



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

**BRUNA RODRIGUES DE SOUSA**

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE  
FRENTE A LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida***

**POMBAL – PB  
2018**

**BRUNA RODRIGUES DE SOUSA**

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE  
FRENTE A LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Sistemas Agroindustriais.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sc. Alfredina dos Santos Araújo

**Área de concentração:** Ciência e tecnologia de alimentos

**POMBAL – PB  
2018**

S725p

Sousa, Bruna Rodrigues de.

Potencial antifúngico do extrato de própolis verde frente a leveduras do gênero *Candida* / Bruna Rodrigues de Sousa. – Pombal, 2018.

63f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2017.

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

1. Própolis verde. 2. Compostos fenólicos. 3. Candidíase. I. Araújo, Alfredina dos Santos. II. Título.

CDU 638.135(043)



Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar



---

**CAMPUS DE POMBAL**

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE FRENTE A LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Pombal-PB, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Mestre (M.Sc.) em Sistemas Agroindustriais.

Aprovada em 20 / 12 / 2017

**COMISSÃO EXAMINADORA**

*Santos*

---

Prof. D.Sc. Alfredina dos Santos Araújo  
Orientadora

*Everton Vieira da Silva*

---

Prof. D.Sc. Everton Vieira da Silva  
Examinador Interno

*Patricia de Oliveira Kocerginsky*

---

Prof. D.Sc. Patricia de Oliveira Kocerginsky  
Examinadora Externa

Pombal - PB, 20 de dezembro de 2017

A minha família, por todo incentivo, em especial a minha mãe  
Maria Luzanira, fonte de inspiração.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, aquele que é o Rei dos Reis e Senhor dos Senhores, por me dar a coragem e a força necessária para não desistir, pois muitas foram as batalhas e as provações, mas o meu Senhor e meu Deus é bom, justo e compassivo e me deu o discernimento necessário para entender que as coisas acontecem no tempo certo e então hoje, diante deste sonho concretizado apenas posso dobrar os meus joelhos e agradecer, pois, para Ti Senhor é o meu canto e para Ti é todo o meu louvor.

A minha família, em especial aos meus avós Maria Daguia e Martim Vicente com quem aprendi que sem fé e uma base sólida nós não somos nada, a minha mãe Maria Luzanira e ao meu pai José Ferreira, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, me dando apoio, conforto e abrigo e ao meu irmão Gustavo, que sempre me trouxe ânimo e alegria nesta caminhada. Muito obrigada!

Aos meus tios, Luziene, Luzivan, Luzenildo e Luzinaldo que sempre não contiveram esforços para que eu conquistasse esse sonho, obrigada por sempre me ajudar, seja essa uma ajuda psicológica ou financeira, muito obrigada, este sonho também é de vocês!

Aos meus priminhos Henrique, Pamela e Bárbara que sempre me acordam com um sorriso contagiante, me lembrando que o sol sempre volta a brilhar sobre um céu azul depois de qualquer tempestade, mesmo sem entender o que isto significa, a alegria que emana de vocês é contagiante, vocês são verdadeiramente um canal de graça neste mundo, são anjos-guardiões!

Ao meu namorado, Eduardo Alves, por estar sempre ao meu lado, me dando força e apoio, mostrando-me que eu sempre posso mais. Obrigada por me escutar a cada momento, por enxugar cada lágrima, por cada risada e por compartilhar este sonho comigo, esta conquista também é sua. Obrigada por me fazer tão feliz, te amo meu amor!

A minha orientadora Alfredina dos Santos, que me acolheu em um momento tão difícil, me deu base e conhecimento para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigada pela oportunidade e confiança em mim depositada, não há palavras que expressem minha gratidão.

A Fernanda Rodrigues, que na verdade é Maria do Socorro e Amanda Rodrigues obrigada de coração por me acolher, mesmo sem me conhecer, vocês me deram casa, comida e apoio em todos os momentos, pessoas como vocês, merecem aplausos por promoverem tanta diferença neste mundo. Obrigada por despertar em mim o desejo de fazer o bem e por se tornarem minhas amigas!

As minhas amigas Uyara Nunes e Brehnda Liberato, que estão comigo desde a graduação, obrigada por compartilharem este sonho comigo, vocês fazem parte da minha história.

A todos que fazem parte da família Centro Vocacional Tecnológico, em especial a Amanda Arielle, Lucimar, Yaroslávia, Dayane, César, Thiago, Pedro, Lúcia e Júnior, obrigada por me acolherem em suas vidas, por contribuírem nem que fosse com um sorriso para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores e funcionários da UFCG e do PPGSA, obrigada por contribuírem para a minha formação acadêmica, prometo produzir bons frutos; em especial quero agradecer ao melhor secretário, Normando Canuto, por me escutar e me fazer sorrir mesmo diante de tudo, por vezes me fazendo esquecer de todas as preocupações, muito obrigada!

*“O papel dos infinitamente pequenos na natureza é infinitamente grande - Louis Pasteur”*

(MADIGAN et al. 2016, p.12).



## RESUMO

Nos últimos anos houve um aumento na incidência de infecções fúngicas por espécies de *Candida*, gerando um grave problema de saúde pública. A Candidíase é uma infecção oportunista que produz lesões de superficiais a invasivas, onde o uso de fármacos de modo empírico produz resistência nas cepas, tornando difícil o tratamento e fazendo-se necessário à escolha de novas opções terapêuticas, na qual a própolis devido às inúmeras características biológicas tem um futuro farmacológico. Assim, objetivou-se avaliar o potencial antifúngico do extrato hidroalcoólico de própolis verde frente a leveduras do gênero *Candida*, por dois métodos de detecção de susceptibilidade. Foram utilizadas na pesquisa seis espécies de *Candida* ATCC, que foram gentilmente cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz, RJ, Brasil. Inicialmente, as isoladas foram reativadas em Ágar Sabouroud Dextrose por 72 horas e posteriormente foram testadas quanto o perfil de susceptibilidade frente ao extrato hidroalcoólico de própolis verde e ao fluconazol pelos métodos de referência de difusão em disco (M44-A2) e de microdiluição em caldo (M27-A3) do CLSI. As espécies de *Candida* foram consideradas como sensível, sensível dose-dependente e resistente, onde foi-se levado em consideração para ambos os testes os breakpoints de  $\leq 62,5$ , 125-250 e  $\geq 500$   $\mu\text{g/ml}$  para o extrato hidroalcoólico de própolis verde e  $\leq 8$ , 16-32 e  $\geq 64$   $\mu\text{g/ml}$  para o fluconazol, respectivamente. Em ambos os testes se foi considerado 50% de inibição para o extrato hidroalcoólico de própolis verde em relação ao fluconazol. Todos os isolados reativados mostraram-se viáveis para determinação da susceptibilidade, onde em relação ao teste de difusão em disco frente ao extrato de própolis verde, todas os isolados foram sensíveis dose dependente frente ao disco com concentração de 500  $\mu\text{g/ml}$ . Frente ao fluconazol, apenas *C. tropicalis* foi sensível, as demais apresentaram resistência, ambos frente ao disco com concentração de 64  $\mu\text{g/ml}$ . Diante da metodologia de microdiluição, frente ao extrato hidroalcoólico de própolis verde, os isolados sensíveis foram os isolados do complexo *parapsilosis*, a *C. tropicalis* (CIM e CFM de 15,63  $\mu\text{g/mL}$ ) e a *C. fumata* (CIM e CFM de 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ); *C. albicans* apresentou sensibilidade dose dependente (CIM e CFM de 125  $\mu\text{g/mL}$ ). Já frente ao fluconazol, apenas a *C. tropicalis* mostrou-se sensível com uma CIM e CFM de 8  $\mu\text{g/mL}$ , os isolados do complexo *parapsilosis* apresentaram-se como sensível dose dependente com uma CIM e CFM de 32  $\mu\text{g/mL}$  e as demais apresentaram resistência com uma CIM e CFM de 64  $\mu\text{g/mL}$ , não podendo se determinar a CFM. Comparando as metodologias apenas a *C. fumata* de comportou de modo semelhante frente as substâncias. Pode-se concluir que o extrato em questão, apresentou uma considerável atividade antifúngica frente aos microrganismos avaliados, isto deve-se a presença dos compostos fenólicos detectados pela CLAE, como o ácido 2,5 dihidroxibenzoico, ácido cafeico, catequina, miricetina e rutina; ambos os testes foram eficazes para determinar a atividade antifúngica das substâncias, no entanto, o microdiluição, é mais confiável para detectar a de extratos naturais, devido os mecanismos de penetração dos compostos secundários presentes no extrato serem melhor distribuídos na técnica de diluição.

**Palavras-chave:** Candidíase. Compostos fenólicos. Disco-difusão. Microdiluição em caldo.

## ABSTRACT

In recent years, there has been an increase in the incidence of fungal infections by species of *Candida*, generating a serious public health problem. Candidiasis is an opportunistic infection that produces lesions from superficial to invasive, where the use of drugs empirically produces resistance in the strains, making treatment difficult and making it necessary to choose new therapeutic options, in which propolis due to innumerable biological characteristics has a pharmacological future. Thus, the objective was to evaluate the antifungal potential of the hydroalcoholic extract of green propolis against yeasts of the genus *Candida*, by two methods of detection of susceptibility. Six species of *Candida* ATCC were used in the research, which were kindly provided by the Oswaldo Cruz Foundation, RJ, Brazil. Initially, the isolates reactivated in Sabouraud Dextrose Agar for 72 hours and subsequently the susceptibility profile of the green propolis hydroalcoholic extract and fluconazole, tested by disc diffusion reference methods (M44-A2) and microdilution in broth (M27-A3) of the CLSI. *Candida* species were considered as sensitive, dose-dependent and resistant sensitive, where the breakpoints of  $\leq 62.5$ , 125-250 and  $\geq 500$   $\mu\text{g} / \text{ml}$  were taken into account for both tests for the hydroalcoholic extract of propolis green and  $\leq 8$ , 16-32 and  $\geq 64$   $\mu\text{g} / \text{ml}$  for fluconazole, respectively. In both tests, 50% inhibition considered for the hydroalcoholic extract of green propolis in relation to fluconazole. All the reactivated isolates were feasible for determination of susceptibility, where, in relation to the disc diffusion test against the green propolis extract, all the isolates were dose-dependent at the concentration of 500  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . In contrast to fluconazole, only *C. tropicalis* was sensitive, the others presented resistance, both in front of the disc with a concentration of 64  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . In view of the microdilution methodology, the isolates of the *parapsilosis* complex, *C. tropicalis* (CIM and CFM of 15.63  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) and *C. fumata* (CIM and CFM of 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); *C. albicans* presented dose-dependent sensitivity (MIC and CFM of 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). In contrast to fluconazole, only *C. tropicalis* was sensitive with a MIC and CFM of 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the isolates of the *parapsilosis* complex were sensitive as a dose-dependent dose with a MIC and CFM of 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and the others showed resistance with an MIC e CFM of 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and CFM may not be determined. Comparing the methodologies only to *C. fumata* behaved in a similar way against the substances. It may be concluded that the extract in question had a considerable antifungal activity, against the evaluated microorganisms, due to the presence of phenolic compounds detected by HPLC, such as 2,5-dihydroxybenzoic acid, caffeic acid, catechin, myricetin and rutin; both tests were effective in determining the antifungal activity of the substances, however, microdilution is more reliable to detect the natural extracts, because the penetration mechanisms of the secondary compounds present in the extract are better distributed in the dilution technique.

**Keywords:** Candidiasis. Phenolic compounds. Disc-diffusion. Microdilution in broth.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>CAPE</b>	Éster Feniletil do Ácido Cafeíco
<b>CCTA</b>	Centro de Ciência e Tecnologia Agroalimentar
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CEEPS</b>	Centro Educacional de Ensino Superior de Patos
<b>CFM</b>	Concentração Fungicida Mínima
<b>CG</b>	Cromatografia Gasosa
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMRVS</b>	Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária
<b>CVT</b>	Centro Vocacional Tecnológico
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose Letal Mediana
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>FIP</b>	Faculdades Integradas de Patos
<b>IFI</b>	Infecção Fúngica Invasiva
<b>IL</b>	Interleucinas
<b>INCQS</b>	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
<b>LACOM</b>	Laboratório de Combustíveis e Materiais
<b>KOH</b>	Hidróxido de Potássio
<b>MOPS</b>	Ácido Morfolinopropanosulfônico
<b>PPGSA</b>	Programa de Pós-graduação <i>Stricto Sensu</i> em Sistemas Agroindustriais
<b>R</b>	Resistente
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>S</b>	Sensível
<b>DAS</b>	Ágar Dextrose Sabouraud
<b>SDD</b>	Sensível/Sensibilidade Dose Dependente
<b>TLR</b>	Receptor Toll-like
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Campina Grande
<b>UFPB</b>	Universidade Federal da Paraíba

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cromatograma do extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta (80mg/mL)..... 39
- Figura 2.** Comparação entre as CIMs e CFMs das espécies ensaiadas frente ao fluconazol e ao extrato hidroalcoólico de própolis verde pela técnica de microdiluição em caldo..... 47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Informações sobre as leveduras do gênero <i>Candida</i> utilizadas na pesquisa de acordo com o INCQS/CMRVS/FIOCRUZ.....	32
<b>Tabela 2:</b> Critérios de interpretação para determinação da susceptibilidade as substâncias avaliadas para os isolados de <i>Candida</i> spp., pela técnica de difusão em disco.....	36
<b>Tabela 3:</b> Critérios de interpretação para determinação da susceptibilidade as substâncias avaliadas para os isolados de <i>Candida</i> spp., pela técnica de microdiluição em caldo.....	37
<b>Tabela 4:</b> Resultados da CLAE apresentando os nomes dos compostos químicos, tempo de retenção e concentração dos compostos químicos no extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta (80 mg/mL).....	40
<b>Tabela 5:</b> Registro dos tamanhos de halos formados pelas espécies ensaiadas de acordo com as suas concentrações inibitórias mínimas frente ao extrato hidroalcoólico de própolis verde..	43
<b>Tabela 6:</b> Registro dos tamanhos de halos formados pelas espécies ensaiadas de acordo com as suas concentrações inibitórias mínimas frente ao fluconazol.....	43
<b>Tabela 7:</b> Padrões de susceptibilidade frente as substâncias testadas, de acordo com as duas metodologias desenvolvidas no trabalho.....	49

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>17</b>
3.1 LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> .....	17
3.2 INFECÇÕES OPORTUNISTAS POR ESPÉCIES DE <i>Candida</i> .....	18
<b>3.2.1 Terapia antifúngica na Candidíase.....</b>	<b>21</b>
3.3 PRÓPOLIS: CONTEXTO HISTÓRICO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	22
<b>3.3.1 Própolis verde de origem da <i>Baccharis dracunculifolia</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.1.1 Atividades biológicas da própolis verde.....</b>	<b>26</b>
3.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO DE PRÓPOLIS....	28
3.5 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	29
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 OBTENÇÃO E REIDRATAÇÃO DAS CULTURAS DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> .....	32
4.2 ELABORAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE BRUTA.....	33
<b>4.2.1 Identificação do perfil químico do extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....</b>	<b>34</b>
4.3 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA.....	34
<b>4.3.1 Teste de difusão em disco.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3.2 Teste de microdiluição em caldo.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.2.1 Determinação da Concentração Fungicida Mínima.....</b>	<b>38</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>39</b>
5.1 REIDRATAÇÃO DAS LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> .....	39

5.2 IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE BRUTA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	39
5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE E DO FLUCONAZOL PELA METODOLOGIA DE DIFUSÃO EM DISCO.....	42
5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE E DO FLUCONAZOL PELA METODOLOGIA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO.....	45
5.5 COMPARAÇÃO ENTRE AS DUAS METODOLOGIAS EMPREGADAS NO PRESENTE TRABALHO, A DE DIFUSÃO EM DISCO E DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO FRENTE AO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE E FLUCONAZOL.....	48
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* são microrganismos comensais que fazem parte da microbiota da pele, das mucosas do trato digestivo e geniturinário humano ou de animais, plantas e objetos inanimados, colonizando-os de modo saprofito, não produzindo nenhum dano. Porém, sob determinadas condições, as quais alteram o ambiente que estas habitam, como alterações no mecanismo de defesa do hospedeiro ou fatores de virulência intrínsecos aos microrganismos, estas leveduras transformam-se de comensais para patógenos produzindo um quadro de patologia infecciosa oportunista conhecida como candidíase (TAIRA, 2011; ALENCAR, 2013; ACEVEDO; TORIBIO, 2017).

