al. (2002) verificaram a atividade

antifúngica *in vitro* de diferentes constituintes de *Caryocar brasiliensis* sobre *Cryptococcus neoformans*, onde a cera retirada da folha, inibiu o crescimento de 91,3% (21/23) dos isolados de *Cryptococcus neoformans* em concentração \leq a $250\mu\text{g mL}^{-1}$. A espessura e a uniformidade do ágar são essenciais para a boa resolução dos resultados. Deve-se controlar rigorosamente o volume de ágar transferido para a placa de Petri e o antimicrobiano de modo a evitar formação de estrias superficiais e bolhas (Pinto et al., 2003).

A difusão em disco é um método aceito pelo FDA (*Food and Drug Administration*), sendo uma das metodologias estabelecidas como padrão pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). A metodologia consiste em colocar os discos embebidos com solução antimicrobiana sobre o meio de cultura sólido previamente inoculado em placas de Petri com diferentes cargas microbianas, 10^8 UFC/mL para bactérias, 10^6 UFC/mL para leveduras e 10^4 para esporos/mL. A disposição dos discos deve ser tal que sua distância até a lateral da placa seja maior que 15mm e de modo a não sobrepor as zonas de inibição. O pH do meio de cultura deve estar entre 7,2 e 7,4, e a profundidade recomendada é de aproximadamente 4mm. Muitas substâncias contidas nos discos não apresentam boa difusão para os meios de culturas contidos nas placas, o que torna a metodologia limitante para alguns compostos utilizados (Chattotadhyay et al., 2002; Karaman et al., 2003).

Rabanal et al. (2002) avaliou a atividade antimicrobiana de três espécies de *Hypericum* contra gram negativas e gram positivas. Karaman et al. (2003) avaliou a atividade antimicrobiana de extratos aquoso e metanólico de *Juniperus oxycedrus* frente a 143 cepas bacterianas de 56 espécies e 31 cepas de fungos de 5 espécies, onde o extrato metanólico demonstrou maior atividade antifúngica em concentrações que variaram entre 31,25 a $500\mu\text{g mL}^{-1}$. Chandrasekaran & Venkatesalu (2004) verificaram a atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* de extratos aquoso e metanólico de *Syzygium jambolanum* frente à *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus ssp.*, com concentrações de 500 a $1000\mu\text{g mL}^{-1}$ de extrato.

Com relação à diluição em caldo, em 1983, o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), atualmente denominado *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), estabelece um subcomitê para padronização de teste

de suscetibilidade *in vitro* para fungos patogênicos. Dez anos mais tarde são determinados vários aspectos complexos e limitantes para tal padronização como concentração e preparação do inóculo, tempo e temperatura de incubação, meio de cultura e determinação do ponto final de leitura, que poderiam gerar resultados de CIM divergentes maiores que 50.000 vezes. O CLSI descreveu uma metodologia proposta inicialmente em 1998 no documento denominado M38-P que foi, após a publicação de outros 2 documentos (M27-T, 1992 e M27-A, 1992) aprovada em 2002 e designada como *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*. Esta publicação (M38-A) traz a metodologia para estudar as seguintes espécies de fungos filamentosos: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* e *Sporothrix schenckii* (Neely & Ghannoum, 2000).

Na diluição em caldo é considerada a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo avaliado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano (Pinto et al., 2003). O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o antifúngico-padrão com a suspensão padronizada de microrganismo em teste, e como controle negativo o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana. Duas metodologias podem ser empregadas: macro e microdiluição.

A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando de 1 e 10mL. Por ser laborioso, consumir muito tempo, requerer muito espaço no laboratório e gerar grande quantidade de resíduos é usado, geralmente, em pequeno número de réplicas (Zgoda & Porter, 2001). Recentemente, tem-se avaliado a atividade antifúngica *in vitro* de *Pterocaulon alopecuroides* (Asteraceae) em agentes da cromoblastomicose, utilizando extrato metanólico em concentrações entre 156,25–5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, onde as CIM's encontradas, na grande maioria, variaram entre 625–2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Daboit et al., 2007).

A microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2mL. Zgoda & Porter (2001) utilizaram extratos orgânicos das plantas *Lemna minor* e *Ilex cornuta* para a pesquisa de novos compostos com

atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos, onde previamente observou-se que concentrações maiores que 2,5% de dimetil sulfóxido (DMSO) nos poços inibiam o crescimento de *Cryptococcus albidus*.

Simié et al. (2004) avaliaram a atividade antifúngica de alguns óleos essenciais de plantas da família *Lauraceae*, onde a casca de *Cinnamomum zeylanicum*, conhecida popularmente como canela, apresentou melhor atividade antifúngica. Khan & Katiyar (2000) testaram a atividade antifúngica do extrato aquoso de alho (*Allium sativum*) frente à *Cryptococcus neoformans*, onde encontraram CIM entre 125–250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O desenvolvimento de mecanismos de resistência aos fármacos e a grande toxicidade de alguns deles, estimulam o desenvolvimento de novos compostos alternativos, mais eficazes e menos tóxicos. Diante de tantas incógnitas e procedimentos diversos faz-se necessário um experimento que possa avaliar novos compostos antifúngicos, em várias concentrações, para se obter *in vitro* distintos padrões de sensibilidade e, finalmente, determinar um ponto de corte hipotético (*breakpoint*) para uma padronização (Soares & Cury, 2001; Mellado et al., 2002).

2.4- Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia é o método de análises óptico mais usado nas investigações biológicas e físico-químicas. A região espectral do infravermelho compreende a radiação com números de onda no intervalo de, aproximadamente, 12800 a 10 cm^{-1} . Este amplo espectro é normalmente dividido em três partes, que são infravermelho distante, médio e próximo. O infravermelho médio, que compreende a região entre 650 a 4000 cm^{-1} , é a região mais usada, tanto para análises qualitativas como para análises quantitativas (Skoog et al., 2002).

O funcionamento de um espectrofotômetro de infravermelho é similar ao de outros espectrofotômetros. Radiações em comprimentos de onda específicas são geradas e essas radiações entram em contato com a amostra que, por sua vez, irá interagir com a radiação incidente, gerando absorções em comprimentos de onda específicos, correspondente ao tipo de composto, ligação e interação existentes na amostra. Normalmente os espectros de infravermelho são registrados em transmitância *versus* número de onda (em cm^{-1}) (Skoog et al., 2002).

A espectroscopia no infravermelho apresenta a impressão digital para algumas substâncias orgânicas. A absorvância em uma frequência particular é característica de um grupo funcional presente no composto químico, logo, ela pode ser utilizada para análise de amostras complexas, oferecendo oportunidades analíticas quase que ilimitadas (Skoog et al., 1998).

Em 1911, W. W. Conbletz foi o primeiro cientista a sugerir que materiais biológicos pudessem ser úteis quando analisados por meio de espectroscopia no infravermelho. A utilização da espectroscopia no infravermelho para a análise de bactérias foi amplamente relatada nos anos 50 e 60. Por causa de especificações limitadas dos espectros de infravermelho daquela época (sensibilidade, tempo e reprodutibilidade), relatos de aplicações da técnica tornaram-se pouco frequentes (Norris, 1959; Naumann, 2000).

Em 1961, Fahrenfort descreveu uma nova técnica para obtenção de espectros no infravermelho para compostos orgânicos, a Reflexão Total Atenuada (*Attenuated Total Reflectance* - ATR), que consiste na utilização de um acessório acoplado ao espectrofotômetro de infravermelho. A espectroscopia com ATR é uma técnica não destrutiva que permite a obtenção de espectros de amostras como sólidos pouco solúveis, adesivos, pós, pastas, entre outros. O simples funcionamento permite a obtenção de espectros com rapidez, quando comparado ao modo clássico (Harrick, 1964; Skoog et al., 2002).

Os equipamentos sofreram mudanças a partir da utilização de espectrofotômetros com transformada de Fourier, possibilitando várias vantagens, entre elas a obtenção de todo o espectro em menos de um segundo, possibilitando a realização de várias varreduras, melhorando assim, a razão sinal-ruído (Skoog et al., 2002).

No final dos anos 1970 e início dos 1980 foi demonstrada a utilidade desta técnica quando acessórios de reflexão difusa foram acoplados com espectrofotômetros interferométricos com transformada de Fourier, sendo conhecida a técnica Espectroscopia por Reflectância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier resultante pela sigla DRIFTS (*Diffuse Reflectance of Infrared by Fourier Transform Spectroscopy*) (Fuller & Griffiths, 1978; Van De Voort & Ismail, 1991; Wilson & Tapp, 1999).

A reflexão difusa é principalmente observada em amostras sólidas pulverizadas, sendo sua aplicação prática muito difundida na literatura, podendo

ser utilizada em equipamentos que operam na região do infravermelho próximo, associada à sigla NIRS (*Near Infrared Reflectante Spectroscopy*) (Abdullah & Sherman, 1997; Pasikatan et al., 2003; Steuer & Schulz, 2003).

A reflexão difusa é observada quando uma luz incide em matriz descontínua, penetra na amostra e reflete contendo informações espectrais. O caminho percorrido pela luz pode ser considerado aleatório devido a múltiplas reflexões, desta forma, a luz refletida pode ser atenuada por absorção e o espectro resultante é similar ao obtido através da técnica no infravermelho por transmissão utilizando brometo de potássio (KBr). No infravermelho próximo as distorções nos espectros são quase imperceptíveis, enquanto que no infravermelho médio as distorções são mais frequentes. Uma das maneiras de contornar esse efeito indesejado é diluindo a amostra em matriz não absorvente, como em KBr (Olinger & Griffiths, 1993(a); Olinger & Griffiths, 1993(b); Ferrão, 2001).

A espectroscopia no infravermelho como ferramenta para caracterização e diferenciação de espécimes clínicos baseia-se na simplicidade da metodologia e baixo custo da análise em relação a outras metodologias tais como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e técnicas moleculares, além da natureza limpa do processo, minimizando a geração de resíduo, sem destruição da amostra, necessitando de algumas poucas miligramas para ensaio por DRIFTS para amostra sólida ou até microgramas para amostras de proteínas em solução aquosa pela técnica de ATR (Naumann, 2000).

Em 1991, Naumann et al., publicaram um artigo apontando as capacidades da espectroscopia com transformada de Fourier para diferenciar, classificar e identificar microrganismos. Este trabalho em conjunto com outros, vem sendo utilizado como referência em vários estudos.

A espectroscopia tem encontrado várias aplicações na área médica e biológica, tendo como principal vantagem, e a qual a torna atrativa, a sua extrema rapidez quando comparada a técnicas convencionais e a sua aplicabilidade uniforme para diversos microrganismos. O poder da espectroscopia está na capacidade de conduzir estudos de casos epidemiológicos e grandes experimentos de triagem muito rapidamente, tornando-a muito promissora nessas áreas (Naumann, 2000).

O desenvolvimento da espectroscopia de infravermelho moderna e a disponibilidade de microcomputadores robustos, bem como de novos algoritmos

de análise estatística multivariada e o reconhecimento de metodologias modelo, contribuíram para o renascimento da espectroscopia como um meio de caracterização de amostras microbianas. Tal desenvolvimento associado a técnicas em microbiologia poderão, presumivelmente, dar origem aos instrumentos mais sensíveis e específicos para a caracterização microbiana no futuro (Naumann, 2000).

Devido aos complexos sinais espectroscópicos fornecidos pelos espectros no infravermelho, a sobreposição de centenas ou milhares de bandas não pode ser interpretada por qualquer medida, necessitando de técnicas de reconhecimento, as quais consideram o espectro como impressões digitais metabólicas (Naumann, 2000). Para a análise destes dados, já é utilizada a quimiometria, que é uma área destinada a análise de dados químicos de natureza multivariada.

2.5- Quimiometria

A quimiometria é um conjunto de técnicas de cálculo que tem por objetivo promover a obtenção de informação útil de um conjunto complexo de dados, englobando conceitos de planejamento experimental, pré-processamento de dados, estatística e análise multivariada que fornecem o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos (Ferreira et al., 1999; Morgano et al., 1999).

As aplicações da quimiometria são amplas e podem ser aplicadas em associação com diversos equipamentos. Dentre as vantagens oferecidas pela quimiometria estão uma boa exatidão e precisão nas predições e a rapidez e simplicidade em que os dados são obtidos. Para a análise desses dados, os métodos multivariados são os mais adequados, pois permitem um estudo com várias espécies presentes ao mesmo tempo, não importando existência ou ausência de diferenças espectrais marcantes entre elas nem a existência de alta correlação nos dados (Wold & Sjöstrom, 1998; Ferreira et al., 1999; Hair et al., 2005).

Interferências de parâmetros espectrais, como espalhamento de luz, profundidade de penetração da luz, entre outros, são fatores que podem variar de um espectro a outro, mesmo que seja da mesma amostra. Operações matemáticas podem ser utilizadas antes da construção do modelo de calibração

multivariada, no intuito de reduzir, eliminar ou padronizar os impactos sobre os espectros. De acordo com Reich (2005), para a execução de análises qualitativas e quantitativas em infravermelho a aplicação de algum método matemático e/ou estatístico é necessária para a obtenção de dados importantes e a exclusão de dados desnecessários do espectro.

No caso de análises realizadas através da espectrometria no infravermelho, inicia-se com uma base de dados, onde a série espectral de interesse é selecionada e então eventualmente filtrada pelo cálculo da primeira ou segunda derivada; finalmente, o espectro é normalizado. A meta da análise fatorial é calcular, através de um vetor ou valor específico, um novo sistema coordenado de variância, o qual está adaptado a características estruturais do grupo de dados (Naumann, 2000).

Os vetores ortogonais do novo sistema coordenado representam informações sobre as características estruturais do complexo grupo de dados. Os objetos podem ser representados no novo sistema como uma função de propriedades específicas de todo o grupo de dados, sendo melhor do que uma função de absorbâncias ou frequências. Normalmente, os primeiros 2 a 24 vetores ortogonais do novo sistema, representam, de forma decrescente, a maior parte da variância dos espectros (Naumann, 2000).

2.5.1- Ferramentas quimiométricas

Existem muitas ferramentas quimiométricas de grande utilidade para análises qualitativa e quantitativa de compostos em função de sua estrutura e atividade, sendo as análises exploratórias e os métodos de regressão os mais utilizados. Entre as análises exploratórias comumente utilizadas estão análise por componentes principais (*Principal Component Analysis* - PCA) e análise por agrupamento hierárquico (*Hierarchical Components Analysis* - HCA) (Ferreira, 2002).

Os métodos de regressões mais utilizados são: Regressão Linear Múltipla (RLM), regressão por componente principal (*Principal Component Regression* - PCR) e regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares* - PLS) (Ferreira, 2002).

A extração de informações dos resultados de um experimento químico envolve a análise de grande número de variáveis. Muitas vezes, um pequeno

número destas variáveis contém as informações químicas mais relevantes, enquanto que a maioria das variáveis adiciona pouco ou nada à interpretação dos resultados em termos químicos. A decisão sobre quais variáveis são importantes é feita, geralmente, com base na intuição química ou na experiência, ou seja, baseado em critérios que são mais subjetivos que objetivos (Kowalski, 1984).

A redução de variáveis através de critérios objetivos, permitindo a construção de gráficos bidimensionais contendo maior informação estatística, pode ser conseguida através da PCA. Também é possível construir agrupamentos entre as amostras de acordo com suas similaridades, utilizando todas as variáveis disponíveis, e representá-los de maneira bidimensional através de um dendrograma, utilizando a HCA. Estas duas análises são técnicas de estatística multivariada complementares que têm grande aceitação na análise de dados químicos (Kowalski, 1984; Brown, 1995).

Os algoritmos PCA e HCA procuram correlacionar todas as variáveis, a fim de encontrar alguma relação entre elas. Se em alguma linha de produção for identificada a formação de algum produto indesejável e ele, após o tratamento matemático, encontrar-se correlacionado com outro produto no meio da linha de produção, pode-se encontrar uma solução para tal correlação (Fidêncio, 2001).

A PCA é um método de compressão de dados que consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados. Em outras palavras, as n -variáveis originais geram, através de suas combinações lineares, n -componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2, que por sua vez tem mais informação estatística que a componente principal 3 e assim por diante. Para os casos de conjuntos de espectros, consideramos inicialmente matriz de dados \mathbf{X} ($m \times n$), sendo que m corresponde ao número de amostras (espectros) e n o número de variáveis (frequências do espectro) (Ferreira, 2002).

A HCA interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma onde as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si. A suposição básica de sua interpretação é esta: quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras. Para proceder esta classificação se faz necessária a definição matemática do conceito de

proximidade: distância entre dois objetos (Kowalski & Bender, 1972). Para estabelecer este conceito, geralmente utiliza-se a distância Euclidiana que é a maneira matematicamente mais simples, calculada de acordo com a EQUAÇÃO 1

$$\text{Equação (1)} \quad d_{ab} = \sqrt{\sum_{i=1}^m (x_{ai} - x_{bi})^2}$$

onde **m** corresponde ao número de variáveis selecionadas. Depois da distância entre os pares terem sido calculadas, as duas amostras mais similares são combinadas para formar um novo ponto. A matriz de dados é, então, atualizada, para incluir informações sobre a similaridade entre os novos pontos e de todos os outros pontos do conjunto de dados (Kowalski & Bender, 1972). O valor da similaridade, é, então, calculado pela EQUAÇÃO 2,

$$\text{Equação (2)} \quad S_{ab} = 1 - \frac{d_{ab}}{d_{m\acute{a}x}}$$

d_{ab} corresponde à distância entre os pontos **a** e **b**, e $d_{m\acute{a}x}$ é a distância máxima entre qualquer par de pontos (amostras).

Existem vários métodos para calcular as distâncias entre as amostras e os agrupamentos hierárquicos, sendo frequentemente utilizado o método de construção flexível de dendrogramas, representado pela EQUAÇÃO 3:

$$\text{Equação (3)} \quad d_{ab \Rightarrow c} = (0,625d_{ac}^2 + 0,625d_{bc}^2 + 0,25d_{ab}^2)^{1/2}$$

Os dendrogramas são especialmente úteis na visualização de semelhanças entre amostras ou objetos onde a representação de gráficos convencionais não é possível. Os dendrogramas são construídos diretamente por todos os programas estatísticos que fazem classificação dos dados através de agrupamento hierárquico (*Hierarchical Analysis ou Cluster Analysis*) (Malinowski & Howery, 1980; Kowalski, 1984).

A construção dos modelos passa então por uma etapa de seleção das variáveis que irão servir de matriz de dados para a geração de diversos fatores a partir dos quais são criados modelos de calibração. A calibração multivariada normalmente é utilizada para correlacionar informação espectral com a propriedade que está sendo estudada. Uma das técnicas de calibração multivariada mais utilizada para se obter esta correlação é o PLS (Geladi & Kowalski, 1986; Brereton, 2000).

O método PLS é análogo ao método PCR. No método PCR as componentes principais são determinadas objetivando descrever, o melhor possível, a variância na variável independente. No método PLS, além da variância das variáveis independentes, a correlação entre as variáveis latentes e as variáveis dependentes são computadas. Para isto, no método PLS dois modelos são construídos, representados pela EQUAÇÃO 4, um para as variáveis independentes \mathbf{X} e outro para as variáveis dependentes \mathbf{Y} ,

$$\text{Equação (4)} \quad \begin{aligned} \mathbf{X} &= \mathbf{TP}^t + \mathbf{E} = \sum t_f p_f^t + \mathbf{E} \\ \mathbf{Y} &= \mathbf{UQ}^t + \mathbf{F} = \sum t_f q_f^t + \mathbf{F} \end{aligned}$$

onde \mathbf{X} é a matriz de dados onde cada linha corresponde a uma amostra e as colunas as variáveis; \mathbf{Y} é a matriz de respostas (por exemplo, concentração do analito); os elementos das matrizes de \mathbf{T} e \mathbf{U} são os "scores" para a matriz de dados e respostas, respectivamente, e os elementos \mathbf{P} e \mathbf{Q} são os "loadings", \mathbf{E} e \mathbf{F} são os respectivos resíduos (erros), ou seja, a falta de ajuste do modelo. O sobrescrito t indica matriz transposta. Uma relação entre os dois blocos (variáveis independentes \mathbf{X} e variáveis dependentes \mathbf{Y}) pode ser realizada correlacionando simultaneamente os "scores" dos blocos \mathbf{X} e \mathbf{Y} (Geladi & Kowalski, 1986; Vandeginste et al., 1998).

Basicamente, o método PLS pode ser dividido em três etapas. A primeira consiste em montar as matrizes de dados \mathbf{X} a partir dos dados espectrais (variáveis independentes) e \mathbf{Y} a partir das propriedades de interesse (variáveis dependentes); a segunda etapa consiste em eliminar informações que não são relevantes ao sistema através de combinações lineares das colunas da matriz \mathbf{X} feita pela análise das componentes principais; a terceira e última etapa consiste em obter-se a relação entre as matrizes \mathbf{X} (reduzida pela PCA) e matriz \mathbf{Y} que possui a propriedade de interesse (Geladi & Kowalski, 1986; Vandeginste et al., 1998; Brereton, 2000).

O PLS tem sido uma das técnicas de calibração multivariada mais utilizada em química analítica. Vários trabalhos descritos na literatura utilizam esta ferramenta em conjunto com espectroscopia vibracional para realização de alguns estudos. Dentre estes, pode-se citar o estudo de Kelly et al. (2004), utilizando reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier*

Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance - FTIR-ATR) para detecção de adulterações em amostras de mel.

Sivakesava & Irudayaraj (2002) identificaram mel adulterado utilizando espectroscopia no infravermelho médio e análise discriminante linear; o PLS foi utilizado como ferramenta para redução de variáveis (espectro). E alguns outros descritos na literatura onde são utilizadas a espectroscopia vibracional e PLS para caracterização de amostras de mel (Qiu et al., 1999; Sivakesava & Irudayaraj 2001(a,b); Dvash et al., 2002).

Uma vez feita a seleção das variáveis e escolha do modelo, estes devem ser submetidos à validação estatística. O primeiro passo é a verificação do grau de ajuste do modelo através dos cálculos do coeficiente de determinação (R^2_{cal}), o número de variáveis latentes, os valores do erro quadrático padrão de validação cruzada (*Root Mean Square Error of Cross Validation* - RMSECV), o erro quadrático padrão de predição (*Root Mean Square Error of Prediction* - RMSEP) e o erro padrão de calibração (*Square Error of Calibration* - SEC), que são parâmetros que indicam a qualidade de um modelo multivariado (Fidêncio, 2001).

Outro parâmetro que se costuma utilizar para acompanhar o nível de informação fornecido pelos fatores é a Variância Acumulada (VA) que mede, em percentagem, a quantidade de variância incluída em cada fator criado pelo método PLS. Normalmente, a maior variância é apresentada pelo primeiro fator com decréscimo rápido da variância nos fatores subsequentes (Ferreira et al., 1999).

Além das vantagens já descritas na utilização da calibração multivariada, como o tempo, custo e rapidez, a utilização destes modelos pode, após implementação na rotina, tanto industrial como laboratorial, facilitar o acompanhamento de processos. Outra vantagem, relacionada ao controle de qualidade, é que, desde que seja um modelo robusto, ele pode ser usado sem a necessidade de calibração contínua, ou seja, a simples certificação de um padrão pode verificar se o modelo está respondendo bem ao sistema. Essa medida acarreta em um sensível ganho de tempo e diminuição de custos (Fidêncio, 2001).

Foi realizado um acompanhamento do processo de produção por fermentação de um antibiótico por espectroscopia no infravermelho utilizando a análise quimiométrica como ferramenta para localizar problemas em cada etapa

deste processo. Foi observado que é possível com a PCA, identificar qual deveria ser o resultado da fermentação. Ademais, os autores concluíram que, depois de corrigidos os problemas encontrados, houve melhora na qualidade do produto final (Lopes et al., 2004).

Em outro estudo, Razic et al. (2005), realizaram a determinação de 10 elementos químicos por espectrometria de absorção e emissão atômica e emissão ótica em 26 amostras de ervas medicinais. Após, os autores realizaram uma PCA e conseguiram associar as amostras, com base no teor de alguns metais, com as possíveis fontes de contaminação.

Em microbiologia, a aplicação de análise multivariada de dados no infravermelho usando as absorbâncias associadas às frequências geradas a partir de espectros por transmissão, reflexão total atenuada ou reflexão difusa tem permitido a diferenciação, classificação e identificação de diversos gêneros de isolados de bactérias e de algumas leveduras, usando diferentes métodos estatísticos de classificação de amostras, tais como PCA, HCA, Análise pelo Índice de Similaridade (*Soft Independent Modeling of Class Analogy - SIMCA*), produto de Pearson, distância Euclidiana, distância de Mahalanobis e algoritmo de Ward (Naumann, 2000; Mariey et al., 2001).

Mais recentemente tem se verificado a possibilidade de utilização de quimiometria associada à DRIFTS para a previsão de atividade antifúngica de fenóis, ácidos salicílicos, 2-fenilbenzoxazolas e cumarinas em *F. pedrosoi* ATCC 46428 (Corbellini et al., 2005). Por esta mesma técnica foi possível também prever a atividade fungistática de itraconazol em diferentes agentes de cromoblastomicose (Lux, 2004). Um trabalho recente proposto por Allen et al. (2004) aliando a quimiometria à espectrometria de massas permitiu a identificação e classificação de diferentes antifúngicos quanto ao seu mecanismo de ação em *Saccharomyces cerevisiae*.

Armenta et al. (2005), desenvolveram um modelo de calibração multivariada utilizando espectroscopia de infravermelho com ATR para acompanhar o processo de fermentação do abacaxi, utilizando apenas uma pequena fração do espectro (907 a 1531 cm^{-1}) para a construção do modelo. Linker et al. (2005), utilizaram espectroscopia por FTIR-ATR para análise de nitratos em solos, associados à métodos quimiométricos, observando alta correlação entre a concentração de nitratos e os espectros obtidos.

Este acentuado crescimento da utilização da espectroscopia no infravermelho médio nos últimos anos e o contínuo desenvolvimento de métodos no infravermelho próximo se deve, no nosso entendimento, à procura de métodos analíticos rápidos e limpos. Neste caso evitando-se o emprego de reagentes agressivos ou a geração de resíduos danosos ao ambiente (Ferrão et al., 2004).

O uso da análise por reflexão difusa no infravermelho médio e próximo pode satisfazer os dois quesitos acima, pois requerem pouco ou nenhum tratamento das amostras. Entretanto, é imperioso reconhecer que a análise multivariada de dados foi uma ferramenta valiosa que contribuiu para o emprego mais extensivo daquelas técnicas. Neste contexto, a aparição de programas computacionais disponíveis comercialmente, que podem ser utilizados sem a necessidade de conhecimento mais aprofundado do tema, impulsionou o estudo de novos métodos analíticos usando a região do infravermelho (Ferrão et al., 2004).

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Avaliar, classificar e prever a atividade antifúngica *in vitro* de extratos etanólicos de própolis em relação a amostras de *F. pedrosoi*.

3.2- Objetivos específicos

Aplicar ferramentas quimiométricas para classificar e selecionar amostras de própolis a serem testadas em amostras de *F. pedrosoi*;

Propor modelos de previsão da atividade antifúngica de própolis frente a amostras de *F. pedrosoi*;

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de própolis em amostras de *F. pedrosoi* selecionadas através do método de microdiluição em caldo, com a finalidade de atividade fungicida/fungistática;

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de própolis em amostras de *F. pedrosoi* selecionadas através do método de diluição em ágar, buscando encontrar regiões de concentrações que justifiquem o uso dos mesmos.

4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, A. H.; SHERMAN, W. F. Kramers-kroning type analysis of short spectral range reflection spectra. *Vibrational Spectroscopy*, Amsterdam, 13 (2), 133 - 142, 1997.

ALLEN, J.; HAZEL, M. D.; DAVID, B.; ROWLAND, J. J.; STEPHEN, G. O.; KELL, D. Discrimination of modes of action of antifungal substances by use of metabolic footprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (10), 6157 - 6165, 2004.

ALMEIDA, E. C.; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *Journal of Venomous and Animals Toxins*, 8 (2), 191 - 212, 2002.

ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; TRAVASSOS, L. R.; ANGLUSTER, J.; SOUZA, W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. *Mycopathologia*, 119 (1), 17 - 23, 1992.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; GUARDIO, M. D. L.; RONDEAU, P. Attenuated Total Reflection-Fourier transform infrared analysis of the fermentation process of pineapple. *Analytical Chemical, Acta* 545, 99 - 106, 2005.

BANKOVA, V. S.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations in essential oil from Brazilian propolis. *Journal of Essential Oil Research*, 10, 693 - 696, 1998.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31 (1), 3 - 15, 2000.

BORELLI, D. A method for producing chromomycosis in mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 66 (5), 793 - 794, 1972.

BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *Analyst*, 125 (11), 2125 - 2154, 2000.

BROWN, S. D. Chemical systems under indirect observation: Latent properties and chemometrics. *Applied Spectroscopy*, 49 (12), 14A - 31A, 1995.

CALIGIORNE, R. B.; RESENDE, M. A.; OLIVEIRA, R. C. B. W.; VALÉRIO, H. M.; CORDEIRO, R. A.; AZEVEDO, V. Fungos dematiáceos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 11, ano 2, 22 - 25, 1999.

CARDONA-CASTRO, N.; AGUDELO-FLÓREZ, P. Development of a chronic chromoblastomycosis model in immunocompetent mice. *Medical Mycology*, 37, 81 - 83, 1999.

CARDONA-CASTRO, N.; AGUDELO-FLÓREZ, P.; RESTREPO-MOLINA, R. Chromoblastomycosis murine model and in vitro test to evaluate the sensitivity of *Fonsecaea pedrosoi* to ketoconazole, itraconazole and saperconazole. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, 91 (6), 779 - 784, 1996.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, S1 - S6, 2002.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Propolis from southeastern and northeastern of Brazil: the influence of seasonality in antibacterial activity and phenolic composition. *Química Nova*, 30 (7), 1512 - 1516, São Paulo, 2007.