A candidíase é um processo infeccioso provocado pela presença patogênica de leveduras do gênero *Candida*, que se caracteriza por apresentar inúmeras formas clínicas que variam desde infecções cutâneo-mucosas a infecções graves e disseminadas. Dentre as formas clínicas da candidíase, pode-se destacar a candidíase cutâneo-mucosa, ungueal e a candidemia, ambas com sinais e sintomas diferentes, mas que em comum apresentam altos índices de morbimortalidade no Brasil e no mundo (ALMEIDA et al., 2012; GLEHN; RODRIGUES, 2012; ALMEIDA, 2013).

Do ponto de vista taxonômico, existem aproximadamente 200 espécies de leveduras do gênero *Candida*, sendo que apenas 10% são reconhecidas como patogênicas aos seres humanos, dentre as quais pode-se destacar *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. fumata* e *C. rugosa*, destas a de maior prevalência e comumente mais isolada em amostras biológicas seja qual for o sítio de infecção, é a *Candida albicans*, correspondendo de 60 a 80% dos casos (ALMEIDA, 2013).

Todavia, observa-se que nos últimos anos, as espécies de *Candida*, que raramente eram associadas a infecções humanas, a exemplo das espécies de *Candida* pertencentes ao Complexo *parapsilosis*, emergiram, como sérios patógenos com altas taxas de resistência a terapias convencionais indicando uma mudança epidemiológica na candidíase (ABEEG, 2010; SANTOS, 2011).

Com a crescente incidência das infecções fúngicas oportunistas, torna-se necessário à seleção adequada de antifúngicos para que não haja a produção de genes de resistência nos microrganismos, tornando-se cada vez mais difícil a terapêutica. Esta triagem pode ser realizada através dos testes de susceptibilidade antifúngica in vitro, que detectam e monitoram os padrões de resistência das espécies de fungos, em particular as espécies de *Candida* (COLOMBO et al., 2012; ALENCAR, 2013).



Segundo o Consenso Brasileiro de infecções por *Candida*, os grupos de fármacos de escolha para o tratamento da candidíase dependem do sítio de infecção, onde os principais compostos terapêuticos utilizados são os tradicionais, que são divididos em três principais classes, de acordo com o seu mecanismo de ação: os azóis que inibem a biossíntese do ergosterol; os polienos que interagem com os esteróis da membrana e as equinocandinas, que inibem a síntese da parede celular (RAMESH et al., 2011; FREITAS, 2012; COLOMBO et al., 2013). Todavia, atualmente há uma busca incansável por terapias menos agressivas, para diminuir os casos de toxicidade ou resistência, fazendo-se constante a utilização de produtos naturais, em que a própolis se torna uma fonte promissora na área farmacológica (HIPÓLITO, 2013).

A própolis é uma mistura complexa de substâncias resinosas produzida pelas abelhas melíferas (*Apis mellifera*) de consistência, textura e coloração variada, que apresenta comprovada atividade anti-inflamatória, antioxidante, antiproliferativa, citotóxica, imunomoduladora e antimicrobiana. Estas e outras atividades exercidas pela própolis estão relacionadas com a sua complexa composição química que é diretamente ligada à vegetação que compõe o habitat das abelhas. Estima-se, atualmente, que existam segundo o seu perfil químico aproximadamente 13 tipos de própolis, onde pode destacar o efeito antimicrobiano da própolis verde (HIPÓLITO, 2013; SIQUEIRA et al., 2014).

A própolis verde, advém da coleta do exsudato da planta nativa da região central do Brasil, a *Baccharis dracunculifolia*, comumente conhecida como alecrim-do-campo, o que torna este produto único com características químicas e biológicas diferenciadas, com particular presença dos compostos fenólicos, o Artepillin C e o ácido hidroxicinâmico (SFORCIN; BANKOVA, 2011; SILVA, 2011).

Nas últimas décadas houve um aumento significativo na incidência da Candidíase, produzindo altas taxas de morbidade, onde o uso prolongado do mesmo antifúngico de forma terapêutica ou empírica, é um fator predisponente para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana, tornando-se um sério problema de saúde pública. Em contrapartida, diversas substâncias naturais têm sido pesquisadas na intenção de desenvolver novas fontes farmacológicas, dentre estas a própolis apresenta grande potencial farmacológico devido as inúmeras atividades biológicas já comprovadas.

Nesta perspectiva, a pesquisa se justificou pelo motivo de que determinar a resistência ou sensibilidade do fungo ao extrato hidroalcoólico de própolis verde pode contribuir para o correto controle e escolha terapêutica mais adequada para o tratamento da candidíase e assim minimizar está problemática.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antifúngico do extrato hidroalcoólico de própolis verde frente a leveduras do gênero *Candida*, por dois métodos de detecção de susceptibilidade.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Elaborar o extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta;
- ✓ Caracterizar o screening fitoquímico do extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- ✓ Obter e reativar as culturas de leveduras do gênero *Candida* oriundas da Coleção de Culturas de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ);
- ✓ Determinar o perfil de susceptibilidade, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos isolados frente ao extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta e ao fluconazol usando os parâmetros dos protocolos M44- A2 e M27- A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI);
- ✓ Comparar e correlacionar os protocolos M44- A2 e M27- A3 do CLSI, para caracterizar a presença de semelhanças e diferenças no perfil de susceptibilidade *in vitro* das espécies de *Candida*.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* são microrganismos eucarióticos, que taxonomicamente são classificados como pertencentes ao domínio Eucarya, reino Fungi, divisão Eumycota, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales, família Debaryomycetaceae. De modo morfológico e funcional, são seres unicelulares e pleomórficos que se reproduzem assexuadamente por brotamento, podendo por vezes apresentar forma micelial, produzindo pseudohifas, hifas verdadeiras e até clamidósporos dependendo das condições de crescimento, quer seja *in vitro* ou *in vivo* (BARBEDO; SGARBI, 2010; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; ALMEIDA, 2013).

Atualmente, existem cerca de 200 (duzentas) espécies de leveduras do gênero *Candida*, sendo que pouco mais de 20 espécies são responsáveis por infecções em seres humanos, dentre as quais se destaca *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* e *C. Krusei*, *C. fumata* e *C. rugosa*. Dessas, a *C. albicans* representa o principal patógeno, sendo frequentemente isolado em associação com diferentes doenças humanas (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; NEGRI et al., 2010; SILVA, 2011).

A *C. albicans* é uma levedura diplóide com história de dimorfismo fúngico invertido, onde enquanto os outros fungos se encontram na natureza na fase miceliana e causam doenças no homem na fase leveduriforme, a *C. albicans* comporta-se de modo contrário, sendo uma das causas para esta alta prevalência (SANTOS, 2011; ALMEIDA, 2013).

As espécies de leveduras do gênero *Candida* são encontradas em uma ampla variedade de nichos ecológicos, que vão desde o solo, água, objetos inanimados até seres humanos. Normalmente em hospedeiros clinicamente saudáveis, elas exercem atividade saprofítica cosmopolita, colonizando a microbiota da pele e de mucosas dos tratos: digestivo, urinário, bucal e vaginal, desde o nascimento, não causando nenhum prejuízo patogênico (SILVA, 2011; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; ALENCAR, 2013).

Porém, quando há alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro, decorrentes de mudanças fisiológicas nos extremos do ciclo de vida humana, infância e velhice, bem como em doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunodepressão induzida por atos médicos, há uma associação destes microrganismos com uma deficiência fisiológica do sistema imune, provocando uma ruptura de seu equilíbrio comensal e gerando concomitantemente uma transformação dessas em parasitas, ou seja, na

dependência de fatores predisponentes, que alteram a integridade orgânica humana, as leveduras modificam a sua conformação leveduriforme para uma forma fusiforme, tornando-se patogênica, produzindo uma patologia infecciosa oportunista conhecida como candidíase (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; SANTOS, 2011; ALENCAR, 2013; ALMEIDA, 2013).

A maioria das leveduras do gênero *Candida* são semelhantes em sua micromorfologia, todavia podem ser diferenciadas por apresentarem capacidades assimilatórias, oxidativas e fermentativas, por meio das quais se tornam aptas a utilizarem uma variedade de substâncias orgânicas, onde em meio sólido, contendo Ágar Sabouraud Dextrose (SDA), suas características macroscópicas se referem a colônias úmidas, cremosas, de aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada. Microscopicamente, suas células são globosas, ovaladas ou ovalada-alongadas, medindo, em média, de 3 por 7µm a 3 por 14µm (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; SANTOS, 2011; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A identificação laboratorial das espécies de *Candida*, é essencial para o estabelecimento de um correto diagnóstico de Candidíase, pois, este além de auxiliar no estudo da epidemiologia da doença, promove um correto início da terapia antifúngica. O diagnóstico laboratorial desta infecção varia de acordo com o tipo de patologia instalada, mas de modo geral é realizado primariamente um exame direto clarificado com Hidróxido de Potássio (KOH) a 10%, que mostra a presença de células ovais de leveduras e/ou pseudo-hifa, com posterior isolamento em meio de cultura SDA mantidas à temperatura de 30 °C a 37 °C por até 15 dias, para posterior identificação por observação das características morfológicas, testes bioquímicos e análises moleculares (ABEEG, 2010; LIGUORI et al., 2010; ANDRADE; FREITAS; CASTILHO 2012).

### 3.2 INFECÇÕES OPORTUNISTAS POR ESPÉCIES DE *Candida*

As infecções decorrentes da ação oportunista e patogênica das leveduras do gênero *Candida* são denominadas de candidíases, quadro clínico de amplo espectro que varia de agudo, subagudo a crônico, como também de superficial a invasivo com manifestações clínicas diversificadas que vão desde as lesões na pele e mucosas a comprometer órgãos por disseminação hematogênica (BARBEDO; SGARBI, 2010; ALMEIDA et al., 2012; ALMEIDA, 2013).

Como citado, poucas espécies de *Candida* estão implicadas em doenças humanas, essas espécies apresentam diferentes habilidades patogênicas, que podem ser descritas como fatores de virulência incluindo a habilidade de aderir em tecidos hospedeiros, potencial para produzir

exoenzimas hidrolíticas e hemolisinas, como as proteinases e fosfolipases e a capacidade de transformação morfológica, fenômeno conhecido como “*switching*”, que confere maior resistência contra o sistema de defesa do hospedeiro (ABEEG, 2010; NEGRI et al., 2010).

Para o estabelecimento da Candidíase, também deve ser levado em consideração os fatores intrínsecos ao hospedeiro, como a existência de doenças de base que deprimem o sistema imunológico como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), Diabetes Mellitus tipo I, Lúpus Eritematoso Sistêmico, bem como deficiências nutricionais, obesidade e desnutrição; o uso de quimioterapia e radioterapia para o tratamento do Câncer, uso de antibioticoterapia de largo espectro, transplante de órgãos e a utilização de cateteres ou dispositivos invasivos, estes e outros fatores favorecem a alta prevalência desta infecção fúngica, que por vezes pode funcionar como um marcador de progressão da doença e preditivo para o aumento da imunossupressão. Dentre as várias formas clínicas envolvidas nesse quadro patológico, pode-se destacar a candidíase cutâneo-mucosa, ungueal e a candidemia (ABEEG, 2010; ALMEIDA et al., 2012; ALMEIDA, 2013).

A candidíase cutâneo-mucosa se manifesta de várias formas clínicas, todavia as mais conhecidas e cientificamente estudadas são a estomatite cremosa ou pseudomembranosa, popularmente e vulgarmente conhecida como “sapinho”, esta doença caracteriza-se pela presença de lesões superficiais constituídas de placas branco-amareladas isoladas ou confluentes aderidas no palato, faringe, laringe, língua ou comissuras labiais, evoluindo para um quadro de queilite angular – crosta seca na boca (ALMEIDA et al., 2012; SIMÕES; FONSECA; FIGUEIRAL, 2013); a candidíase intertriginosa, infecção cutânea que se manifesta em dobras, como axilas, regiões submamárias, ínguido-crurais e interdigitais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012); candidíase vulvovaginal, também chamada de monolíase vaginal, caracteriza-se clinicamente pela ocorrência de prurido vulvar e intenso, dispareunia, disúria, edema, hiperemia na vulva e vagina e leucorréia de cor esbranquiçada, em grumos, com aspecto de “leite coalhado” (FEUERSCHUETTE et al., 2010; GLEHN; RODRIGUES, 2012; BOATTO et al., 2015) e a balanopostite, que se manifesta pela presença de placas eritematosas que evoluem para placas com conteúdo cremoso na região da glande, parte sensível do órgão sexual masculino, situada na extremidade do pênis (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Dentre as manifestações clínicas da candidíase cutâneo-mucosa, a infecção fúngica oral é a mais prevalente, especialmente em imunosuprimidos pelo vírus HIV/AIDS, onde aproximadamente 74% dos pacientes apresentam lesões na mucosa bucal ocasionados por infecções causadas por *Candida* spp. (ALMEIDA et al., 2012; SIMÕES; FONSECA; FIGUEIRAL, 2013).

A candidíase vulvovaginal também apresenta altos índices, sendo considerada a segunda vaginite aguda mais frequente nos países tropicais, estimada em 17 a 39% dos casos, atrás somente da vaginose bacteriana com 22 a 50%; esta patologia produz grande desconforto, interferindo nas relações sexuais e afetivas, prejudicando o desempenho laboral (BARBEDO; SGARBI, 2010; FEUERSCHUETTE et al., 2010; BOATTO et al., 2015).

A candidíase ungueal também conhecida como onicomicose se caracteriza pela presença de lesões fúngicas causadas por espécies de *Candida* na unha, onde em casos mais graves há a tumefação das bordas da unha (PEREIRA, 2012; RESENDE, 2015).

As leveduras representam 7% dos casos de onicomicose, sendo a *Candida albicans* e a *Candida parapsilosis* as maiores responsáveis e os profissionais como lavadeiras, cozinheiras, jardineiros, os mais acometidos por ficarem em maior contato com água e solo (COPETO, 2010; CAMBUIM et al., 2011; OLIVEIRA, 2014).

A candidemia ou candidíase hematogênica é uma Infecção Fúngica Invasiva (IFI), com alta taxa de mortalidade em pacientes que fazem uso de antibioticoterapia de largo espectro, submetidos a procedimentos invasivos e internados em unidades de terapia intensiva ao redor do mundo, pois, de modo geral, caracteriza-se por ser uma infecção na corrente sanguínea, no entanto, engloba um amplo leque de situações clínicas, incluindo desde episódios isolados de candidemia até casos onde o fungo presente na corrente sanguínea dissemina-se para um ou vários órgãos do hospedeiro infectado com localização mais frequente nos pulmões e trato urinário (CABRERA; LÓPEZ-CEPERO, 2012; ALENCAR, 2013; COLOMBO et al., 2013).

Atualmente, dentre as espécies de *Candida* patogênicas, a de maior prevalência, seja qual for o quadro clínico estabelecido é a *Candida albicans*. Porém, ao longo dos anos observa-se um aumento progressivo de espécies de *Candida* não-*albicans*, associadas a estas infecções, como *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, em maior parte devido à transmissão do patógeno através dos profissionais de saúde, aderência da levedura em dispositivos médico-hospitalares produzindo biofilmes e uso profilático ou empírico de agentes antifúngicos, com menor sensibilidade a espécie (ABEEG, 2010; SANTOS, 2011; ALMEIDA et al., 2012; ALENCAR, 2013).

Em estudo Alves e colaboradores (2015), determinaram a prevalência de espécies de *Candida* provenientes de secreção vaginal, onde identificaram pelo sistema de VITEK-2 que de 144 amostras, 62,5% produziram culturas positivas para *Candida* spp., onde a maior prevalência em espécie foi de *C. parapsilosis* (43%), demonstrando uma emergente incidência de espécies de *Candida* não-*albicans*.

As diferentes espécies de *Candida* podem causar o mesmo tipo de enfermidade, no entanto, a gravidade e as opções terapêuticas diferem entre as espécies e dentro da mesma espécie, justificando o uso dos testes de sensibilidade *in vitro* para o estabelecimento de uma terapia adequada (ALMEIDA, 2013; COLOMBO et al., 2013).

### 3.2.1 Terapia antifúngica na Candidíase

A adoção de conduta terapêutica adequada para leveduroses consiste primariamente em identificar e corrigir os fatores predisponentes ao parasitismo desses microrganismos oportunistas, onde posteriormente deve-se proceder a terapia, com enfoque na escolha apropriada do fármaco, da via de administração e da duração do tratamento para uma efetiva resposta clínica e cura micológica da doença (FREITAS, 2012; COLOMBO et al., 2013).

Atualmente, as opções terapêuticas de escolha para o tratamento da candidíase podem ser administradas na forma tópica, oral e intravenosa, dependendo da forma clínica da doença estabelecida, onde os principais agentes antifúngicos utilizados pertencem às classes farmacológicas dos azóis, polienos e equinocandinas (RAMESH et al., 2011; FREITAS, 2012; COLOMBO et al., 2013).

Os azólicos são antifúngicos fungicidas e fungistáticos de amplo espectro, utilizados no tratamento das diversas formas clínicas da Candidíase. De acordo com suas formulações e estrutura química, esta classe pode ser subdividida em imidazólicos (miconazol, cetoconazol), triazóis de primeira geração (fluconazol, itraconazol), e triazóis de segunda geração (voriconazol, posaconazol e ravuconazol), estes últimos têm um espectro de ação ampliado e causam menos efeitos colaterais auxiliando no potencial de combate das candidemias (KLEPSEK, 2011; CASTRO et al., 2013).

Apresentam como mecanismo de ação a atuação sobre as enzimas do citocromo P450 das leveduras, inibindo a enzima lanosterol 14  $\alpha$ -desmetilase e assim consequentemente bloqueando a síntese do ergosterol alterando a permeabilidade da membrana das células fúngicas. Também agem modificando a síntese de lipídios, inativando enzimas do processo oxidativo dos fungos. Apesar de ser destinado apenas aos fungos, por vezes, podem afetar as células humanas causando diversos efeitos adversos, dentre os quais podem-se destacar a intolerância gastrointestinal, hepatotoxicidade e hipersensibilidade, além de serem drogas teratogênicas não devendo ser administradas a gestantes (ARNOLD et al., 2010; PAM et al., 2012; VASCONCELOS-JÚNIOR et al., 2012; NEVES-JÚNIOR et al., 2015).

Nos casos de candidíase vulvovaginal, todos os azólicos tópicos ou orais alcançam cura clínica e microbiológica de 80 a 95% em casos agudos na ausência de gravidez e os poliênicos como a nistatina alcançam 70 a 90%. Cerca de 10% das pacientes apresentam infecção mista, devendo o tratamento de cada agente ser realizado por via diferente, evitando-se o uso de cremes de amplo espectro (BARBEDO; SGARBI, 2010; FEUERSCHUETTE et al., 2010).

Os polienos ligam-se ao ergosterol presente na membrana de fungos sensíveis e alteram a permeabilidade da membrana formando poros ou canais permitindo a perda de íons e o extravasamento de diversas pequenas moléculas, levando à morte celular. Dentre os polienos utilizados no tratamento da candidíase destaca-se a nistatina, primeiro antifúngico a ser descoberto, isolado a partir da cultura da bactéria *Streptomyces noursei* em 1950. O uso clínico da anfotericina B é limitado, pois este fármaco apresenta escassa absorção oral, tendo seu uso restrito a IFIs, podendo também causar efeitos adversos como náuseas, vômitos e diarreia (LEWIS et al., 2013; FALCI, 2015).

As equinocandinas representam uma classe de antifúngicos de administração intravenosa composta por três agentes: caspofungina, micafungina e anidulafungina para os casos de candidíase superficial, invasiva e aspergilose, no entanto ambos são lipopeptídeos que apresentam um mecanismo de ação diferente dos outros antifúngicos: a inibição da síntese da enzima  $\beta$ -1,3-glucano sintase, componente essencial da parede celular de algumas leveduras e fungos filamentosos, originando um duplo efeito, fungistático e fungicida provocando a morte celular do fungo. Este novo e diferente mecanismo de ação traz à tona uma vantagem, a ausência de toxicidade, produzindo menos efeitos adversos quando comparado à anfotericina B para os tecidos dos mamíferos, pois nas células dos mesmos não possuem as enzimas envolvidas na síntese de glucano (PEMÁN, 2010; GEORGE; REBOLI, 2012).

Apesar da forte associação existente entre o uso de antimicrobianos e o surgimento de resistência, o mercado farmacêutico brasileiro dispõe de uma infinidade de antifúngicos que podem ser comercializados indiscriminadamente, favorecendo a automedicação e prática do crescimento da resistência antifúngica (ANVISA, 2016).

### 3.3 PRÓPOLIS: CONTEXTO HISTÓRICO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Nos últimos anos houve um crescente interesse pelo uso de produtos naturais no combate a patologias, dentre estes produtos naturais, destaca-se a própolis, devido a sua gama



única de micronutrientes, que conferem a esta substância, diversas propriedades biológicas comprovadas (ALMEIDA, 2013; BITTENCOURT et al., 2014; BOROWSKI, 2015).

A própolis é uma substância resinosa balsâmica produzida pelas abelhas *Apis mellifera*, que a elaboram a partir da coleta do exsudato de diversos tecidos vegetais que podem ser de diversas naturezas, como material lipofílico nas folhas, mucilagens, gomas e resinas; as abelhas as unem em conjunto com os produtos do seu metabolismo, em especial a enzima salivar  $\beta$ -glicosidase que hidrolisa flavonoides heterosídeos em agliconas, cera e pólen transformando-a em uma substância enriquecida única (ARSLAN et al., 2011; SFORCIN; BANKOVA, 2011; SILVA, 2011; BONVEHÍ; GUTIÉRREZ, 2012).

Os primeiros relatos do uso da própolis são datados no antigo Egito, no papiro de Ebers escrito em 1700 a.C., onde os egípcios a utilizavam para embalsamar mortos no processo de mumificação por seus efeitos anti-putrefativos (SOUZA; FISCHER; VARGAS, 2013). A própolis também era utilizada por outras civilizações, como os Incas que a utilizavam como antipirético e os Gregos e Romanos que reconheceram suas propriedades medicinais cicatrizantes e antissépticas (PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011).

Entretanto, na questão científica, o termo própolis somente foi descrito pela primeira vez no século XVI na França, quando a Farmacopeia de Londres do século XVII a listou como uma droga oficial (PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011). No Brasil, esse interesse surgiu na década de 80 com o trabalho pioneiro de Ernesto Ulrich Breyer, que demonstrou em seu livro, “Abelhas e saúde”, as propriedades terapêuticas da própolis e sua utilização como antibiótico natural (SOUZA; FISCHER; VARGAS, 2013).

A palavra própolis é oriunda dos radicais gregos *pro* “em defesa de” e *polis* - “cidade”, que refletem a sua importância para as abelhas (HIPÓLITO, 2013). Esta resina é conhecida como uma “arma química”, pois, é depositada na entrada das colmeias para cobrir as paredes, preencher as rachaduras para a proteção contra microrganismos patogênicos e animais, embalsamar insetos invasores mortos, manter o ambiente asséptico, reparar favos e envernizar o interior dos alvéolos para a postura da abelha rainha (PEREIRA et al., 2015; PETER, 2015).

Devido ao fato de ser uma mistura de substâncias naturais a composição química da própolis varia com seu tipo. Mas quando colhida, denominada em tal momento como própolis bruta, é constituída de cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra (AL-WAILI et al., 2012; PETER, 2015).

Dessa maneira, a própolis pode apresentar diversos aspectos e variações em sua textura, cheiro e coloração, sendo essas características atribuídas a flora vegetal que se encontra nas

proximidades das colmeias, pelos ciclos evolutivos das plantas provedoras de resinas, pelos microrganismos presentes em torno da região, fatores climatológicos bem como da espécie de abelha e da época do ano em que este material é coletado (LINS et al., 2010; MIGUEL et al., 2010; PORTILHO et al., 2013).

A própolis é uma substância extremamente complexa, onde mais de 300 compostos químicos já foram isolados, entre eles a cera, a resina vegetal e os compostos voláteis, como os flavonóides, ácidos carboxílicos, hidrocarbonetos superiores, álcoois, ácidos aromáticos, ácidos graxos, cetonas, flavonas e flavonóis, flavononas, chalconas e diidrochalconas, terpenóides, esteróides, aminoácidos, açúcares, lignanas, vitaminas (A, B1, B2, B6, C, E e PP) e minerais (sódio, potássio, magnésio, bário, estrôncio, cádmio, chumbo, cobre, manganês, ferro, cálcio, vanádio, silício, alumínio, níquel, zinco, cromo, titânio, prata, molibdênio e cobalto) (MIGUEL et al., 2010; BISPO-JÚNIOR et al., 2012; CAPISTRANO et al., 2013).

Atualmente, muitas são as propriedades biológicas conferidas a própolis como antimicrobiana (CHOUDHARI et al., 2012; BARUD et al., 2013; BITTENCOURT et al., 2014), anticariogênica (GONÇALVES, 2010), citotóxica (FROZZA et al., 2013; PETER et al., 2017), anti-inflamatória e imunomodulatória (ARAÚJO et al., 2011; MACHADO et al., 2012; FARIAS et al., 2014), antioxidante (RIGHI et al., 2011), antileishmania e antiprotozoário (SALOMÃO et al., 2011; SILVA et al., 2013) e adstringente e antiespasmódico (KUROPATNICKI; SZLISKA; KROL, 2013).

Em estudo Righi et al. (2011), utilizaram um extrato metanólico de própolis vermelha coletada na região de Maceió, Alagoas, para avaliar a atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis*, *E. faecalis* e *Streptococcus pyogenes*; Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* e *E. coli*; e do fungo *Candida albicans*. O extrato inibiu o crescimento de todos os microrganismos testados, havendo uma maior sensibilidade das bactérias Gram-positivas do que as Gram-negativas ao extrato.

Herrera (2016), avaliou o efeito antiproliferativo e citotóxico de amostras de própolis verde do Brasil e vermelha de Cuba em linhagens de células tumorais humanas (A549, Hep-2, MDA/MB-231). Referente à viabilidade da linhagem MDA/MB-231, pode-se observar que a própolis verde não afetou o tratamento e a própolis vermelha apresentou efeito citotóxico em uma CIM de  $67,27 \pm 12,8 \mu\text{g/mL}$ , havendo a morte celular por necrose com liberação da enzima LDH e não por apoptose como o observado nas demais linhagens.

Sobre a forma como as atividades antimicrobianas ocorrem, Capistrano et al. (2013), sugeriram alguns mecanismos que poderiam ser exercidos pela própolis, como inibição da divisão celular; colapso do citoplasma bacteriano, bem como da sua parede ou membrana

celular; bacteriólise e inibição da síntese de proteínas. Afirma ainda que a galangina e o ácido cafeico, encontrados em extratos etanólicos de própolis, seriam agentes inibidores de enzimas nas bactérias.

Sobre as suas formas de apresentação, a própolis pode ser distribuída como produto puro, apenas retirando-se a cera, na forma de cápsulas (isolada ou combinada), como extrato (hidroalcoólico ou glicólico), como antisséptico bucal (combinado com melissa), como pastilhas para garganta, cremes, em forma de pó e de cosméticos (NUNES et al., 2012; ROCHA, 2012).

Park et al. (2002), classificaram a própolis brasileira em 13 tipos distintos, através do perfil químico obtido pelas técnicas de espectrofotometria de absorção na região UV-visível, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa, atividade antimicrobiana e antioxidante, onde as mais importantes são a verde, vermelha e preta (PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011).

### **3.3.1 Própolis verde de origem da *Baccharis dracunculifolia***

A principal fonte botânica da própolis verde é a resina extraída da planta *Baccharis dracunculifolia*, conhecida como alecrim-do-campo ou vassourinha. A referida espécie vegetal apesar de ser considerada invasora, é utilizada popularmente, no tratamento da tuberculose, de úlcera duodenal, de distúrbios gástricos, na redução da febre, contra doenças inflamatórias, como analgésico, anticancerígeno, bem como por sua atividade antimicrobiana (REIDEL, 2014; BRAGA, 2017).

A *Baccharis dracunculifolia* não é adaptada as condições climáticas existentes em outros países, transformando a própolis verde brasileira em um produto único com características químicas e biológicas diferenciadas (ARSLAN et al., 2011).

A própolis verde apresenta uma screening fitoquímico único, com alta concentração de compostos fenólicos com predomínio do ácido cinâmico – o artepelin C, e o Éster Feniltil do Ácido Cafeico (CAPE), ácido cafeoilquínico, ácido p-cumárico; terpenos como o ácido diterpênico, ácidos aromáticos e ácidos sesqui, di e triterpênicos; flavonóides como canferide, pinobanskina, crisina, galangina, canferol e isosakuranetina; acetofenonas, lignanas, álcool triterpênico e hidrocarbonos, esta ampla gama de substância confere a própolis verde inúmeras atividades biológicas (ARSLAN et al., 2011; BISPO-JÚNIOR et al., 2012; MATTIGATTI et al., 2012; POSSAMAI et al., 2013; REIDEL, 2014; BRAGA, 2017).

A própolis do alecrim-do-campo é considerada um produto tipicamente brasileiro e, devido ao fato de ser altamente eficaz no combate a uma série de microrganismos é altamente valorizada no mercado internacional, sendo que, somente no Japão, movimenta um mercado da ordem de setecentos milhões de dólares ao ano (PEREIRA et al., 2015).

Tanto em modelos experimentais quanto em humanos, a própolis não apresenta efeitos colaterais. Em camundongos, a  $DL_{50}$  varia entre 2 a 7.3 g/kg enquanto em humanos, a dose sugerida é de 1,4 mg/kg, ou aproximadamente 70 mg/dia (POSSAMAI et al., 2013; BRAGA, 2017).

### **3.3.1.1 Atividades biológicas da própolis verde**

A ação anti-inflamatória da própolis verde tem sido relatada por várias pesquisas usando diferentes modelos de inflamação. Xuan et al. (2010), identificaram em seu estudo que o aumento no tempo de tratamento, inibe a produção das Interleucinas (IL), IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2 E IL-10 em esplenócitos, sugerindo atividade anti-inflamatória uma vez que essas citocinas compõem as características da inflamação crônica de várias doenças.

Bachiega et al. (2012), investigaram o efeito imunomodulador da própolis verde com base na produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 por macrófagos intraperitoneais, e induzidos por lipopolissacarídeos antes e após tratamento com própolis e com os seus compostos isolados, o ácido p-cumárico e cinâmico, onde pode-se constatar que própolis modulou a resposta imune/inflamatória de acordo com a concentração empregada, e na concentração de 25  $\mu$ g/poço, houve aumento da produção de IL-6, enquanto na concentração de 50  $\mu$ g/poço, houve diminuição. Mostrando, assim, que a própolis pode se comportar tanto como pró, como anti-inflamatória conforme a dose.

A própolis verde também foi investigada quanto à expressão de compostos essenciais para o reconhecimento microbiano e desenvolvimento da resposta imune adaptativa, os Receptores Toll-like (TLRs), onde a terapia com a própolis, produziu aumento na produção basal de IL-1 $\beta$  e IL-6 e na expressão do gene TLR-2 e TLR-4 em macrófagos peritoneais e esplenócitos de camundongos, constatando que uso da própolis em curto prazo pode estimular os eventos iniciais da resposta imune, sugerindo um efeito anti-inflamatório *in vivo* (ORSATTI et al., 2010).

Possamai et al. (2013), em estudo constataram o efeito sinérgico-estimulador do extrato da própolis verde bruto em monócitos humanos auxiliando na resposta antifúngica sobre *Candida albicans*, sendo esse efeito potencializado quando incorporado em microesferas de

polietileno glicol, sugerindo que a própolis pode ser utilizada como uma alternativa terapêutica para o controle da candidemia. Yalfani; Khosravi; Pirouz (2013), também demonstraram que a própolis tem atividade antifúngica em modelo experimental de *C. albicans* modulando a resposta imune e permitindo o aumento da sobrevivência dos animais.

Recentemente, Berretta et al. (2013) desenvolveram géis mucoadesivos à base de extrato de própolis verde, para o tratamento de candidíase vulvovaginal, com 1% de própolis. Os resultados demonstraram que, os géis contendo própolis para dois sistemas diferentes, uma base do polímero aniônico carbopol 940® e outro à base de co-polímero em bloco (poloxamer F127 – Lutrol F127®), foram tão eficazes na redução da carga fúngica quanto um creme contendo clotrimazol (10mg/g), medicamento comumente utilizado para essa doença.

A ação antifúngica da própolis verde pode estar relacionada por esta inibir a formação de biofilme, devido à indução de morte celular via metacaspase e sinalização do gene RAS (CASTRO et al., 2013; CAPOCI et al., 2015).