CHAILLOU, L. L.; HERRERA, H. A.; MAIDANA, J. F. Estudio del propoleos de Santiago del Estero, Argentina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24 (1), 11 - 15, 2002.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 105 - 108, 2004.

CHATTOTADHYAY, D.; ARUNACHALAM, G.; MANDAL, A. B.; SUR, T. K.; MANDAL, S. C.; BHATTACHARYA, S. K. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 82, 229 - 237, 2002.

CORBELLINI, V. A.; SCROFERNEKER, M. L.; STEFANI, V. Correlação quantitativa entre estrutura e atividade antifúngica de fenóis e ácidos salicílicos sobre *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428. *Tecno-Lógica*, 9 (2), 95 - 101, 2005.

CORBELLINI, V. A.; SCROFERNEKER, M. L.; CARISSIMI, M.; SANTOLIN, L. D. Delayed-type hypersensitivity response to crude and fractionated antigens from *Fonsecaea pedrosoi* CMMI 1 grown in different culture media. *Mycopathologia*, 162 (1), 51 - 55, 2006.

CUCÉ, L. C.; WROLCLAWSKI, E. L.; SAMPAIO, S. A. P. Treatment of paracoccidioidomycosis, candidiasis, chromomycosis, lobomycosis, and mycetoma with ketoconazole. *International Journal of Dermatology*, 19, 405 - 408, 1980.

DABOIT, T. C.; STOPLIGLIA, C. D. O.; SORRENTINO, J. M.; POSER, G. V.; SCROFERNEKER, M. L. Avaliação da atividade antifúngica de *Pterocaulon alopecuroides* em agentes da cromoblastomicose. In: V Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife. *Anais do V Congresso Brasileiro de Micologia*, 1, 265 - 265, 2007.

D'ÁVILA, S. C. G. P.; PAGLIARI, C.; DUARTE, M. I. S. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. *Mycopathologia*, 156 (2), 51 - 60, 2002.

DVASH, L.; AFIK, O.; SHAFIR, S.; SCHAFFER, A.; YESELSON, Y.; DAG, A.; LANDAU, S. Determination by near-infrared spectroscopy of perseitol used as a marker for the botanical origin of avocado (*Persea americana Mill*) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (19), 5283 - 5287, 2002.

ESPINEL-INGROFF, A.; SHADOMY, S.; DIXON, D.; GOLDSON, P. Exoantigen test for *Cladosporium bantianum*, *Fonsecaea pedrosoi* and *Phialophora verrucosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 23 (2), 305 - 310, 1986.

ESTERRE, P.; JAHEVITRA, M.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 7 (3), 497 - 500, 2000.

FAHRENFORT, J. Attenuated total reflectância, a new principle for production of useful infrared reflection spectra of organic compounds. *Spectrochemical, Acta* 17, 698 - 709, 1961.

FERNANDES, F. F.; DIAS, A. L. T.; RAMOS, C. L.; IKEGAKI, M.; SIQUEIRA, A. M.; FRANCO, M. C. The *in vitro* antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 49 (2), 93 - 95, 2007.

FERRÃO, M. F. Técnicas de Reflexão no Infravermelho Aplicadas na Análise de Alimentos. *Tecno-Lógica*, Santa Cruz do Sul, 5, 63 - 85, 2001.

FERRÃO, M. F.; CARVALHO, C. W.; MÜLLER, E. I.; DAVANZO, C. U. Simultaneous determination of ash content and protein in wheat flour using infrared reflection techniques and partial least-squares regression (PLS). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 24 (3), Campinas, 2004.

FERREIRA, M. M. C. Multivariate QSAR. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, São Paulo, 13 (6), 742 - 753, 2002.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, 22 (5), 724 - 731, 1999.

FIDÊNCIO, P. H. Análise de solos por espectroscopia no infravermelho próximo e aplicação de métodos quimiométricos. *Tese de Doutorado*, UNICAMP, 2001.

FUCHS, J.; PECHER, S. Partial suppression of cell mediated immunity in chromoblastomycosis. *Mycopathologia*, 119 (2), 73 - 76, 1992.

FULLER, M. P. E.; GRIFFITHS, P. R. Diffuse Reflectance Measurements by Infrared Fourier Transform Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 50, 1906 - 1910, 1978.

GELADI, P. E.; KOWALSKI, B. R. Partial Least-Squares Regression: A Tutorial. *Analytical Chemical, Acta*, 185, 1 - 17, 1986.

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

GIMENES, V. M. F.; CRIADO, P. R.; MARTINS, J. E. C.; ALMEIDA, S. R. Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. *Mycophatologia*, 162 (2), 97 - 101, 2006.

GIMENES, V. M. F.; SOUZA, M. G.; FERREIRA, K. S.; MARQUES, S. G.; GONÇALVES, A. G.; SANTOS, D. V. C. L.; PEDROSO E SILVA, C. M.; ALMEIDA, S. R. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes and Infections*, 7 (4), 708 - 713, 2005.

GRANADE, T. C.; ARTIS, W. M. Antimycotic susceptibility testing of dermatophytes in microcultures with a standardized fragmented mycelial inoculum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 725 - 729, 1980.

GUPTA, A. K.; TABORDA, P. R.; SANZOVO, A. D. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Medical Mycology*. 40, 529 - 534, 2002.

HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. C. *Análise multivariada de dados*. Ed. Bookman. São Paulo - SP, 5ª edição, 593, 2005.

HARRICK, N. J. Multiple reflection cells for internal reflection spectrometry. *Analytical Chemistry*, 36, 188 - 191, 1964.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96 (2-3), 67 - 202, 2002.

HOWARD, R. J.; FERRARI, M. A.; ROACH, D. H.; MONEY, N. P. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88 (24), 11281 - 11284, 1991.

IWATSU, T.; MIYAJI, M.; TAGUCHI, H.; OKAMOTO, S.; KURITA, N. Skin test-active substance prepared from culture filtrate of *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycopathologia*, 67 (2), 101 - 105, 1979.

IWATSU, T.; MIYAJI, M.; OKAMOTO, S. Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi* from nature in Japan. *Mycopathologia*, 75, 149 - 158, 1980.

JORGENSEN, J. H.; SWENSON, J. M.; TENOVER, F. C. Development of interpretive criteria and quality control limits for broth microdilution and disk diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 2448 - 2459, 1994.

JUNIOR, F. A.; LEOMIL, L.; FERNANDES, A. A. H. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. *Journal of Venomous and Animals Toxins*, 7 (2), 173 - 182, 2001.

KARAMAN, I.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖGÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 85, 231 - 235, 2003.

KELLY, J. F. D.; DOWNEY, G.; FOURATIER, V. Initial study of honey adulteration by sugar solutions using midinfrared (MIR) spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (1), 33 - 39, 2004.

KHAN, Z. K.; KATIYAR, R. Potent antifungal activity of garlic (*Allium sativum*) against experimental murine disseminated cryptococcosis. *Pharmaceutical Biology*, 38, 87 - 100, 2000.

KOROLKOVAS, A. *Dicionário Terapêutico Guanabara*, Ed. Guanabara Koogan, cap. 18, 18.14 - 18.19, 2004.

KORTING, H. C.; OLLERT, M.; AVECK, D. German Collaborative Dermatophyte Drug Susceptibility Study Group. Results of German Multicenter Study of Antimicrobial Susceptibilities of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* Strains Causing Tinea Unguium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (5), 1206 - 1208, 1995.

KOWALSKI, B. R.; BENDER, C. F. Pattern recognition. A powerful approach to interpreting chemical data. *Journal of the American Chemical Society*, Washington, 94, 5632 - 5639, 1972.

KOWALSKI, B. R. Chemometrics: Mathematical and Statistics in Chemistry. *NATO ASI series. Série C*, 138. D. Riedel Publishing Company, Dordrecht, 1984.

KÖNIG, B. Plants sources of propolis. *Bee World*, 66, 136 - 139, 1985.

KUMAZAWA, S.; HAYASHI, K.; KAJIYA, K.; ISHII, T.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Studies of the constituents of Uruguayan propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4777 - 4782, 2002.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. *Micologia Médica - Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8^o edição, São Paulo - SP, Sarvier, 1991.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. *Guia para identificação de interesse médico - Fungos, Actinomicetos e Algas*. São Paulo - SP; Sarvier, 1998.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; MELO, N. T. *Tratado de Micologia Médica*. 9^a edição, São Paulo - SP, Sarvier, cap. 18, 451 - 458, 2002.

LINKER, R.; SHMULEVICH, I.; KENNY, A.; SHAVIV, A. Soil identification and chemometrics for direct determination of nitrate in soils using FTIR-ATR midinfrared spectroscopy. *Chemosphere*, 61, 652 - 658, 2005.

LIU, W.; LIONAKIS, M. S.; LEWIS, R. E.; WIEDERHOLD, N.; MAY, G. S.; KONTOYIANNIS, D. P. Attenuation of itraconazole fungicidal activity following preexposure of *Aspergillus fumigatus* to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (11), 3592 - 3597, 2003.

LOPES, J. A.; COSTA, P. F.; ALVES, T. P.; MENEZES, J. C. Chemometrics in bioprocess engineering: process analytical technology (PAT) applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 74, 269 - 275, 2004.

LUX, L. L. Aplicação de ferramentas quimiométricas para a previsão de sensibilidade de amostras de fungos agentes de cromoblastomicose a antifúngicos de uso sistêmico. *Trabalho de Conclusão de Curso de Química Industrial*, UNISC, 2004.

MAARET, T. B. S. Propolis: nutritional consultants group. *Beehive Botanicals*, 3, 1 - 3, 2001.

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 79 (6), 647 - 664, 2004.

MALINOWSKI, E. R.; HOWERY, D. G. Factor Analysis in Chemistry. *John Wiley & Sons*, Inc. New York, 1980.

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

MARIEY, L.; SIGNOLLE, J. P.; AMIEL, C.; TRAVERT, J. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, 26, 151 - 159, 2001.

MARQUES, S. G.; SILVA, C. M. P.; SALDANHA, P. C.; REZENDE, M. A.; VICENTE, V. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; COSTA, J. M. L. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the Babassu Cocomet (*Orbignya phalerata* Martius) in

the Amazon Region of Maranhão Brazil. *Japanese Journal of Medical Mycologic*, 47 (4), 305 - 311, 2006.

MATTE, S. M. W.; LOPES, J. O.; MELO, I. S.; ESPADIM, L. E. R.; PINTO, M. S. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30 (4), 36 - 42, 1997.

MELLADO, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDEL, J. L. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 20 (10), 523 - 530, 2002.

MÉIS, J.; PETROU, M.; BILLE, J.; ELLIS, D. Global Antifungal Surveillance Group. A global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to Fluconazole by disk diffusion. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 36, 215 - 223, 2000.

MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C. N.; FERREIRA, M. M. C. Application of exploratory analysis to the differentiation of vegetables. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2, 73 - 79, 1999.

MÜLLER, F. M. C.; STAUDIGEL, A.; SALVENMOSER, S.; TREDUP, A.; MILTENBERGER, R.; HERRMANN, J. V. Cross-resistance to medical and agricultural azole drugs in yeasts from the oropharynx of human immunodeficiency virus patients and from environmental Bavarian vine grapes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (8), 3014 - 3016, 2007.

NATANELLO, A.; AMI, D.; BROCCA, S.; LOTTI, M.; DOGLIA, M. S. Secondary structure, conformational stability and glycosylation of a recombinant *Candida rugosa* lipase studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemical Journal*, 385, 511 - 517, 2005.

NAUMANN, D.; LABISCHINSKI, H.; GIESBRECHT, P. The characterization in microorganism by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), in modern

techniques for rapid microbiological analysis. Ed. W. H. Nelson, VCH, New York, 43 - 96, 1991.

NAUMANN, D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Meyers, R.A (Ed.) Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 102 - 131, 2000.

NEDER, R. N. *Microbiologia: Manual de laboratório*, Ed. Nobel - São Paulo - SP, 387, 1992.

NEELY, M. N.; GHANNOUM, M. A. The exciting future of antifungal therapy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19, 887 - 914, 2000.

NIMRICHTER, L.; BARRETO-BERGTER, E.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; KNEIPP, L. F.; MAZZI, M. T.; SALVE, P.; FARIAS, S. E.; WAIT, R.; ALVIANO, C. S.; RODRIGUES, M. L. A monoclonal antibody to glucosylceramide inhibits the growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages. *Microbes and Infections*, 6 (7), 657 - 665, 2004.

NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Defense mechanisms of mice against *Fonsecaea pedrosoi* infection. *Mycopathologia*, 76, 155 - 166, 1981.

NORRIS, K. P. Infrared spectroscopy and its application to microbiology. *Journal of Hygiene*, 57, 326 - 345, 1959.

NOTHENBERG, M. Desafio das pesquisas com própolis. *Química e derivados*, 32 (348), 24 - 28, 1997.

OGAWA, M. M.; ALCHORNE, M. M. A.; BARBIERE, A.; CASTIGLIONI, M. V.; PENNA, A. P. B.; TOMIMORI-YAMASHITA, J. Lymphoscintigraphic analysis in chromoblastomycosis. *International Journal of Dermatology*, 42 (8), 622 - 625, 2003.

OLINGER, J. M. E.; GRIFFITHS, P. R. Effects of Sample Dilution and Particle Size/Morphology on Diffuse Reflection Spectra of Carbohydrate Systems in the Near- and Mid-Infrared. Part I: Single Analytes. *Applied Spectroscopy*, 47, 687 - 694, 1993(a).

OLINGER, J. M. E.; GRIFFITHS, P. R. Effects of Sample Dilution and Particle Size/Morphology on Diffuse Reflection Spectra of Carbohydrate Systems in the Near- and Mid-Infrared. Part II: Durum Wheat. *Applied Spectroscopy*, 47, 695 - 701, 1993(b).

ORSI, R. O.; FUNARI, S. R. C.; SOARES, A. M. V. C.; CALVI, S. A.; OLIVEIRA, S. L.; SFORCIN, J. M. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous and Animals Toxins*, 6 (2), 205 - 219, 2000.

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

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia Alimentos*, 18 (3), 313 - 318, 1998.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybee Science*. Tamagawa , Japan, 21, 85 - 90, 2000.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Evaluation on ethanol extracts of propolis from Brazil and Korea by physicochemical and biological methods. *Korean Journal of Apiculture*, 13, 27 - 34, 1998.

PASIKATAN, M. C.; HAQUE, E.; SPILLMAN, C. K.; STEELE, J. L.; MILLIKEN, G. A. Granulation Sensing of first-break ground wheat using a Near-Infrared Reflectance Spectrometer: studies with soft red winter wheats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 151 - 157, 2003.

PASSOS, X. S.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. R. R. Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) against *Cryptococcus neoformans*. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35 (6), 01 - 05, 2002.

PEREIRA, A. D.; BICALHO, B.; RADLER, F.; NETO, D. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. *Apidologie*, 34 (3), 291 - 298, 2003.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, 25, 1 - 15, 2002.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 2ª edição, São Paulo - SP, Atheneu Editora, 325, 2003.

QIU, P. Y.; DING, H. B.; TANG, Y. K.; XU, R. J. Determination of chemical composition of commercial honey by near-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (7), 2760 - 2765, 1999.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, D. A.; SOBERÓN, J. R.; SGARIGLIA, M. A.; VATTUONE, M. A. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 103 - 110, 2006.

RABANAL, R. M.; ARIAS, A.; PRADO, B.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; SÁNCHEZ-MATEO, C. C. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 287 - 292, 2002.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*, Ed. Guanabara Koogan - Rio de Janeiro - RJ, 3ª edição, 692, 1997.

RAZIC, S.; ONJIA, A.; DOGO, S.; SLAVKOVIC, L.; POPOVIC, A. Determination of metal content in some herbal drugs - empirical and chemometric approach. *Talanta*, 67 (1), 233 - 239, 2005.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceuticals applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1109 - 1143, 2005.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESQINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (4), 643 - 658, 2001.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 73, 21 - 29, 2002.

SALGADO, C. G.; SILVA, J. P.; DINIZ, J. A. P.; SILVA, M. B.; COSTA, P. F.; TEIXEIRA, C.; SALGADO, U. I. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 46 (1), 33 - 36, 2004.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. *Dermatologia*, Ed. Artes Médicas Ltda. - São Paulo - SP, 1155, 1998.

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

SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C.; NOVELLI, E. L. B. Serum biochemical determinations of propolis - treated rats. *Journal of Venomous and Animals Toxins*, 1 (1), 31 - 37, 1995.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*, Ed. Guanabara Koogan - Rio de Janeiro - RJ, 287, 1999.

SILBER, J. G.; GOMBERT, M. E.; GREEN, K. M.; SHALITA, A. R. Treatment of chromomycosis with ketoconazole and 5-fluorocytosine. *Journal of American Academy of Dermatology*, 8 (2), 236 - 238, 1983.

SILICI, S.; KAFTANOGLU, O. Antimicrobial analysis of propolis samples from different regions of Turkey. *Uludag Bee Journal*, 3, 16 - 18, 2003.

SILICI, S.; KOC, A. N. Comparative study of in vitro methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 318 - 324, 2006.

SILVA, J. P.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, W.; TRAVASSOS, L. R.; DINIZ, J. A. P.; ROZENTAL, S. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 33 (1), 63 - 69, 2002.

SILVA, J. P.; SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia*, 143 (3), 171 - 175, 1999.

SIMIĆ, A.; SOKOVIC, M.; RISTIC, M.; GRUJIC-JOVANOVIC, S.; VUKOJEVIC, J.; MARIN, P. The chemical composition of some *Lauraceae* essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*, 18, 713 - 717, 2004.

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Classification of simple and complex sugar adulterants in honey by midinfrared spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology*, 37 (4), 351 - 360, 2002.

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Prediction of inverted cane sugar adulteration of honey by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Science*, 66 (7), 972 - 978, 2001(a).

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Detection of inverted but sugar adulteration of honey by FTIR spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 81 (8), 683 - 690, 2001(b).

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Principles of instrumental analysis. In: Harcourt Brace & Company. 5th edition. Philadelphia: Harcourt Brace & Company. *Applications of Infrared Spectrometry*, cap. 17, 404 - 428, 1998.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de análise instrumental*, 5ª edição. Editora Artmed, Porto Alegre, cap. 16, 2002.

SOARES, M. M. S. R.; CURY, A. E. *In Vitro* Activity of Antifungal and Antiseptic Agents against Dermatophyte Isolates from Patients with Tinea Pedis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32 (2), 130 - 134, 2001.

STEUER, B.; SCHULZ, H. Near-infrared Analysis of Fennel (*Foeniculum vulgare* Miller) on Different Spectrometers - Basic Considerations for a Reliable Network. *Phytochemical Analysis*, 14, 285 - 289, 2003.

VAN DE VOORT, F. R.; ISMAIL, A. A. Proximate Analysis of Foods by Mid-FTIR Spectroscopy. *Trends in Food Science and Technology*, 2, 13 - 17, 1991.

VANDEGINSTE, B. G. M.; MASSART, D. L.; BUYDENS, L. M. C.; JONG, S. D.; LEWI, P. J.; SMEYERS-VERBEKE, J. *Handbook of chemometrics and qualimetrics: part B: 1st edition*. Amsterdam: Vandeginste, B. G. M., Rutan S. C., 1998.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Alcoholic propolis extract: antimicrobial activity. *Ciência Rural*, 34 (1), 159 - 163, 2004.

VENUGOPAL, P. V.; VENUGOPAL, T. V. Disk Diffusion Susceptibility Testing of Dermatophytes with Allylamines. *International Journal of Dermatology*, 33 (10), 730 - 732, 1994.

VIDAL, M. S. M.; CASTRO, L. G. M.; CAVALECATE, S. C. Immunoprecipitation techniques and Elisa in the detection of anti-*Fonsecaea pedrosoi* in chromoblastomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45 (6), 315 - 318, 2003.

WILSON, R. H.; TAPP, H. S. Mid-Infrared Spectroscopy for Food Analysis: Recent New Applications and Relevant Developments in Sample Presentation Methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 85 - 93, 1999.

WOLD, S.; SJÖSTROM, M. Chemometric, present and future success. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 44, 3 - 14, 1998.

ZGODA, J. R.; PORTER, J. R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharmaceutical Biology*, 39, 221 - 225, 2001.

ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE O PERFIL FITOQUÍMICO DE PRÓPOLIS E A ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM *FONSECAEA PEDROSOI*

Claiison Jodel dos Santos^{1,2}, Tatiane Caroline Daboit^{1,2}, Luisa de Andrade Salles³, Gilsane von Poser³, Maria Lúcia Scroferneker^{1,2}.

¹Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Correspondente:

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua: Sarmiento Leite, 500

CEP: 90050-170

Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: +55 51 3308 3934

Fax: +55 51 3308 3121

E-mail: scrofern@ufrgs.br; gilsane@farmacia.ufrgs.br

RESUMO

Neste estudo, foi avaliada a atividade antifúngica de oito amostras de extratos etanólicos de própolis (EEP) provenientes de diferentes localidades do Rio

Grande do Sul, Brasil, na faixa de concentração de 156,25 a 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, frente a doze amostras de *Fonsecaea pedrosoi* e correlacionada a atividade apresentada por estas com sua composição fitoquímica. A determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) da própolis foi realizada segundo a metodologia de microdiluição em caldo, preconizada pelo documento M28-A do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A caracterização fitoquímica foi realizada através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e quantificação de compostos fenólicos totais. Os EEP's com melhor atividade antifúngica foram das localidades de Santo Antônio da Patrulha e Candelária, com CIM's que variaram entre 625 e 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente às amostras fúngicas analisadas. Nas amostras, em geral, foi verificada a presença de produtos com perfil cromatográfico de terpenóides, estando estes em maior concentração nas amostras mais ativas, além de produtos com perfil cromatográfico de flavonóides. Através desta técnica observou-se menor variedade de compostos nas amostras mais ativas quando comparadas com as demais própolis analisadas. A quantificação dos compostos fenólicos demonstrou que não há correlação entre a concentração e a atividade antifúngica. As amostras testadas de própolis apresentaram alto potencial antifúngico em *F. pedrosoi*, entretanto não foi encontrado um padrão fitoquímico que possa estar relacionado com a atividade.

Unitermos: cromoblastomicose, *Fonsecaea pedrosoi*, própolis, análise fitoquímica.

1. INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea crônica, de evolução lenta e progressiva, caracterizada pelo surgimento de lesões pápulo-descamativas que evoluem para lesões cutâneas variadas, decorrente da implantação traumática transcutânea de material orgânico contaminado pelos conídios e micélios de fungos pertencentes à família *Herpotrichelaceae*. Os principais causadores da cromoblastomicose são *Rhinocladiella aquaspersa*, *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa*, sendo o agente etiológico mais prevalente no Brasil, *Fonsecaea pedrosoi* (Matte et al., 1997; Sidrim & Moreira, 1999; Nimrichter et al., 2004; Gimenes et al., 2005; Corbellini et al., 2006; Marques et al., 2006).

Essas espécies de fungos caracterizam-se por apresentarem melanina em sua parede celular. Este pigmento, além de favorecer a capacidade fotoprotetora, permitindo ao fungo desenvolver-se em ambientes ensolarados, atua também como um dos fatores de virulência desses patógenos. Ainda não se conhece nenhum tratamento totalmente eficaz para eliminação desses agentes do organismo por eles afetado (Arenas, 1993; Caligiorne et al., 1999; Gupta et al., 2002; Sidrim & Rocha, 2004).

O interesse por novas alternativas terapêuticas em infecções microbianas tem aumentado, principalmente fazendo uso de produtos de origem natural. A própolis é uma substância resinosa, coletada pelas abelhas, de diversas partes da planta como broto, florais e exsudatos. Sua composição química é bastante complexa e variada, estando intimamente relacionada com a época, vegetação e área de coleta (Bankova et al. 1998; Park & Ikegaki, 1998; Junior et al., 2001; Castro et al., 2007, Lutosa et al., 2008).

De modo geral, a própolis contém em torno de 60% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 5% de óleos essenciais e o restante de grãos de pólen e microelementos que são misturados às secreções salivares da abelha (Bankova et al. 1998; Park & Ikegaki, 1998). A própolis apresenta propriedades imunomodulatória, antineoplásica, antioxidante, antiinflamatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, anticariogênica, antibacteriana e antifúngica que impulsionam sua utilização como tratamentos alternativos (Sforcin et al., 1995; Orsi et al., 2000; Vargas et al., 2004; Quiroga et al., 2006; Silici & Koc, 2006; Fernandes et al., 2007).

Apesar da atividade antifúngica da própolis já ter sido relatada há bastante tempo, estudos voltados para esta análise vêm sendo bastante difundidos na literatura. Seus efeitos terapêuticos têm sido atribuídos aos compostos fenólicos, principalmente flavonóides e ácidos fenólicos. Além destes compostos são encontrados na própolis ácidos aromáticos, aldeídos, alcoóis, cetonas, ésteres, aminoácidos, éter, terpenóides, esteróides, carboidratos, entre outros (Marcucci, 1995; Park & Ikegaki, 1998; Kumazawa et al., 2002).

A determinação da origem geográfica e, principalmente, a origem vegetal, aliada à fenologia da planta hospedeira, se faz importante no controle de qualidade e até mesmo na padronização das amostras de própolis para uma efetiva aplicação terapêutica (Marcucci, 1995; Bankova et al., 1998; Park & Ikegaki, 1998).

O objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antifúngica de amostras de própolis coletadas em diferentes localidades no Rio Grande do Sul contra *F. pedrosoi* e correlacionar a atividade apresentada por estas com sua composição fitoquímica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostra de fungos

Foram utilizadas doze amostras de agentes da cromoblastomicose *F. pedrosoi* 1, 19, 49, 855, 1420, 1509, 43456, 44327, 46422 ATCC, 46428 ATCC, 47748 e MA, do Laboratório de Fungos Patogênicos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, mantidos em ágar Sabouraud-dextrose à 35°C.

2.2 Obtenção da própolis e preparo dos extratos etanólicos

Foram coletadas oito amostras de diferentes localidades (Camaquã, Candelária, Caçapava do Sul, Cerro Branco, Lavras do Sul, Santo Antônio da Patrulha, São Sepé e Sobradinho) do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, no período de Janeiro a Fevereiro de 2007. Cada uma dessas amostras passou por um processo de extração. Foram pesadas 15g de própolis *in natura* e maceradas com 150mL de etanol 96°GL (Nuclear®). Após, a mistura foi passada por processo de filtração simples e submetida à rota-evaporação a 78°C e 105 RPM por 30

minutos. A resina ficou em repouso por 7 dias em dessecador com sílica para completa desidratação dos extratos de própolis.

2.3 Atividade antifúngica *in vitro*

A CIM dos extratos etanólicos de própolis (EEP's) foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo para fungos filamentosos, preconizada pelo documento M28-A do CLSI. As amostras de *F. pedrosoi* foram cultivadas em ágar batata dextrose à 35°C por 10 dias. A suspensão de esporos de cada cultura foi preparada em solução salina 0,9% e ajustada em espectrofotômetro, até a obtenção de transmitância 80-82% em $\lambda=530\text{nm}$. O inóculo foi preparado por diluição em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) e tamponado com MOPS (Sigma) até concentração final de 165mM e pH=7.0 para obtenção da concentração final $0,4-5,0 \times 10^4$ UFC/mL.

As soluções de própolis foram preparadas em dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração de $25000\mu\text{g mL}^{-1}$. Itraconazol (Janssen Pharmaceutical N. V. Beerse, Belgium) foi utilizado como controle positivo, e a solução-mãe ($1600\mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparada em DMSO. As soluções foram diluídas em meio RPMI, e as concentrações finais dos antifúngicos foram $160-0,0313\mu\text{g mL}^{-1}$ para itraconazol e $2500-156,25\mu\text{g mL}^{-1}$ para as amostras de própolis avaliadas. Após 5 dias de incubação à 35°C, a CIM foi determinada visualmente comparando com o controle de crescimento livre de antifúngicos. A CIM foi definida como a menor concentração do agente antifúngico que inibiu o crescimento dos fungos. O experimento foi realizado em triplicata.

2.4 Quantificação de compostos fenólicos totais

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais foi utilizado o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, com algumas modificações do método descrito por Singleton e Rossi (1965), e quercetina como substância de referência. Cada amostra foi medida em triplicata e a absorvância lida três vezes. As amostras de própolis (em diluição apropriada para a medida espectrofotométrica) foram oxidadas com 5mL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,2N (Merck® 2N diluído em água destilada 1:10) sendo essa reação neutralizada com volumes variáveis de solução saturada de carbonato de sódio (7,5%), necessário para completar o

volume final de reação em 10mL. Esta mesma mistura, substituindo-se a amostra por água destilada, foi utilizada como branco no espectrofotômetro. Após incubação por 60 minutos à temperatura ambiente, a absorvância da solução de coloração azul resultante do processo foi medida a $\lambda=765\text{nm}$ em espectrofotômetro UV-visível Hewlett Packard 8451A. A quantificação foi realizada com base em uma curva analítica de quercetina (soluções metanólicas nas concentrações de 0; 0,65; 1,30; 1,95; 3,25 e $6,5\mu\text{g mL}^{-1}$) e os resultados foram expressos como equivalentes de quercetina (EQ/g : miligramas de quercetina por grama de extrato).

2.5 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Em placas de sílica foram aplicadas as oito amostras de própolis já diluídas previamente. Quando as amostras foram diluídas com hexano utilizou-se o sistema eluente diclorometano e hexano na proporção 2:1, revelada com anisaldeído sulfúrico. Para as amostras diluídas com acetona utilizou-se os sistemas eluente diclorometano e reveladas em luz UV $\lambda=365\text{nm}$ e quando utilizado metanol para diluir os EPP's, o sistema eluente foi acetato de etila:metanol:água na proporção 100:13,5:10 e revelação com reagente natural.