Vilela e colaboradores (2011), em estudo, avaliaram o potencial de um extrato etanólico de própolis verde como virucida contra o *avipoxvirus* na membrana corioalantóide de ovos embrionados. Os ovos foram inoculados com diferentes concentrações da própolis (2400 µg/dose, 240 µg/dose e 24 µg/dose) e submetidos à zero, quatro ou oito horas de incubação juntamente com o vírus. Após o período de incubação, pode-se observar que o número de lesões causadas pelo vírus e as lesões histopatológicas reduziram-se significativamente após oito horas de incubação, havendo inclusive ausência de lesões quando incubados com 2400 µg/dose de própolis.

Em estudo semelhante, Peter et al. (2017), identificou que o extrato da própolis verde a 37 °C levou a uma redução de 4.33 log no título viral em comparação com o extrato da própolis marrom (3.5log) e o extrato da própolis de abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*) (3.24log), frente ao herpesvírus bovino tipo 1 e ao vírus da diarreia viral bovina, mostrando ser eficiente no combate desses patógenos.

Alguns compostos de própolis verde, como o Éster Feniltil do Ácido Cafeíco têm mostrado efeito biológico. Búfalo; Sforcin (2015), isolaram um composto do CAPE e identificaram que o mesmo tem ação imunomoduladora em monócitos humanos sem apresentar efeito citotóxico.

Além do CAPE, a Artepelin C demonstrou atividade anti-inflamatória no estudo de Machado et al. (2012), onde ela promoveu a inibição de citocinas próinflamatórias e aumentou as citocinas inflamatórias.

Silva et al. (2013), identificaram que o extrato de própolis verde apresenta efeito antiparasitário e imunomodulador direto sobre o parasita *Leishmania brasiliensis* e *Trypanosoma cruzi*, em um modelo experimental de infecção.

Devido a tantas características peculiares e altamente significativas, há a necessidade incansável de promover a caracterização da própolis verde quanto as propriedades físico-químicas e ação biológica, para proporcionar subsídios para impulsionar o desenvolvimento das comunidades que trabalham neste setor.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO DE PRÓPOLIS

A depender da fonte botânica do ecossistema de onde a própolis está sendo produzida, a mesma apresenta diferente Screening Fitoquímico, por isso, para a instalação de uma terapêutica adequada com o uso deste produto natural se faz necessário determinar a sua origem botânica através da análise de seu perfil químico comparado com a provável fonte vegetal, bem como determinar sua origem geográfica, aliada à fenologia da planta hospedeira (LINS et al., 2010; PORTILHO et al., 2013).

A origem botânica é o fator determinante na variabilidade química da composição da própolis, e como consequência, das propriedades biológicas a partir de uma determinada região. Na Europa, América do Norte e regiões não tropicais da Ásia, a fonte dominante para a produção da própolis é o exsudato do botão de álamo (*Populus* sp.); já na América do Sul outras espécies vegetais são empregadas como fontes de produção da própolis como o alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), rabo-de-bugi (*Dalbergia Ecastophyllum*), copaíba (*Copaifera langsdorffii*), cipreste (*Cupressus sempervirens*) e palmeira-sagu (*Macaranga tanarius*). As amostras originárias destas regiões são quimicamente similares, predominantemente compostas por substâncias flavonoides, como o CAPE (BANKOVA et al., 2013; CASTRO et al., 2013; HIPÓLITO, 2013; SOUZA; FICHER; VARGAS, 2013).

Bankova, Popova e Trusheva (2014) descrevem que o controle da origem geográfica da própolis é fundamental para assegurar uma composição constante e alcançar uma melhor padronização possível.

Estudos recentes apontaram que a composição química e o efeito antimicrobiano das amostras de própolis são dependentes da vegetação ao redor dos apiários. Castro *et al.* (2007) e Siqueira et al. (2014), em estudo sobre a influência da sazonalidade na atividade antibacteriana da própolis das regiões sudeste e nordeste, ao longo dos períodos de safra apícola, pode constatar que a medida que a sazonalidade mudava a atividade antibacteriana das própolis dos

tipos 6 (região nordeste) e 12 (região sudeste), sofriam alterações nas concentrações dos compostos bioativos.

Muitos são os métodos utilizados para analisar os compostos químicos da própolis, como os métodos analíticos que se baseiam em curvas de calibração e absorvância, que apesar de pouco sensíveis ainda hoje continuam a serem utilizados. Dentre os métodos destacam-se os cromatográficos, a cromatografia em papel, Cromatografia em Camada Delgada (CCD), bidimensional em papel, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia Gasosa (CG), além dos métodos de espectrofotometria de massa. Destes os de maiores sucessos aplicados à separação e identificação das moléculas que estão solubilizadas nos extratos de própolis são os de CG, CLAE e a espectrofotometria de massa, que apesar de serem métodos onerosos, são extremamente sensíveis neste processo (ALMEIDA, 2014; PEREIRA et al., 2016).

### 3.5 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Atualmente, mesmo com o uso de fármacos de largo espectro para instituir uma terapêutica adequada na Candidíase e a notória fiscalização pelo uso indiscriminado de antimicrobianos de modo empírico ou profilático, existe a possibilidade do surgimento de resistência nos microrganismos. Assim, a resistência antimicrobiana vem sendo considerada como um crescente problema de saúde pública mundial, sendo o maior obstáculo para a comprovação da eficácia terapêutica de antimicrobianos disponíveis, onde há diante deste quadro uma necessidade de introduzir novos agentes antimicrobianos no acervo terapêutico (SILVA et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2014).

O processo de desenvolvimento de resistência nas leveduras do gênero *Candida*, ocorre devido a uma série de mecanismos que podem ocorrer simultaneamente, ampliando este fenômeno. Basso-Júnior et al. (2010) e Almeida et al. (2012) destacam a superexpressão ou mutação do gene ERG-11, que codifica a enzima lanosterol 14-á-desmetilase, alvo dos antifúngicos sintéticos azólicos, como fluconazol, miconazol e intraconazol; a superexpressão de genes CDR-1, CDR-2 e MDR-1 que codificam bombas de efluxo; alterações do gene ERG-3 que codifica a enzima 5-6 esterol dessaturase, importante na síntese do ergosterol, bem como alterações na composição lipídica da membrana plasmática fúngica, o que dificulta o influxo do fármaco na célula.

Para a avaliação do desenvolvimento de resistência de leveduras do gênero *Candida* a antifúngicos e substâncias naturais faz-se necessária à utilização de testes de sensibilidade, que

determinam não somente o tipo de antifúngico adequado, como também a concentração do fármaco para a terapêutica instituída, pois nem sempre um microrganismo segue o padrão geral dos outros, sendo necessário a utilização de vários métodos para poder conferir os resultados diferentes e assim refletir em uma terapêutica eficaz (COSTA, 2013; PORTILHO et al., 2013).

Para a detecção da atividade antifúngica *in vitro* dos mais diferentes compostos relatados na literatura, destacam-se os ensaios de difusão e diluição. Dentre estes, as técnicas mais conhecidas são as de difusão em ágar por poço, difusão em disco e a macrodiluição e microdiluição em caldo (DIOGO et al., 2010; ALMEIDA et al., 2012).

Os ensaios de difusão em ágar, também chamados de difusão em placas são métodos qualitativos, descritos pela primeira vez em 1966 por Bayer e Kirby, nos quais a atividade do composto avaliado é determinada através da sua difusão em meio de cultura sólido com o inóculo do microrganismo. A partir da difusão da substância, há o aparecimento de um halo de inibição, no qual não há crescimento do microrganismo, que quando mensurado determina a classificação dos microrganismos como sensíveis, moderadamente sensíveis e resistentes (ALMEIDA et al., 2012; ALMEIDA, 2013; BITTENCOURT et al., 2014).

O modo como o qual o composto a ser testado é colocado em contato com o meio de cultura inoculado, define os diferentes métodos de difusão, que podem ser por discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e poços feitos no meio de cultura (ALMEIDA et al., 2012; CAFINI et al., 2012).

Dentre essas técnicas, a de difusão em disco é particularmente a mais utilizada por ser prática e de fácil execução. Inicialmente este ensaio foi idealizado para bactérias de crescimento rápido, entretanto, atualmente, pode ser utilizado para leveduras do gênero *candida*, conforme pode ser observado no documento M44-A2 (2009) do CLSI. Nesse protocolo são testados os antifúngicos, utilizando como meio de cultura o ágar Mueller-Hinton suplementado com 2% de glicose e 0,5ul/mL de azul de metileno e 10ul da solução de agente antimicrobiano em discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro, nas diferentes concentrações a serem testadas para a determinação qualitativa da sensibilidade de um microrganismo (CLSI, 2009; DIOGO et al., 2010; PORTILHO et al., 2013).

Já nos ensaios de diluição, as substâncias testadas são adicionadas a um meio de cultura líquido, previamente inoculado com o microrganismo teste, onde após a incubação, o crescimento do microrganismo é determinado pela leitura visual ou uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado. De modo geral é considerado a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo inoculado no meio líquido e a concentração da substância



ensaiada, ou seja, a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano (ARSLAN, 2011; ARDILA; ALZATE; GUZMÁN, 2014).

No método de diluição, duas metodologias podem ser empregadas, a de macrodiluição e a de microdiluição. Entretanto, pela grande quantidade de resíduos gerados e pelo uso de menos material, a microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A3 (2008) proposto pelo CLSI é a mais utilizada. Nesse protocolo são testados os antifúngicos, utilizando microplacas com 96 poços para inoculação do microrganismo e do meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) com glutamina componente essencial para o crescimento celular, que é tamponado com Ácido Morfolinopropanosulfônico (MOPS) a pH 7,0, para determinação da CIM, menor concentração do composto a ser testado capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo quando comparado com os poços controles. Nesse tipo de teste também pode-se determinar a CFM, menor concentração da substância capaz de promover a total eliminação do microrganismo (CLSI, 2008; ARSLAN, 2011; ALMEIDA, 2013).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo trata-se de uma pesquisa experimental com abordagem quali-quantitativa, a qual foi realizada no Centro Vocacional Tecnológico (CVT) e no laboratório de química, ambos vinculados ao Centro de Ciência e Tecnologia Agroalimentar (CCTA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Pombal, PB, Brasil; e no Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, Brasil.

### 4.1 OBTENÇÃO E REIDRATAÇÃO DAS CULTURAS DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

Os isolados de *Candida* utilizados na pesquisa foram obtidos gentilmente por doação pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, onde as mesmas fazem parte da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária. Os dados sobre cada espécime utilizada na pesquisa estão contidos na Tabela 1.

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

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

\* Número de identificação da cepa no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde;

<sup>^</sup> Número de identificação da cepa no American Type Culture Collection.

**Fonte:** Elaborado pela autora com dados extraídos do INCQS/CMRVS/FIOCRUZ (2017).

As amostras foram transportadas liofilizadas da FIOCRUZ até o CVT/UFCG em ampolas de vidro seladas a vácuo, mantidas em caixa UN 3373, embalagem própria para o transporte de material biológico classe B. No laboratório de microbiologia do CVT/UFCG as ampolas foram preparadas para o processo de reidratação, em condições assépticas, as mesmas foram desinfetadas com álcool etílico a 70% (Itajá) e a parte superior da ampola foi aquecida

pela chama do bico de bunsen e resfriada com algumas gotas de solução salina (NaCl 0,85g/L) promovendo a quebra do vidro por choque térmico. Posteriormente, com o auxílio de uma micropipeta, 500µl de água deionizada foram ressuspensos com o sedimento, homogeneizando-o (INCQS/CMRVS/FIOCRUZ, 2017).

A suspensão formada foi semeada por esgotamento com o auxílio de uma alça de Drigasky na superfície de placas de Petri contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose acrescido de cloranfenicol (50mg/L) e incubado a 35 °C em estufa de cultivo por 72 horas. Após o surgimento das colônias, foram realizadas análises por exame direto com azul de metileno para identificação da morfologia das espécies, posteriormente as amostras foram mantidas a temperatura de 35 °C até o final do experimento. Devido às amostras já virem identificadas ao nível de espécie, não foi realizado nenhum teste taxonômico confirmativo dos isolados clínicos de *Candida* spp. (HOOG; GUARRO; FIGUERAS, 2000).

#### 4.2 ELABORAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE BRUTA

A própolis verde bruta foi obtida do município brasileiro de Pitimbu, localizado na região metropolitana de João Pessoa, Paraíba, Brasil, por doação do apicultor Edvaldo Pacheco. As amostras de própolis foram conservadas a temperatura ambiente e protegidas do sol até o momento da elaboração do extrato hidroalcoólico.

A extração da própolis verde foi realizada no laboratório de análises físico-químicas do CVT e no laboratório de química da UFCG seguindo a metodologia proposta por Dausch et al. (2008), com modificações, onde previamente a própolis verde bruta foi congelada a -18 °C por 24 horas e macerada de modo mecânico em liquidificador industrial de alta rotação (Vithory) para obtenção de um pó; após este processo amostras de 02 gramas da amostra foram pesadas em balança analítica de alta precisão (Shimadzu) para 25 mL de álcool etílico a 70% como solvente. Para extração, o material foi incubado em banho-maria estático a 50 °C por 30 minutos com agitação a cada 5 minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas a vácuo e centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos a 50 °C em centrífuga refrigerada NT 815 (Nova Técnica). O sobrenadante foi levado para rotaevaporação a 50 °C em evaporador rotativo (New Lab) para evaporação total do solvente, onde se obteve o extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta.

#### 4.2.1 Identificação do perfil químico do extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

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

A metodologia utilizada para esta análise seguiu o protocolo descrito por Zhao; Dong; Sun (2009), com adaptações para analisar os compostos fenólicos presentes nos extratos foi utilizado o módulo de separação (LC-20 AT, Shimadzu Corporation, Japão) equipado com uma coluna de 18 cadeias de Carbono em fase reversa (SUPELCOSIL™ LC-PAH CLAE Column, 250x4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e um detector UV-VISÍVEL (Rheodyne, EUA).

O extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta de concentração de 80 mg/mL, foi eluídas em um sistema gradiente que consistiu nas seguintes fases móveis: solvente A (2% de ácido acético, v/v) e solvente B (acetonitrila: metanol, 2:1, v/v), em fluxo constante de 1 mL / min. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e o volume de injeção foi de 20 µL.

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

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

#### 4.3 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Foram realizados dois tipos de testes de susceptibilidade antifúngica, o teste de difusão em disco (M44-A2) e o de teste de microdiluição em caldo (M27-A3), onde as espécies de *Candida* foram consideradas como sensível, sensível dose-dependente e resistente. Foi-se levado em consideração, para determinação das CIMs para ambos os testes, os breakpoints de  $\leq 62,5$ , 125-250 e  $\geq 500$  µg/ml para o extrato hidroalcoólico de própolis verde e  $\leq 8$ , 16-32 e  $\geq 64$  µg/ml para o fluconazol (Cimed), respectivamente. Em ambos os testes foi considerado 50% de inibição para o extrato hidroalcoólico de própolis verde em relação ao controle positivo, o medicamento fluconazol (Cimed). A leitura foi realizada com 24 e 48 horas para a ambas as substâncias e em ambos os testes, para confirmação dos dados.

### 4.3.1 Teste de difusão em disco

A susceptibilidade das leveduras frente as substâncias avaliadas seguiram o protocolo M44-A2 (CLSI, 2009), e foi determinada pela técnica de difusão em disco, que foi desenvolvida no laboratório de microbiologia do CVT/UFCG. O meio de cultura utilizado foi o Ágar Mueller-Hinton (Difco) suplementado com 2% de glicose (Difco) e 0,5ul/mL de azul de metileno (Neon) com pH 7,2 a 7,4. As substâncias avaliadas foram o extrato hidroalcoólico de própolis verde, com discos nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL e o fluconazol (Cimed), com discos na concentração de 64, 32, 16 e 8 µg/mL.

Para o desenvolvimento da técnica de sensibilidade em difusão em disco, ambas as substâncias foram diluídas para as concentrações desejadas, onde com o auxílio de uma micropipeta calibrada (Digpet), foi retirada a quantidade específica do extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta, que apresentava a concentração inicial de 80mg/mL e acrescentado ao mesmo álcool etílico a 70% para promover a diluição, já o medicamento convencional fluconazol (Cimed) que apresentava a concentração inicial de 150mg/mL foi diluído em Dimetilsufóxido (DMSO) (Pfizer).