3. RESULTADOS

A atividade antifúngica *in vitro* de EEP's de diferentes localidades do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, foi avaliada através da técnica de microdiluição em caldo em *F. pedrosoi*. De acordo com a TABELA 1, os EEP's apresentaram CIM's com valores entre 625 e $2500\mu\text{g mL}^{-1}$. Observou-se que as amostras mais ativas foram àquelas provenientes de Santo Antônio da Patrulha e Candelária e as menos ativas as de Caçapava do Sul e Sobradinho.

Tabela 1: Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* de EEP's e itraconazol utilizados nas diluições do método de microdiluição em caldo baseado no documento M28-A do CLSI, em *F. pedrosoi* (valores de CIM são expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$).

<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Camaquã	Candelária	Caçapava do Sul	Cerro Branco	Lavras do Sul
F.p. 1	1250	1250	2500	1250	2500
F.p. 19	2500	2500	2500	2500	2500
F.p. 49	1250	1250	1250	1250	1250
F.p. 855	2500	1250	2500	2500	2500
F.p. 1420	1250	1250	2500	1250	1250
F.p. 1509	2500	1250	2500	2500	2500
F.p. 43456	2500	2500	2500	2500	2500
F.p. 44327	2500	1250	2500	2500	1250
F.p. 46422 ATCC	1250	1250	1250	1250	1250
F.p. 46428 ATCC	1250	1250	1250	1250	1250
F.p. 47748	2500	1250	2500	2500	2500
F.p. MA	1250	1250	1250	1250	1250
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Santo Antônio da Patrulha	São Sepé	Sobradinho	Itraconazol	
F.p. 1	1250	1250	2500	0,5	
F.p. 19	1250	2500	2500	0,5	
F.p. 49	1250	1250	1250	0,25	
F.p. 855	1250	2500	2500	0,5	
F.p. 1420	625	1250	1250	0,125	
F.p. 1509	2500	2500	2500	0,125	
F.p. 43456	2500	2500	2500	0,5	
F.p. 44327	1250	2500	2500	0,25	
F.p. 46422 ATCC	625	1250	1250	0,125	
F.p. 46428 ATCC	625	1250	2500	0,5	
F.p. 47748	2500	2500	2500	0,5	
F.p. MA	625	1250	1250	0,125	

A quantificação dos compostos fenólicos totais presentes nos EPP's está representada no gráfico 1 (em mg quercetina/g extrato).

Gráfico 1: Quantificação dos compostos fenólicos totais presentes nos EEP's de amostras oriundas de diferentes localidades do Rio Grande do Sul, Brasil. (1) Cerro Branco; (2) Lavras do Sul; (3) Camaquã; (4) Santo Antônio da Patrulha; (5) Candelária; (6) Sobradinho; (7) São Sepé; (8) Caçapava do Sul.

Com relação às cromatografias, nas placas eluídas com diclorometano e hexano na proporção 2:1 pode-se verificar compostos com perfil cromatográfico de terpenóides em todas as amostras, estando em maior concentração nas amostras de Santo Antônio da Patrulha e Candelária, que foram as mais ativas. Nas placas eluídas com acetato de etila:metanol:água na proporção 100:13,5:10, pode-se verificar a presença de compostos com perfil cromatográfico de flavonóides nas amostras mais ativas. Pode-se observar, ainda, nas placas eluídas com diclorometano, uma menor variedade de compostos nas amostras mais ativas quando comparadas com as demais avaliadas.

4. DISCUSSÃO

De acordo com a metodologia empregada, o EEP da localidade de Santo Antônio da Patrulha apresentou CIM's que variaram entre $625\mu\text{g mL}^{-1}$ (33%), $1250\mu\text{g mL}^{-1}$ (42%) e $2500\mu\text{g mL}^{-1}$ (25%) para as amostras de *F. pedrosoi*. Os demais EEP's apresentaram CIM's que variaram entre $1250\mu\text{g mL}^{-1}$ e $2500\mu\text{g mL}^{-1}$.

É interessante observar que o EEP da localidade de Candelária teve suas CIM, na grande maioria (83%), de $1250\mu\text{g mL}^{-1}$. Já para os EEP's das localidades de Caçapava do Sul e Sobradinho as CIM's obtidas, na grande maioria (67%), de $2500\mu\text{g mL}^{-1}$. O itraconazol apresentou CIM's entre 0,125 e $0,5\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo estas de acordo com estudos anteriores (Bedout et al., 1997).

Silici & Koc (2006) utilizaram três métodos para avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do EEP, comparando com a atividade do itraconazol. Testaram quinze amostras de fungos (*Candida albicans* e *glabrata*, *Trichosporon sp.* e *Rhodotorula sp.*) isolados de pacientes portadores de micoses superficiais, onde a própolis apresentou resultados promissores. Fernandes et al. (1995), avaliaram a atividade antifúngica de EEP contra várias leveduras, entre as espécies testadas, *C. albicans* (CIM₉₀ de $3,8\text{mg mL}^{-1}$) e *C. tropicalis* (CIM₉₀ de $2,1\text{mg mL}^{-1}$)

apresentaram melhor sensibilidade que *C. parapsilosis* (CIM₉₀ de 10,9mgmL⁻¹) e *C. guilliermondii* (CIM₉₀ de 9,6mgmL⁻¹). Em nosso estudo obtivemos como CIM maior de 2500µgmL⁻¹ (2,5mgmL⁻¹), demonstrando que os extratos avaliados em nosso estudo possuem alto potencial antifúngico, visto a dificuldade de tratamento de infecções causadas por *F. pedrosoi* e as amostras avaliadas terem sido suscetíveis em concentrações muito reduzidas, quando comparadas com as obtidas para a maior parte das espécies de *Candida* avaliadas no estudo citado.

Hegazi et al. (2000), relataram a atividade de própolis contra *C. albicans* obtendo CIM entre 1200 a 6400µgmL⁻¹. Quando os extratos de própolis foram combinados com fármacos antifúngicos, houve um aumento na atividade antifúngica sobre esta cepa. Em outro estudo, a própolis apresentou um importante potencial antifúngico contra *Trichophyton* e *Microsporum* na presença de propilenoglicol, com o qual interage sinergicamente na concentração de 5% (Marcucci, 1995; Marcucci, 1996). Dobrowolski et al. (1991) informaram que própolis obtidas comercialmente (10mg) na forma de comprimidos ou grânulos possuem atividade antifúngica contra fungos *Trichosporon cutaneum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Piedraea hortae*, *Microsporum gypseum* e *Microsporum canis*.

Fernandes et al. (2007) analisaram uma amostra padrão de *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90112), utilizando para avaliação da atividade antifúngica, EEP com a técnica de macrodiluição em caldo, com diferentes concentrações do extrato (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2 and 1,6mgmL⁻¹), onde observaram CIM em 0,2mgmL⁻¹ e Concentração Fungicida Mínima (CFM) em 1,6mgmL⁻¹. Metzner et al. (1977), atribuíram à própolis, também efeitos fungicidas e fungistáticos, sendo o efeito fungicida relacionado à ocorrência do flavonóide pinocembrina. Nas amostras mais ativas temos compostos com perfil cromatográfico de flavonóides, podendo estar de alguma forma relacionada com a atividade.

Em termos de ação farmacológica, a principal classe de constituintes da própolis é a dos compostos fenólicos, sendo os flavonóides os mais encontrados, os quais representam uma barreira química de defesa contra microrganismos (bactérias, fungos e vírus), insetos e outros animais herbívoros (Marcucci, 1996). Apesar destes compostos serem os maiores responsáveis pelas atividades farmacológicas da própolis, todas as pesquisas realizadas com substâncias

isoladas de própolis demonstraram que nenhum componente isolado tem uma atividade maior do que o extrato total (Marcucci, 1996; Kujumgiev et al., 1999).

Apesar da metodologia de extração da própolis ainda permanecer sem padronização, pode-se afirmar por vários estudos que extratos de própolis possuem uma baixa toxicidade inata. Estes resultados já eram esperados já que os flavonóides possuem uma toxicidade relativamente baixa (Burdock, 1998). O grande problema da própolis, assim como de outros produtos obtidos de colméias, é que fatores associados à técnica de extração, metodologia de condução de ensaios, local de origem da própolis (flora), época do ano em que foi produzida e contaminantes podem ter influência sobre o maior ou menor grau de atividade biológica (Bianchini & Bedendo, 1998).

A diversidade de resultados obtidos para as diferentes amostras de nosso estudo está de acordo com vários autores que sugerem que a composição de flavonóides nos extratos etanólicos de própolis são qualitativamente e quantitativamente variados dependendo das diferenças regionais e que a quantidade e a qualidade dos flavonóides presentes nas própolis também variam dependendo da variedade da abelha que coleta a própolis, mesmo em uma mesma região (Koo & Park, 1997).

Um método cromatográfico analítico rápido para verificar o perfil dos componentes de um extrato de própolis se tornou imprescindível, como a CCD. Esta técnica requer apenas cromatoplacas, demonstrando ser útil para avaliar as amostras da própolis (Ackermann, 1991). Como a quantidade de flavonóides e compostos fenólicos não reflete corretamente a eficácia biológica das amostras de própolis e a qualidade dos mesmos em relação a *F. pedrosoi*, podemos sugerir que as metodologias analíticas devem estar obrigatoriamente associadas a ensaios biológicos no controle de qualidade de amostras de própolis, como sugerido por Banskota et al. (2000) e Bankova et al. (2000).

Através da quantificação de compostos fenólicos totais, não podemos correlacionar a atividade das amostras de própolis avaliadas com a quantidade dos primeiros, visto que no EPP de Santo Antônio da Patrulha tem aproximadamente a metade da quantidade do EPP de Candelária, sendo estas amostras com maior atividade. As amostras de própolis que possuem maiores teores de flavonóides e compostos fenólicos totais nem sempre apresentaram as maiores atividades biológicas diante de *F. pedrosoi*, comprovando que não só a

quantidade destes compostos presentes na própolis, mas principalmente a qualidade dos mesmos exerce uma grande influência nas atividades biológicas destas amostras.

5. CONCLUSÃO

De acordo com nosso estudo, verificou-se que as amostras de *F. pedrosoi* são sensíveis aos EEP's utilizados, principalmente a amostra *F. pedrosoi* MA. Diante do exposto, concluímos que os EEP's das localidades de Santo Antônio da Patrulha e Candelária, demonstraram um maior potencial antifúngico frente às amostras de *F. pedrosoi* analisadas. Os EEP's das localidades de Sobradinho e Caçapava do Sul apresentaram menor atividade antifúngica. As amostras avaliadas de própolis apresentaram alto potencial antifúngico em *F. pedrosoi*, entretanto não foi encontrado um padrão fitoquímico que possa estar relacionado com a atividade.

A cromoblastomicose ainda constitui um desafio terapêutico (Gupta et al., 2002). Poucos estudos de atividade antifúngica com agentes etiológicos da cromoblastomicose são relatados, portanto, apresenta-se a importância dessa investigação e da avaliação de novas possibilidades terapêuticas baseadas na utilização da própolis, com intuito de encontrar possíveis efeitos contra estes agentes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, T. Fast chromatography study of propolis crudes. *Food Chemistry*, 42 (2), 135 - 138, 1991.

ARENAS, R. Micologia Médica. México. *Nueva Editorial Interamericana*, 1993.

BANKOVA, V. S.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations in essential oil from Brazilian propolis. *Journal of Essential Oil Research*, 10, 693 - 696, 1998.

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

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A. A. G.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 239 - 246, 2000.

BEDOUT C, GÓMEZ BL, RESTREPO A. In vitro susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 39, 145 - 148, 1997.

BIANCHINI, L.; BEDENDO, I. P. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Scientia Agricola (Piracicaba)*, 55, 149 - 152, 1998.

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

CALIGIORNE, R. B.; RESENDE, M. A.; OLIVEIRA, R. C. B. W.; VALÉRIO, H. M.; CORDEIRO, R. A.; AZEVEDO, V. Fungos dematiáceos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 11, ano 2, 22 - 25, 1999.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Propolis from southeastern and northeastern of Brazil: the influence of seasonality in antibacterial activity and phenolic composition. *Química Nova*, 30 (7), 1512 - 1516, São Paulo, 2007.

CORBELLINI, V. A.; SCROFERNEKER, M. L.; CARISSIMI, M.; SANTOLIN, L. D. Delayed-type hypersensitivity response to crude and fractionated antigens from *Fonsecaea pedrosoi* CMMI 1 grown in different culture media. *Mycopathologia*, 162 (1), 51 - 55, 2006.

DOBROWOLSKI, J. W.; VOHORA, S. B.; SHARMA, K.; SHAH, S. A.; NAQVI, S. A. H.; DANDIYA, P. C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and

antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology*, 35, 77 - 82, 1991.

FERNANDES, F. F.; DIAS, A. L. T.; RAMOS, C. L.; IKEGAKI, M.; SIQUEIRA, A. M.; FRANCO, M. C. The *in vitro* antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 49 (2), 93 - 95, 2007.

FERNANDES, J. A.; SUGIZAKI, M. F.; FOGO, M. L.; FUNARI, S. R. C.; LOPES, C. A. M. *In vitro* activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 1 (2), 63 - 69, 1995.

GIMENES, V. M. F.; SOUZA, M. G.; FERREIRA, K. S.; MARQUES, S. G.; GONÇALVES, A. G.; SANTOS, D. V. C. L.; PEDROSO E SILVA, C. M.; ALMEIDA, S. R. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes and Infections*, 7 (4), 708 - 713, 2005.

GUPTA, A. K.; TABORDA, P. R.; SANZOVO, A. D. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Medical Mycology*. 40, 529 - 534, 2002.

HEGAZI, A. G.; HADY, F. K. A. E.; ALLAH, F. A. M. A. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeitschrift Fur Naturforschung*, 55C, 70 - 75, 2000.

JUNIOR, F. A.; LEOMIL, L.; FERNANDES, A. A. H. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. *Journal of Venomous and Animals Toxins*, 7 (2), 173 - 182, 2001.

KOO, M. H.; PARK, Y. K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61, 367 - 369, 1997.

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

KUMAZAWA, S.; HAYASHI, K.; KAJIYA, K.; ISHII, T.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Studies of the constituents of Uruguayan propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4777 - 4782, 2002.

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

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

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, 19 (5), 529 - 535, 1996.

MARQUES, S. G.; SILVA, C. M. P.; SALDANHA, P. C.; REZENDE, M. A.; VICENTE, V. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; COSTA, J. M. L. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the Babassu Cocomet (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon Region of Maranhão Brazil. *Japanese Journal of Medical Mycologic*, 47 (4), 305 - 311, 2006.

MATTE, S. M. W.; LOPES, J. O.; MELO, I. S.; ESPADIM, L. E. R.; PINTO, M. S. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30 (4), 36 - 42, 1997.

METZNER, J.; SCHNEIDEWIND, E. M.; FRIEDERICH, E. Effect of propolis and pinocembrin on fungi. *Pharmazie*, 32 (11), 730 - 732, 1977.

NIMRICHTER, L.; BARRETO-BERGTER, E.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; KNEIPP, L. F.; MAZZI, M. T.; SALVE, P.; FARIAS, S. E.; WAIT, R.; ALVIANO, C. S.; RODRIGUES, M. L. A monoclonal antibody to glucosylceramide inhibits the

growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages. *Microbes and Infections*, 6 (7), 657 - 665, 2004.

ORSI, R. O.; FUNARI, S. R. C.; SOARES, A. M. V. C.; CALVI, S. A.; OLIVEIRA, S. L.; SFORCIN, J. M. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous and Animals Toxins*, 6 (2), 205 - 219, 2000.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Evaluation on ethanol extracts of propolis from Brazil and Korea by physicochemical and biological methods. *Korean Journal of Apiculture*, 13, 27 - 34, 1998.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, D. A.; SOBERÓN, J. R.; SGARIGLIA, M. A.; VATTUONE, M. A. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 103 - 110, 2006.

SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C.; NOVELLI, E. L. B. Serum biochemical determinations of propolis - treated rats. *Journal of Venomous and Animals Toxins*, 1 (1), 31 - 37, 1995.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*, Ed. Guanabara Koogan - Rio de Janeiro - RJ, 287, 1999.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro - RJ, Editora Guanabara, 2004.

SILICI, S.; KOC, A. N. Comparative study of in vitro methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 318 - 324, 2006.

SINGLETON, V. L.; ROSSI J. A. J. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 (3), 144 - 158, 1965.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Alcoholic propolis extract: antimicrobial activity. *Ciência Rural*, 34 (1), 159 - 163, 2004.

7. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Analysis of the correlation between the phytochemical profile of propolis and its antifungal activity against *Fonsecaea pedrosoi*

Claiison Jodel dos Santos^{1,2}, Tatiane Caroline Daboit^{1,2}, Luisa de Andrade Salles³, Gilsane von Poser³, Maria Lúcia Scroferneker^{1,2}.

¹Graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil ²Department of Microbiology, Institute for Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil and ³Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Short title: Activity of propolis against *Fonsecaea pedrosoi*

Keywords: chromoblastomycosis, *Fonsecaea pedrosoi*, propolis, phytochemical analysis

Correspondence to:

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite, 500,

CEP 90050-170

Porto Alegre, RS, Brazil

Tel.: +55 51 3308 3934

Fax: +55 51 3308 3121

E-mail address: scrofern@ufrgs.br; gilsane@farmacia.ufrgs.br

Summary

Background: Chromoblastomycosis is a subcutaneous disease caused by dematiaceous fungi, and *Fonsecaea pedrosoi* is the major etiologic agent in Brazil. Propolis is a resinous material collected by honeybees, with variable composition and several pharmacological properties, including antifungal activity. Phenolic compounds, such as flavonoids, have been correlated with its biological properties. Objectives: We assessed the antifungal activity of eight ethanolic extracts of propolis (EEP) obtained from different towns in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, against twelve *F. pedrosoi* strains, and correlated the activity exhibited by these strains with the phytochemical composition of the propolis

extracts. Methods: The minimum inhibitory concentrations (MIC) of propolis were determined using broth microdilution, according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M28-A. Phytochemical composition was analyzed by thin-layer chromatography and by quantification of total phenolic compounds. Results: The EEP with the best antifungal activity were those obtained from Santo Antônio da Patrulha and Candelária. The extracts, in general, showed the presence of products with chromatographic profile of terpenoids and flavonoids. Conclusions: The quantification of phenolic compounds demonstrated that there is no correlation between their concentration and antifungal activity. The investigated propolis extracts had a high antifungal potential against *F. pedrosoi*, but we did not find a phytochemical pattern related to this activity.

1. Introduction

Chromoblastomycosis is a chronic subcutaneous fungal disease which evolves slowly and progressively and is characterized by papular desquamative lesions that develop into various skin lesions, resulting from traumatic transcutaneous implantation of organic material contaminated by conidia and mycelia of fungi of the *Herpotrichelaceae* family. The major etiologic agents of chromoblastomycosis include *Rhinocladiella aquaspersa*, *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea compacta* and *Phialophora verrucosa*, but *Fonsecaea pedrosoi* is its main etiologic agent in Brazil [1-6].

These fungal species contain melanin in their cell wall. Melanin, in addition to enhancing photoprotection and thus allowing the fungus to grow in sunlit environments, also acts as a virulence factor. To date, a totally efficient treatment that can eradicate these pathogens from the body of affected hosts remains unknown [7-10].

The interest in new treatment options against microbial infections has heightened, especially with respect to the use of natural products.

Propolis is a mixture containing resinous and balsamic material that is collected by honeybees (*Apis mellifera*) from the buds or other parts of different trees and bushes. Its chemical composition is quite complex and varies considerably, crucially depending on the season of the year, vegetation and collection site [11-15].

In general, propolis is made up of around 60% of resins and balsams, 30% of waxes, 5% of essential oils, and the remaining 5% includes pollen grains and microelements blended to the salivary secretions from honeybees [11,12]. Propolis has immunomodulatory, antineoplastic, antioxidant, anti-inflammatory, hypotensive, healing, anesthetic, anticariogenic, antibacterial and antifungal properties that have contributed towards its growing use as alternative treatment [16-21].

Even though the antifungal activity of propolis has been described for a long time, only now have some studies about such property been widely referenced in the literature. Its therapeutic effects have been ascribed to phenolic compounds, such as flavonoids and phenolic acids. Besides these compounds, propolis also contains aromatic acids, aldehydes, alcohols, ketones, esters, amino acids, ether, terpenoids, steroids, carbohydrates, among other substances [12, 22, 23].

Determination of their geographic origin and mainly of their vegetable origin, combined with the phenology of the host plant, is important for quality control and standardization of propolis extracts so that their therapeutic use can be effective [11, 12, 22].

The aim of this study is to assess the antifungal activity of propolis extracts collected from different towns in the state of Rio Grande do Sul against *Fonsecaea pedrosoi* and to correlate this activity with their phytochemical composition.

2. Materials and methods

2.1. Fungal strains

Twelve *F. pedrosoi* strains, provided by the Laboratory of Pathogenic Fungi of the Department of Microbiology of the Institute of Basic Health Sciences of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, were used, namely: 1, 19, 49, 855, 1420, 1509, 43456, 44327, 46422 ATCC, 46428 ATCC, 47748 and MA. The strains were stored on Sabouraud dextrose agar (Difco, Detroit, MI, USA) at 35°C.

2.2. Propolis collection and preparation of ethanolic extracts

Eight propolis extracts were obtained from different towns (Camaquã, Candelária, Caçapava do Sul, Cerro Branco, Lavras do Sul, Santo Antônio da Patrulha, São Sepé and Sobradinho), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, between January and February 2007. Each of the propolis samples underwent an extraction procedure. Fifteen grams of propolis *in natura* were weighed and then macerated with 150mL of ethanol 96°GL (Nuclear®). The mixture obtained was filtered and evaporated in a rotary evaporator at 78°C and at 105 rpm for 30 minutes. The resin was allowed to rest for 7 days in a dehydrator filled with silica gel until total dehydration.

2.3. In vitro antifungal activity

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the ethanolic extracts of propolis (EEP) was determined by broth microdilution for filamentous fungi, according to CLSI document M28-A. The strains were subcultured onto potato dextrose agar (PDA) at 35 °C for 10 days. The spore suspension of each culture was prepared in saline solution at 0.9% and adjusted on a spectrophotometer until a transmittance

of 80-82% at 530nm was achieved. The inoculum was prepared by dilution in RPMI 1640 medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) buffered to pH 7.0 with 165 mM morpholinepropanesulfonic acid (MOPS; Sigma) until a final concentration of $0.4\text{--}5.0 \times 10^4$ cfu/mL.

The stock solutions of propolis were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) at the concentration of $25,000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Itraconazole (Janssen Pharmaceutical N. V. Beerse, Belgium) was used as positive control, and the stock solution ($1,600 \mu\text{g mL}^{-1}$) was prepared in DMSO. The solutions were diluted in RPMI medium and the final drug concentrations ranged from $160\text{--}0.0313 \mu\text{g mL}^{-1}$ for itraconazole and $2,500\text{--}156.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the propolis extracts. After 5 days of incubation at 35°C , the MIC was determined visually by comparison with the drug-free growth control well. The MIC was defined as the lowest concentration of the antifungal agent preventing visible fungal growth. All the experiments were done in triplicate.

2.4. Quantification of total phenolic compounds

The colorimetric method proposed by Folin-Ciocalteu was used for quantification of total phenols compounds, with some modifications described by Singleton and Rossi [24], and quercetin was utilized as the reference substance. Each sample was measured in triplicate and absorbance was read three times. Propolis extracts (diluted in compliance with the spectrophotometric measurement) were oxidized with 5mL of Folin-Ciocalteu reagent 0.2N (Merck[®] 2N diluted in distilled water 1:10), and this reaction was neutralized with variable volumes of saturated solution of sodium carbonate (7.5%), necessary to complete the final volume of reaction in 10mL. This same mixture, after replacement of the sample with distilled water, was

used as control on the spectrophotometer. After incubation for 60 minutes at ambient temperature, the absorbance of the resulting blue solution was measured at $\lambda=765$ nm using a UV-visible Hewlett Packard 8451A spectrophotometer. Quantification was based on a standard curve for quercetin (methanolic solutions at the concentrations of 0; 0.65; 1.30; 1.95; 3.25 and $6.5\mu\text{g mL}^{-1}$) and the results were expressed as quercetin equivalents (QE/g: milligrams of quercetin per gram of dry extract).

2.5. Thin-layer chromatography (TLC)

The eight propolis extracts, which had been previously diluted, were seeded onto silica plates. When the samples were diluted with hexane, dichloromethane and hexane eluents (2:1 ratio) were used, developed with sulfuric anisaldehyde. For the samples diluted with acetone, we used dichloromethane as eluent, and developed them under UV light at $\lambda = 365$ nm, and when methanol was used to dilute the EEP, ethyl acetate:methanol:water (100:13.5:10 ratio) was used as eluent, and the samples were developed with a natural reagent.

3. Results

The *in vitro* antifungal activity of EEP from different towns in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, against *F. pedrosoi*, was assessed by using broth microdilution. According to Table 1, the EEP yielded MIC values between 625 and $2,500\mu\text{g mL}^{-1}$. The most active samples were those from Santo Antônio da Patrulha and Candelária and the least active ones were those from Caçapava do Sul and Sobradinho.

The quantification of total phenolic compounds found in EEP is shown in Figure 1 (in mg quercetin/g extract).

With regard to chromatographies, compounds with a chromatographic profile of terpenoids were detected in all samples eluted with dichloromethane and hexane (2:1 ratio), but the highest concentration was obtained by the most active samples. In the samples eluted with ethyl acetate:methanol:water (100:13.5:10 ratio), compounds with a chromatographic profile of flavonoids were detected in the most active samples. Fewer compounds were present in the most active samples eluted with dichloromethane than in the other samples analyzed.

4. Discussion

According to the method used, the EEP from Santo Antônio da Patrulha had MIC values between $625\mu\text{g mL}^{-1}$ (33%), $1,250\mu\text{g mL}^{-1}$ (42%) and $2,500\mu\text{g mL}^{-1}$ (25%) for *F. pedrosoi* strains. The other EEP had MIC values between $1,250\mu\text{g mL}^{-1}$ and $2,500\mu\text{g mL}^{-1}$. It is interesting to note that the MIC value of the EEP from Candelária corresponded to $1,250\mu\text{g mL}^{-1}$ in most cases (83%). The EEP from Caçapava do Sul and Sobradinho yielded MIC values of $2,500\mu\text{g mL}^{-1}$ in most cases (67%). Itraconazole had MIC values between 0.125 and $0.5\mu\text{g mL}^{-1}$, which are in agreement with studies conducted before on [25].

Silici & Koc [20] used three methods to assess the *in vitro* antifungal activity of EEP, comparing it with the activity of itraconazole. They tested 15 fungal strains (*Candida albicans* and *glabrata*, *Trichosporon sp.* and *Rhodotorula sp.*) isolated from patients with superficial mycoses, on which propolis had positive effects.

Fernandes et al. [26] evaluated the antifungal activity of EEP against several yeasts, and among the tested species, *C. albicans* (MIC₉₀ of 3.8mgmL⁻¹) and *C. tropicalis* (MIC₉₀ of 2.1mgmL⁻¹) showed better sensitivity than *C. parapsilosis* (MIC₉₀ of 10.9mgmL⁻¹) and *C. guilliermondii* (MIC₉₀ of 9.6mgmL⁻¹). In our study, we obtained a maximum MIC value of 2,500µgmL⁻¹ (2.5mgmL⁻¹), which indicates that the extracts analyzed exhibit a high antifungal potential, given the difficulty in treating infections caused by *F. pedrosoi* and the fact that the assessed strains were susceptible at very low concentrations, compared to the ones obtained for most *Candida* species analyzed in the referenced study.

Hegazi et al. [27] described the activity of propolis against *Candida albicans* and obtained an MIC value between 1,200 and 6,400µgmL⁻¹. When the propolis extracts were combined with antifungal drugs, there was an increase in their effect on this strain. In another study, propolis showed significant antifungal potential against *Trichophyton* and *Microsporium* in the presence of propylene glycol, with which it interacts synergistically at the concentration of 5% [22, 28]. Dobrowolski et al. [29] reported that commercially available propolis tablets or granules (10mg) have antifungal activity against *Trichosporon cutaneum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Piedraea hortae*, *Microsporium gypseum* and *Microsporium canis*.

Fernandes et al. [21] analyzed a standard *Cryptococcus neoformans* strain (ATCC 90112) using broth microdilution with different concentrations of EEP (0.1; 0.2; 0.4; 0.8; 1.2 and 1.6mgmL⁻¹), and obtained an MIC value of 0.2mgmL⁻¹ and a minimum fungicidal concentration (MFC) of 1.6mgmL⁻¹. Metzner et al. [30] also attributed

fungicidal and fungistatic effects to propolis, and according to them, the fungicidal effect was related to the presence of pinocembrin. In the most active samples, we have compounds with chromatographic profile of flavonoids, which might somehow be associated with this activity.

In terms of pharmacological activity, phenolic compounds are the main constituents of propolis, and among these, flavonoids are the most common, building a chemical protective barrier against microorganisms (bacteria, fungi and viruses), insects and other herbivores [28]. Although these compounds are accountable for the pharmacological activity of propolis, all of the research studies conducted on substances isolated from propolis demonstrate that no isolated component has a higher activity than the total extract itself [28, 31].

Even though the methods for propolis extraction have not been standardized yet, several studies indicate that propolis extracts have a low innate toxicity. These results were already expected because flavonoids have a toxicity relatively low [32]. The biggest problem concerning propolis, as well as other products obtained from beehives, is that factors associated with the extraction technique, type of assay used, site of origin of propolis (flora), season of the year in which it was produced, and contaminants may play a role in increasing or decreasing its biological activity [33].

The distinct results obtained for different samples in our study concur with those of several authors who suggest that the composition of flavonoids in the EEP are qualitatively and quantitatively variable depending on regional differences and that

the quantity and quality of flavonoids found in propolis also vary according to the type of bee that collects the propolis, even in the same region [34].