Os discos foram confeccionados em papel de filtro medindo 6 mm de diâmetro, onde foram previamente autoclavados e armazenados até a data da sua produção. Antes do início do teste, os discos de papel foram separados em placas de Petri e com o auxílio de uma micropipeta foram embebidos de 20 ul do extrato hidroalcoólico de própolis verde nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL e do antifúngico fluconazol (Cimed) nas concentrações de 64, 32, 16 e 8 µg/mL. O antifúngico fluconazol (Cimed) foi utilizado na pesquisa como controle positivo, também foi produzido um disco contendo álcool etílico a 70% (Itajá), que foi utilizado como controle negativo.

Para desenvolvimento do teste, os isolados de *Candida* reativados foram semeadas em meio SDA (Difco) e incubadas a 35°C por 24h. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina (NaCl 0,85 g/L) e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530nm, garantindo que a concentração do inóculo estivesse entre 1 a  $5 \times 10^6$  células por mL.

Posteriormente um swab foi mergulhado nesta solução e foi realizado um semeio em placa contendo o meio Ágar Mueller-Hinton (Difco) suplementado com 2% de glicose (Difco) e 0,5 ul/mL de azul de metileno (Neon) pela técnica de esgotamento com swab cobrindo todo

o meio com estrias; 15 minutos após este processo, os discos embebidos com as substâncias a serem testadas foram distribuídos na placa com o auxílio de uma pinça previamente esterilizada.

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

O tamanho do halo de inibição formado pelas substâncias foi medido com paquímetro e correlacionado para ambas as substâncias com a escala de sensibilidade para fluconazol (Cimed) presente no documento M44-A2 (2009, CLSI). Não existe uma escala de sensibilidade para produtos naturais, no entanto, autores como Portilho et al. (2013), consideram uma escala de até 50% em referência ao fluconazol. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados, expressos em mm, foram calculados pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas duas repetições. Os pontos de corte para interpretação dos resultados estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Critérios de interpretação para determinação da susceptibilidade as substâncias avaliadas para os isolados de *Candida* spp., pela técnica de difusão em disco

Substância avaliada	Sensível (S)	Sensibilidade Dose dependente (SDD)	Resistente (R)
Fluconazol	$\geq 19\text{mm}$	15-18mm	$\leq 14\text{mm}$
Extrato hidroalcoólico de própolis verde	$\geq 10\text{mm}$	8-9mm	$\leq 7\text{mm}$

Fonte: CLSI (2009) e PORTILHO et al. (2013).

#### 4.3.2 Teste de microdiluição em caldo

A CIM das leveduras frente as substâncias avaliadas seguiram o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008) e foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, que também foi desenvolvida no laboratório de microbiologia do CVT/UFCG. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) esterilizado em membranas de 0,22µm (Millipore, Darmstadt, Alemanha), com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e pH 7,0±0,1 tamponado com MOPS, 0,165 mol.L<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich) e as substâncias avaliadas foram o extrato hidroalcoólico de própolis verde em concentrações variando de 0,98 µg/mL a 500 µg/mL e o fluconazol (Cimed) diluído em DMSO na concentração de 0,125 µg/mL a 64 µg/mL.

Para realização do teste, inicialmente, os isolados de *Candida* spp. reativados foram semeados em SDA (Difco) e incubadas a 35°C por 24h. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina (0,85 g/L), e sua densidade foi ajustada conforme a escala 0.5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530nm. Após, o volume do inóculo foi diluído em RPMI 1640 a uma concentração de  $2 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  células por mL.

Para este tipo de teste de susceptibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação em U de 96 poços (Nunclon, Delta) enumeradas de 1 a 12 na horizontal e em ordem alfabética, de A a H, na vertical, onde primariamente 100 µl do meio de cultura RPMI 1640, foram adicionados aos 96 poços, posteriormente na primeira coluna, foram colocados 100 µl da solução mãe do extrato hidroalcoólico de própolis verde bruto. A partir dessa coluna, foram feitas diluições seriadas de 1:2, ou seja, foram retirados 100 µl da coluna atual e adicionados na coluna seguinte, até a décima coluna. Aos poços das diluições foram colocados 100 µl da suspensão dos isolados clínicos.

A décima primeira coluna foi considerada o controle positivo, onde foi adicionada 100 µl da suspensão microbiana padronizada e a décima segunda coluna foi o controle negativo, ou seja, continha apenas 100 µl do meio RPMI, terminado o processo, as placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas antes de ler os resultados para determinar a CIM; 48 horas após a processo, a leitura foi repetida para confirmação dos resultados. A leitura foi realizada analisando os poços de modo visual para 100% de inibição no fluconazol e 50% de inibição para o extrato hidroalcoólico de própolis verde em relação ao controle positivo.

Os testes foram realizados em duplicata e os resultados expressos pela média aritmética das duas repetições. Os pontos de corte dos resultados estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3:** Critérios de interpretação para determinação da susceptibilidade as substâncias avaliadas para os isolados de *Candida* spp., pela técnica de microdiluição em caldo

Substância avaliada	Sensível (S)	Sensibilidade Dose dependente (SDD)	Resistente (R)
Fluconazol	$\leq 8 \mu\text{g}/\text{MI}$	16-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$\geq 64 \mu\text{g}/\text{mL}$
Extrato hidroalcoólico de própolis verde	$\leq 62,5 \mu\text{g}/\text{mL}$	125-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$\geq 500 \mu\text{g}/\text{mL}$

Fonte: CLSI (2009) e PETER (2015).

#### ***4.3.2.1 Determinação da Concentração Fungicida Mínima***

Após a leitura visual da CIM, alíquotas de 10 µL do sobrenadante dos poços nos quais foi observada completa inibição do crescimento fúngico, foram semeadas na superfície de placas de Petri contendo meio ágar SDA, posteriormente as placas foram incubadas a 35 °C e, após 24 horas, foi definida a CFM como a menor concentração do extrato hidroalcoólico de própolis verde e do fluconazol em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's (MEDEIROS, 2016).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

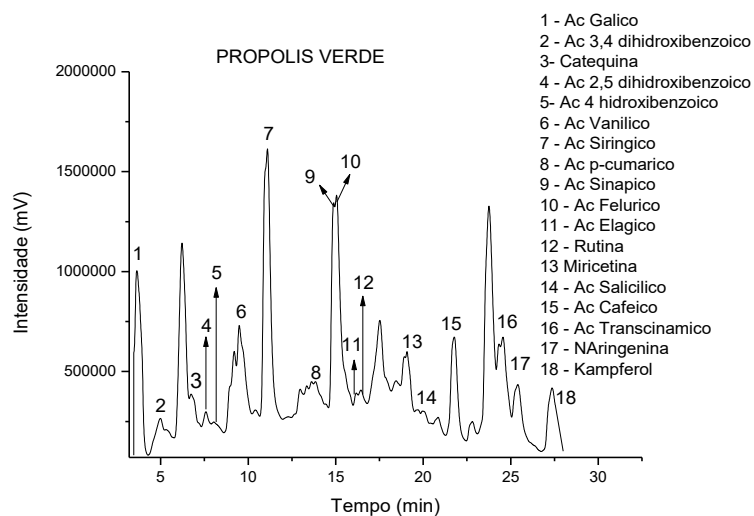
### 5.1 REIDRATAÇÃO DAS LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

Com relação a reidratação das culturas de leveduras do gênero *Candida*, todas as amostras apresentaram crescimento satisfatório para o desenvolvimento dos testes de susceptibilidade. A microscopia das amostras se apresentaram positivas para a morfologia das espécies de *Candida*, devido os isolados clínicos já virem identificados ao nível de espécie não foi realizado provas de identificação. Após crescimento visível, cada espécie de levedura foi testada quanto o perfil de susceptibilidade pelas técnicas de difusão em disco e diluição em caldo, considerando-o como sensível, sensível dose dependente ou resistente.

### 5.2 IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE BRUTA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A análise cromatográfica do extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta detectou a presença e quantificou 18 compostos secundários (**Figura 1**), identificado dentre eles o ácido 2,5 dihidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido p cumárico, ácido salicílico, catequina, kampferol, miricetina e rutina, principais compostos secundários relacionados as atividades biológicas conferidas a própolis.

**Figura 1.** Cromatograma do extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta (80mg/mL)



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

Os principais compostos químicos presentes no extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta, são reconhecidos na literatura por apresentarem significativas propriedades antimicrobianas. O perfil cromatográfico com as concentrações de cada composto químico presente na amostra está apresentado na Tabela 4.

**Tabela 4:** Resultados da CLAE, apresentando os nomes dos compostos químicos, tempo de retenção e concentração dos compostos químicos no extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta (80 mg/mL)

Nome dos compostos químicos	Tempo de retenção	Concentração do extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta (mg/mL)
Ácido 2,5 dihidroxibenzoico	7,58	21,39
Ácido 3,4 diroxibenzoico	5,31	1,81
Ácido 4 Hidroxibenzoico	8,03	2,68
Ácido Cafeico	22,81	1,39
Ácido Elágico	16,18	0,69
Ácido Felúrico	15,05	5,07
Ácido Gálico	3,64	0,56
Ácido p Cumárico	13,62	0,56
Ácido Salicílico	19,62	1,78
Ácido Sinápico	14,88	5,66
Ácido Siríngico	10,41	1,02
Ácido Trans cinâmico	24,33	0,31
Ácido Vanílico	9,49	1,35
Catequina	6,74	2,97
Kampferol	27,37	2,46
Miricetina	19,07	3,41
Naringenina	25,41	1,98
Rutina	16,44	4,32

**Fonte:** Elaborado pela autora com dados extraídos dos resultados da pesquisa (2017)

O ácido 2,5 dihidroxibenzoico (21,39mg/mL), ácido sinápico (5,66 mg/mL) e o ácido felúrico (5,07mg/mL) que foram os compostos mais abundantes detectados, são largamente difundidos como sendo compostos responsáveis por combater radicais livre, apresentando alto potencial antioxidante, maior até do que a alfa-tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), e o betacaroteno (VIEIRA, 2016).

A rutina, composto também detectado no extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta, na concentração de (4,32mg/mL) é normalmente utilizada para o tratamento de patologias que se caracterizam por hemorragia e excessiva fragilidade capilar, no entanto Oliveira et al. (2016), identificou que a quercetina e rutina são potenciais agentes antifúngicos, podendo trabalhar em combinação com antifúngicos convencionais, como fluconazol e anfotericina B, reduzindo suas doses, diminuindo assim os efeitos colaterais provocados por esses fármacos.

Moreira (2010), em seu trabalho, isolou a miricetina dos extratos etanólicos de *Melaleuca alternifolia* e *Plinia cauliflora*, identificando um significativo potencial antifúngico frente a cepas de *Candida albicans*.

Costa et al. (2013), identificou que os derivados das catequinas constituem os principais compostos encontrados no extrato de chá verde dos Açores (108 g/kg) sendo este um potente agente fungistático natural, de baixo custo, frente a cepas de *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*. Os flavonoides miricetina e catequina foram detectados na amostra na concentração de 3,41 mg/mL e 2,97 mg/mL, respectivamente.

O ácido salicílico também identificado no extrato, na concentração de (1,78 mg/mL) possui ampla atividade antimicrobiana, sendo utilizado em associação com medicamentos como o tolnaftato, no tratamento de micoses cutâneas, como as lesões hiperqueratóticas causadas pela Candidíase ungueal (DELUCIA, 2014).

Um dos compostos secundários mais bem definidos em relação atividade antifúngica da própolis é o ácido cafeico, que nesta amostra apresentou uma concentração de 1,39 mg/mL. Araújo (2017), em seu trabalho, obteve-se 16 ésteres do ácido cafeico, com rendimentos variando entre 11,82-93,06%, sendo 6 derivados inéditos na literatura. Seis ésteres apresentaram atividade antifúngica, os ésteres ME7 e ME13 demonstraram as melhores CIM (128 e 256 µg/mL, respectivamente) frente a isolados de *Candida* spp.

Nunes et al. (2012), ao realizar a padronização de uma amostra de extrato etanólico de própolis verde, também identificou a presença e quantificou o ácido cafeico, só que em uma concentração menor (0,87 mg/mL) do que a determinada por este estudo, demonstrando que este apresenta um maior potencial antimicrobiano, do que o avaliado.

Queiroz (2010), em trabalho semelhante a este, também identificou a presença do ácido p-cumarico (0,75 mg/mL), kaempferol (1,43 mg/mL), ácido ferúlico (1,12 mg/mL) e ácido cafeico (0,44 mg/mL) no extrato etanólico de própolis verde. As concentrações destas substâncias no extrato em questão são maiores, exceto a do ácido p-cumárico (0,56 mg/mL), no entanto, apenas a sua presença já garante ao extrato hidroalcoólico de própolis verde uma potencial atividade farmacológica.

Alguns picos não puderam ser identificados no extrato devido à falta de padronização de alguns compostos químicos, a exemplo o ácido 3-5-diprenil-4-hidroxiâmico (Artepelin C) e a quercetina, que por apresentar um tempo de retenção muito próximo ao do ácido cafeico pode ter sido diluído com o mesmo, formando apenas um pico.

Estes dados associados ao do presente estudo mostram uma congruência de resultados e contribuem para o conhecimento da atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico de própolis verde, favorecendo a busca de novos agentes terapêuticos.

### 5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE E DO FLUCONAZOL PELA METODOLOGIA DE DIFUSÃO EM DISCO

No que se refere aos resultados para o teste de difusão em disco, o extrato hidroalcoólico de própolis verde, foi testado nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL, onde pode-se constatar que todos os isolados testados – *C. tropicalis* INCQS 40042 (ATCC 13803), *C. fumata* INCQS 40135 (ATCC 62894), *C. albicans* INCQS 40178 (ATCC 60193), *C. orthopsilosis* INCQS 40304 (ATCC 96139) *C. parapsilosis* INCQS 40305 (ATCC 96144) e *C. metapsilosis* INCQS 40329 (ATCC 96143) – frente ao disco de concentração de 500 µg/mL formaram um tamanho de halo compatível com sensibilidade dose dependente (9 mm) (Tabela 5).

Antimicrobianos que apresentam valores considerados como intermediário ou dose dependente são aqueles em que a CIM se aproxima de níveis sanguíneos atingíveis, pois de modo geral promovem eficácia clínica nos sítios corpóreos, onde as drogas se concentram fisiologicamente ou por outro lado, pode-se dizer que estes exibem propriedades de destruição de microrganismos em função da concentração, ou seja, dependem das concentrações alcançadas no sítio infeccioso ou se o microrganismo é sensível à terapêutica de infecções sistêmicas no caso de altas doses do antifúngico (CLSI, 2009).

O extrato hidroalcoólico de própolis verde teve sua atividade antifúngica mais significativa na concentração de 500 mg/mL, apresentando em sua maioria um padrão de sensibilidade dose dependente, o que significa que outras doses devam ser testadas para uma melhor detecção. As demais concentrações dos discos (250, 125 e 62,5 µg/mL) também produziram halos, no entanto, estes foram considerados como resistentes.

**Tabela 5:** Registro dos tamanhos de halos formados pelas espécies ensaiadas de acordo com as concentrações inibitórias mínimas frente ao extrato hidroalcoólico de própolis verde

Espécies ensaiadas	Tamanho do halo / CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	Extrato hidroalcoólico de própolis verde			
	500 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$	61,5 $\mu\text{g/mL}$
<i>C. tropicalis</i> (INCQS 40042)	9 mm	5 mm	4,9mm	4,9 mm
<i>C. fumata</i> (INCQS 40135)	9 mm	5 mm	0 mm	0 mm
<i>C. albicans</i> (INCQS 40178)	9 mm	4,9 mm	0 mm	0 mm
<i>C. orthopsilosis</i> (INCQS 40304)	9 mm	4,9 mm	0 mm	0 mm
<i>C. parapsilosis</i> (INCQS 40305)	9 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>C. metapsilosis</i> (INCQS 40329)	9 mm	4 mm	0 mm	0 mm

**Fonte:** Elaborado pela autora com dados extraídos dos resultados da pesquisa (2017)

Com relação a susceptibilidade do fluconazol pelo teste de difusão em disco, dos seis isolados clínicos testados, apenas a espécie de *C. tropicalis* apresentou tamanho de halo compatível com sensibilidade (32mm) para o disco de concentração de 64  $\mu\text{g/mL}$ , as demais espécies – *C. fumata* INCQS 40135 (ATCC 62894), *C. albicans* INCQS 40178 (ATCC 60193), *C. orthopsilosis* INCQS 40304 (ATCC 96139), *C. parapsilosis* INCQS 40305 (ATCC 96144) e *C. metapsilosis* INCQS 40329 (ATCC 96143) – formaram halos variando de 0 mm a 14 mm, classificando as espécies como resistentes para todas as concentrações de discos testadas (64, 32, 16 e 8  $\mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6:** Registro dos tamanhos de halos formados pelas espécies ensaiadas de acordo com as concentrações inibitórias mínimas frente ao fluconazol

Espécies ensaiadas	Tamanho do halo / CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	Fluconazol			
	64 $\mu\text{g/mL}$	32 $\mu\text{g/mL}$	16 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/mL}$
<i>C. tropicalis</i> (INCQS 40042)	32 mm	10 mm	0mm	0 mm
<i>C. fumata</i> (INCQS 40135)	10 mm	9 mm	0 mm	0 mm
<i>C. albicans</i> (INCQS 40178)	14 mm	14 mm	0 mm	0 mm
<i>C. orthopsilosis</i> (INCQS 40304)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>C. parapsilosis</i> (INCQS 40305)	14 mm	14 mm	0 mm	0 mm
<i>C. metapsilosis</i> (INCQS 40329)	11 mm	8 mm	0 mm	0 mm

**Fonte:** Elaborado pela autora com dados extraídos dos resultados da pesquisa (2017)

Não houve crescimento de nenhum halo nas amostras testadas frente ao controle negativo, o álcool 70%, confirmando que o mesmo pode ser utilizado para extração de compostos secundários de produtos naturais, pois não interfere na detecção de sua atividade antimicrobiana.

De acordo Alencar (2013), em 2005 foi estabelecido que a espécie de *C. parapsilosis* é, na verdade, um complexo de três espécies: *C. metapsilosis* (*C. parapsilosis* grupo III), *C. orthopsilosis* (*C. parapsilosis* grupo II) e *C. parapsilosis stricto sensu*, espécies distintas que apresentam diferentes atividades antifúngicas *in vitro* e mecanismos de resistência fúngica. Este complexo de leveduras apresenta grande capacidade de produzir biofilmes na superfície de cateteres e frequentemente coloniza a pele e as mãos de profissionais da área da saúde, podendo ser importantes agentes de infecções nosocomiais, estas espécies de modo geral são diferenciadas por testes de biologia molecular sendo a *C. parapsilosis stricto sensu* a mais prevalente seguida de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. (PEMÁN, 2010; XIAO et al., 2015).

Desde os anos 80, a espécie de *Candida parapsilosis* vem sendo descrita como um patógeno emergente, onde se apresenta como o segundo principal microrganismo capaz de provocar infecção hospitalar sendo responsável por 20% a 30% das fungemias, no Brasil e em outros Países da América Latina (GONÇALVES et al., 2010).

Vale ressaltar que as espécies de *C. fumata* INCQS 40135 (ATCC 62894), *C. albicans* INCQS 40178 (ATCC 60193), *C. orthopsilosis* INCQS 40304 (ATCC 96139), *C. parapsilosis* INCQS 40305 (ATCC 96144) e *C. metapsilosis* INCQS 40329 (ATCC 96143) apresentaram sensibilidade intermediária ao extrato hidroalcoólico de própolis verde (500µg/mL) e resistência ao fluconazol (64µg/mL). Já a espécie de *C. tropicalis* INCQS 40042 (ATCC 13803), foi sensível ao fluconazol (64µg/mL) e sensível dose dependente ao extrato hidroalcoólico de própolis verde, mesmo em sua maior concentração (500µg/mL).

Em um estudo experimental para avaliar o efeito da própolis verde como tratamento da estomatite dentária associada a *Candida albicans*, pode-se constatar que esta tem um efeito semelhante ao miconazol sendo uma alternativa natural para a terapêutica desta patologia (CAPISTRANO et al., 2013). Resultados semelhantes também foram descritos por Dalben-Dota et al. (2010), no entanto, sobre amostras de *Candida* não *albicans* de pacientes com candidíase vulvovaginal.

Segundo Capoci et al. (2015), em um de seus estudos sobre a ação antifúngica de extratos de própolis em infecções vaginais, demonstra que independente das condições clínicas

do paciente e das espécies de fungos isolados, a própolis apresenta uma condição antifúngica comparável aos compostos antifúngicos clássicos.

Almeida et al. (2012) ao avaliar a ação antifúngica de tinturas de própolis *Apis mellifera* e romã *Punica granatum* sobre *Candida albicans* (ATCC 76618), *Candida krusei* (ATCC 6538) e *Candida tropicalis* (ATCC 13803), identificou que a tintura de própolis não apresentou atividade sobre *C. albicans* (CIM>200 mg/mL) e apresentou CIM nas concentrações 200 mg/mL frente *C. krusei* e *C. tropicalis*; estes dados demonstram que a concentração utilizada no presente teste pode não ter sido a mais apropriada para determinar a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico de própolis verde bruta pela técnica de difusão em disco.

De acordo com os dados referentes a técnica de difusão em disco, o extrato hidroalcoólico de própolis verde apresentou ação antifúngica, sendo possível constatar que todos os isolados apresentaram halo de inibição, todavia quando estes halos são comparados com os halos obtidos pelo antifúngico fluconazol nesta pesquisa e em pesquisas anteriores, este não tem tanto efeito, pois, de acordo com Mattigatti et al. (2012), Portilho et al. (2013) e Pedroso et al. (2014), a técnica de difusão em disco não é altamente sensível para a detecção das atividades antimicrobianas de extratos naturais, estes ainda explanam que o fármaco de escolha para o tratamento de Candidíase, continua sendo o fluconazol.

No entanto, embora a atividade apresentada no presente trabalho tenha se mostrado discreta, é importante ressaltar que associações da própolis com antimicrobianos convencionais ou mesmo contra algumas cepas resistentes têm mostrado bons resultados inibitórios, Pippi (2014), constatou este fato ao testar em conjunto fluconazol e extrato de própolis verde frente cepas de *Candida* spp. resistentes. Estes dados corroboram com os dados desta pesquisa, demonstrando que o extrato hidroalcoólico de própolis verde em questão pode possuir efeito sinérgico quando combinado com antifúngicos convencionais para o tratamento de microrganismos resistentes.

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE E DO FLUCONAZOL PELA METODOLOGIA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Com relação aos resultados para determinar a susceptibilidade dos isolados frente ao extrato hidroalcoólico de própolis verde pela metodologia de microdiluição em caldo, 83,3% (n=5) dos isolados, mostraram ser sensíveis, as amostras pertencentes ao Complexo *Parapsilosis* - *C. parapsilosis* INCQS 40305 (ATCC 96144), *C. orthopsilosis* INCQS 40304

(ATCC 96139) e *C. metapsilosis* INCQS 40329 (ATCC 96143) - a espécie de *C. tropicalis* INCQS 40042 (ATCC 13803) com uma CIM e CFM de 15,63 µg/mL e a espécie de *C. fumata* INCQS 40135 (ATCC 62894), com uma CIM e CFM de 62,5 µg/mL; A espécie de *C. albicans* INCQS 40178 (ATCC 60193), apresentou-se como sensível em dose dependente com uma CIM e CFM de 125 µg/mL.

Peter (2015), ao avaliar a atividade antifúngica de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) frente a microrganismos infecciosos de interesse em Medicina Veterinária e Humana, constatou que o extrato de própolis verde apresentou eficácia significativa frente aos fungos *Candida* spp., com valores de CIM e CFM entre 43,4 µg/mL. Resultados semelhantes foram alcançados por Agüero et al. (2011), onde obtiveram 94,4% do efeito fungistático de uma amostra de própolis de abelhas *Apis mellifera* frente à *Candida albicans*.

Reidel (2014), avaliou o potencial antifúngico e antibiofilme de diferentes tipos de própolis do Rio Grande do Sul (RS) e pode constatar que houve um baixo espectro de ação dos extratos e fração de própolis verde, frente aos fungos avaliados, sendo que apenas a cepa CK02 de *Candida krusei* foi inibida pelo extrato etanólico e pela fração diclorometano, com valor de CIM ≤ 250 µg/mL.

Os dados apresentados pelos autores, corroboram com os obtidos nesta pesquisa, pois todas as leveduras do gênero *Candida* foram inibidas significativamente pelo extrato hidroalcoólico de própolis verde, com um valor de CIM ≤ 125 µg/mL, corroboram ainda com a presença dos compostos fenólicos, ácido 2,5 dihidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido p cumárico, ácido salicílico, catequina, kampferol, miricetina e rutina.

Segundo Castro et al. (2013), a própolis tem efeito direto tanto na morfogênese quanto na virulência de *Candida* spp. Os autores demonstraram que a própolis inibe os três tipos morfológicos do fungo, induzindo a morte celular via metacaspase e sinalização de RAS, reduzindo a formação de unidades formadoras de colônia, em especial a de biofilme.

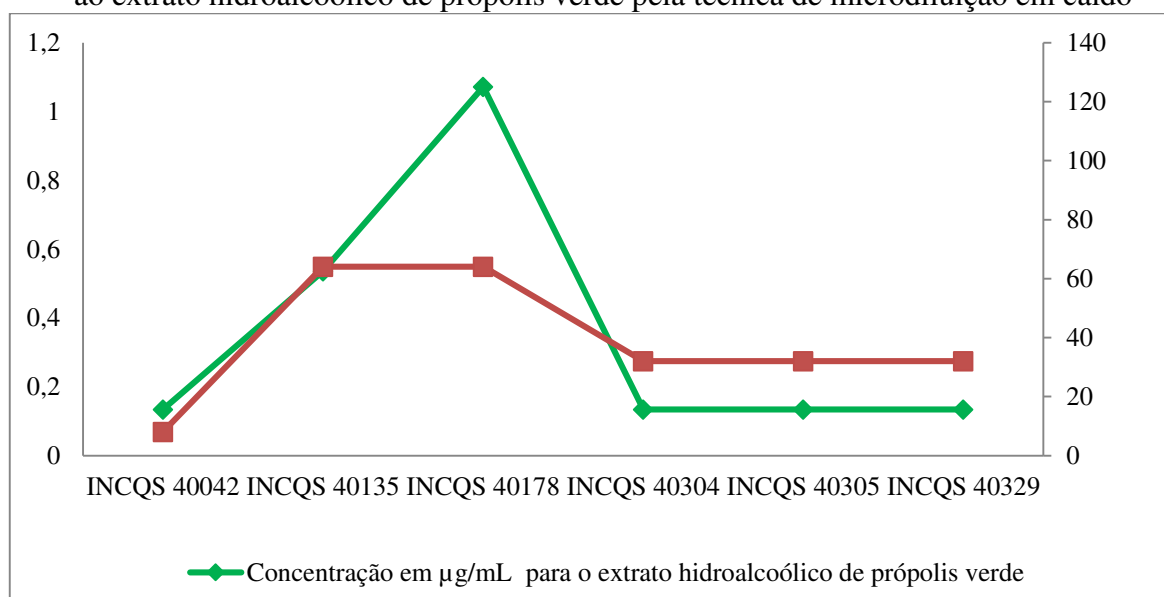
Em estudo sobre a atividade antifúngica de seis extratos comerciais de própolis contra *Candida* spp., isoladas da cavidade oral de usuários de próteses dentárias, identificou-se em ambas as amostras a CIM para *C. albicans* variou de 197 µg/mL a 441 µg/mL, concluindo que todos os extratos de própolis apesar das diferenças significativas na concentração de polifenóis apresentam presentes atividades antifúngicas, capazes de inibir o desenvolvimento de *Candida* spp. (HERRERA et al., 2010). Arslan et al. (2011) também comprovaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de própolis sobre *Candida albicans*, no entanto, o extrato apresentou uma CIM mais significativa de 0.075 µg/mL e CFM de 0.150 µg/mL.



Com relação ao fluconazol, apenas um isolado apresentou sensibilidade, com uma CIM e CFM de 8  $\mu\text{g/mL}$ , que foi a espécie de *C. tropicalis* INCQS 40042 (ATCC 13803), os isolados das espécies do Complexo *Parapsilosis* - *C. parapsilosis* INCQS 40305 (ATCC 96144), *C. orthopsilosis* INCQS 40304 (ATCC 96139) e *C. metapsilosis* INCQS 40329 (ATCC 96143), apresentaram sensibilidade intermediária com uma CIM e CFM média de 32  $\mu\text{g/mL}$ . Já as espécies de *C. fumata* INCQS 40135 (ATCC 62894) e *C. albicans* INCQS 40178 (ATCC 60193) apresentaram resistência até a concentração de 64  $\mu\text{g/mL}$ , não podendo ser observadas CFMs para estas amostras.

Não houve crescimento em nenhum dos poços utilizados como controle negativo (Poço 12), que continha apenas o meio de cultura RPMI 1640, determinando a confiabilidade da técnica. Os resultados comparativos das CIMs e CFMs frente as duas substâncias testadas pela técnica de microdiluição em caldo, estão dispostos na Figura 2.

**Figura 2.** Comparação entre as CIMs e CFMs das espécies ensaiadas frente ao fluconazol e ao extrato hidroalcoólico de própolis verde pela técnica de microdiluição em caldo



**Fonte:** Elaborado pela autora com base nos dados da pesquisa (2017)

Castro et al. (2016) ao avaliarem a ação antifúngica de imidazólicos (cetoconazol, clotrimazol e miconazol) e triazólicos (fluconazol, itraconazol e voriconazol) frente a cepas de *Candida*, detectou uma CIM semelhante, variando de 0,125  $\mu\text{g/mL}$  a 8  $\mu\text{g/mL}$ . Pedroso et al. (2014), em seu estudo, também detectou uma CIM de 0,125  $\mu\text{g/mL}$  a 32  $\mu\text{g/mL}$  para o fluconazol, o que corrobora em partes com o presente trabalho, pois a CIM média do trabalho foi de 8  $\mu\text{g/mL}$  a 64  $\mu\text{g/mL}$ , estando dentro dos padrões de susceptibilidade.

Nunes et al. (2011) determinaram a sensibilidade de 81 isolados de *Candida*, onde apenas 3,7% das amostras foram resistentes ao fluconazol. Os valores de resistência apresentados, nesse estudo, são maiores do que quando comparados com o de outros autores, o que indica uma alta frequência e, assim, levanta a necessidade de adoção de medidas para se evitar o uso indiscriminado de antifúngicos.

Pemán (2010), em estudo multicêntrico realizado na Espanha, diagnosticou mais de 1.200 episódios de candidemia em 43 hospitais, onde a segunda etiologia mais comumente encontrada foi pela *C. parapsilosis* (30%), onde constatou que entre 2% e 8% destas amostras eram resistentes ao fluconazol.

## 5.5 COMPARAÇÃO ENTRE AS DUAS METODOLOGIAS EMPREGADAS NO PRESENTE TRABALHO, A DE DIFUSÃO EM DISCO E DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO FRENTE AO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE E FLUCONAZOL

Promovendo uma comparação entre as duas metodologias em questão para detecção da atividade antifúngica das substâncias ensaiadas, pode-se constatar diferenças entre os dois testes, onde apenas as espécies de *C. fumata* INCQS 40135 (ATCC 62894) e *C. albicans* INCQS 40178 (ATCC 60193) se comportaram de maneira semelhante frente ao extrato hidroalcoólico de própolis verde e ao fluconazol nos testes de difusão em disco e microdiluição em caldo, ambas sendo sensíveis dose-dependente frente ao extrato hidroalcoólico de própolis verde e resistente frente ao fluconazol (Tabela 5).

Com relação aos dois testes, frente ao extrato hidroalcoólico de própolis verde, apenas *C. fumata* INCQS 40135 (ATCC 62894) e *C. albicans* INCQS 40178 (ATCC 60193) obtiveram resultados semelhantes quanto ao perfil de susceptibilidade, estas apresentaram-se como sensíveis dose dependente, no entanto, estas diferem quanto a concentração utilizada para chegar a este resultado, *C. fumata* INCQS 40135 (ATCC 62894) e *C. albicans* INCQS 40178 (ATCC 60193) que no teste de difusão em disco teve este resultado frente ao disco de concentração de 500 µg/mL e no de teste de microdiluição frente a concentração de 62,5 µg/mL e 125 µg/mL o que demonstra que o teste de microdiluição em caldo imprime uma melhor ação da atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico de própolis verde.