A quick analytical chromatographic method to check the profile of components present in propolis extracts, such as TLC, is of utmost importance. This technique only requires chromatoplates, and has proved to be useful in assessing propolis samples [35]. As the amount of flavonoids and phenolic compounds does not properly indicate the biological efficacy and the quality of propolis extracts, we can suggest that analytical methods should be obligatorily associated with biological assays for the quality control of propolis extracts, as suggested by Banskota *et al.* [36] and Bankova *et al.* [37].

By the quantification of total phenols compounds, we cannot correlate the activity of the propolis extracts analyzed with the amount of the former, given that the EEP from Santo Antônio da Patrulha has nearly half the amount of the EEP from Candelária, considering also that these samples are the most active ones. Propolis extracts with higher flavonoid and total phenol concentrations do not always have the highest biological activity, confirming that not only the amount of these compounds present in propolis, but also their quality play a key role in the biological activity of these samples.

Our study found that *F. pedrosoi* strains are sensitive to the EEP used, especially strain MA. Our conclusion is that the EEP from Santo Antônio da Patrulha and Candelária exhibited a higher antifungal potential against the *F. pedrosoi* strains analyzed. The EEP from Sobradinho and Caçapava do Sul showed lower

antifungal activity. The assessed samples had a high antifungal potential against *F. pedrosoi*, but no phytochemical pattern related to such activity was observed.

Chromoblastomycosis still poses a therapeutic challenge [9]. Few studies on antifungal activity against chromoblastomycosis agents have been reported; therefore, this study shows the importance of this investigation and of the assessment of new treatment options based on the use of propolis, in an attempt to encounter possible effects of this substance against these pathogens.

5. Acknowledgements

We thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Research Incentive Foundation of Rio Grande do Sul (FAPERGS) for their financial support.

References

1. Matte SMW, Lopes JO, Melo IS, Espadim LER, Pinto MS. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997; **30**: 36-42.
2. Sidrim JJC, Moreira JLB. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1999: 287 pp.
3. Nimrichter L, Barreto-Bergter E, Mendonça-Filho RR, Kneipp LF, Mazzi MT, Salve P, *et al.* A monoclonal antibody to glucosylceramide inhibits the growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages. *Microb Infect* 2004; **6**: 657-665.
4. Gimenes VMF, Souza MG, Ferreira KS, Marques SG, Gonçalves AG, Santos DVCL, *et al.* Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microb Infect* 2005; **7**: 708-713.
5. Corbellini VA, Scroferneker ML, Carissimi M, Santolin LD. Delayed-type hypersensitivity response to crude and fractionated antigens from *Fonsecaea pedrosoi* CMMI 1 grown in different culture media. *Mycopathologia* 2006; **162**: 51-55.
6. Marques SG, Silva CMP, Saldanha PC, Rezende MA, Vicente VA, Queiroz-Telles F, *et al.* Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the Babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon Region of Maranhão Brazil. *Jpn J Mycol* 2006; **47**: 305-311.
7. Arenas R. *Micologia Médica*. México: Nueva Editorial Interamericana, 1993; 154-160.

8. Caligionne RB, Resende MA, Oliveira RCBW, Valério HM, Cordeiro RA, Azevedo V. Fungos dematiáceos. *Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento* 1999; **11**:22-25.
9. Gupta AK, Taborda PR, Sanzovo AD. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Med Mycol* 2002; **40**: 529-534.
10. Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2004; 83-86.
11. Bankova VS, Boudourova-Krasteva G, Popov S, Sforcin JM, Funari SRC. Seasonal variations in essential oil from Brazilian propolis. *J Essent Oil Res* 1998; **10**: 693-696.
12. Park YK, Ikegaki M. Evaluation on ethanol extracts of propolis from Brazil and Korea by physicochemical and biological methods. *Korean J Apic* 1998; **13**: 27-34.
13. Junior FA, Leomil L, Fernandes AAH. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. *J Venom Anim Toxins*, 2001; **7**: 173-182.
14. Castro ML, Cury JA, Rosalen PL, Alencar SM, Ikegaki M, Duarte S, et al. Propolis from southeastern and northeastern of Brazil: the influence of seasonality in antibacterial activity and phenolic composition. *Quím Nova* 2007; **30**: 1512-1516.
15. Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Rondau KP, Neto PJR. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Rev Bras Farmacogn* 2008; **18**: 447-454.

16. Sforcin JM, Funari SRC, Novelli ELB. Serum biochemical determinations of propolis - treated rats. *J Venom Anim Toxins* 1995; **1**: 31-37.
17. Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvi SA, Oliveira SL, Sforcin JM. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J Venom Anim Toxins* 2000; **6**: 205-219.
18. Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, Costa MM, Silva MS, Viana LR. Alcoholic propolis extract: antimicrobial activity. *Ciênc Rural* 2004; **34**: 159-163.
19. Quiroga EN, Sampietro DA, Soberón JR, Sgariglia MA, Vattuone MA. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *J Appl Microbiol* 2006; **101**: 103-110.
20. Silici S, Koc AN. Comparative study of in vitro methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Lett Appl Microbiol* 2006; **43**: 318-324.
21. Fernandes FF, Dias ALT, Ramos CL, Ikegaki M, Siqueira AM, Franco MC. The "in vitro" antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007; **49**: 93-95.
22. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 1995; **26**: 83-99.
23. Kumazawa S, Hayashi K, Kajiya K, Ishii T, Hamasaka T, Nakayama T. Studies of the constituents of Uruguayan propolis. *J Agric Food Chem* 2002; **50**: 4777-4782.

24. Singleton VL, Rossi JAJ. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Viticult* 1965; **16**: 144-158.
25. Bedout C, Gómez BL, Restrepo A. In vitro susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1997; **39**: 145-148.
26. Fernandes JA, Sugizaki MF, Fogo ML, Funari SRC, Lopes CAM. *In vitro* activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *J Venom Anim Toxins* 1995; **1**: 63-69.
27. Hegazi AG, Hady FKAE, Allah FAMA. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeits Naturf* 2000; **55**: 70-75.
28. Marcucci MC. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Quím Nova* 1996; **19**: 529-535.
29. Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SAH, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 1991; **35**: 77-82.
30. Metzner J., Schneidewind EM, Friederich E. Effect of propolis and pinocembrin on fungi. *Pharmazie* 1977; **32**: 730-732.
31. Kujungiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999; **64**: 235-240.
32. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 1998; **36**: 347-363.
33. Bianchini L, Bedendo IP. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Scientia Agricola* 1998; **55**: 149-152.

34. Koo MH, Park YK. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; **61**: 367-369.
35. Ackermann T. Fast chromatography study of propolis crudes. *Food Chem* 1991; **42**: 135-138.
36. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, *et al.* Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacol* 2000; **72**: 239-246.
37. Bankova VS, Castro SLD, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000; **31**: 3-15.

Table 1: Assessment of the *in vitro* antifungal activity of EEP and itraconazole used for dilutions in the broth microdilution technique following the recommendations of CLSI document M28-A, in *F. pedrosoi* (MIC values are expressed in $\mu\text{g mL}^{-1}$).

<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Camaquã	Candelária	Caçapava do Sul	Cerro Branco	Lavras do Sul
F.p. 1	1250	1250	2500	1250	2500
F.p. 19	2500	2500	2500	2500	2500
F.p. 49	1250	1250	1250	1250	1250
F.p. 855	2500	1250	2500	2500	2500
F.p. 1420	1250	1250	2500	1250	1250
F.p. 1509	2500	1250	2500	2500	2500
F.p. 43456	2500	2500	2500	2500	2500
F.p. 44327	2500	1250	2500	2500	1250
F.p. 46422 ATCC	1250	1250	1250	1250	1250
F.p. 46428 ATCC	1250	1250	1250	1250	1250
F.p. 47748	2500	1250	2500	2500	2500
F.p. MA	1250	1250	1250	1250	1250
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Santo Antônio da Patrulha	São Sepé	Sobradinho	Itraconazole	
F.p. 1	1250	1250	2500	0,5	
F.p. 19	1250	2500	2500	0,5	
F.p. 49	1250	1250	1250	0,25	
F.p. 855	1250	2500	2500	0,5	
F.p. 1420	625	1250	1250	0,125	
F.p. 1509	2500	2500	2500	0,125	
F.p. 43456	2500	2500	2500	0,5	
F.p. 44327	1250	2500	2500	0,25	
F.p. 46422 ATCC	625	1250	1250	0,125	
F.p. 46428 ATCC	625	1250	2500	0,5	
F.p. 47748	2500	2500	2500	0,5	
F.p. MA	625	1250	1250	0,125	

Figure 1: Quantification of total phenolic compounds found in EEP of extracts obtained from different towns in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. (1) Cerro Branco; (2) Lavras do Sul; (3) Camaquã; (4) Santo Antônio da Patrulha; (5) Candelária; (6) Sobradinho; (7) São Sepé; (8) Caçapava do Sul.

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE PRÓPOLIS EM *FONSECAEA PEDROSOI* UTILIZANDO FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS ASSOCIADAS À ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Claiison Jodel dos Santos^{1,3}; Valeriano Antonio Corbellini²; Marco Flôres Ferrão²; Maria Lúcia Scroferneker^{1,3}

¹Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Departamento de Química e Física da Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil.

³Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Correspondente:

Valeriano Antonio Corbellini,

Rua: Davi Canabarro 35/Apto 5

Santa Cruz do Sul, RS, Brasil

CEP: 96820-140

Tel.: +55 51 3717 7390

Fax: +55 51 3717 1855

E-mail: valer@unisc.br; scrofern@ufrgs.br

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a atividade antifúngica *in vitro* de extratos etanólicos de própolis em cinco diferentes concentrações diante de doze amostras de *Fonsecaea pedrosoi* (agentes causadores da cromoblastomicose) através da técnica de diluição em ágar. Foram utilizadas oito amostras de própolis das localidades de Camaquã, Candelária, Caçapava do Sul, Cerro Branco, Lavras do Sul, Santo Antônio da Patrulha, São Sepé e Sobradinho, localizadas na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras de própolis das localidades de Santo Antônio da Patrulha e Candelária demonstraram maior atividade antifúngica. Através da utilização da espectroscopia de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFTS) analisou-se o conjunto espectral dos extratos de própolis liofilizados e das biomassas fúngicas produzidas. Com o auxílio de ferramentas quimiométricas foi possível construir modelos com fatores mais relevantes e um menor número de variáveis, realizado pela análise por componentes principais (PCA) e após, agrupá-las de acordo com sua similaridade, através da análise por agrupamento hierárquico (HCA). Houve a formação de quatro grupos para as amostras de própolis e de dois grandes grupos para as amostras de *F. pedrosoi*. Após, foi aplicado o algoritmo de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) que proporcionou a criação de modelos otimizados para previsão da atividade antifúngica. O melhor modelo PLS para as amostras de própolis foi na concentração de $40\mu\text{g mL}^{-1}$ para *F. pedrosoi* MA, com $\text{RMSECV}=3,44$ e $R^2_{\text{cal}}=0,98$ com 2 variáveis latentes; para as amostras de *F. pedrosoi*, o melhor modelo PLS foi para a amostra de própolis da localidade de Santo Antônio da Patrulha na concentração de $40\mu\text{g mL}^{-1}$, com $\text{RMSECV}=23,58$ e $R^2_{\text{cal}}=0,97$ com 8 variáveis latentes.

Unitermos: *Fonsecaea pedrosoi*, própolis, DRIFTS, ferramentas quimiométricas.

1. INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea de aspecto polimórfico, que acomete a pele e o tecido celular subcutâneo caracterizando-se pelo surgimento de lesões descamativas, que evoluem lenta e progressivamente para lesões cutâneas variadas, podendo espalhar-se pelos tecidos adjacentes (Fuchs & Pecher, 1992; Matte et al, 1997). É uma doença de distribuição cosmopolita incidente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e estados da região Amazônica a cromoblastomicose chega a ser endêmica (Matte et al., 1997; Silva et al., 1999; Ogawa et al., 2003; Marques et al., 2006).

A patologia é causada por diferentes fungos dematiáceos, estando entre as espécies principais *Rhinocladiella aquaspersa*, *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea compactum*, *Phialophora verrucosum*, e *Fonsecaea pedrosoi* (Iwatsu et al., 1979; Gimenes et al., 2005), sendo este último o principal agente etiológico em nossa região, podendo ser encontrados no solo, ar e vegetais em decomposição (Matte et al., 1997; Caligiorne et al., 1999; Marques et al., 2006).

Ainda não se conhece nenhuma droga ou procedimento completamente eficaz para eliminar o fungo do organismo, porém, para seu tratamento farmacológico existem alguns fármacos indicados para o combate dessas doenças, sendo os derivados dos azóis os antifúngicos de primeira escolha para a terapia (Cucé et al., 1980; Gupta et al., 2002).

Novas alternativas terapêuticas em infecções microbianas têm utilizado produtos naturais devido à comprovada eficácia de alguns desses produtos frente a microrganismos nocivos a saúde humana (Sidrim & Moreira, 1999). Um desses produtos é a própolis, cujo potencial antifúngico ainda não tem sido investigado em agentes da cromoblastomicose, o que abre caminho para pesquisas nessa área. A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas de diversas partes da planta. Com composição química variada e com grande quantidade de substâncias com potencial farmacológico contidas na sua formulação, acredita-se que ela possa ser usada no tratamento de doenças humanas e veterinárias com grande sucesso (Russo et al., 2002; Castro et al., 2007).

Na medicina, a própolis tem sido usada em diversas áreas, com potenciais terapêuticos inclusive contra fungos (Ghisalberti, 1979; Bankova et al. 1998; Park

& Ikegaki, 1998; Castro et al., 2007). Seu potencial antifúngico tem sido relatado frente a diversos gêneros, como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. A atividade *in vitro* do extrato etanólico de própolis também tem sido investigada, com relatos frente à *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* e *glabrata*, *Trichosporon sp.* e *Rhodotorula sp.* (Park et al., 2000; Quiroga et al., 2006; Silici & Koc, 2006; Fernandes et al., 2007).

Paralelamente, faz-se necessária a utilização de ferramentas estatísticas mais potentes que permitam fazer uma previsão da suscetibilidade de fungos a diferentes agentes antifúngicos constituídos por misturas complexas de produtos naturais, como a própolis, e que conseqüentemente, possam facilitar a avaliação de suas propriedades antifúngicas frente a estes microrganismos. A utilização de espectroscopia por reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFTS) associada à quimiometria tem sido utilizada como uma ferramenta robusta para diferenciar, classificar e identificar microrganismos (Wold & Sjöstrom, 1998). Nestes casos, o uso da quimiometria ajuda a decidir quais determinações são importantes e, assim, algumas delas podem ser suprimidas.

Isto pode ser realizado através da técnica de análise por componentes principais (PCA) que é baseada na correlação entre as inúmeras variáveis, agrupando aquelas que estão intimamente correlacionadas, transformando-as num menor número de fatores, conhecidos como componentes principais. Pode-se também, agrupar as amostras por similaridade e representar esta informação na forma de um diagrama bidimensional denominado dendrograma. Neste caso, a técnica empregada é a análise por agrupamento hierárquico (HCA) (Morgano et al., 1999).

As técnicas quimiométricas para análises multivariadas tornaram-se abordagens comuns para análise rápida de amostras complexas de suas assinaturas espectrais e tornam-se ainda mais eficientes com a escolha dessas regiões, minimizando, com isso, os erros de previsão. Existem algoritmos que indicam o melhor conjunto espectral que pode dar melhores resultados, sendo, atualmente, a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) o mais utilizado, (Ferreira, 2002; Borin & Poppi, 2005). Esse método baseia-se em montar as matrizes de dados a partir dos dados espectrais e das propriedades de interesse, eliminando informações que não são relevantes ao sistema através de

combinações lineares pela PCA, obtendo-se a relação entre as matrizes (reduzida pela PCA) e matriz que possui a propriedade de interesse (Fidêncio, 2001).

Neste sentido, a quimiometria aliada à espectroscopia no infravermelho é uma técnica recente utilizada na classificação e identificação de microrganismos, que possibilita análises mais rápidas e menos trabalhosas, utilizando uma quantidade pequena de amostras, minimizando a geração de resíduos (Wold & Sjöstrom, 1998; Costa, 2006). Em microbiologia, a aplicação de análise multivariada de dados no infravermelho usando as absorvâncias associadas às frequências geradas a partir de espectros por reflexão difusa tem permitido a diferenciação, classificação e identificação de diversos gêneros de isolados de bactérias e de algumas leveduras (Naumann, 2000; Mariey et al., 2001).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostra de fungos

Foram utilizadas doze amostras de agentes da cromoblastomicose *F. pedrosoi* 1, 19, 49, 855, 1420, 1509, 43456, 44327, 46422 ATCC, 46428 ATCC, 47748 e MA, obtidos do Laboratório de Fungos Patogênicos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, mantidos em ágar Sabouraud com extrato de levedura 1% YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) à 35°C.

2.2 Inóculo das amostras de fungos

As amostras foram inoculadas em erlenmeyer de 50mL contendo 10mL de ágar YEPD (g/L^{-1} : glicose anidra (Synth®) 40, peptona bacteriológica (Oxoid®) 10, extrato de levedura 1% (Oxoid®) e ágar bacteriológico (Oxoid®) 20, água destilada 1L) e incubadas em estufa à 35°C por 14 dias para completo crescimento. No 15° dia, foram adicionados 10mL de caldo YEPD sobre as espécies e o material celular foi suspenso por agitação com pino magnético por cerca de 10 minutos. O material foi novamente incubado por 24 horas e o processo de agitação seguido por incubação repetiu-se por mais duas vezes. Alíquotas de 1mL da suspensão de material celular obtida foram aplicadas sobre placas de Petri de 7cm de diâmetro contendo 10mL de ágar YEPD. As placas

contendo o ágar YEPD e o material celular foram incubadas em estufa à 35°C por mais 14 dias, até cobertura completa da superfície do ágar.

2.3 Preparo dos extratos de própolis

Foram coletadas oito amostras de própolis de diferentes localidades da região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Camaquã, Candelária, Caçapava do Sul, Cerro Branco, Lavras do Sul, Santo Antônio da Patrulha, São Sepé e Sobradinho) no período de Janeiro a Fevereiro de 2007. Cada uma dessas amostras passou por um processo de extração. Foram pesadas 15g de própolis in natura e maceradas com 150mL de etanol 96°GL (álcool etílico) (Nuclear®). O composto formado foi submetido à filtração simples por 24 horas. A solução obtida foi levada ao rota-evaporador a uma temperatura de 78°C e a 105 RPM por 30 minutos. A resina obtida foi transferida para frasco âmbar, o qual foi deixado em repouso por 7 dias em dessecador com sílica para completa desidratação.

2.4 Preparo das soluções

A partir de soluções 3,2mgmL⁻¹ de itraconazol (Galena®) e 40mgmL⁻¹ de própolis em dimetil sulfóxido (DMSO) (Nuclear®), utilizou-se as concentrações de antifúngicos que após diluição 1:100 em ágar, atendiam as concentrações plasmáticas e aos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) (do inglês *Minimum Inhibitory Concentration* - MIC) (McGinnis & Pasarell, 1998; Vivas & Torres-Rodríguez, 2001). Foram realizadas cinco diluições seriadas no mesmo solvente de modo a obter soluções 3,2; 1,6; 0,8; 0,4 e 0,2µgmL⁻¹ de itraconazol e 40; 20; 10; 5 e 2,5µgmL⁻¹ para própolis.

2.5 Ensaio de atividade antifúngica

Foram recortados discos de cultura de 5mm de diâmetro das placas que continham as amostras de *F. pedrosoi*, com auxílio de *punch biopsy* n° 5. Os discos foram depositados invertidos, em triplicata, em placas de Petri de 7cm de diâmetro, contendo 9,9mL de ágar YEPD e 0,1mL de solução antifúngica. Como controle negativo (ausência de composto antifúngico) foram inoculadas duas placas com ágar acrescido de 0,1mL de DMSO. As placas foram incubadas por

21 dias à 35°C e após, submetidas a determinação dos diâmetros de Crescimento Micelial Radial (CMR). A determinação do diâmetro de CMR para cada concentração foi feita da seguinte maneira: inicialmente determinaram-se os diâmetros perpendiculares (d_{i1} e d_{i2}) de cada disco por placa com auxílio de paquímetro digital (precisão de 0,1mm), sendo calculado o diâmetro médio (d_i) para cada disco com a seguinte fórmula:

$$\text{Equação (1)} \quad d_i = (d_{i1} \times d_{i2})^{1/2}$$

O diâmetro médio final por placa foi obtido a partir da média aritmética dos diâmetros médios de cada disco conforme a fórmula.

$$\text{Equação (2)} \quad D_i = \frac{(d_1 + d_2 + d_3)}{3}$$

Os resultados foram expressos em gráfico de diâmetro médio, D_i , (em mm) X concentração de antifúngico, incluindo-se o cálculo do desvio-padrão para cada média.

2.6 Produção de biomassa das amostras de *F. pedrosoi*

Através da técnica de microcultivo em lâmina produziu-se a biomassa das amostras de *F. pedrosoi* (Sidrim & Moreira, 1999). A técnica consiste em colocar dentro de uma placa de Petri uma lâmina com pequenos blocos de ágar Sabouraud, sobre estes adiciona-se algumas gotas da suspensão de esporos do fungo em estudo e após, cobre-se estes blocos com outra lâmina. Após, as placas foram incubadas por 7 dias à 35°C, até formação de micélio.

2.7 Análise da biomassa das amostras de *F. pedrosoi* e dos extratos etanólicos de própolis por espectroscopia de infravermelho

Os espectros no infravermelho foram registrados utilizando um espectrofotômetro Magna 550 (Nicolet®) acoplado com um dispositivo para reflectância difusa com feixe de luz monocromático para as amostras sólidas (micélio produzido de *F. pedrosoi* e extratos liofilizados de própolis) previamente trituradas e misturadas com brometo de potássio (KBr). Cada espectro foi coletado em triplicata na região de 650 a 4000 cm^{-1} em absorbância com 32 varreduras.

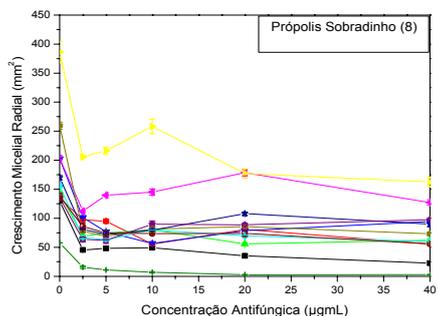
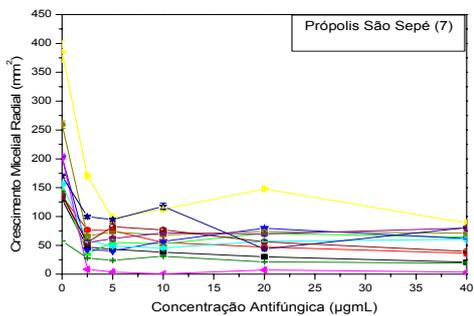
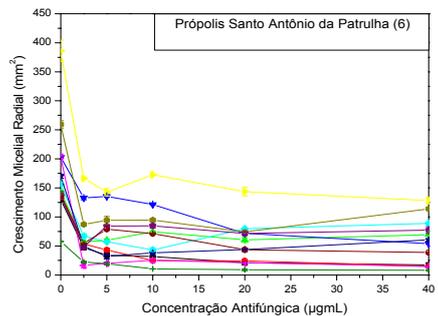
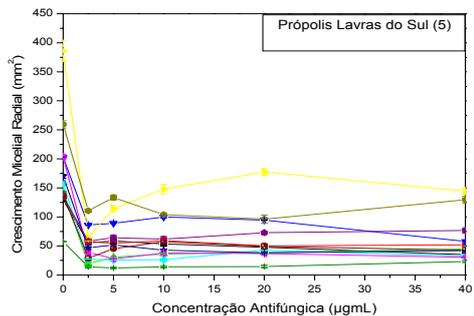
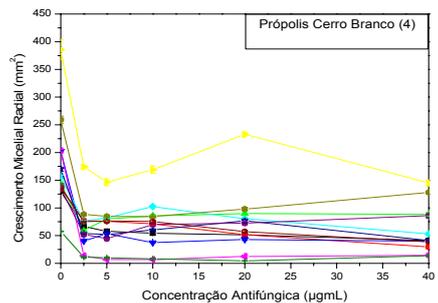
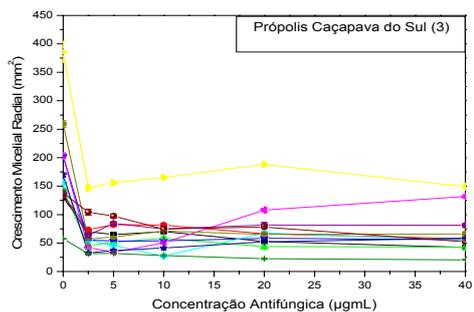
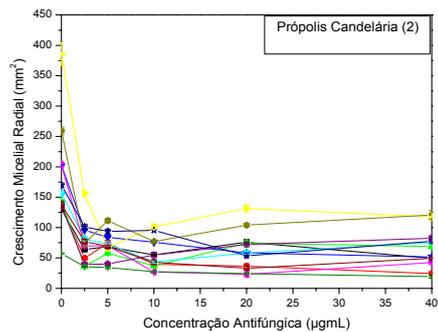
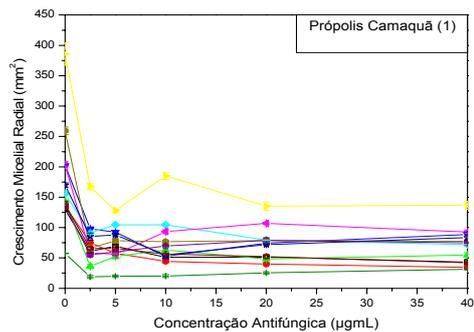
2.8 Análise quimiométrica e estatística

Os dados obtidos através das análises por espectroscopia no infravermelho das amostras de própolis e de *F. pedrosoi* foram convertidos para uma matriz de dados no programa Excel (Microsoft Office) e após, transferidos e tratados no programa Pirouette® 3.11 da Infometrix. As informações espectrais foram modeladas com as ferramentas PCA, HCA e PLS. Os parâmetros estatísticos utilizados para avaliar os modelos obtidos foram o coeficiente de determinação (R^2_{cal}) (o mais próximo de 1 possível) e os valores do erro quadrático padrão de validação cruzada (RMSECV). Simultaneamente, foi avaliada a variância relativa acumulada para se ter noção da informação necessária para se alcançar os modelos otimizados em função do número de fatores utilizados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Atividade antifúngica *in vitro*

O método da diluição em ágar não é o método padrão indicado para avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de isolados clínicos, segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), que é baseado na macro ou microdiluição em caldo (Sidrim & Moreira, 1999). Entretanto, a diluição em ágar é um método muito utilizado em estudos iniciais de novos compostos com potencial fungistático em função da sua praticidade de gerar dados que correlacionam halo de crescimento com concentração do agente a ser testado. Por essa técnica, já tem sido possível identificar a semelhança em resultados obtidos com outros métodos de atividade fungistática para dermatófitos, tornando-se assim, uma técnica eficiente, confiável, rápida e altamente reprodutível (Butty et al., 1995). Através da determinação do CMR pode-se avaliar o perfil da atividade antifúngica das amostras de própolis, sendo apresentado seu comportamento nos gráficos da FIGURA 1:



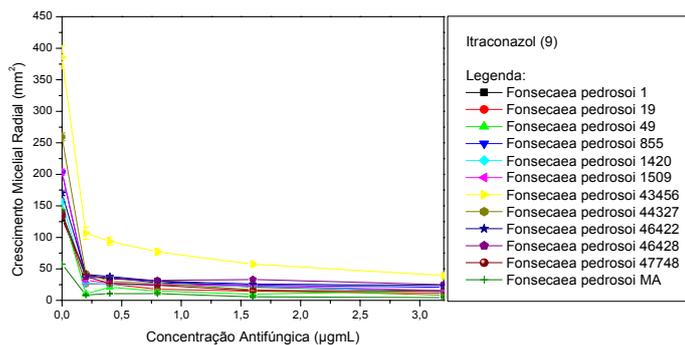


FIGURA 1: Perfil antifúngico das amostras de própolis frente às amostras de *F. pedrosoi*.

Os gráficos anteriormente apresentados representam o comportamento das amostras de *F. pedrosoi* diante da atividade antifúngica das amostras de própolis das diferentes localidades do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O comportamento do itraconazol, que é um fármaco derivado dos azóis e utilizado no tratamento de pacientes com cromoblastomicose, e está representado no gráfico 9 (Rang et al., 1997; Korolkovas, 2004).

A técnica de diluição em ágar para dermatófitos foi utilizada por Silici & Koc (2006) para avaliar a atividade antifúngica *in vitro* da própolis, onde este método demonstrou ser conveniente para este tipo de análise. Nos gráficos referentes à técnica, é possível visualizar uma menor atividade antifúngica das amostras de própolis frente à *F. pedrosoi* 43456. Entre as cepas analisadas, esta demonstrou maior resistência, principalmente nas concentrações intermediárias (10 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) testadas, destacando-se principalmente os gráficos 4 e 8, representados pelas amostras de própolis das localidades de Cerro Branco e Sobradinho. A cepa 44327, quando testadas as amostras das localidades de Candelária, Cerro Branco e Lavras do Sul, nos gráficos 2, 4 e 5 respectivamente, apresentou um CMR alto, indicando maior resistência diante das demais amostras de *F. pedrosoi*. Em concentrações baixas (2,5 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *F. pedrosoi* 47748 está entre as mais resistentes, frente às própolis das localidades de Caçapava do Sul e São Sepé, nos gráficos 3 e 7.

Para todas as amostras de própolis estudadas, a amostra de *F. pedrosoi* mais sensível foi a do MA, com um baixo CMR em todos gráficos apresentados, destacando-se os gráficos 4, 6 e 8, das própolis das localidades de Cerro Branco,

Santo Antônio da Patrulha e Sobradinho, respectivamente, onde quase não apresentou CMR. Em concentração inicial, a amostra 46428 demonstrou grande sensibilidade nos gráficos 2 e 4, das própolis de Candelária e Cerro Branco. As amostras 1 e 49, em algumas concentrações também apresentaram CMR baixo. As demais amostras de *F. pedrosoi* apresentaram um crescimento linear com pouca oscilação em suas curvas.

Apesar das propriedades antifúngicas da própolis serem amplamente difundidas na literatura (Park et al., 1998; Orsi et al., 2000; Sforcin et al., 2000), estas não podem ser generalizadas para qualquer tipo de microrganismo. No caso particular deste trabalho, as amostras investigadas apresentaram comportamento diferenciado, sendo as amostras de própolis das localidades de Santo Antônio da Patrulha e de Candelária as amostras que apresentaram um maior potencial antifúngico. Já as amostras das localidades de Sobradinho, Caçapava do Sul e Camaquã demonstraram uma menor atividade antifúngica, pois quando utilizadas, as amostras de *F. pedrosoi* demonstraram um CMR com valores mais altos em relação às demais amostras.

O gráfico representando o comportamento do itraconazol (9) frente às amostras de *F. pedrosoi* estudadas indica uma boa inibição do crescimento desses fungos, porém, esse comportamento inibitório é semelhante ao comportamento das amostras de própolis analisadas. Esse resultado é interessante principalmente para pacientes que fazem uso crônico (4 a 8 meses em média) de compostos azólicos. Nestes casos é comum o surgimento de efeitos adversos, tais como hepatotoxicidade (hepatite fulminante) pelos níveis plasmáticos elevados dos compostos azólicos em questão e a associação com própolis poderia diminuir esses riscos pela diminuição da dose terapêutica plasmática desses compostos. Entretanto, isso são apenas suposições para estudos futuros, pois cabe salientar que, nem sempre os resultados obtidos *in vitro* são reprodutíveis *in vivo* (Rodríguez-Tudela et al., 2003).

Outro aspecto a considerar é que os resultados acima foram obtidos com células vegetativas, pois este é o modo que elas crescem naturalmente no meio utilizado. Entretanto, em células escleróticas encontradas em humanos, elas podem apontar outros resultados, uma vez que, essas estruturas apresentam composição bioquímica diferentes das vegetativas, principalmente quanto ao teor de melanina e composição lipídica que lhe confere resistência à fagocitose e a

ação de outras células do sistema imune do hospedeiro (Alviano et al., 1991; Gomes & Resende, 1991; Farbiarz et al., 1992).

3.2 Espectrometria na região do infravermelho e análise multivariada das amostras de própolis e *F. pedrosoi*

A metodologia empregando métodos quimiométricos baseou-se na seleção de frequências de espectros realizados com DRIFTS obtidos a partir dos extratos etanólicos liofilizados de própolis e da biomassa produzida pelas amostras de *F. pedrosoi*. A seleção das frequências seguiu um critério baseado nas regiões características de bandas de absorção de biomoléculas que costumam ser detectadas majoritariamente, partindo-se da utilização do espectro total (Naumann, 2000). Para a análise multivariada de dados, as informações espectrais foram convertidas para uma matriz de dados no programa Excel (Microsoft Office), e após tratadas no aplicativo Pirouette® 3.11 da Infometrix.

3.2.1 Análise espectral das amostras de própolis

As regiões onde se evidenciou pouca informação espectral, bem como àquelas onde o ruído no espectro devido ao vapor d'água e dióxido de carbono estavam presentes, foram excluídas. Desta forma os resultados foram obtidos empregando as regiões espectrais compreendidas entre 650-2200 cm^{-1} como apresentado na FIGURA 2.

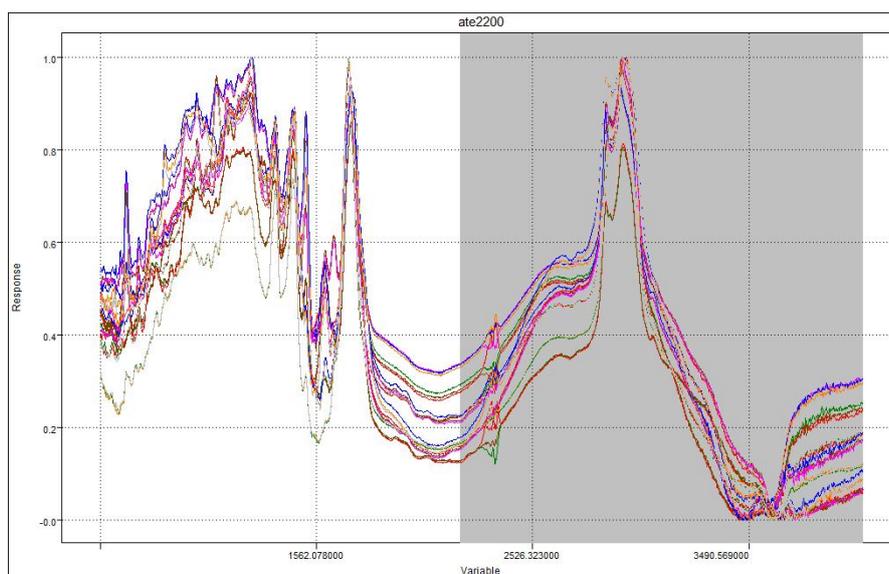


FIGURA 2: Conjunto de espectros no infravermelho por DRIFTS das amostras de própolis.

Após, foi feita a análise por componentes principais (PCA), na qual os melhores resultados obtidos foram quando utilizados como tratamento, as ferramentas estatísticas variação padrão normal (*Standard Normal Variate* - SNV) e ainda os dados centrados na média, utilizando 15 fatores. As quatro componentes principais acumularam 97,73% da informação contida nos espectros, indicando a diferenciação das amostras de própolis. As amostras foram agrupadas, formando 4 grupos, identificados através da análise por agrupamentos hierárquicos (HCA). Nesta etapa foram experimentadas várias formas para construção dos dendrogramas destacando-se simples, flexível e incremental. Os melhores resultados foram àqueles nos quais foi empregado dendrogramas com construção flexível, como ilustra a FIGURA 3.

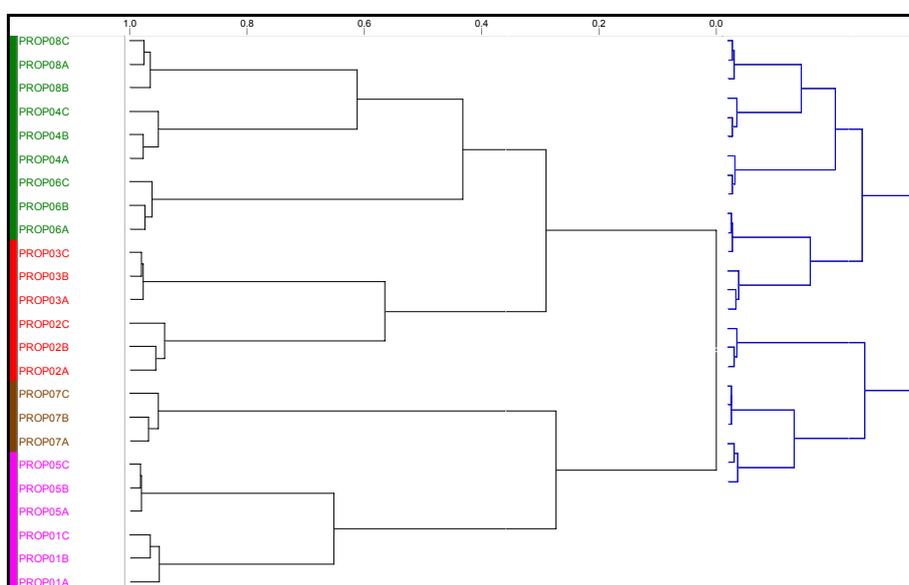


FIGURA 3: Dendrograma para HCA dos espectros no infravermelho das amostras de própolis com construção flexível.

O dendrograma da Figura 3 mostra a separação das amostras em quatro grupos, representados pelas cores verde, vermelha, marrom e rosa. O primeiro grupo, cor verde, agrupa as amostras de própolis das localidades de Sobradinho (PROP08), Cerro Branco (PROP04) e Santo Antônio da Patrulha (PROP06); o segundo grupo, cor vermelha, agrupa as amostras de própolis das localidades de Caçapava do Sul (PROP03) e Candelária (PROP02); o terceiro grupo, cor marrom, está representado pela amostra de própolis da localidade de São Sepé (PROP07); o quarto grupo, cor rosa, agrupa as amostras de própolis das localidades de Lavras do Sul (PROP05) e Camaquã (PROP01).

3.2.2 Análise exploratória dos espectros das amostras de própolis

Entre as vantagens da espectroscopia de infravermelho, está a possibilidade de detecção dos componentes das amostras analisadas. A interpretação dos espectros em infravermelho é baseada principalmente na análise de estruturas conhecidas.

Após a análise dos espectros das amostras de própolis, sua atividade foi predita utilizando diferentes faixas espectrais dentre as amostras utilizadas no estudo. Na TABELA 1, podemos verificar as faixas de absorção e sua atribuição para as diferentes amostras.

TABELA 1: Análise das regiões espectrais das amostras de própolis.

Própolis	Faixa de absorção (cm ⁻¹)	Atribuição
Camaquã e Lavras do Sul	1674-1724	C = O estrutura β-pregueada de proteínas
São Sepé	873-950	C – H ; O – H estiramento simétrico
Candelária e Caçapava do Sul	1253-1284	C – O – C ; C – N ; N – H estiramento assimétrico
Cerro Branco, Santo Antônio da Patrulha e Sobradinho	1496-1531 e 1573-1623	C – N ; C = C ; C = O ; O – H ; N – H deformação de CH ₂ , estruturas β e banda de tirosina

Na FIGURA 4, estão representadas as regiões espectrais selecionadas das amostras de própolis.

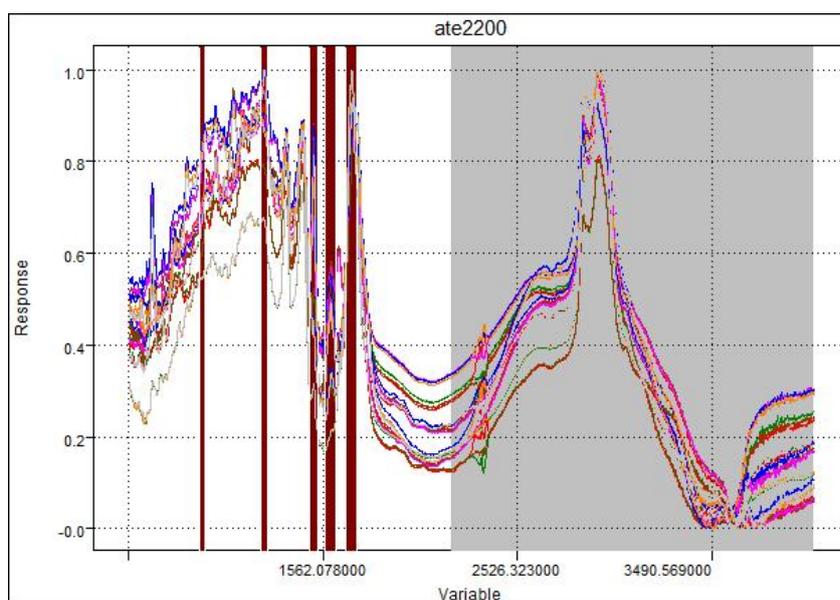


FIGURA 4: Regiões espectrais relacionadas para as amostras de própolis.

As amostras de própolis após a análise dos espectros foram separadas em grupos distintos, devido às diferenças espectrais contidas em sua composição. A região selecionada para as amostras de própolis foi $650\text{-}2200\text{cm}^{-1}$, que indicou uma maior absorção para os diferentes compostos de acordo com cada grupo de amostras. Para a própolis das localidades de Camaquã e Lavras do Sul ($1674\text{-}1724\text{cm}^{-1}$) seus movimentos vibracionais estão associados a estruturas de proteínas; a própolis da localidade de São Sepé ($873\text{-}950\text{cm}^{-1}$) refere-se a aldeídos e estiramento do grupo fosfato; a própolis das localidades de Candelária e Caçapava do Sul ($1253\text{-}1284\text{cm}^{-1}$) refere-se à banda de amida e as própolis das localidades de Cerro Branco, Santo Antônio da Patrulha e Sobradinho ($1496\text{-}1531$ e $1573\text{-}1623\text{cm}^{-1}$) associam-se às bandas de amida, amina e piridina (Naumann et al., 1991).

Almeida & Menezes (2002), relatam que as amostras de própolis contêm grande quantidade de substâncias de estruturas químicas distintas, pertencentes às classes álcoois, aldeídos, ácidos alifáticos, ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, flavonóides, ésteres de carboidratos, éter, ácidos graxos, cetonas, terpenóides, esteróides e açúcares. Após a análise das amostras em estudo por espectroscopia no infravermelho, pode-se avaliar a diversidade de compostos encontrados em sua composição.

3.2.3 Análise espectral das amostras de *F. pedrosoi*

De forma análoga ao conjunto de espectros das amostras de própolis, para os espectros no infravermelho das amostras de *F. pedrosoi*, as regiões onde se evidenciou pouca informação espectral, bem como àquelas onde o ruído no espectro devido ao vapor d'água e dióxido de carbono estavam presentes, foram excluídas. Portanto, na primeira análise os resultados foram obtidos empregando as regiões espectrais compreendidas entre $650\text{-}2200\text{cm}^{-1}$ como apresentado na FIGURA 5.

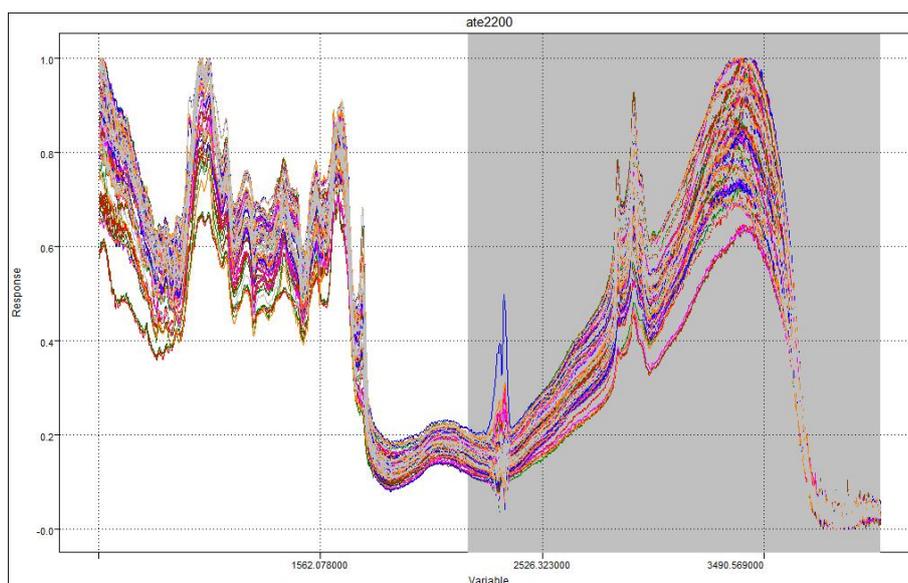


FIGURA 5: Conjunto de espectros no infravermelho por DRIFTS das amostras de *F. pedrosoi*.

Na sequência, foi realizada a PCA, na qual os melhores resultados obtidos foram quando utilizados como tratamento, as ferramentas estatísticas SNV e ainda os dados centrados na média, utilizando 10 fatores. Três componentes principais acumularam 88,28% da informação contida nos espectros, possibilitando a diferenciação das amostras de *F. pedrosoi*, separando-as em dois grandes grupos que podem ser mais facilmente identificados através da análise por agrupamentos hierárquicos (HCA). Para a construção dos dendrogramas, os melhores resultados foram àqueles nos quais foi empregado dendrogramas com construção flexível, como ilustra a FIGURA 6.

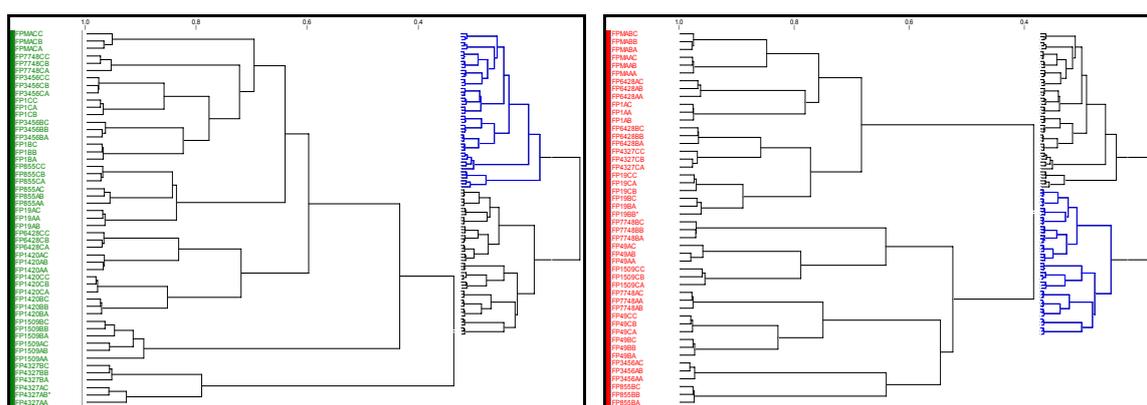


FIGURA 6: Dendrogramas para HCA dos espectros no infravermelho das amostras de *F. pedrosoi* com construção flexível.

Os dendrogramas mostram os dois grandes grupos representadas pela cor verde e que agrupa, preferencialmente, as amostras de *F. pedrosoi* 43456

(FP3456), 1 (FP1), 855 (FP855), 1509 (FP1509), 1420 (FP1420) e 44327 (FP4327). No segundo grupo, representado pela cor vermelha, as amostras agrupadas são *Fonsecaea pedrosoi* MA (FPMA), 47748 (FP7748), 19 (FP19), 46428 (FP6428) e 49 (FP49).

3.2.4 Análise exploratória dos espectros da biomassa das amostras de *F. pedrosoi*

A interpretação dos espectros em infravermelho de moléculas biológicas são baseados principalmente na análise de estruturas conhecidas. Proteínas, lipídios e carboidratos estão constantemente presentes. A TABELA 2 apresenta algumas bandas do infravermelho e suas atribuições.

TABELA 2: Atribuições de algumas bandas frequentemente encontradas em espectro de infravermelho microbiano.

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
~ 3500	O – H estiramento de grupos hidroxil
~ 3200	N – H estiramento (amida A) de proteínas
2959	C – H estiramento (assimétrico) de CH ₃
2934	C – H estiramento assimétrico de >CH ₂
2921	C – H estiramento assimétrico de >CH ₂ em ác. graxos
2898	C – H estiramento de CH metino
2872	C – H estiramento (simétrico) de CH ₃
2852	C – H estiramento (simétrico) de >CH ₂ em ác. graxos
1741	>C=O estiramento de ésteres
~ 1695	Componentes da banda de amida I
~ 1675	Estrutura β-pregueada de proteínas
~ 1655	Amida I de estruturas α-hélice
~ 1637	Amida I de estruturas β
1548	Amida II
1515	Banda de tirosina
1468	C – H deformação de >CH ₂
~ 1400	C = O estiramento (simétrico) de COO ⁻
1310-1240	Banda de amida III, componentes de proteínas
1250-1220	P = O estiramento (assimétrico) de >PO ₂ ⁻
1200-900	C – O – C, C – O vibrações do anel de carboidratos
1085	P = O estiramento (simétrico) de >PO ₂ ⁻
900-600	Região de impressão digital

Fonte: Naumann et al., 1991

Após a análise dos espectros das amostras de *F. pedrosoi*, seu perfil de diferenciação entre os grupos formados foi predito utilizando faixas espectrais relacionadas com a análise de sua biomassa. Na TABELA 3, podem ser verificadas as faixas de absorção e suas atribuições para as amostras agrupadas no segundo grupo, representado pela cor vermelha no dendrograma anterior.

TABELA 3: Análise das regiões espectrais das amostras de própolis.

<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Faixa de absorção (cm ⁻¹)	Atribuição
Região 1	1037-1097	C – O vibrações do anel de carboidratos
Região 2	1141-1164	C – O vibrações do anel de carboidratos
Região 3	1216-1307	N – H ; P = O estiramento assimétrico de >PO ₂ ⁻
Região 4	1319-1477	C = O estiramento simétrico de COO-
Região 5	1500-1695	N – H amida I de estruturas α e β de proteínas
Região 6	1731-1758	C = O estiramento de ésteres

Na FIGURA 7, estão representadas as regiões espectrais selecionadas da biomassa das amostras de *F. pedrosoi*.

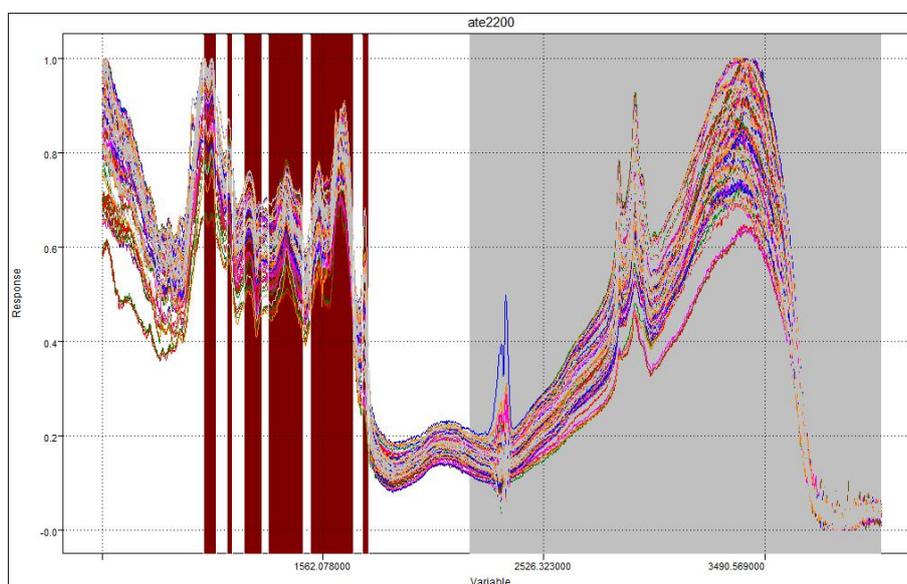


FIGURA 7: Regiões espectrais relacionadas com as amostras de *F. pedrosoi* MA, 47748, 19, 46428 e 49.

Quando analisadas as amostras de *F. pedrosoi*, é interessante observar que, apesar de pertencerem a mesma espécie, estas apresentaram diferenças

espectrais que as separaram em dois grupos. A região selecionada para as amostras de *F. pedrosoi*, 650-2200 cm^{-1} , indica contribuições de movimentos vibracionais associados a bandas de éter (C – O, 1037-1097 cm^{-1}), estiramento do anel de carboidratos (C – O, 1141-1164 cm^{-1}), ésteres de fosfato e bandas de amida (P = O e N – H, 1216-1307 cm^{-1}), estiramento da ligação de cetona (C = O, 1319-1477 cm^{-1}), bandas de amida (N – H, 1500-1695 cm^{-1}) e estiramento de ésteres (C = O, 1731-1758 cm^{-1}), o que contribuiu para a separação das amostras de *F. pedrosoi* MA, 47748, 19, 46428 e 49 (Naumann et al., 1991).

Outra observação importante na formação dos grupos foi que as amostras de *F. pedrosoi* que demonstraram maior sensibilidade na avaliação da atividade antifúngica *in vitro*, são as componentes do grupo representado pela cor vermelha no dendrograma anterior. A única amostra pertencente a este grupo no dendrograma e que não demonstrou sensibilidade é a *F. pedrosoi* 47748. O mesmo ocorreu no grupo representado pela cor verde, onde as amostras pertencentes a este grupo foram as mesmas que demonstraram mais resistência na atividade *in vitro*, com exceção da *F. pedrosoi* 1. O grupo mais sensível difere-se do mais resistente provavelmente pela composição observada nos conjuntos de espectros, atribuindo-se especificamente às faixas de absorção das referidas amostras.

3.2.5 Desenvolvimento de modelos quantitativos empregando PLS

Após uma seleção de variáveis foi possível encontrar um modelo otimizado PLS-DRIFTS, constituído pelas regiões espectrais relacionadas nos espectros de própolis e de biomassa fúngica. Os benefícios em selecionar-se uma região espectral vão desde a estabilidade do modelo em relação à colinearidade, como também na interpretação das relações entre o modelo e a composição da amostra (Borin & Poppi, 2005).

3.2.6 Avaliação dos espectros das amostras de própolis

O melhor modelo PLS para as amostras de própolis foi quando utilizada a concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a amostra de *F. pedrosoi* MA. Os parâmetros estatísticos RMSECV e R^2_{cal} obtidos para representar esse modelo foram 3,44 e 0,98 com apenas 2 variáveis latentes, apresentados na TABELA 4.

Tabela 4: Figuras de mérito para os modelos PLS aplicados aos dados espectrais das amostras de própolis empregando amostras de *F. pedrosoi*.

<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Variáveis Latentes	RMSECV	R^2_{cal}
1	5	3	5,51	0,99
19	40	5	13,76	0,99
49	5	4	5,57	0,99
855	10	4	10,62	0,99
1420	40	4	27,51	0,96
43456	40	2	21,09	0,90
44327	10	5	14,97	0,99
46428	2,5	3	8,60	0,93
47748	20	4	14,83	0,98
MA	40	2	3,44	0,98

Foram criados vários outros modelos utilizando as demais concentrações de própolis, no entanto, estes não estavam tão bem correlacionados, não tendo significância em seus parâmetros estatísticos. Na Tabela 4 foram relacionados aqueles modelos que melhor atenderam essa significância, com valores de RMSECV baixos e uma correlação linear muito próxima de 1.

A FIGURA 8 apresenta o melhor modelo PLS referente a correlação entre as amostras de própolis diante das amostras de *F. pedrosoi*.

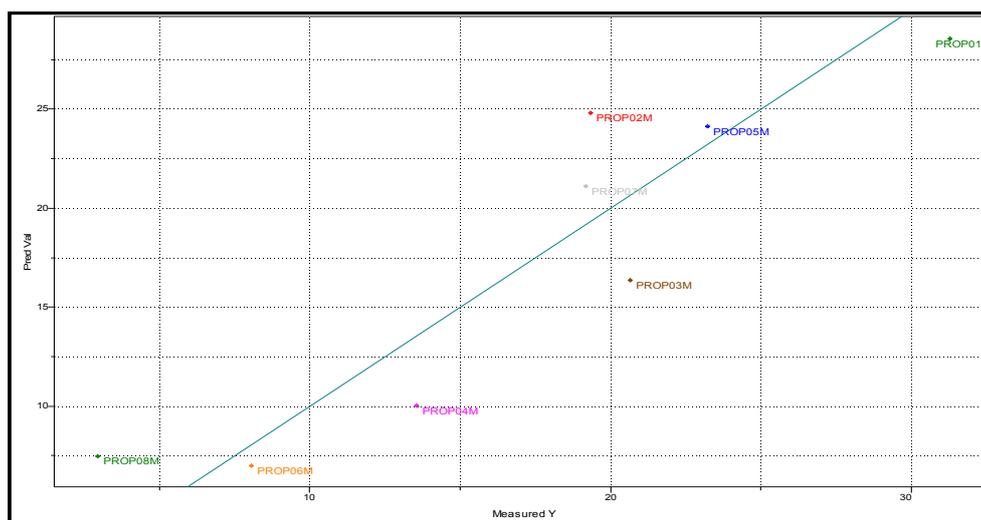


Figura 8: Curva de correlação do tamanho do halo medido X estimado pela média dos espectros das amostras de própolis com concentração de $40\mu\text{g mL}^{-1}$ para a amostra *F. pedrosoi* MA.

A Figura 8 demonstra como ficaram distribuídas as amostras de própolis e seus potenciais antifúngicos diante da amostra de *F. pedrosoi* MA. Nas demais figuras criadas para o modelo PLS, demonstrando o perfil dos espectros das amostras de própolis frente às amostras de *F. pedrosoi*, foi possível observar que, do lado esquerdo inferior, preferencialmente, esteve a amostra de própolis da localidade de Santo Antônio da Patrulha. No lado direito superior, ficaram as amostras de própolis das localidades de Sobradinho e Caçapava do Sul na grande maioria dos gráficos apresentados. Na parte central dos gráficos, agruparam-se as demais amostras de própolis.

3.2.7 Avaliação dos espectros das amostras de *F. pedrosoi*

No caso das amostras de *F. pedrosoi*, o melhor modelo PLS para as amostras foi empregando a própolis da localidade de Santo Antônio da Patrulha na concentração de $40\mu\text{g mL}^{-1}$. Os parâmetros estatísticos RMSECV e R^2_{cal} obtidos para representar esse modelo foram 23,58 e 0,97 com 8 variáveis latentes, apresentados na TABELA 5.

Tabela 5: Figuras de mérito para os modelos PLS aplicados aos dados espectrais das amostras de *F. pedrosoi* empregando amostras de própolis.

Própolis	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Variáveis Latentes	RMSECV	R^2_{cal}
Camaquã	5	7	21,63	0,93
Candelária	40	8	20,61	0,96
Caçapava do Sul	2,5	3	31,02	0,65
Cerro Branco	10	5	23,91	0,92
Lavras do Sul	5	6	23,30	0,92
Santo Antônio da Patrulha	40	8	23,58	0,97
São Sepé	5	6	18,75	0,93
Sobradinho	40	7	42,50	0,89

Para as amostras de *F. pedrosoi* também foram criados vários outros modelos utilizando as demais concentrações de própolis, no entanto, estes não estavam tão bem correlacionados, não apresentando significância em seus parâmetros estatísticos. Na Tabela 5 foram apresentados aqueles modelos que

melhor atenderam essa significância, com valores de RMSECV baixos e uma correlação linear muito próxima de 1.