As amostras de Complexo *parapsilosis* – *C. parapsilosis* INCQS 40305 (ATCC 96144), *C. orthopsilosis* INCQS 40304 (ATCC 96139) e *C. metapsilosis* INCQS 40329 (ATCC 96143) e a espécie de *C. tropicalis* INCQS 40042 (ATCC 13803) foram sensíveis ao extrato

hidroalcoólico de própolis verde no teste de microdiluição e sensível dose-dependente no de difusão em disco. As diferenças existentes frente ao extrato hidroalcoólico de própolis verde podem ter ocorrido devido uma maior distribuição do mesmo no teste de microdiluição (Tabela 7).

Com relação ao fluconazol, três isolados apresentaram comportamento semelhante diante dos dois testes, as amostras de *C. tropicalis* INCQS 40042 (ATCC 13803), que se apresentou como sensível até a concentração de 64 µg/mL em ambos os testes e os isolados de *C. fumata* INCQS 40135 (ATCC 62894) e *C. albicans* INCQS 40178 (ATCC 60193) que se apresentaram como resistente. As demais amostras apresentaram resultados diferentes nos dois testes, onde vale ressaltar que as espécies de Complexo *parapsilosis* que foram resistentes ao fluconazol (64 µg/mL) no teste de difusão em disco, foram sensíveis dose dependente no de microdiluição, isso deve-se ao fato, de uma melhor incorporação da substância nos testes de diluição.

**Tabela 7.** Padrões de susceptibilidade frente as substâncias testadas, de acordo com as duas metodologias desenvolvidas no trabalho

Espécies ensaiadas	Testes de susceptibilidade antifúngica			
	Extrato hidroalcoólico de própolis verde		Fluconazol	
	TDD	TMC	TDD	TMC
INCQS 40042 <i>C. tropicalis</i>	SDD	S	S	S
INCQS 40135 <i>C. fumata</i>	SDD	SDD	R	R
INCQS 40178 <i>C. albicans</i>	SDD	SDD	R	R
INCQS 40304 <i>C. orthopsilosis</i>	SDD	S	R	SDD
INCQS 40305 <i>C. parapsilosis</i>	SDD	S	R	SDD
INCQS 40329 <i>C. metapsilosis</i>	SDD	S	R	SDD

**TDD:** Teste de Difusão em Disco; **TMC:** Tesde de Microdiluição em Caldo; **S** – Sensível; **SDD-** Sensível dose dependente; **R** - Resistente

**Fonte:** Elaborado pela autora com base nos dados da pesquisa (2017)

O teste de difusão em disco ainda é usado na rotina laboratorial, devido aos baixos custos empregados na técnica, todavia, muitas são as variáveis que podem provocar erros nesta técnica como o tipo e pH do meio de cultura a ser utilizado, profundidade do ágar, densidade do inóculo, pré-difusão e pré-incubação, estas variáveis podem ter interferido nos resultados deste trabalho (VASCONCELOS-JÚNIOR et al., 2012).

Pedroso et al. (2014) compararam as técnicas de disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo na determinação da sensibilidade *in vitro* de isolados de *Candida* spp. a antifúngicos convencionais e constataram que a técnica de disco-difusão apresentou boa concordância com a microdiluição, especialmente, em relação ao fluconazol, representando, assim, um recurso importante para os laboratórios reportarem os resultados dos testes de sensibilidade dos isolados dessas espécies ao fluconazol. O que corrobora com os dados da presente pesquisa, pois, apesar das diferenças envolvidas, as leveduras do gênero *Candida* se comportaram de modo semelhante, sendo em sua maioria sensíveis, mesmo que em dose dependente ao fluconazol. Isto também pode ser observado em relação ao extrato hidroalcoólico de própolis verde, já que as diferenças com relação a atividade antifúngica foram mínimas, no entanto, os dados confirmam que a melhor técnica para a determinação da atividade antifúngica de extratos naturais é a de microdiluição em caldo, uma vez que há uma melhor difusão do mesmo em meio líquido.

Segundo Vasconcelos-Júnior et al. (2012), o método de microdiluição é melhor empregado para extratos naturais devido um maior campo de penetração para os compostos secundários, a exemplo o ácido cinâmico, composto presente nessa própolis, que tem relação direta com a ação fungicida, pois, segundo Guzman (2014), este tem a capacidade de inibir a filamentação e o dimorfismo de *Candida albicans* por alterar a hidrofobicidade da superfície celular fúngica, bem como a síntese da  $\beta$ -1,3-glucano sintase, induzindo uma maior interação com os receptores específicos na superfície de fagócitos.

## 6 CONCLUSÕES

Na conclusão desse estudo, é possível afirmar que o extrato hidroalcoólico de própolis verde apresentou 18 compostos fenólicos, dentre eles o ácido 2,5 dihidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido p cumárico, ácido salicílico, catequina, kampferol, miricetina e rutina, principais compostos secundários relacionados as atividades biológicas conferidas a própolis.

Em comunhão com este resultado, foi possível determinar que extrato em questão apresentou atividade antifúngica frente aos microrganismos avaliados, visto que o mesmo demonstrou sensibilidade mesmo sobre cepas resistentes ao fluconazol, confirmando que o mesmo apresenta potencial para as atividades farmacológicas ora apresentadas e pode ser utilizado como terapia alternativa para o tratamento da candidíase.

Com relação aos padrões de determinação da atividade antifúngica, diante das duas metodologias elaboradas pelo CLSI, ambas mostraram ser eficazes para estabelecer a atividade antimicrobiana, no entanto, a técnica de difusão em disco consiste na mais utilizada, uma vez que esta determina a atividade de medicamentos convencionais, como observou-se com o fluconazol.

Pode-se afirmar que a técnica da atividade antifúngica possui muitas variáveis quando se trata de determinar a atividade antimicrobiana de extratos naturais com discos produzidos manualmente, como os do extrato hidroalcoólico de própolis verde. Entretanto, pode-se sugerir ainda a realização de estudos utilizando outras concentrações de extrato, os quais devem ser desenvolvidos para a confirmação da eficácia desta técnica aplicada frente as espécies de *Candida spp.*

A metodologia de microdiluição em caldo, obteve resultados satisfatórios para ambas as substâncias avaliadas, no entanto, ela pode ser identificada como a melhor técnica para determinar a CIM de extratos naturais, uma vez que a mesma apresenta resultados quantitativos e promove uma melhor incorporação do extrato ao meio de cultura, gerando, dessa forma, uma distribuição significativa dos compostos secundários do extrato que são responsáveis por sua atividade.

A detecção da atividade antifúngica do extrato de própolis verde, produzida na Paraíba, compreende um avanço importante no nosso arsenal terapêutico. Todavia, ainda se faz necessário a realização de estudos adicionais, envolvendo testes *in vitro*, com maiores quantidades de microrganismos, bem como ensaios pré-clínicos e clínicos, capazes de determinar as doses corretas a serem administradas, para que seja plenamente esclarecido o real

efeito desta própolis, além de pesquisas sobre o seu perfil químico, destacando como seus principais constituintes químicos, responsáveis pela atividade antifúngica, agem no mecanismo de morte celular dos fungos.

## REFERÊNCIAS

- ABEEG, M. A. **Estresse oxidativo em espécies de *Candida* com relevância clínica**. 2010. 156f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- ACEVEDO, Y. W. A.; TORIBIO, C. P. G. **Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial extraído de la raíz de *Cúrcuma longa* L. (cúrcuma) en *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli***. 2017. 37f. Trabalho de Conclusão de curso (Graduação) - Curso de Bacharelado em Farmácia e Bioquímica – Universidad Nacional de Trujillo, Perú. 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Instrução Normativa – Nº- 11, de 29 de setembro de 2016. **Lista de medicamentos isentos de prescrição**. 2016. Disponível em: <http://www.in.gov.br/autenticidade.html> Acesso em: 01 jul. 2017.
- AGUERO, M. B.; SVETAZ, L.; SÁNCHEZ, M.; LUNA, L.; LIMA, B.; LÓPEZ, M. L.; ZACCHINO, S.; PALERMO, S. J.; WUNDERLIN, D.; FERESIN, G. E.; TAPI, A. Argentine na Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae) HPLC–MS and GC–MS characterization and antifungal activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1970–1978, 2011.
- ALENCAR, D. S. O. **Caracterização de *Candida* spp. isoladas de hemocultivo e aspectos clínicos de candidemia**. 2013. 81f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.
- ALMEIDA, L. F. D.; CAVALCANTI, Y. W.; LIRA-JÚNIOR, R.; LIMA, E. O.; CASTRO, R. D. Efeito antifúngico de tinturas de própolis e romã sobre espécies de *Candida*. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 26, n. 2, p. 99-106, 2012.
- ALMEIDA, M. B. **Prospecção tecnológica de óleos essenciais de *Schinus terebinthifolius* e desenvolvimento de um creme vaginal à base de *Ocimum basilicum* para tratamento de candidíase**. 2013. 102f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.
- ALMEIDA, N. A. **Atividade antifúngica de extratos da própolis contra o fungo *Botrytis* sp. isolados de morango**. 2014. 61f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Bacharelado em Tecnologia em Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná. 2014.
- ALVES, M. B.; SILVA, I. M. O.; SANTOS, C. I.; FRANÇA, Y. R.; OLIVEIRA, S. K. R.; MONTEIRO, S. G.; MONTEIRO, G. A. Prevalência de *Candida* spp. em amostras de secreção vaginal e sua relação com fatores associados à vulvovaginite. **Revista de Investigação Biomédica**, v. 1, p. 53-63, 2015.
- AL-WAILI, N.; AL-GHAMDI, A.; ANSARI, M. J.; AL-ATTAL, Y.; SALOM, K. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* and *Candida Albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 9, p. 793-800, 2012.

ANDRADE, J. G.; FREITAS, H. J.; CASTILHO, M. S. Estudos de QSAR 2D baseados em descritores topológicos e fragmentos moleculares para uma série de derivados azólicos ativos contra *Candida albicans*. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 466-472, 2012.

ARAÚJO, M. J.; MATTAR, N. S.; REIS, A. S.; SERRA, I. C.; FIALHO, E. M.; ASSUNÇÃO, A. K.; DUTRA, R. P.; NOGUEIRA, A. M.; LIBÉRIO, S. A.; GUERRA, R. N.; LOPES, A. S.; RIBEIRO, M. N.; NASCIMENTO, F. R. Pharmacognostic and acute toxicological evaluation of *Scaptotrigona aff. postica* própolis extract in pre-clinical assays. **Natural Products Research**, v. 25, n 11, p.1037-1064, 2011.

ARAÚJO, M. O. **Preparação de derivados do ácido cafeico e avaliação das suas atividades antimicrobianas**. 2017. 178f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

ARDILA, C. M. M.; ALZATE, J. V.; GUZMÁN, I. C. Z. Eficacia *in vitro* de la moxifloxacina frente a *Candida albicans* en enfermedad periodontal. **Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral**, v. 26, n. 1, p. 45-50, 2014.

ARNOLD, H. M.; MICEK, S.T.; SHORR, A. F.; ZILBERBERG, M. D.; LABELLE, A. J.; KOTHARI, S.; KOLLEF, M. H. Hospital resource utilization and costs of inappropriate treatment of candidemia. **Pharmacotherapy**, v. 30, p. 361-368, 2010.

ARSLAN, S.; OZBILGE, H.; KAYA, E. G.; OZGUR, E. R. In vitro antimicrobial activity of propolis, BioPure MTAD, sodium hypochlorite, and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **Saudi Medical Journal**, v. 32, n. 5, p. 479-483, 2011.

BACHIEGA, T.F.; ORSATTI, C. L.; PAGLIARONE, A. C.; SFORCIN, J. M. The effects of propolis and its isolated compounds on cytokine production by murine macrophages. **Phytotherapy Research**, p. 35-46, 2012.

BANKOVA, V.; KHISMATULLIN, R.; KHISMATULLIN, M.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B.; LEGOTKINA, G.; GAVRILOVA, N. Chemical composition and antibacterial activity of propolis. **Apimondia**, s/p., 2013.

BANKOVA, V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity. A review. **Chemistry Central Journal**, v. 8, p. 28-35, 2014.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase, **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARUD, H. S.; ARAÚJO-JÚNIOR, A. M.; SASKA, S.; MESTIERI, L. B.; CAMPOS, J. A. D. B.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, N. U.; NASCIMENTO, A. P.; MIGUEL, F. G.; VAZ, M. M. O. L. L.; BORIZON, E. A.; OLIVEIRA, F. M.; GASPAR, A. M. M.; RIBEIRO, S. J. L.; BERRETTA, A. A. Antimicrobial Brazilian Propolis (EPP-AF) Containing Biocellulose Membranes as Promising Biomaterial for Skin Wound Healing. **Evidence based complementary and alternative medicine**, v. 2013, p.23-34, 2013.



BASSO-JÚNIOR, L. R.; GAST, C. E.; MAO, Y.; WONG, B. Fluconazole transport into *Candida albicans* secretory vesicles by the membrane proteins Cdr1p, Cdr2p, and Mdr1p. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 6, p. 960-970, 2010.

BERRETTA, A. A.; CASTRO, P. A. C.; CAVALHEIRO, A. H.; FORTES, V. S.; BOM, V. P.; NASCIMENTO, A. P.; OLIVEIRA, F. M.; PEDRAZZI, V.; RAMALHO, L. N. Z.; GOLDMAN, G. H. Evaluation of mucoadhesive gels with propolis (EPP-AF) in preclinical treatment of candidiasis vulvovaginal infection. **Evidence-based complementar and Alternative Medicine**, v. 13, p. 1-18, 2013.

BISPO-JÚNIOR, W.; MIRANDA, E. O.; ALVINO, V.; ARAUJO, B.; SILVA, D. W.; PORFIRIO, Z. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 03-10, 2012.

BITTENCOURT, F. O.; PADILHA, F. F.; SIQUEIRA, A. L.; DANTAS, C. G.; MENDONÇA, L. S.; ARAÚJO, Y. L. F. M.; ARAÚJO, E. D.; CARDOSO, J. C. Avaliação da atividade antifúngica de formulações semi-sólidas contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 10, n. 10, p. 01-11, 2014.

BOATTO, H. F.; GIRÃO, M. J. B. C.; MORAES, M. S.; FRANCISCO, E. C.; GOMPERTZ, O. F. O papel dos parceiros sexuais sintomáticos e assintomáticos nas vulvovaginites recorrentes. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 37, n. 7, p. 314-318, 2015.

BONVEHÍ, J. S.; GUTIÉRREZ, A. L. The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1351-1358, 2012.

BOROWSKI, R. G. V. **Avaliação da atividade antibiofilme de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* (Solanaceae)**. 2015. 100f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

BRAGA, T. S. F. **Extrato padronizado de própolis (EPP-AF®) aumenta a sobrevida em camundongos imunossuprimidos com sepse induzida por *Candida Albicans***. 2017. 105f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

BÚFALO, M. C.; SFORCIN, J. M. The modulatory effects of caffeic acid on human monocytes and its involvement in propolis action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 740-745, 2015.

CABRERA M. N.; LÓPEZ-CEPERO, E. E. Infección fúngica en el paciente crítico: papel de micafungina. **Revista Española de quimioterapia**, v. 25, n. 1, p. 4-9, 2012.

CAFINI, F.; REY, C. G.; BAS, P.; GOMEZ-LUS, M. L.; SÁNCHEZ, I.; VÁZQUEZ, S.; PRIETO, J. Discordancia en los resultados de sensibilidad mediante método de difusión en agar de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística tras pre incubación anaerobia y su potencial relevancia clínica. **Revista Española de quimioterapia**, v. 25, n. 4, p. 269-273, 2012.

CAMBUIM, I. I. F.; MACÊDO, D. P. C.; DELGADO, M.; LIMA, K. M.; MENDES, G. P.; MOTTA, C. M. S.; LIMA, D. M. M.; FERNANDES, M. J.; MAGALHÃES, O. M. C.; QUEIROZ, L. A.; NEVES, R. P. Avaliação clínica e micológica de onicomicose em pacientes brasileiros com HIV/AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 40-42, 2011.

CAPISTRANO, H. M.; ASSIS, E. M.; LEAL, R. M.; LEITE, M. E. A.; BRENER, S.; BASTOS, E. M. A. F. Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-6, 2013.