A FIGURA 9 apresenta o melhor modelo PLS referente a correlação entre as amostras de *F. pedrosoi* diante das amostras de própolis.

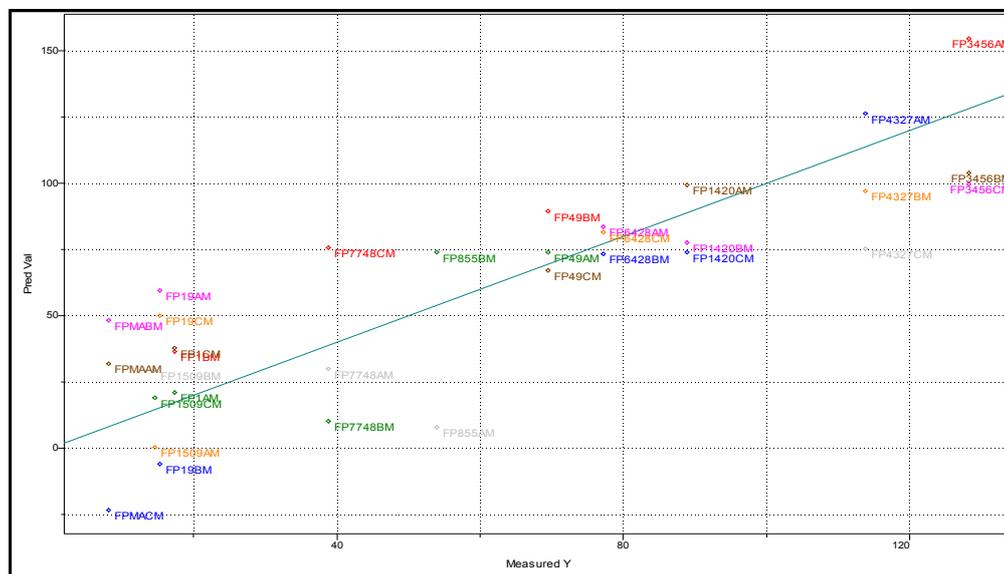


Figura 9: Curva de correlação de halo medido X estimado pela média dos espectros das amostras de *F. pedrosoi* empregando a própolis da localidade de Santo Antônio da Patrulha na concentração de $40\mu\text{gmL}^{-1}$.

A Figura 9 demonstra como ficaram distribuídas as amostras de *F. pedrosoi* diante da amostra de própolis da localidade de Santo Antônio da Patrulha. Nas demais figuras criadas para o modelo PLS, demonstrando o perfil dos espectros das biomassas de *F. pedrosoi* frente às amostras de própolis, foi possível observar que, do lado esquerdo inferior, preferencialmente, esteve a amostra de MA. No lado direito superior, ficaram as amostras de *F. pedrosoi* 43456 e 44327 na maioria dos gráficos. Na parte central, agruparam-se as demais amostras de fungos.

Em relação às amostras de própolis e amostras de fungos observou-se um comportamento linear da atividade fungistática. É importante a criação desses modelos para demonstrar mais facilmente como as amostras de própolis se portaram frente às amostras de *F. pedrosoi* e também, como estes agentes portaram-se frente às amostras de própolis, indicando quais possuem mais significância estatística.

A utilização de ferramentas quimiométricas de classificação e calibração permitiu o desenvolvimento de metodologias empregando técnicas analíticas

pouco utilizadas para as amostras de própolis. Os métodos desenvolvidos apresentaram características de rapidez de execução e operacionalidade melhores que os métodos atualmente utilizados para determinação dos parâmetros estudados.

A utilização de DRIFTS para análise de fungos ainda é pouco descrita. Em agentes causadores da cromoblastomicose existem apenas estudos iniciais. A utilização de DRIFTS e da quimiometria para prever propriedades biológicas tem sido investigada. A atividade lípase foi avaliada em nove amostras de agentes causadores da cromoblastomicose, com culturas produzidas em 14 e 21 dias, onde obtiveram bons resultados nos modelos de predição para atividade lipolítica, utilizando culturas de biomassa fúngica (Corbellini et al., 2009).

No entanto, é importante verificar a utilização de DRIFTS e métodos quimiométricos para caracterizar esses agentes, pois são normalmente diferenciados em ensaios laboratoriais de investigação morfofisiológica demorados (Fischer & Cook, 2001). A proposição de um modelo de classificação deste tipo, permite agilizar estas análises, pois uma vez criado um modelo robusto que aceite grande variabilidade das amostras, este pode ser usado para identificação de novas amostras conforme já propostos para outros organismos patogênicos (Naumann, 2000; Mariey et al., 2001).

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que pelo método de diluição em ágar pode ser possível avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de amostras de *F. pedrosoi*. A atividade antifúngica das amostras de própolis coletadas das localidades de Santo Antônio da Patrulha e Candelária, região central do estado do Rio Grande do Sul - Brasil, mostra-se promissora frente às amostras testadas de *F. pedrosoi*, pois foram as amostras mais ativas no estudo *in vitro*, porém deve-se utilizar um maior número de amostras para obtenção de dados mais concretos quanto sua atividade diante de agentes causadores da cromoblastomicose.

A composição química da própolis é bastante complexa e variada e relaciona-se intimamente com a época, vegetação e área de coleta, diferenciando-se conforme a vegetação e o clima de cada região, logo, um

número maior de amostras de diferentes regiões, coletadas em diferentes épocas do ano, certamente resultariam em dados mais concretos quanto a sua possível utilização em agentes da cromoblastomicose (Ghisalberti, 1979; Bankova et al. 1998; Park & Ikegaki, 1998; Russo et al., 2002; Castro et al., 2007).

A utilização de DRIFTS associada a ferramentas quimiométricas para analisar os dados da impressão digital obtida através da biomassa de amostras de *F. pedrosoi* e das amostras de própolis em estudo, mostrou-se extremamente útil, principalmente pela existência de um grande número de informações. Foi possível obter informações rápidas e eficientes sobre a similaridade das amostras em estudo, através da seleção de variáveis, classificação e calibração das amostras. É uma técnica alternativa simples e rápida para a determinação da composição de amostras complexas, como é o caso das amostras de própolis e de *F. pedrosoi*. As principais vantagens do método proposto foram redução do tempo de análise, a não destruição da amostra, pouca manipulação e minimização da geração de resíduos químicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. C.; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *Journal of Venomous and Animals Toxins*, 8 (2), 191 - 212, 2002.

ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; SOUZA, W.; ANGLUSTER, J.; TRAVASSOS, L. R. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Journal of General Microbiology*, 137 (4), 837 - 844, 1991.

BANKOVA, V. S.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations in essential oil from Brazilian propolis. *Journal of Essential Oil Research*, 10, 693 - 696, 1998.

BORIN, A.; POPPI, R. J. Application of mid infrared spectroscopy and iPLS for the quantification of contaminants in lubricating oil. *Vibrational Spectroscopy*, 37, 27 - 32, 2005.

BUTTY, P.; LEBECQ, J. C.; MALLIÉ, M.; BASTIDE, J. M. Evaluation of the susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a new technique. *Journal of Medical & Veterinary Mycology*, 33 (6), 403 - 409, 1995.

CALIGIORNE, R. B.; RESENDE, M. A.; OLIVEIRA, R. C. B. W.; VALÉRIO, H. M.; CORDEIRO, R. A.; AZEVEDO, V. Fungos dematiáceos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 11, ano 2, 22 - 25, 1999.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Propolis from southeastern and northeastern of Brazil: the influence of seasonality in antibacterial activity and phenolic composition. *Química Nova*, 30 (7), 1512 - 1516, São Paulo, 2007.

CORBELLINI, V. A.; SCROFERNEKER, M. L.; CARISSIMI, M.; COSTA, J. M.; FERRÃO, M. F. Lipolytic activity of chromoblastomycosis agents measured by infrared spectroscopy and chemometric methods. *Medical Mycology*, 47, 63 - 69, 2009.

COSTA, J. M. Caracterização enzimática de agentes da cromoblastomicose com ênfase em atividade lipase. *Dissertação de Mestrado*, UFRGS, 2006.

CUCÉ, L. C.; WROLCLAWSKI, E. L.; SAMPAIO, S. A. P. Treatment of paracoccidioidomycosis, candidiasis, chromomycosis, lobomycosis, and mycetoma with ketoconazole. *International Journal of Dermatology*, 19, 405 - 408, 1980.

FARBIARZ, S. R.; CARVALHO, T. U.; ALVIANO, C.; SOUZA, W. Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells *in vitro*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 30 (4), 265 - 273, 1992.

FERNANDES, F. F.; DIAS, A. L. T.; RAMOS, C. L.; IKEGAKI, M.; SIQUEIRA, A. M.; FRANCO, M. C. The "in vitro" antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 49 (2), 93 - 95, 2007.

FERREIRA, M. M. C. Multivariate QSAR. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, São Paulo, 13 (6), 742 - 753, 2002.

FIDÊNCIO, P. H. Análise de solos por espectroscopia no infravermelho próximo e aplicação de métodos quimiométricos. *Tese de Doutorado*, UNICAMP, 2001.

FISCHER, F.; COOK, N. B. Micologia: Fundamentos e Diagnóstico. Trad. FIORAVANTI, I. *Livraria e Editora Revinter Ltda*, Rio de Janeiro - RJ., 337, 2001.

FUCHS, J.; PECHER, S. Partial suppression of cell mediated immunity in chromoblastomycosis. *Mycopathologia*, 119 (2), 73 - 76, 1992.

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

GIMENES, V. M. F.; SOUZA, M. G.; FERREIRA, K. S.; MARQUES, S. G.; GONÇALVES, A. G.; SANTOS, D. V. C. L.; PEDROSO E SILVA, C. M.; ALMEIDA, S. R. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes and Infections*, 7 (4), 708 - 713, 2005.

GOMES, M. H. R.; RESENDE, M. A. *Fonsecaea pedrosoi*: lipid composition and determination of susceptibility to amphotericin B. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 209 - 214, 1991.

GUPTA, A. K.; TABORDA, P. R.; SANZOVO, A. D. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Medical Mycology*. 40, 529 - 534, 2002.

IWATSU, T.; MIYAJI, M.; TAGUCHI, H.; OKAMOTO, S.; KURITA, N. Skin test-active substance prepared from culture filtrate of *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycopathologia*, 67 (2), 101 - 105, 1979.

KOROLKOVAS, A. *Dicionário Terapêutico Guanabara*, Ed. Guanabara Koogan, cap. 18, 18.14 - 18.19, 2004.

MARIEY, L.; SIGNOLLE, J. P.; AMIEL, C.; TRAVERT, J. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, 26, 151 - 159, 2001.

MARQUES, S. G.; SILVA, C. M. P.; SALDANHA, P. C.; REZENDE, M. A.; VICENTE, V. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; COSTA, J. M. L. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the Babassu Cocomet (*Orbignya phalerata Martius*) in the Amazon Region of Maranhão Brazil. *Japanese Journal of Medical Mycologic*, 47 (4), 305 - 311, 2006.

MATTE, S. M. W.; LOPES, J. O.; MELO, I. S.; ESPADIM, L. E. R.; PINTO, M. S. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30 (4), 36 - 42, 1997.

MCGINNIS, M. R.; PASARELL, L. In vitro evaluation of terbinafine and itraconazole against dematiaceous fungi. *Medical Mycology*. 36, 243 - 246, 1998.

MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C.; FERREIRA, M. M. C. Application of exploratory analysis to the differentiation of vegetables. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2 (1,2), 73 - 79, 1999.

NAUMANN, D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Meyers, R.A (Ed.) Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 102 - 131, 2000.

NAUMANN, D.; LABISCHINSKI, H.; GIESBRECHT, P. The characterization in microorganism by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), in modern techniques for rapid microbiological analysis. *Ed. W. H. Nelson*, VCH, New York, 43 - 96, 1991.

OGAWA, M. M.; ALCHORNE, M. M. A.; BARBIERE, A.; CASTIGLIONI, M. V.; PENNA, A. P. B.; TOMIMORI-YAMASHITA, J. Lymphoscintigraphic analysis in chromoblastomycosis. *International Journal of Dermatology*, 42 (8), 622 - 625, 2003.

ORSI, R. O.; FUNARI, S. R. C.; SOARES, A. M. V. C.; CALVI, S. A.; OLIVEIRA, S. L.; SFORCIN, J. M. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous and Animals Toxins*, 6 (2), 205 - 219, 2000.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Evaluation on ethanol extracts of propolis from Brazil and Korea by physicochemical and biological methods. *Korean Journal of Apiculture*, 13, 27 - 34, 1998.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia Alimentos*, 18 (3), 313 - 318, 1998.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybee Science*. Tamagawa, Japan, 21, 85 - 90, 2000.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, D. A.; SOBERÓN, J. R.; SGARIGLIA, M. A.; VATTUONE, M. A. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 103 - 110, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*, Ed. Guanabara Koogan - Rio de Janeiro - RJ, 3ª edição, 692, 1997.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 73, 21 - 29, 2002.

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

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*, Ed. Guanabara Koogan - Rio de Janeiro - RJ, 287, 1999.

SILICI, S.; KOC, A. N. Comparative study of in vitro methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 318 - 324, 2006.

SILVA, J. P.; SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia*, 143 (3), 171 - 175, 1999.

RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; CHAIRMAN, F. B.; BILLE, J.; CHRYSANTHOU, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DENNING, D.; DONNELLY, J. P.; DUPONT, B.; FEGELER, W.; MOORE, C.; RICHARDSON, M.; VERWEIJ, P. E. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection*, 9 (8), 467 - 474, 2003.

VIVAS, J. R. C.; TORRES-RODRÍGUEZ, J. M. Sensibilidad de hongos miceliares dematiáceos a diez antifúngicos empleando un método de difusión en agar. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18, 113 - 117, 2001.

WOLD, S.; SJÖSTROM, M. Chemometric, present and future success. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 44, 3 - 14, 1998.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

***In vitro* antifungal activity of propolis against *Fonsecaea pedrosoi* using chemometric tools combined with infrared spectroscopy**

Short title: Propolis against *Fonsecaea pedrosoi*.

Claisson Jodel dos Santos^{a,c}; Valeriano Antonio Corbellini^b; Marco Flôres Ferrão^b; Maria Lúcia Scroferneker^{a,c}

^aGraduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

^bDepartment of Chemistry and Physics, Universidade de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

^cDepartment of Microbiology of the Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

Correspondence:

Valeriano Antonio Corbellini,

Rua Davi Canabarro 35/Apto 5, Santa Cruz do Sul,

CEP 96820-140, Brazil.

Tel.: +55 51 3717 7390; fax: +55 51 3717 1855

E-mail: valer@unisc.br and scrofern@ufrgs.br

SUMMARY

The *in vitro* antifungal activity of ethanolic extracts of propolis was evaluated at five different concentrations in twelve *Fonsecaea pedrosoi* strains using agar dilution. Eight propolis extracts were collected from towns located in the central region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy was employed to analyze the spectra of lyophilized propolis extracts and of the fungal biomasses produced by *F. pedrosoi*. The use of chemometric tools allowed for the development of models with more relevant factors and with fewer variables. First, principal components analysis, followed by hierarchical clustering analysis, was used to cluster the variables according to their similarities. Four groups were formed for propolis extracts and two large groups were formed for *F. pedrosoi* strains. Thereafter, partial least squares (PLS) regression was applied, allowing for the development of optimized models for the prediction of antifungal activity. The best PLS model for propolis extracts was that at the concentration of $40\mu\text{g mL}^{-1}$ for *F. pedrosoi* MA, with RMSECV=3.44 and $R^2_{\text{cal}}=0.98$ with two latent variables; and the best PLS model for *F. pedrosoi* strains was that at the concentration of $40\mu\text{g mL}^{-1}$, with RMSECV=23.58 and $R^2_{\text{cal}}=0.97$ with eight latent variables.

Keywords: *Fonsecaea pedrosoi*, propolis, DRIFTS, chemometric tools.

Introduction

Chromoblastomycosis is a subcutaneous polymorphic fungal disease that affects the skin and the subcutaneous cellular tissue and which is characterized by desquamative lesions that evolve slowly and progressively into various skin lesions and may spread into adjacent tissues [1,2]. It is a ubiquitous disease that occurs in tropical and subtropical regions. In Brazil, chromoblastomycosis has an endemic course in the states of Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais and in the states located in the Amazon region [2-5].

The disease is caused by different dematiaceous fungi, including mainly *Rhinocladiella aquaspersa*, *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea compactum*, *Phialophora verrucosum* and *Fonsecaea pedrosoi* [6,7]. *F. pedrosoi* is the major etiologic agent in our region, and it can be found in the soil, air and decaying vegetables [2,5,8].

To date, no drug or procedure is known to be totally effective in eliminating this fungus from the body. However, among some of the drugs recommended against this fungus, azole derivatives have been the first line of treatment [9,10].

New treatment alternatives against microbial infections have used natural products due to the proven efficacy of some of these products against microorganisms considered to be harmful to human health [11]. Propolis is one of these products. Nevertheless, its antifungal potential has not been investigated in chromoblastomycosis agents, thus opening the path for new research in this area. Propolis is a resinous substance that honeybees collect from several parts of a plant. Its chemical composition varies widely and it contains

a large amount of substances with pharmacological potential in its formulation, and it is believed that it can be successfully used to treat human and veterinary diseases [12,13].

In Medicine, propolis has been used in different areas, with therapeutic potential against fungi as well [13-16]. Its antifungal potential has been reported in several genera, such as *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*. The *in vitro* activity of the ethanolic extract of propolis against some microorganisms also has been investigated, and reports include species like *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and *glabrata*, *Trichosporon sp.* and *Rhodotorula sp.* [17-20].

On the other hand, it is necessary to use more powerful statistical tools that allow predicting the susceptibility of fungi to different antifungal agents containing complex mixtures of natural products, such as propolis, and which can facilitate the assessment of their antifungal properties against these microorganisms. Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS), combined with chemometrics, has been used as a robust tool to differentiate, classify and identify microorganisms [21]. In these cases, chemometrics helps to decide which determinations are important and which of them can be discarded.

This can be achieved by principal components analysis (PCA), which is based on the correlation between numerous variables, by grouping those that are closely related, turning them into a smaller number of factors, known as principal components. The samples can also be clustered according to similarity and the data obtained can be represented in a two-dimensional diagram denominated dendrogram. In this case, hierarchical clustering analysis (HCA) is employed [22].

Chemometric methods for multivariate analyses have become quite common, enabling the quick analysis of the spectral signatures of complex samples and are even more efficient in the selection of these regions, thus minimizing prediction errors. There are algorithms that indicate the spectra that can yield the best results, and partial least squares (PLS) regression is the one most widely used [23,24]. This method consists in building a data matrix using spectral data and properties of interest, eliminating information that is not relevant to the system using linear combinations through PCA, establishing a relationship between matrices (reduced by PCA) and the matrix that has the property of interest [25].

In this regard, chemometrics, coupled to infrared spectroscopy, is a recent technique used for the classification and identification of microorganisms, which provides quicker and less complex analyses, using a small amount of samples, thus reducing the generation of residues [21,26]. In Microbiology, multivariate infrared analysis using absorbances associated with the frequencies produced by diffuse reflectance spectra has allowed for the differentiation, classification and identification of different genera of bacterial isolates and of some yeasts as well [27,28].

Material and methods

Fungal strains

F. pedrosoi strains 1, 19, 49, 855, 1420, 1509, 43456, 44327, 46422 ATCC, 46428 ATCC, 47748 and MA were obtained from the Laboratory of Pathogenic Fungi of the Department of Microbiology of the Institute of Basic Health Sciences of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, and stored on Sabouraud dextrose agar (Difco, Detroit, MI, USA) at 35°C.

Inoculum of fungal strains

For inoculum preparation, the fungi were grown in 50mL Erlenmeyer flasks containing 10mL of YEPD agar (gL^{-1} : anhydrous glucose (Synth®) 40, bacteriological peptone (Oxoid®) 10, 1% yeast extract (Oxoid®) and bacteriological agar (Oxoid®) 20, 1L of sterile distilled water) for 14 days at 35°C. At day 15, 10mL of YEPD broth were added to the species and the cell material was suspended by way of agitation with a magnetic pin for around 10 minutes. The material was incubated again for 24 hours and the procedure was repeated twice. Aliquots of 1mL of the suspended cell material were plated onto Petri dishes measuring 7cm in diameter and containing 10mL of YEPD agar. The dishes containing YEPD agar and the cell material were incubated in an oven at 35°C for more 14 days, until the surface of the agar was totally covered.

Preparation of propolis extracts

Eight propolis extracts were collected from different sites in the central region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil (Camaquã, Candelária, Caçapava do Sul, Cerro Branco, Lavras do Sul, Santo Antônio da Patrulha, São Sepé and Sobradinho) between January and February 2007. Each of these extracts underwent an extraction process. Fifteen grams of propolis *in natura* were weighed and then macerated with 150mL of 95% ethanol (ethyl alcohol) (Nuclear®). After that, the resulting compound was submitted to simple filtration for 24 hours. The solution obtained was evaporated in a rotary evaporator at 78°C and at 105 rpm for 30 minutes. The resulting resin was transferred into an amber flask, which was allowed to rest for 7 days in a dehydrator filled with silica gel for total dehydration.

Preparation of solutions

From solutions of 3.2 mgmL⁻¹ of itraconazole (Galena®) and 40 mgmL⁻¹ of propolis in dimethylsulfoxide (DMSO) (Nuclear®), we used the concentrations of antifungals that, after dilution 1:100 in agar, corresponded to plasma concentrations and to the minimum inhibitory concentration (MIC) values [29,30]. Five serial dilutions were performed in the same solvent in order to obtain solutions containing 3.2; 1.6; 0.8; 0.4 and 0.2 µgmL⁻¹ of itraconazole and 40; 20; 10; 5 and 2.5 µgmL⁻¹ of propolis.

Antifungal activity assay

Culture discs measuring 5 mm in diameter were cut out of dishes containing *F. pedrosoi* strains with the help of punch biopsy tool 5. The discs were placed in an inverted position, in triplicate, in 7cm Petri dishes, with 9.9mL of YEPD agar and 0.1mL of antifungal solution. As negative control (absence of antifungal solution), two dishes were inoculated with agar supplemented with 0.1mL of DMSO. The dishes were then incubated for 21 days at 35°C and were submitted to analysis of radial mycelial growth (RMG) diameters. The RMG diameter for each concentration was determined as follows: the perpendicular diameters (d_{i1} e d_{i2}) of each disc per dish were initially determined with a digital pachymeter (precision of 0.1mm), and the mean diameter (d_i) was calculated for each disc using the following formula:

$$\text{Equation (1)} \quad d_i = (d_{i1} \times d_{i2})^{1/2}$$

The final mean diameter per dish was obtained with the arithmetic mean of the mean diameters of each disc according to the following formula:

Equation (2)
$$D_i = \frac{(d_1 + d_2 + d_3)}{3}$$

The results were expressed in mean diameter graph, D_i , (in mm) X antifungal concentration, including the calculation of standard deviation for each mean.

Biomass production by *F. pedrosoi* strains

Biomass of *F. pedrosoi* strains was obtained with microcultivation on glass slides [11]. The technique consisted in placing a slide with small Sabouraud agar blocks in a Petri dish; some drops of a suspension containing fungal spores were added to the blocks, which were covered with another slide. The dishes were then incubated for 7 days at 35°C until mycelial growth occurred.

Analysis of the biomass produced by *F. pedrosoi* strains and of the ethanolic extracts of propolis using infrared spectroscopy

Infrared spectra were recorded using a Magna 550 (Nicolet®) spectrophotometer coupled to a diffuse reflectance device with a monochromatic light source for solid strains (mycelium produced by *F. pedrosoi* and lyophilized propolis extracts) previously ground and mixed with KBr. Each spectrum was collected in triplicate in the 650 and 4000 cm^{-1} cm absorbance spectrum (32 scans).

Chemometric and statistical analyses

The data obtained by infrared spectroscopic analysis of propolis extracts and of *F. pedrosoi* strains were converted into a data matrix using Microsoft Excel and then transferred and handled by Pirouette® 3.11 software (Infometrix). Spectral information was modeled with PCA, HCA and PLS. The statistical parameters used to assess the models obtained were

the determination coefficient (R^2_{cal}) (as close to 1 as possible) and the root mean square error of cross validation (RMSECV). Simultaneously, the cumulative relative variance was also determined in order to get an idea of the information necessary to build optimized models, given the number of factors used.

Results and discussion

In vitro antifungal activity

Agar dilution is not the standard method for assessing *in vitro* antifungal activity of clinical isolates, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), which is based on broth macrodilution or microdilution [11]. However, agar dilution is widely used in preliminary studies of new compounds with fungistatic potential due to the ease with which it generates data that correlate growth diameter with the concentration of the agent to be tested. Through this technique, it has been possible to find similarities in results obtained from other methods that assess fungistatic activity in dermatophytes; therefore it is an efficient, reliable, quick and highly reproducible technique [31]. By determining the RMG, one can assess the profile of the antifungal activity of propolis extracts, whose behavior is shown in Figures 1A to 1I.

Figures 1A to 1H show the behavior of *F. pedrosoi* strains in terms of the antifungal activity of propolis extracts from different towns in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. The behavior of itraconazole, which is an azole derivative and is used to treat patients with chromoblastomycosis, is shown in Figure 1I [32,33].

Agar dilution for dermatophytes was utilized by Silici & Koc [19] to assess the *in vitro* antifungal activity of propolis, and it proved to be suitable for this type of analysis. In the

figures that refer to this technique, there is a smaller antifungal activity of propolis extracts against *F. pedrosoi* 43456. Among the analyzed strains, this was the one that yielded higher resistance, especially at intermediate concentrations (10 and 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), and in this case, special attention should be given to Figures 1D and 1H. Strain 44327, when the extracts from Candelária, Cerro Branco and Lavras do Sul (Figures 1B, 1D and 1E) were tested, showed a high RMG, revealing higher resistance to the other *F. pedrosoi* strains. At low concentrations (2.5 and 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *F. pedrosoi* 47748 is amongst the most resistant strains to propolis extracts from Caçapava do Sul and São Sepé (Figures 1C and 1G).

For all propolis extracts analyzed, MA was the most sensitive *F. pedrosoi* strain, with a low RMG (Figures 1A through 1I), but special attention should be paid to Figures 1D, 1F and 1H where RMG was virtually absent. At the initial concentration, strain 46428 demonstrated high sensitivity (Figures 1B and 1D). Strains 1 and 49, at some concentrations, also had a low RMG. All other *F. pedrosoi* strains showed linear growth with little variation in their curves.

Although the antifungal properties of propolis are widely described in the literature [34-36], they cannot be generalized to all types of microorganisms. In the specific case of this study, the investigated extracts showed a distinct behavior, but the extracts from Santo Antônio da Patrulha and Candelária had the highest antifungal potential. On the other hand, the extracts from Sobradinho, Caçapava do Sul and Camaquã had a lower antifungal activity, because when they were used, *F. pedrosoi* strains had a higher RMG than the remaining extracts.

Figure 11, which shows the activity of itraconazole against *F. pedrosoi* strains, indicates good inhibitory effect on fungal growth, but such inhibition is similar to the activity of propolis extracts analyzed. This is an interesting result mainly for patients on chronic use (4 to 8 months, on average) of azole compounds. In these cases, adverse effects, such as hepatotoxicity (fulminant hepatitis), are common due to elevated plasma levels of these azole compounds; however, their combination with propolis could minimize these effects by reducing the therapeutic dose of these compounds in plasma. Nonetheless, these are just assumptions that need to be confirmed by future research, as *in vitro* results are not always reproducible *in vivo* [37].

Another aspect that should be contemplated is that the results above were obtained from vegetative cells as this is how these cells naturally grow in the medium used. However, in sclerotic cells found in humans, they might yield different results, because these structures have a different biochemical composition from that of vegetative cells, chiefly with respect to melanin concentration and lipid composition, which build up resistance to phagocytosis and to the action of other cells in the host's immune system [38-40].

Infrared spectroscopy and multivariate analysis of propolis extracts and *F. pedrosoi* strains

The use of chemometric methods was based on the selection of spectral regions employing DRIFTS obtained from ethanolic extracts of lyophilized propolis and from the biomass produced by *F. pedrosoi* strains. The selection of spectral regions followed a criterion based on characteristic regions of the absorption spectrum of biomolecules which are often detected in large numbers, using the total spectrum [27]. For the multivariate analysis of data, spectral information was converted into a data matrix using Microsoft Excel and was then analyzed by Pirouette® software version 3.11 (Infometrix).

Spectral analysis of propolis extracts

The regions with little spectral information, as well as those with spectral noise caused by water vapor and carbon dioxide, were excluded from the analysis. Therefore, the results were obtained from spectral regions between 650 and 2200 cm^{-1} (Figure 2).

After that, PCA was carried out, and the best results were obtained when we used the standard normal variate (SNV) and mean-centered data, totaling 15 factors, as statistical tools. The four principal components accounted for 97.73% of the information obtained from the spectra, thus indicating differentiation of propolis extracts. The extracts were clustered into four groups by way of HCA. At this stage, several dendrogram designs were tested, including the simple, flexible and incremental types. The best results were those in which flexible dendrograms were utilized (Figure 3).

The dendrogram in Figure 3 shows the categorization of extracts into four groups, represented by the following colors: green, red, brown and pink. The first group (green) clusters the propolis extracts obtained from Sobradinho (PROP08), Cerro Branco (PROP04) and Santo Antônio da Patrulha (PROP06); the second group (red) clusters the propolis extracts obtained from Caçapava do Sul (PROP03) and Candelária (PROP02); the third group (brown) represents the propolis extracts collected from São Sepé (PROP07) and the fourth group (pink) contains the propolis extracts obtained from Lavras do Sul (PROP05) and Camaquã (PROP01).

Exploratory analysis of the spectra of propolis extracts

One of the advantages of infrared spectroscopy is the possibility to detect the components of the analyzed extracts. The interpretation of infrared spectra is based mainly upon the analysis of known structures.

After the analysis of the spectra of propolis extracts, their activity was predicted by the use of different spectral regions. Table 1 shows the absorption spectra and their distribution across the different extracts.

Figure 4 presents the spectral regions of propolis extracts.

After spectral analysis, propolis extracts were placed in different groups, based on the spectral differences found in their composition. The $650\text{-}2200\text{cm}^{-1}$ region was selected for the propolis extracts. It showed higher absorption for the different compounds according to each group of extracts. For the extracts from Camaquã and Lavras do Sul ($1674\text{-}1724\text{cm}^{-1}$), their vibrational spectra are associated with protein structures; the extract from São Sepé ($873\text{-}950\text{cm}^{-1}$) refers to aldehydes and stretching of the phosphate group; the extracts from Candelária and Caçapava do Sul ($1253\text{-}1284\text{cm}^{-1}$) refer to the amide band, and the extracts from Cerro Branco, Santo Antônio da Patrulha and Sobradinho ($1496\text{-}1531$ and $1573\text{-}1623\text{cm}^{-1}$) are associated with amide, amine and pyridine bands [41].

Almeida & Menezes [42] report that propolis extracts contain a large amount of substances with different chemical structures, including alcohols, aldehydes, aliphatic acids, aliphatic esters, amino acids, aromatic acids, aromatic esters, flavonoids, carbohydrate esters, ether, fatty acids, ketones, terpenoids, steroids and sugars. After analyzing the extracts by

infrared spectroscopy, it is possible to have an idea about the wide array of compounds found in their composition.

Spectral analysis of *F. pedrosoi* strains

With regard to the infrared spectra of *F. pedrosoi* strains, similarly to the spectra of propolis extracts, the ranges with little spectral information, as well as those with spectral noise caused by water vapor and carbon dioxide, were excluded from the analysis. Therefore, the results were obtained from spectral regions between 650-2200 cm^{-1} (Figure 5).

After that, PCA was carried out, and the best results were obtained when we used SNV and mean-centered data, totaling 10 factors, as statistical tools. Three principal components accounted for 88.28% of the information obtained from the spectra, thus indicating differentiation of *F. pedrosoi* strains, placing them in two large groups, which can be more easily identified by HCA. The best results were those in which flexible dendrograms were utilized (Figures 6A and 6B).

The dendrograms show two large groups (green and red). The first group (green) contains strains 43456 (FP3456), 1 (FP1), 855 (FP855), 1509 (FP1509), 1420 (FP1420) and 44327 (FP4327). The second group (red), contains strains MA (FPMA), 47748 (FP7748), 19 (FP19), 46428 (FP6428) and 49 (FP49).

Exploratory analysis of the spectra of the biomass produced by *F. pedrosoi* strains

The interpretation of infrared spectra of biological molecules is based mainly upon the analysis of known structures. Proteins, lipids and carbohydrates are often present. Table 2 shows some infrared spectra and their attributes.

After the spectra of *F. Pedrosoi* strains were analyzed, the differentiation profile across groups was predicted using spectral regions related to the analysis of their biomass. Table 3 shows the absorption spectra and their attributes for the strains placed in the second group (red) in the dendrogram above.

Figure 7 presents the spectral regions selected for the biomass of *F. pedrosoi* strains.

When *F. pedrosoi* strains were analyzed, it was interesting to note that, despite the fact that they belong to the same species, there were spectral differences, and therefore they were classified into two groups. The region selected for *F. pedrosoi* strains ($650\text{-}2200\text{cm}^{-1}$) indicates vibrational spectra associated with ether bands ($\text{C} - \text{O}$, $1037\text{-}1097\text{cm}^{-1}$), stretching of the carbohydrate ring ($\text{C} - \text{O}$, $1141\text{-}1164\text{cm}^{-1}$), phosphate esters and amide bands ($\text{P} = \text{O}$ and $\text{N} - \text{H}$, $1216\text{-}1307\text{cm}^{-1}$), stretching of the ketone bond ($\text{C} = \text{O}$, $1319\text{-}1477\text{cm}^{-1}$), amide bands ($\text{N} - \text{H}$, $1500\text{-}1695\text{cm}^{-1}$) and stretching of esters ($\text{C} = \text{O}$, $1731\text{-}1758\text{cm}^{-1}$), which contributed towards the separation of strains MA, 47748, 19, 46428 and 49 [41].

Another important finding is that *F. pedrosoi* strains which showed higher sensitivity in the assessment of their *in vitro* antifungal activity are those from the second group (red). The only strain belonging to this group and which did not show any sensitivity was *F. pedrosoi*

47748. The same occurred in the first group (green), where the strains were the same that revealed higher resistance in the *in vitro* activity, except for *F. pedrosoi* 1. The most sensitive group differs from the most resistant one probably due to the composition of spectra, specifically due to the absorption spectra of these strains.

Development of quantitative models using PLS

After the selection of variables it was possible to find an optimized PLS-DRIFTS model, made up of spectral regions associated with the spectra of propolis and fungal biomass.

The benefits of selecting a spectral region include the stability of the model in relation to collinearity and the interpretation of relationships between the model and the composition of the strain [24].

Spectral analysis of propolis extracts

The best PLS model for propolis extracts was obtained at the concentration of $40\mu\text{g mL}^{-1}$ for strain MA. The RMSECV and R^2_{cal} obtained to represent this model were respectively 3.44 and 0.98, with only two latent variables (Table 4).

Many other models were built using different concentrations of propolis, but these models were not well correlated and therefore did not yield statistically significant parameters. Table 4 presents the models that best represented this statistical significance, with low RMSECV values and a linear correlation quite close to 1.

Figure 8 shows the best PLS model with respect to the correlation between propolis extracts and *F. pedrosoi* strains.

Figure 8 shows the distribution of propolis extracts and their potential antifungals with regard to strain *MA*. The other graphs built for the PLS model, which demonstrated the profile of the spectra of propolis extracts in relation to *F. pedrosoi* strains, revealed that the propolis extract from Santo Antônio da Patrulha was located in the lower left side. Extracts from Sobradinho and Caçapava do Sul were located in the upper right side in most of the graphs. The other propolis extracts clustered at the center of the graphs.

Spectral analysis of *F. Pedrosoi* strains

With regard to *F. Pedrosoi* strains, the best PLS model was the one in which propolis extract from Santo Antônio da Patrulha was used at the concentration of $40\mu\text{gmL}^{-1}$. The RMSECV and R^2_{cal} obtained were respectively 23.58 and 0.97 with eight latent variables (Table 5).

Many other models were also built for *F. Pedrosoi* strains using other concentrations of propolis, but these models were not well correlated and therefore did not yield statistically significant parameters. Table 5 presents the models that best represented this statistical significance, with low RMSECV values and a linear correlation quite close to 1.

Figure 9 shows the best PLS model with respect to the correlation between *F. pedrosoi* strains and propolis extracts.

Figure 9 shows the distribution of *F. pedrosoi* strains with regard to the propolis extract from Santo Antônio da Patrulha. The other graphs built for the PLS model, which demonstrated the profile of the spectra of *F. pedrosoi* biomasses in relation to propolis extracts, revealed that strain MA was located in the lower left side. Strains 43456 and

44327 were located in the upper right side in most of the graphs. The other fungal strains clustered at the center of the graphs.

Propolis extracts and fungal strains showed a linear fungistatic activity. The development of these models is important to demonstrate how propolis extracts behaved in relation to *F. pedrosoi* strains and also how these agents behaved in relation to propolis extracts, thus showing which of them have higher statistical significance.

The use of chemometric tools for classification and calibration enabled the development of methods by way of analytical techniques that are not often used for propolis extracts. The methods developed here are easier to perform and operate than those currently used for the determination of the parameters analyzed.

The use of DRIFTS for the analysis of fungi is not well described in the literature. Only preliminary studies have been conducted on chromoblastomycosis agents. The use of DRIFTS and chemometrics to predict biological properties has been investigated. Lipase activity was assessed in nine strains of chromoblastomycosis agents, with cultures produced at 14 and 21 days, and good results were obtained by the models used for prediction of lipolytic activity, by way of fungal biomass cultures [43].

However, it is important to assess the use of DRIFTS and of chemometric methods employed to characterize these agents, as they are usually differentiated in time-consuming morphophysiological laboratory assays [44]. The proposal of such a model for classification allows expediting these analyses, because as soon as a robust model that

contemplates a wider variety of strains is developed, it can be used for the identification of new strains as previously proposed for other pathogenic organisms [27,28].

It can be concluded that agar dilution permits assessing the *in vitro* antifungal activity of *F. pedrosoi* strains. The antifungal activity of propolis extracts collected from Santo Antônio da Patrulha and Candelária, central region of the state of Rio Grande do Sul - Brazil, yielded thriving results against the *F. pedrosoi* strains analyzed as they were the most active extracts in the *in vitro* study, but a larger number of extracts should be analyzed in order to obtain more consistent data about their activity against chromoblastomycosis agents.

The chemical composition of propolis is very complex and varies considerably and is also closely related to the season, vegetation and collection site, changing according to the vegetation and climate of each region. Therefore, a larger number of extracts from different regions, collected in different seasons, would certainly provide better results about their possible use against chromoblastomycosis agents [12-16].

DRIFTS, combined with chemometric tools, for the analysis of fingerprint data from the biomass produced by *F. pedrosoi* strains and from propolis extracts proved extremely useful, especially due to the existence of an enormous amount of information. It was possible to gather information in a quick and efficient fashion about the similarity between the strains analyzed, through the selection of variables, classification and calibration of the strains. This is a simple and quick alternative technique to determine the composition of complex propolis extracts and *F. pedrosoi* strains. The major advantages of the method

proposed here concern shorter time of analysis, preservation of the extracts and strains, convenient handling and reduction in the production of chemical residues.

Acknowledgements

We would like to thank the National Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for financial support.

References

1. Fuchs J, Pecher S. Partial suppression of cell mediated immunity in chromoblastomycosis. *Mycopathologia* 1992; **119**: 73-76.
2. Matte SMW, Lopes JO, Melo IS, *et al.* Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997; **30**: 36-42.
3. Silva JP, Souza W, Rozental S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia* 1999; **143**: 171-175.
4. Ogawa MM, Alchorne MMA, Barbieri A, *et al.* Lymphoscintigraphic analysis in chromoblastomycosis. *Int J Dermatol* 2003; **42**: 622-625.
5. Marques SG, Silva CMP, Saldanha PC, *et al.* Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the Babassu coconut (*Orbignya phalerata Martius*) in the Amazon Region of Maranhão Brazil. *Jpn J Mycol* 2006; **47**: 305-311.
6. Iwatsu T, Miyaji M, Taguchi H, *et al.* Skin test-active substance prepared from culture filtrate of *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycopathologia* 1979; **67**: 101-105.
7. Gimenes VMF, Souza MG, Ferreira KS, *et al.* Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microb Infect* 2005; **7**: 708-713.
8. Caligorne RB, Resende MA, Oliveira RCBW, *et al.* Fungos dematiáceos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 1999; **11**:22-25.
9. Cucé LC, Wrolclawski EL, Sampaio SAP. Treatment of paracoccidioidomycosis, candidiasis, chromomycosis, lobomycosis, and mycetoma with ketoconazole. *Int J Dermatol* 1980; **19**: 405-408.
10. Gupta AK, Taborda PR, Sanzovo AD. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Med Mycol* 2002; **40**: 529-534.

11. Sidrim JJC, Moreira JLB. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1999: 287 pp.
12. Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of própolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 2002; **73**: 21-29.
13. Castro ML, Cury JA, Rosalen PL, *et al.* Propolis from southeastern and northeastern of Brazil: the influence of seasonality in antibacterial activity and phenolic composition. *Quím Nova* 2007; **30**: 1512-1516.
14. Ghisalberti EL. Propolis: a review. *Bee World* 1979; **60**: 59-84.
15. Bankova VS, Boudourova-Krasteva G, Popov S, *et al.* Seasonal variations in essential oil from Brazilian propolis. *J Essent Oil Res* 1998; **10**: 693-696.
16. Park YK, Ikegaki M. Evaluation on ethanol extracts of propolis from Brazil and Korea by physicochemical and biological methods. *Korean J Apic* 1998; **13**: 27-34.
17. Park YK, Ikegaki M, Alencar SM. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybee Sci* 2000; **21**: 85-90.
18. Quiroga EN, Sampietro DA, Soberón JR, *et al.* Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *J Appl Microbiol* 2006; **101**: 103-110.
19. Silici S, Koc AN. Comparative study of in vitro methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Lett Appl Microbiol* 2006; **43**: 318-324.
20. Fernandes FF, Dias ALT, Ramos CL, *et al.* The “in vitro” antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007; **49**: 93-95.
21. Wold S, Sjöstrom M. Chemometric, present and future success. *Chem Intell Lab Syst* 1998; **44**: 3-14.

22. Morgano MA, Queiroz SC, Ferreira MMC. Application of exploratory analysis to the differentiation of vegetables. *Braz J Food Technol* 1999; **2**: 73-79.
23. Ferreira MMC. Multivariate QSAR. *J Braz Chem Soc.*2002; **13**: 742-753.
24. Borin A, Poppi RJ. Application of mid infrared spectroscopy and iPLS for the quantification of contaminants in lubricating oil. *Vib Spect*, 2005; **37**: 27-32.
25. Fidêncio PH. Análise de solos por espectroscopia no infravermelho próximo e aplicação de métodos quimiométricos. PhD thesis, UNICAMP, 2001.
26. Costa JM. Caracterização enzimática de agentes da cromoblastomicose com ênfase em atividade lipase. Master's thesis, UFRGS, 2006.
27. Naumann D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. In: Meyers, R.A (Ed.). *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000: 102-131.
28. Mariey L, Signolle JP, Amiel C, *et al.* Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vib Spect* 2001; **26**: 151-159.
29. McGinnis MR, Pasarell L. In vitro evaluation of terbinafine and itraconazole against dematiaceous fungi. *Med Mycol* 1998; **36**: 243-246.
30. Vivas JRC, Torres-Rodríguez JM. Sensibilidad de hongos miceliares dematiáceos a diez antifúngicos empleando un método de difusión en agar. *Rev Iberoam Micol* 2001; **18**: 113-117.
31. Butty P, Lebecq JC, Mallié M, *et al.* Evaluation of the susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a new technique. *J Med Vet Mycol* 1995; **33**: 403-409.
32. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia*, 3º edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1997: 692 pp.

33. Korolkovas A. *Dicionário Terapêutico Guanabara*, Editora Guanabara Koogan, edição 2004/2005, cap. 18, 18.14 - 18.19, 2004.
34. Park YK, Ikegaki M, Abreu JAS. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciênc Tecnol Aliment* 1998; **18**: 313-318.
35. Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, *et al.* Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J Venom Anim Toxins* 2000; **6**: 205-219.
36. Sforcin JM, Fernandes JA, Lopes CAM, *et al.* Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000; **73**: 243-249.
37. Rodríguez-Tudela JL, Chairman FB, Bille J, *et al.* Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect*, 2003; **9**: 467-474.
38. Alviano CS, Farbiarz SR, Souza W, *et al.* Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *J Gen Microbiol* 1991; **137**: 837-844.
39. Gomes MHR, Resende MA. *Fonsecaea pedrosoi*: lipid composition and determination of susceptibility to amphotericin B. *Can J Microbiol* 1991; **38**: 209-214.
40. Farbiarz SR, Carvalho TU, Alviano CS, *et al.* Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells *in vitro*. *J Med Vet Mycol* 1992; **30**: 265-273.
41. Naumann D, Labischinski H, Giesbrecht P. The characterization in microorganism by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), in modern techniques for rapid microbiological analysis, *Ed. W. H. Nelson*. New York: VCH, 1991: 43-96.
42. Almeida EC, Menezes H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *J Venom Anim Toxins* 2002; **8**: 191-212.

43. Corbellini VA, Scroferneker ML, Carissimi M, *et al.* Lipolytic activity of chromoblastomycosis agents measured by infrared spectroscopy and chemometric methods. *Med Mycol* 2009; **47**: 63-69.
44. Fischer F, Cook NB. *Micologia: Fundamentos e Diagnóstico*. Trad. FIORAVANTI, I. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda, 2001: 337 pp.

Tables

Table 1: Analysis of spectral regions of propolis extracts.

Propolis	Absorption spectrum (cm ⁻¹)	Attribute
Camaquã and Lavras do Sul	1674-1724	C = O β-pleated sheet
São Sepé	873-950	C – H ; O – H symmetric stretching
Candelária and Caçapava do Sul	1253-1284	C – O – C ; C – N ; N – H asymmetric stretching
Cerro Branco, Santo Antônio da Patrulha and Sobradinho	1496-1531 and 1573-1623	C – N ; C = C ; C = O ; O – H ; N – H deformation of >CH ₂ , β-pleated sheet and Tyrosine band

Table 2: Attributes of some bands usually found in microbial infrared spectra.

Band (cm⁻¹)	Attribute
~ 3500	O – H stretching of hydroxyl groups
~ 3200	N – H stretching (amide A) of proteins
2959	C – H (asymmetric) stretching of CH ₃
2934	C – H asymmetric stretching of >CH ₂
2921	C – H asymmetric stretching of >CH ₂ in fatty acids
2898	C – H stretching of CH methine
2872	C – H (symmetric) stretching of CH ₃
2852	C – H (symmetric) stretching of >CH ₂ in fatty acids
1741	>C=O stretching of esters
~ 1695	Components of the amide I band
~ 1675	β-pleated sheet
~ 1655	Alpha-helical amide I
~ 1637	Beta-helical amide I
1548	Amide II
1515	Tyrosine band
1468	C – H deformation of >CH ₂
~ 1400	C = O (symmetric) stretching of COO ⁻
1310-1240	Amide III band, protein components
1250-1220	P = O (asymmetric) stretching of >PO ₂ ⁻
1200-900	C – O – C, C – O vibrations of the carbohydrate ring
1085	P = O (symmetric) stretching of >PO ₂ ⁻
900-600	Fingerprint region

Source: Naumann et al., 1991

Table 3: Spectral analysis of propolis extracts.

<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Absorption spectrum (cm ⁻¹)	Attributes
Region 1	1037-1097	C – O vibrations of the carbohydrate ring
Region 2	1141-1164	C – O vibrations of the carbohydrate ring
Region 3	1216-1307	N – H ; P = O asymmetric stretching of >PO ₂ ⁻
Region 4	1319-1477	C = O symmetric stretching of COO-
Region 5	1500-1695	N – H Alpha-helical amide I and β-pleated sheet
Region 6	1731-1758	C = O stretching of esters

Table 4: Figures of merit for PLS models applied to the spectral data of propolis extracts using *F. pedrosoi* strains.

<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Latent variables	RMSECV	R^2_{cal}
1	5	3	5.51	0.99
19	40	5	13.76	0.99
49	5	4	5.57	0.99
855	10	4	10.62	0.99
1420	40	4	27.51	0.96
43456	40	2	21.09	0.90
44327	10	5	14.97	0.99
46428	2.5	3	8.60	0.93
47748	20	4	14.83	0.98
MA	40	2	3.44	0.98

Table 5: Figures of merit for PLS models applied to spectral data of *F. pedrosoi* strains using propolis extracts.

Propolis	Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Latent variables	RMSECV	R^2_{cal}
Camaquã	5	7	21.63	0.93
Candelária	40	8	20.61	0.96
Caçapava do Sul	2.5	3	31.02	0.65
Cerro Branco	10	5	23.91	0.92
Lavras do Sul	5	6	23.30	0.92
Santo Antônio da Patrolha	40	8	23.58	0.97
São Sepé	5	6	18.75	0.93
Sobradinho	40	7	42.50	0.89

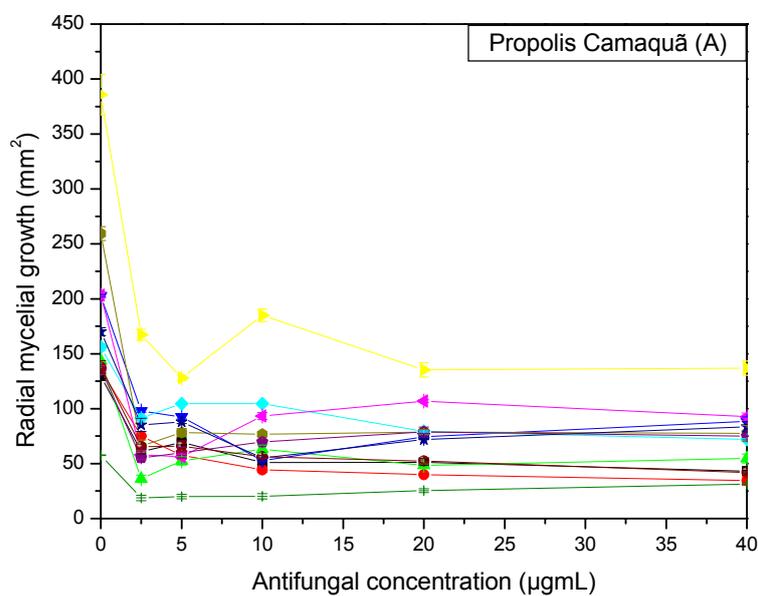
Figure captions

Figure 1A: Antifungal activity of propolis extract from Camaquã against *F. pedrosoi* strains.

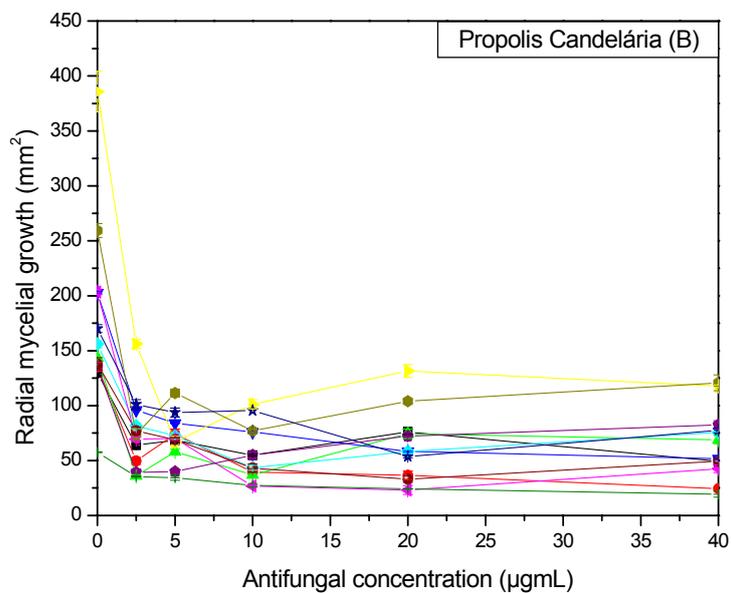


Figure 1B: Antifungal activity of propolis extract from Candelária against *F. pedrosoi* strains.

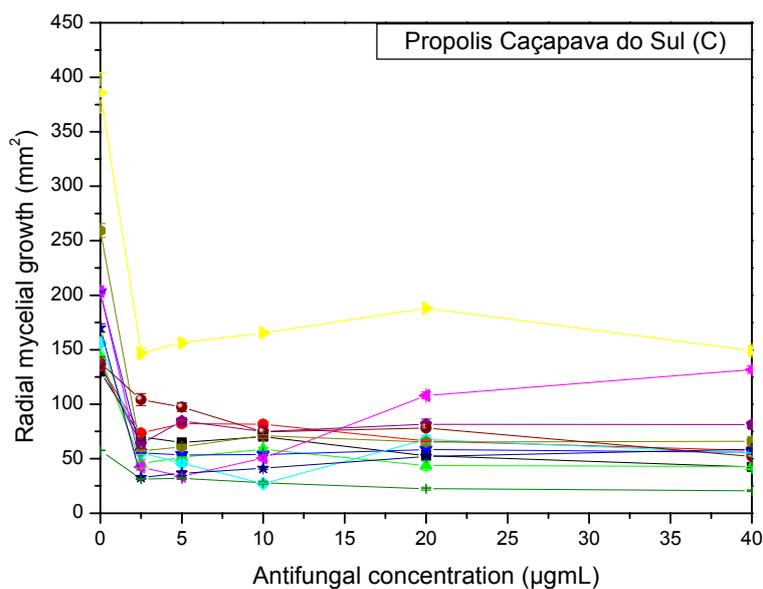


Figure 1C: Antifungal activity of propolis extract from Caçapava do Sul against *F. pedrosoi* strains.

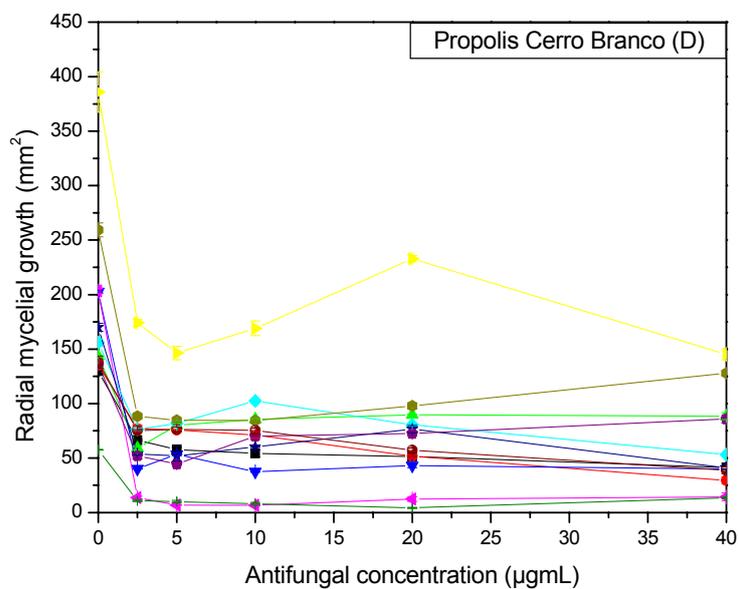


Figure 1D: Antifungal activity of propolis extract from Cerro Branco against *F. pedrosoi* strains.

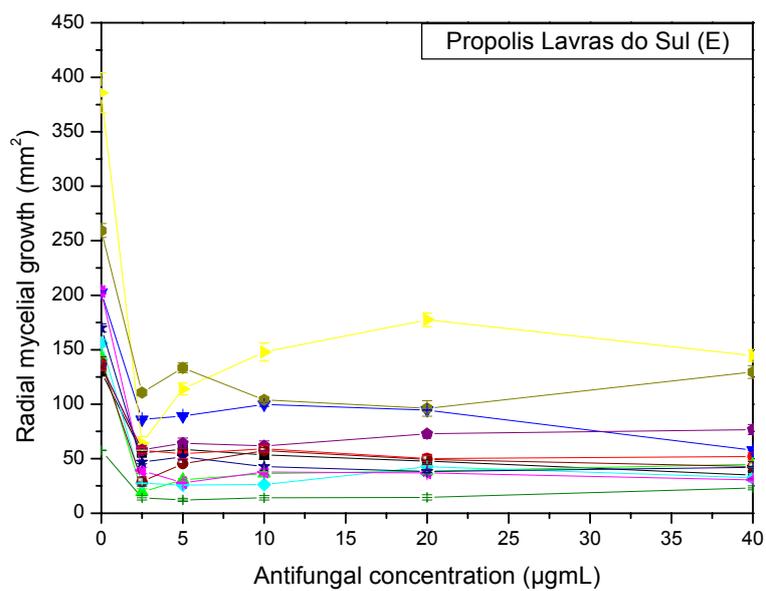


Figure 1E: Antifungal activity of propolis extract from Lavras do Sul against *F. pedrosoi* strains.

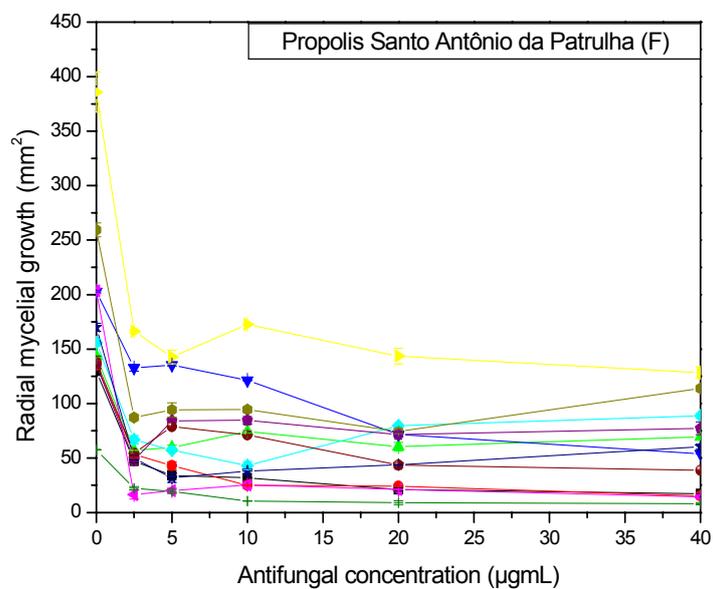


Figure 1F: Antifungal activity of propolis extract from Santo Antônio da Patrulha against *F. pedrosoi* strains.

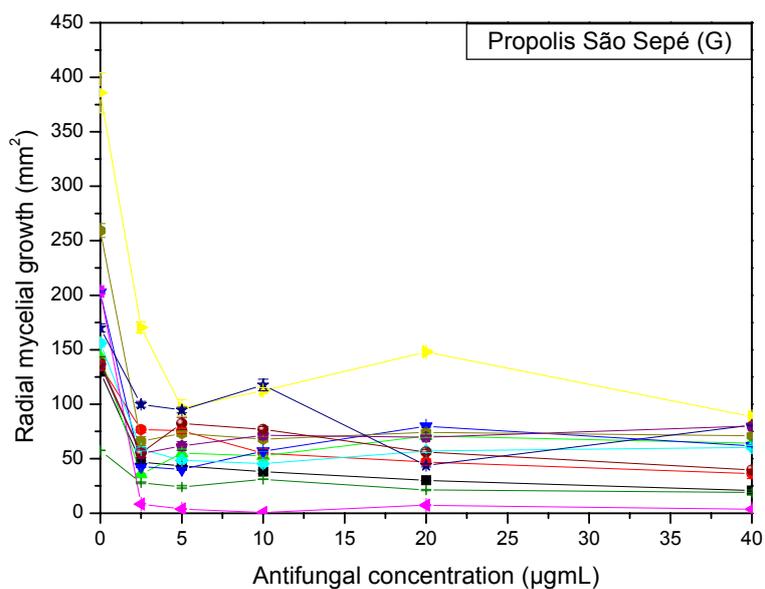


Figure 1G: Antifungal activity of propolis extract from São Sepé against *F. pedrosoi* strains.