CAPOCI, I. R. G.; MENDONÇA, P. S. B.; ARITA, G. S.; PEREIRA, R. R. A.; CONSOLARO, M. E. L.; BRUSCHI, M. L.; NEGRI, M.; SVIDZINSKI, T. I. E. Propolis is an efficient fungicide and inhibitor of biofilm production by vaginal *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

CASTRO, I. M. N.; VASCONCELOS-JÚNIOR, A. A.; CUNHA, F. A.; CUNHA, M.C. S.; MENEZES, E. A. Comparação da atividade de antifúngicos imidazólicos e triazólicos frente a *Candida albicans*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, n. 3, p. 216-222, 2016.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CASTRO, P. A.; BOM V. L. P.; BROWN, N. A.; ALMEIDA, R. S. C.; RAMALHO, L. N. Z.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M. H. S.; BERRETTA, A. A.; GOLDMAN, G. H. Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in *Candida albicans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 74–86, 2013.

CHOUDHARI, M. K.; PUNEKAR, S. A.; RANADE, R. V.; PAKNIKAR, K. M. Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 1, p. 363-367, 2012.

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A3. 3<sup>a</sup> ed. Wayne: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008.

COLOMBO A. L.; GUIMARAES T.; CAMARGO L. F. A.; RICHTMANN R.; QUEIROZ-TELLES R. F.; SALLES M. J. C.; CUNHA C. A.; YASUDA M. A. S.; MORETTI M. L.; NUCCI M. Tratamento das principais infecções causadas por *Candida* spp.: Relato de reunião em conjunto de três sociedades médicas. **The brazilian journal of infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 1-43, 2012.

COPETO, S. C. M. F. **Contribuição para o diagnóstico molecular das onicomicoses.** 2010. 116f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.

COSTA, C. D. P. **Avaliação da atividade anti-*Candida* do chá verde dos Açores Experiência Profissionalizante na Vertente de Farmácia Comunitária, Hospitalar e Investigação.** 2013. 123f. Relatório de Estágio (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2013.

DALBEN-DOTA, K. F.; FARIA, M. G.; BRUSCHI, M. L.; PELLOSO, S. M.; LOPES-CONSOLARO, M. E.; SVIDZINSKI, T. I. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. **Journal of Alternative and Complementart Medicine**, v. 16, n. 3, p. 285-290, 2010.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2008.

DELUCIA, R. (Org). **Farmacologia Integrada: uso racional de medicamentos.** 2 ed. São Paulo: Clube de Autores, 2014.

DIOGO, H. C.; MELHEM, M.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Avaliação do método de disco-difusão para determinação da eficácia da terbinafina in vitro em agentes de micoses superficiais e subcutâneas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 3, p. 324-30, 2010.

FALCI, D. R. **Toxicidade de anfotericina B em diferentes formulações.** 2015. 103f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2015.

FARIAS, J. H. C.; REIS, A. S.; ARAÚJO, M. A. R.; ARAÚJO, M. J. A. M.; ASSUNÇÃO, A. K. M.; FARIAS, J. C.; FIALHO, E. M. S.; SILVA, L. A.; COSTA, G. C.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Effects of stingless bee propolis on experimental asthma. **Evidencebased Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-8, 2014.

FEUERSCHUETTE, O. H. M.; SILVEIRA, S. K.; FEUERSCHUETTE, I.; CORRÊA, T.; GRANDO, L.; TREPANI, A. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. **FEMINA**, v. 38, n. 2, p. 30-36, 2010.

FREITAS M. A. S.; **Inovações no Tratamento de micoses.** 2012. 57f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

FROZZA, C. O.; GARCIA, C. S.; GAMBATO, G.; SOUZA, M. D.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.

GEORGE J.; REBOLI A. C. Anidulafungin: when and how? The clinician's view. **Mycoses**, v. 55, n.1, p.36-44, 2012

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GLEHN, E. A. V.; RODRIGUES, G. P. S. Antifungigrama para comprovar o potencial de ação dos extratos vegetais hidroglicólicos sobre *Candida* spp. (berkhout). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, 2012.

GONÇALVES, P. H. P. **Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas**. 2010. 148f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GUZMAN, J. D. Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. **Molecules**, v. 19, p. 19292-19349, 2014.

HERRERA, C. L.; ALVEAR, M.; BARRIENTOS, L.; MONTENEGRO, G.; SALAZAR, L. A. The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on *Candida* spp. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 37, n. 1, p. 75-84, 2010.

HERRERA, Y. F. **Atividade citotóxica de amostras de própolis brasileira e cubana contra células tumorais humanas**. 2016. 101f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Patologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2016.

HIPÓLITO, T. M. M. **Própolis de abelha nativa sem ferrão da espécie *Frieseomelitta varia*: determinação da composição química e atividades biológicas**. 2013. 96f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Geras, 2013.

HOOG G. S.; GUARRO J.; FIGUERAS M. J. **Atlas of clinical *Fungi***. 2º Ed. Amer Society for Microbiology, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS). FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Coleção De Microrganismos De Referência Em Vigilância Sanitária (CMRVS). **Catálogo de fungos disponíveis para doação**. 2017.

KLEPSEK, M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. **Journal of Critical Care**, v. 26, n.2, p. 225, 2011.

KUROPATNICKI, A. K.; SZLISZKA, E.; KROL, W. Historical aspects of propolis research in modern times. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2013, p. 37-45, 2013.

LEWIS, R. E.; CAHYAME-ZUNIGA, L.; LEVENTAKOS, K.; CHAMILOS, G.; BEN-AMI, R.; TAMBOLI, P.; TARRAND, J.; BODEY, G. P.; LUNA, M.; KONTOYIANNIS, D. P.

Epidemiology and sites of involvement of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: a 20-year autopsy study. **Mycoses**, v. 56, n. 6, p. 638-645, 2013.

LIGUORI, G.; GALLÉ F.; LUCARIELLO, A.; DI ONOFRIO, V.; ALBANO, L.; MAZZARELLA, G.; D'AMORA, M.; ROSSANO F. Comparison between multiplex PCR and phenotypic systems for *Candida* spp. Identification. **New Microbiologica**, v. 33, n. 1, p. 63-67, 2010.

LINS, A. S.; SILVA, A. P. P.; FERREIRA, M. L. S.; CASTRO, M. S. Implantação das análises físico-químicas da própolis no laboratório da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola. **Revista Eletrônica Multidisciplinar Pindorama**, v. 1, n.1, p. 1-20, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. Ed. – Porto Alegre: Artmed, 2016.

MACHADO, J. L.; ASSUNÇÃO, A. K. M.; SILVA, M. C. P.; REIS, A. S.; COSTA, G. C.; ARRUDA, D. S.; ROCHA, B. A.; VAZ, M. M. O. L. L.; PAES, A. M. A.; GUERRA, R. N. M.; BERRETA, A. A.; NASCIMENTO, F. R. F. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-10, 2012.

MATTIGATTI, S.; JAIN, D.; RATNAKAR, P.; MOTURI, S.; VARMA, S.; RAIRAM, S. Antimicrobial Effect of Conventional Root Canal Medicaments vs Propolis against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 13, n. 3, p. 305-309, 2012.

MEDEIROS, C. I. S. **Atividades antifúngicas e toxicológica in silico dos enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-citronelal**. 2016. 128f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

MIGUEL, M. G.; NUNES, S.; DANDLEN, S. A.; CAVACO, A. M.; ANTUNES, M. D. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3418–3423, 2010.

MOREIRA, T. M. S. **Composição química, citotoxicidade e alvos da atividade antifúngica de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) e de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae)**. 2010. 158f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho, Araraquara – São Paulo, 2010.

NEGRI M. F.; FARIA M. G.; GUILHERMETT E.; ALVES A. A.; PAULA C. R.; SVIDZINSKI T. I. E. Hemolytic activity and production of germ tubes related to pathogenic potential of clinical isolates of *Candida albicans*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 8, p. 99-93, 2010.

NEVES-JÚNIOR, A.; CARTÁGENES-PINTO, A. C.; ROCHA, D. A. S.; SÁ, L. F. R.; JUNQUEIRA, M. L.; PEREIRA, A. F. Prevalence and fluconazole susceptibility profile of

*Candida* spp. clinical isolates in a Brazilian tertiary hospital in Minas Gerais, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 1349-1359, 2015.

NUNES, C. F.; FINGER, P. F.; FISCHER, G.; CASTRO, C. C.; HÜBNER, S. O.; PAULINO, N.; MARCUCCI, M. C.; VIEIRA, O.; MARTES, P. E.; VARGAS, G. D. Padronização de uma amostra de extrato etanólico de própolis verde. **Revista Fitos**, v. 7, n. 1, p. 67-72, 2012.

NUNES, E. B.; MONTEIRO, J. C.; M. S.; NUNES, N. B.; PAES, A. L. V. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 4, p. 23-30, 2011.

OLIVEIRA, S. B. B. **Perfil de suscetibilidade antifúngica e fatores de virulência de leveduras isoladas de onicomicose de pacientes atendidos no Laboratório central do Estado do Pará (LACEN)**. 2014. 58f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular, Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

OLIVEIRA, V. M.; CARRARO, E.; AULER, M. E.; KHALIL, N. M. Quercetina e rutina: potenciais agentes para terapia antifúngica. **Brazilian Journal Biology**, v. 76, n. 4, p. 1029-1034, 2016.

ORSATTI, C. L.; MISSIMA, F.; PAGLIARONE, A. C.; SFORCIN, J. M. Th1/Th $\beta$  cytokines' expression and production by propolis-treated mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 314–318, 2010.

PAM, V. K.; AKPAN, J. U.; ODUYEBO, O. O.; NWAOKORIE, F. O.; FOWORA, M. A.; OLADELE, R. O.; OGUNSOLA, F. T.; SMITH, S. I. Fluconazole susceptibility and ERG11 gene expression in vaginal *Candida* species isolated from Lagos Nigeria. **Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, v. 3, n. 1, p. 84-90, 2012.

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**, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

PEDROSO, R. S.; MENEZES, R. P.; FERREIRA, J. C.; PENATTI, M. P. A.; SÁ, W. M.; MALVINO, L. D. S.; CANDIDO, R. C.; MOREIRA, T. A. Sensibilidade de isolados de *Candida* spp. a antifúngicos por disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 304-311, 2014.

PEMÁN, J. **Epidemiología De Las Candidemias**. III Congreso De Microbiología Clínica. Sociedade Española De Microbiología. Ávila. 2010.

PEREIRA, C. Q. M. **Identificação de espécies de fungos causadores de onicomicose em idosos institucionalizados no município de São Bernardo de Campo**. 2012. 87f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em dermatologia, USP, São Paulo, 2012.

PEREIRA, D. S.; ABRANTES, M. R.; COELHO, W. A. C.; OLIVEIRA FREITAS, M.; FREITAS, C. I. A.; SILVA, J. B. A. Potencial antibiótico da própolis apícola Potiguar em bactérias de importância veterinária. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 3, p. 151-158, 2016.

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

PETER, C. M. **Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) frente a micro-organismos infecciosos de interesse em Medicina Veterinária e Humana**. 2015. 75f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

PETER, C. M.; PICOLI, T.; ZANI, J. L.; LATOSINSKI, G. S.; LIMA, M.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. O.; FISCHER, G. Atividade antiviral e virucida de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*) frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 667-675, 2017.

PINTO, L. M. A.; PRADO, N. R. T.; CARVALHO, L. B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 8, n. 3, p. 76 - 100, 2011.

PIPIPI, B. **Avaliação da capacidade de *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* desenvolverem resistência fenotípica à própolis vermelha brasileira e ao fluconazol e avaliação de sua atividade antifúngica em associação com fluconazol e anidulafungina**. 2014. 145f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

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

POSSAMAI, M. M.; HONORIO-FRANÇA, A. C.; REINAQUE, A. P.; FRANÇA, E. L.; SOUTO, P. C. Brazilian propolis: a natural product that improved the fungicidal activity by blood phagocytes. **BioMed Research International**, p. 50-59, 2013.

QUEIROZ, V. C. P. P. **Avaliação do potencial antifúngico de própolis de *Apis mellifera* contra leveduras do gênero *Candida***. 2010. 82f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo, 2010.

RAMESH, N.; PRIYADHARSINI, M.; SAMIAPPAN, C.; BALASUBRAMANIAN, V.; HEMAPRIVA, J.; KANNAN, R. Virulence factors and antifungal sensitivity pattern of *Candida* Sp. isolated from HIV and TB patients. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 273-278, 2011.

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

RESENDE, R. B. **Onicomicoses e a terapia fotodinâmica**. 2015. 66f. Monografia (Especialização) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

REVISTA PLANETA. **O presente das abelhas, a própolis**. Google. 01. abr.2011. Disponível em: <https://www.revistaplaneta.com.br/o-presente-das-abelhas-propolis/> Acesso em: 12 set. 2017.

RIGHI, A. A.; ALVES, T.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363-2370, 2011.

ROCHA, R. L. **Efeito do extrato de própolis em mucosa bucal em modelo de carcinogênese induzida por DMBA**. 2012. 71f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Murici, Diamantina, 2012.

SALOMÃO, K.; SOUZA, E. M.; PONS, A. H.; BARBOSA, H. S.; CASTRO, S. Brazilian Green Propolis: Effects *in vitro* and *in vivo* on *Trypanosoma cruzi*. **Evidence -Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 11-22, 2011.

SANTOS, S. S. F.; PEREIRA, D. F. A.; MARTINS, C. A. P.; ZOLLNER, M. S. A. C.; JORGE, A. O. C.; ITO, C. Y. K. Atividade antifúngica de formulação a base de bórax sobre leveduras do gênero *Candida*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 40, n. 2, p. 91-95, 2011.

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

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica a Luz dos Autores Contemporâneos**; Edição 1, Rio de Janeiro; Editora Guanabara, 2004, p. 265-274.

SILVA, C. V.; REIS, A. L. V.; FERRER, S. R.; GUERREIRO, H. M. N.; BARROS, T. F.; VELOZO, E. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 355-360, 2010.

SILVA, H. M. **Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes transplantados de medula óssea**. 2011. 53f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

SILVA, S. S.; THOMÉ, G. S.; CATANEO, A. H. D.; MIRANDA, M. M.; ANDRADE, C. G. T. J.; WATANABE, M. A. E.; PIANA, G. M.; SFORCIN, J. M.; PAVANELLI, W. R.; COSTA, I. C. Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. **Evidence -Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 54- 61, 2013.

SIMÕES, R. J.; FONSECA, P.; FIGUEIRAL, M. H. Infecções por *Candida* spp. na cavidade oral. **Revista Odontologia Clínica-Científica**, v. 12, n. 1, p. 19-22, 2013.

SIQUEIRA, A. L. DANTAS, C. G.; GOMES, M. Z.; PADILHA, F. F.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; CARDOSO, J. C. Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 43, n. 6, p. 359-366, 2014.



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

TAIRA, D. L. **Atividade enzimática e susceptibilidade antifúngica de isoladas de *Candida* spp. de pacientes com candidemia em hospital universitário de Campo Grande – MS, 1998-2010**. 2011. 60f. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em doenças infecciosas e parasitárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Artmed, 10 ed., Porto Alegre, 2012.

VASCONCELOS-JÚNIOR, A. A.; MENEZES, E. A.; CUNHA, F. A.; CUNHA, M. C. S.; BRAZ, B. H. L.; CAPELO, L. G.; SILVA, C. L. F. Comparação entre microdiluição e disco difusão para o teste de susceptibilidade aos antifúngicos contra *Candida* spp. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 135-142, 2012.

VIEIRA, E. A. **Potencial nutricional e antioxidante de Goji berry (*Lycium barbarum* L.)**. 2016. 76f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

VILELA, C. O.; FISCHER, G.; CASTRO, C. C.; NUNES, C. F.; HUBNER, S. O.; RAFFI, M. B.; SALLES, S. E.; ANCIUTI, M. A.; VARGAS, G. D. Virucidal activity of green propolis against avipoxvirus in chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 9, p. 1075-1082, 2011.

XIAO, M.; FAN, X.; CHEN, S. C. A.; WANG, H.; SUN, Z. Y.; LIAO, K.; SHU-LAN CHEN, S. L.; YAN, Y.; KANG, M. Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 3, p. 802–810, 2015.

XUAN, H.; ZHAO, J.; MIAO, J.; LI, Y.; CHU, Y.; HU, F. Effect of brazilian propolis on human umbilical vein endothelial cell apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 78-85, 2010.

YALFANI, R.; KHOSRAVI, A.; PIROUZ, B. Evaluation of the antifungal activity of Iranian propolis against *Candida albicans*. **African Journal of Microbiology Reserch**, v. 7, n. 35, p. 4457–4464, 2013.

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