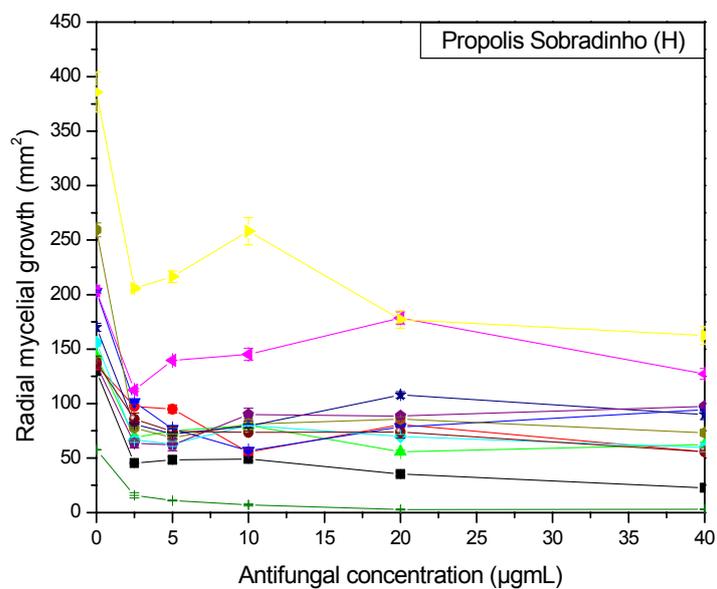


Figure 1H: Antifungal activity of propolis extract from Sobradinho against *F. pedrosoi* strains.

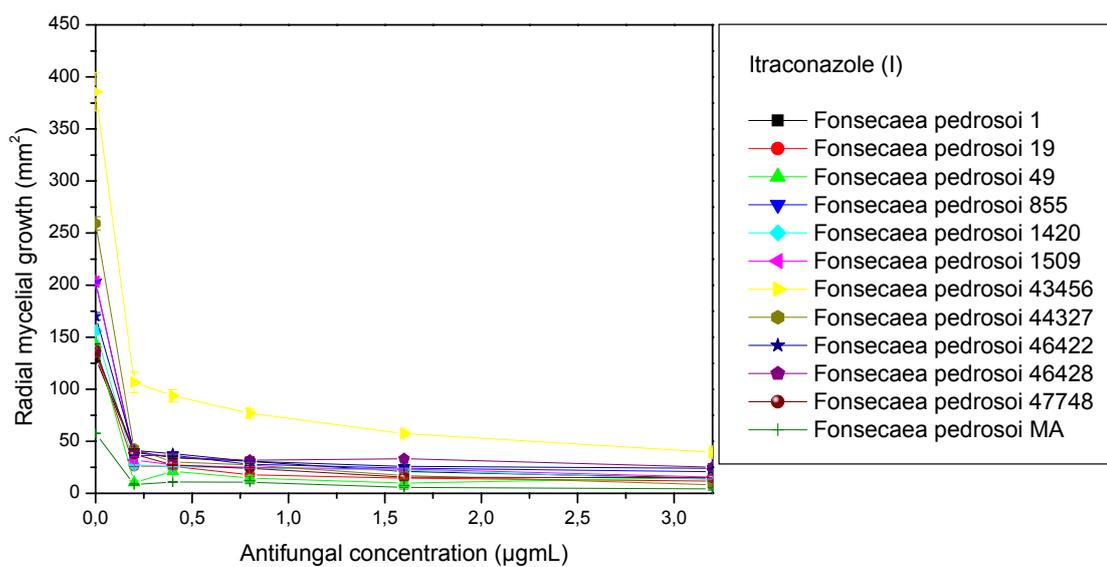


Figure 11: Antifungal activity of itraconazole against *F. pedrosoi* strains.

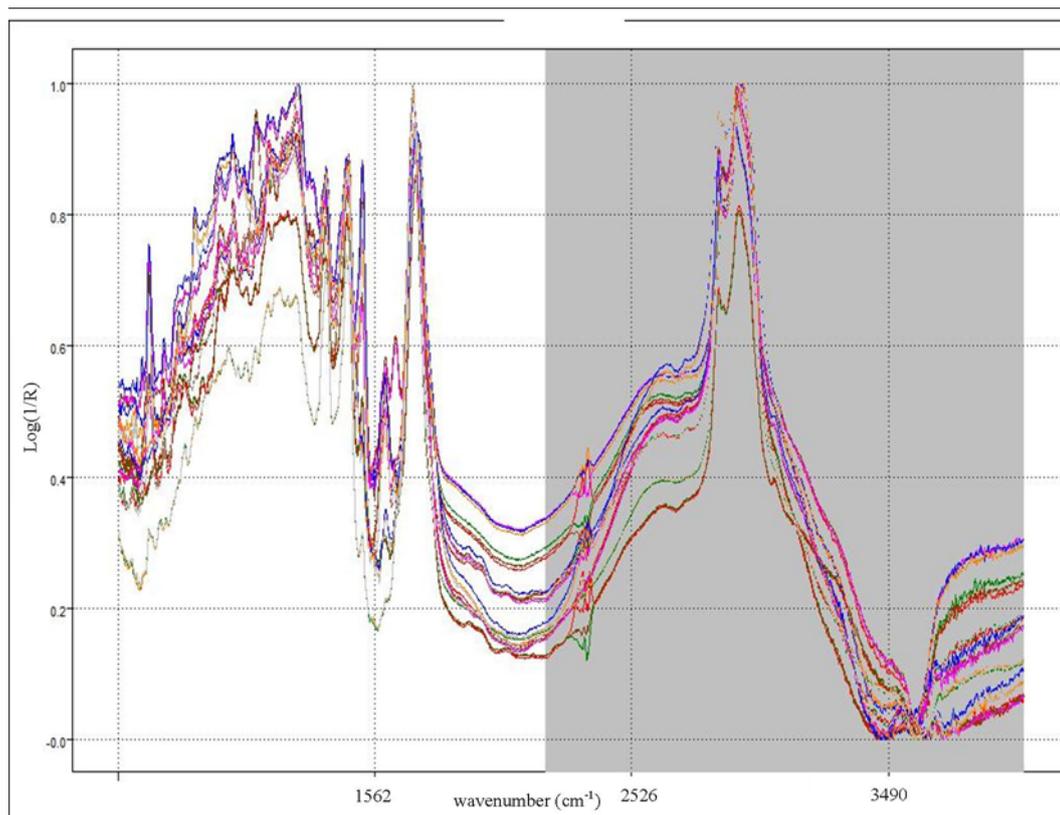


Figure 2: Infrared spectra of propolis extracts according to DRIFTS.

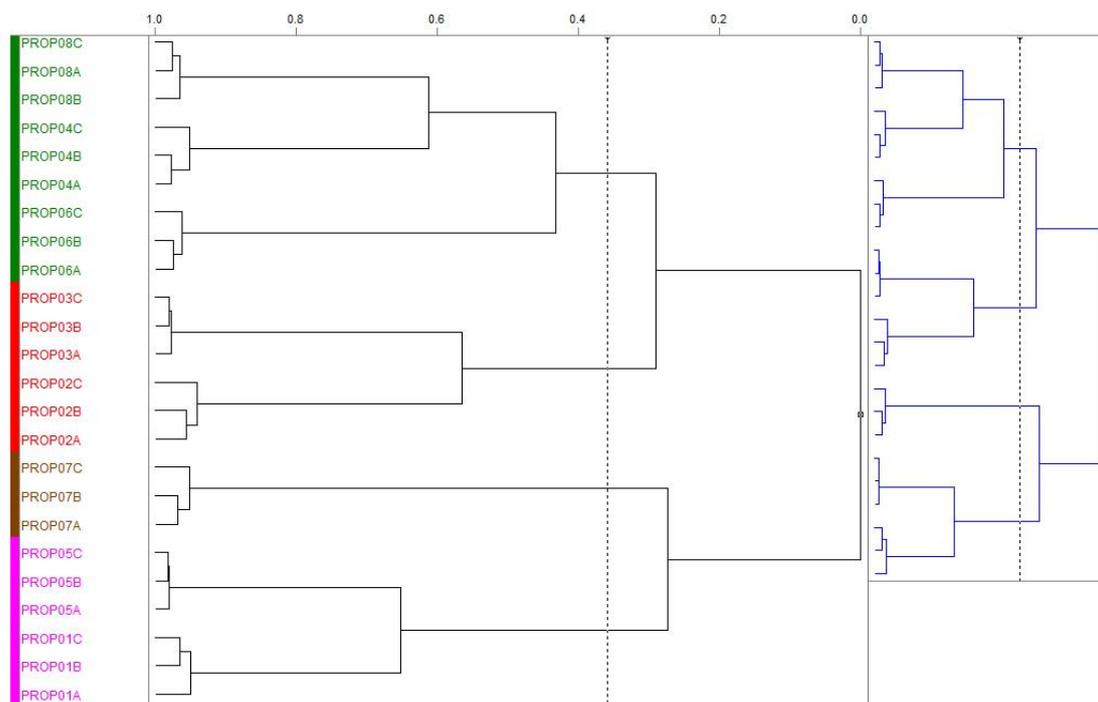


Figure 3: Flexible dendrogram showing HCA of infrared spectra for propolis extracts.

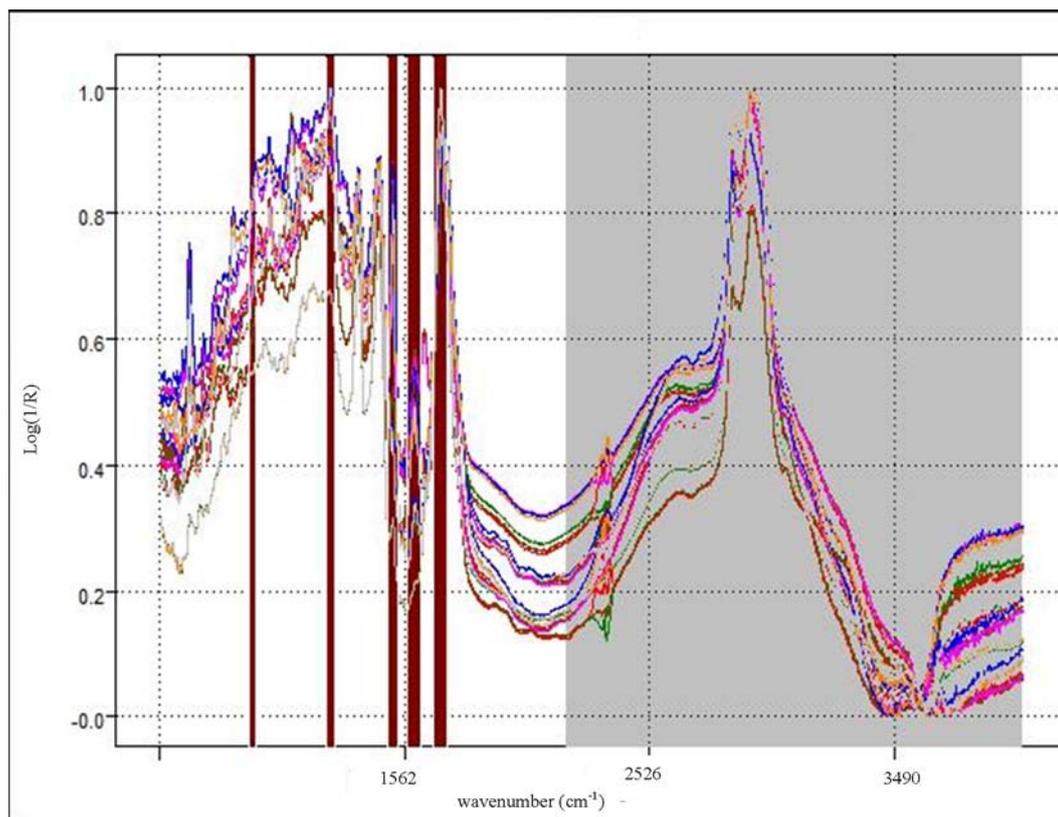


Figure 4: Spectral regions of propolis extracts.

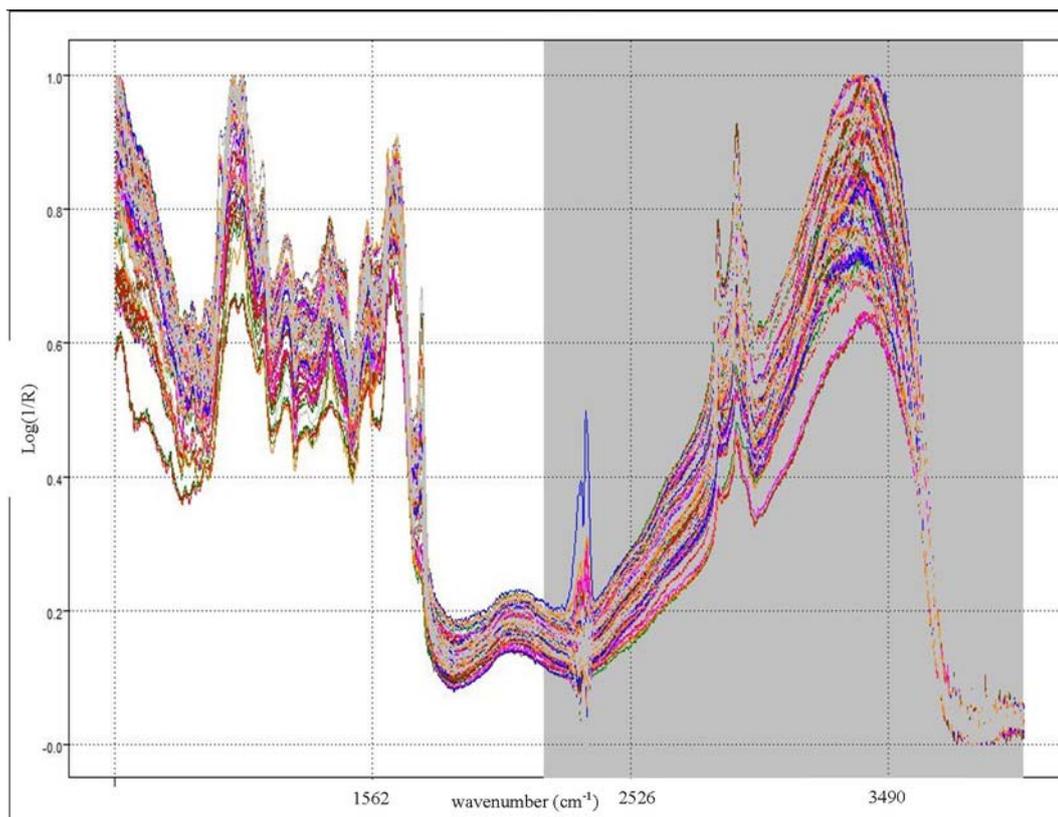
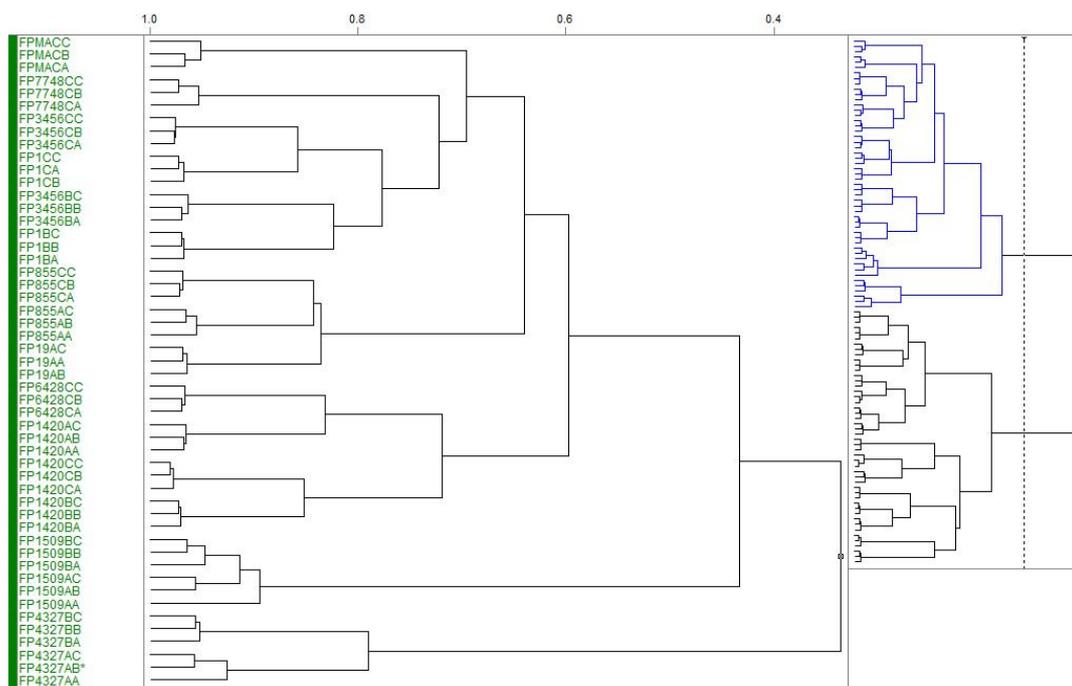


Figure 5: Infrared spectra of *F. pedrosoi* strains according to DRIFTS.



Figures 6A: Flexible dendrogram showing HCA of infrared spectra of *F. pedrosoi* strains (green group).

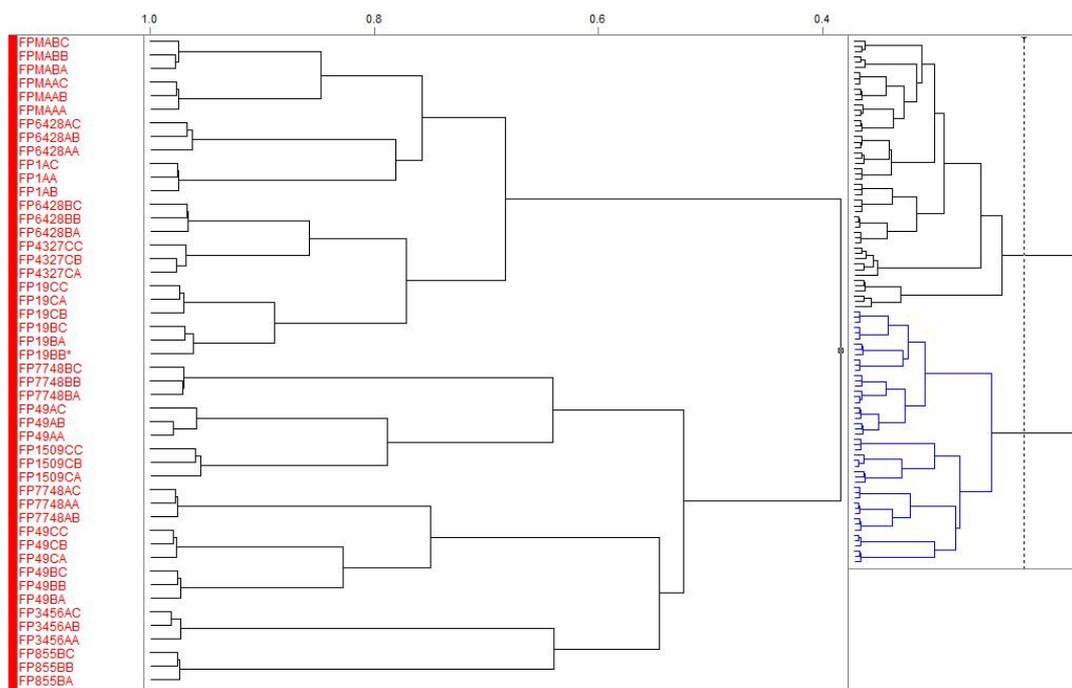


Figure 6B: Flexible dendrogram showing HCA of infrared spectra of *F. pedrosoi* strains (red group).

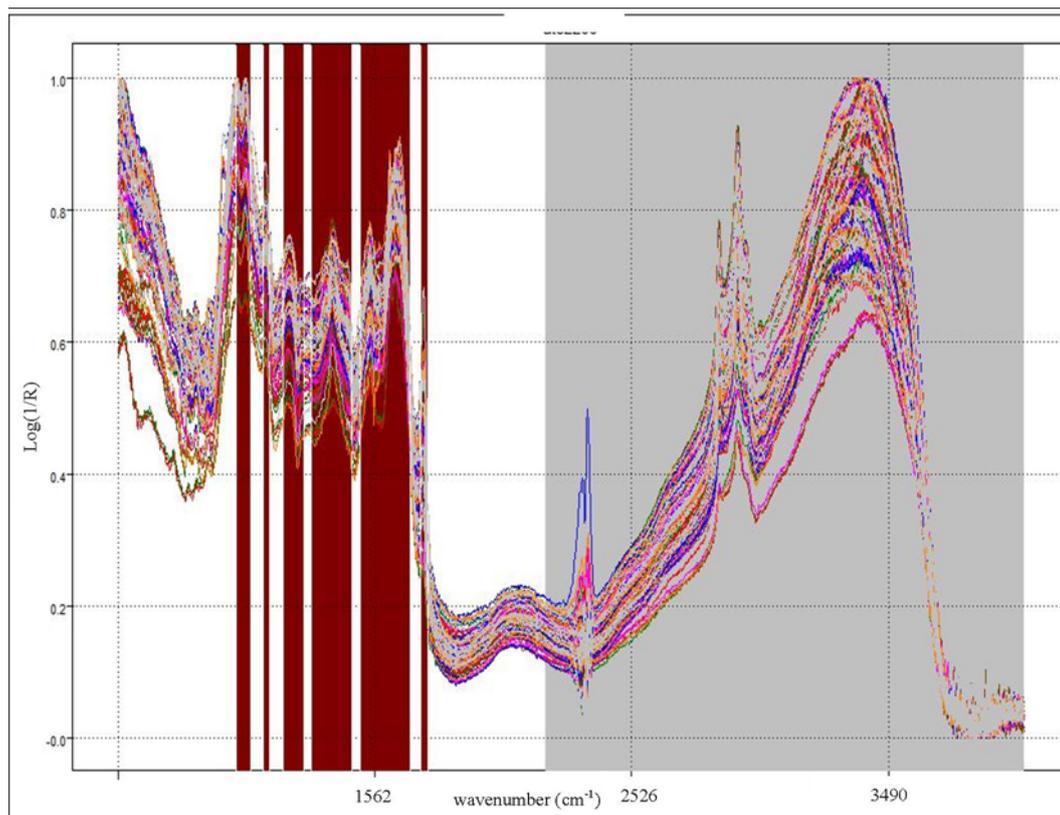


Figure 7: Spectral regions related to *F. pedrosoi* strains MA, 47748, 19, 46428 and 49.

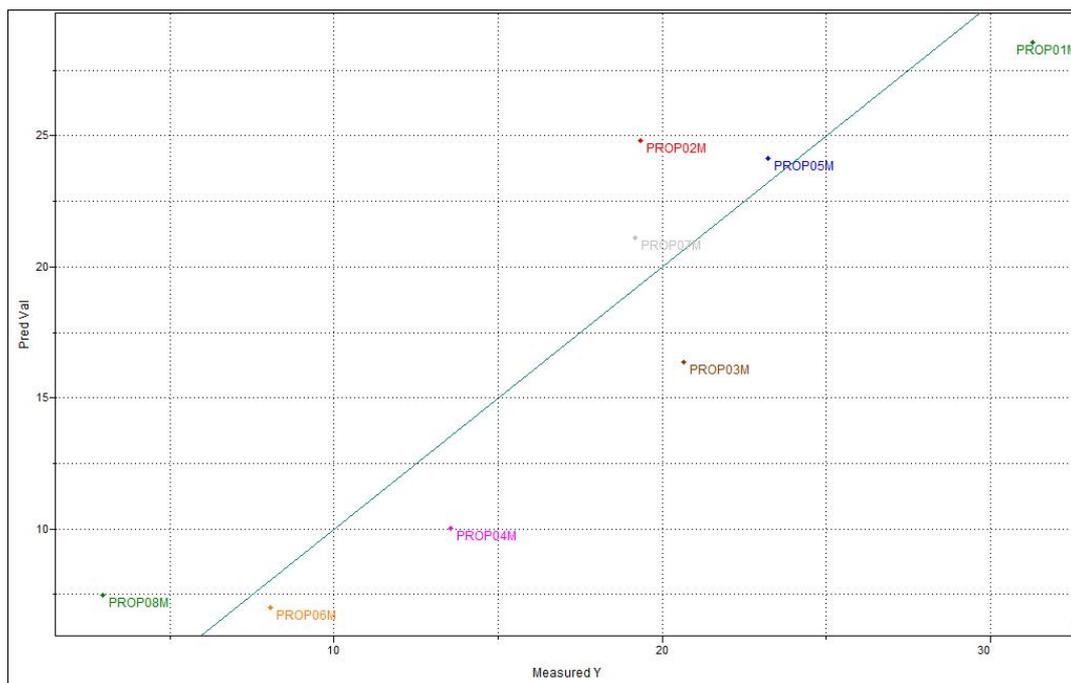


Figure 8: Correlation curve for the measured halo size versus estimated by medium the spectra of propolis extracts at the concentration of $40\mu\text{g mL}^{-1}$ for *F. pedrosoi* strain MA.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Após a análise dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se chegar às seguintes conclusões:

1. Todas as amostras de própolis demonstraram efeitos antifúngicos frente às amostras de *F. pedrosoi* estudadas. Os extratos etanólicos de própolis das localidades de Santo Antônio da Patrulha e Candelária proporcionaram maior inibição frente às amostras de *F. pedrosoi*, principalmente do MA. As amostras de própolis das localidades de Caçapava do Sul e Sobradinho demonstraram menor atividade antifúngica. Esse comportamento inibitório frente às amostras de *F. pedrosoi* indica a possibilidade de utilização da própolis em pacientes portadores da cromoblastomicose causada por *F. pedrosoi* e que fazem uso crônico de fármacos antifúngicos.

2. As amostras de própolis que possuem maiores teores de compostos fenólicos nem sempre apresentaram maior atividade biológica, comprovando que não só a quantidade destes compostos, mas principalmente a totalidade das demais substâncias presentes nas amostras de própolis é que determinam realmente suas propriedades, o que implica no emprego de metodologias analíticas associadas a ensaios biológicos para o controle de suas atividades farmacológicas.

3. As metodologias utilizadas para determinação da atividade antifúngica mostraram-se eficientes para determinação da sensibilidade das amostras de *F. pedrosoi*. Apesar de serem técnicas diferentes, os resultados obtidos foram semelhantes, demonstrando a possibilidade de utilização de métodos não referenciais para avaliação de sensibilidade antifúngica em amostras de *F. pedrosoi*.

4. A utilização de ferramentas quimiométricas de classificação e calibração permitiu o desenvolvimento de metodologias para determinação de parâmetros de qualidade empregando técnicas analíticas pouco utilizadas para as amostras de própolis; os métodos desenvolvidos apresentaram características de rapidez de

execução, custo e operacionalidade melhores que os métodos atualmente utilizados para determinação dos parâmetros estudados;

5. O emprego da análise por componentes principais (PCA) não evidenciou existência de amostras anômalas no conjunto, enquanto que a análise por agrupamento hierárquico (HCA) possibilitou o agrupamento das amostras por similaridade, importante para a diferenciação das amostras, dificilmente visualizados diretamente na matriz de dados (conjunto de espectros). A utilização do método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) foi utilizada para correlacionar a informação espectral com a propriedade estudada, o que gerou ótimos modelos de predição de atividade antifúngica.

6. Ainda pode-se afirmar que esta metodologia pode ser utilizada para análise de outras substâncias complexas, uma vez que neste trabalho ficou demonstrado que mesmo compostos com formulação e estrutura química muito semelhantes podem ser facilmente diferenciados e identificados.

7. A utilização de DRIFTS associada a ferramentas quimiométricas para analisar os dados da impressão digital obtida através da biomassa de amostras de *F. pedrosoi* e das amostras de própolis em estudo, mostrou-se extremamente útil, principalmente pela existência de um grande número de informações. Foi possível obter informações rápidas e eficientes sobre a similaridade das amostras em estudo, sem destruição das amostras e com minimização da geração de resíduos químicos.

7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com base nas exposições acima, esse trabalho abre caminho para investigações futuras, entre as quais podemos citar:

- Expandir a investigação para maior número de amostras de agentes da cromoblastomicose, principalmente para diferentes isolados de mesma espécie de *F. pedrosoi*;
- Investigar um maior número de amostras de própolis coletadas em outras regiões do estado do Rio Grande do Sul, Brasil;
- Trabalhar com mais concentrações de extratos etanólicos de própolis, uma vez que o CMR das amostras fúngicas variaram, logo, é importante buscar uma faixa onde poderá ocorrer um perfil mais próximo de uma curva dose-resposta de determinadas concentrações de própolis;
- Investigar o comportamento de células escleróticas nestas mesmas condições, uma vez que já é possível gerá-las *in vitro*;
- Identificar possíveis componentes (flavonóides, por exemplo), com atividade antifúngica na amostra de própolis através de técnicas específicas;
- Analisar amostras de própolis de diferentes procedências através da quimiometria devido às diferenças no comportamento espectral;
- Partir futuramente para ensaios *in vivo*, avaliando os possíveis efeitos da própolis separadamente ou em associação a antifúngicos azólicos.