



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E NUTRIÇÃO**



MÁRCIA CHRISTINA DORNELAS DE FREITAS

PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

OURO PRETO
2018

MÁRCIA CHRISTINA DORNELAS DE FREITAS

PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Trabalho apresentado à Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto para obtenção do título de Mestre em Saúde e Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dra. Sônia Maria de Figueiredo

Co-Orientadora: Prof^a Dra. Susana Johann

F866p

Freitas, Márcia Christina Dornelas .

Própolis verde e vermelha: atividade antifúngica [manuscrito] / Márcia Christina Dornelas Freitas. - 2018.

62f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientadora: Profª. MScª. Sônia Maria Figueiredo.

Coorientadora: Profª. MScª. Susana Johann.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Departamento de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição.

Área de Concentração: Saúde e Nutrição.

I. Própolis - Teses. 2. Candidíase - Teses. I. Figueiredo, Sônia Maria. II. Johann, Susana. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 613.2



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Nutrição – ENUT
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e seis dias do mês de março de dois mil e dezoito, às catorze horas, no Auditório da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna **Márcia Christina Dornelas de Freitas**. A Banca Examinadora, definida anteriormente, foi composta pelos professores Marcelo Eustáquio Silva (UFOP), Rachel Basques Caligiorme (Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte – IEP-BH), Sônia Maria de Figueiredo (UFOP). Dando início ao exame, a aluna apresentou sua Dissertação de Mestrado intitulada: “**Própolis verde e vermelha: atividade antifúngica**”. Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado à dissertação. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento do Programa. Após julgamento, os membros da Banca decidiram por:

APROVAR

APROVAR CONDICIONALMENTE

REPROVAR


 Profa. Rachel Basques Caligiorme (Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte – IEP-BH),
 Examinadora Externa.


 Prof. Marcelo Eustáquio Silva (UFOP),
 Examinador Interno.


 Profa. Sônia Maria de Figueiredo (UFOP),
 Orientadora.


 Márcia Christina Dornelas de Freitas,
 Mestranda.

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

Augusto Cury

DEDICATÓRIA

Dedico todo o esforço aqui aplicado àqueles que nunca um dia ousaram a vencer suas limitações.

Somos capazes de vencer o invencível, quando com toda alma nos dedicamos na execução da tarefa.

“Tudo parece impossível até que seja feito.”

Nelson Mandela

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as graças a mim concedidas, principalmente me permitir ter fé e superar minhas limitações e por ter colocado tantas pessoas iluminadas no meu caminho;

Às minhas amadas e fiéis intercessoras no céu Santa Terezinha do Menino Jesus e minha mãezinha do céu, Nossa Senhora;

À minha querida orientadora, Prof.^a Dr.^a Sônia Maria de Figueiredo, essencial na minha formação acadêmica e humana, a quem admiro pelo profissionalismo, pela simplicidade. Obrigada pelo abraço de mãe para meus momentos de desespero, por acreditar em meu potencial, obrigada pelas palavras de incentivo, ensinamentos, apoio, amizade e por me orientar nessa jornada;

À minha família, por ser minha base, pela compreensão à minha ausência e por me apoiar na realização deste sonho;

Aos colegas do laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos da Universidade Federal de Minas Gerais, muito obrigada pela acolhida, carinho e disponibilidade sempre que solicitei. E ao grupo de antifúngicos ao qual fui muito bem recebida, obrigada pela paciência em dividir comigo suas habilidades com os experimentos. Em especial, agradeço à Larissa e Nívea que não se restringiram a apenas passar a técnica, vocês se mostraram fiéis companheiras e foram muito além, terão minha eterna gratidão.

À Prof.^a Dr.^a Susana Jhonnann, minha co-orientadora, pela valiosa contribuição nos ensinamentos e por me introduzir no mundo dos antifúngicos, obrigada por todo carinho e paciência a mim dedicada.

Aos colegas do mestrado obrigada pela amizade e disponibilidade para me ajudar no que fosse necessário.

Às amadas Claudinha e Fabi do IEP de BH, surgiram como anjos nessa minha caminhada, foram responsáveis por me apresentarem os procedimentos básicos de laboratório e me ajudaram em um momento tão difícil de desenvolvimento dessa pesquisa, grandes seres humanos e profissionais, tens minha eterna gratidão.

Ao professor Bibó, por ser sempre solícito e por contribuir tanto na banca de qualificação, ajudou muito a nos direcionarmos no desenvolvimento dessa pesquisa.

À professora Júlia Carraro por aceitar participar de minha banca de qualificação.

Ao setor de transporte, em especial aos motoristas, que foram responsáveis em me conduzir para a realização de todos os experimentos.

Aos membros da banca examinadora, por dedicaram parte do seu tempo na avaliação deste trabalho e pelas excelentes contribuições realizadas.

Aos membros da Pós-graduação em Saúde e Nutrição da UFOP.

Ao CNPq pela aprovação do projeto e apoio financeiro.

À CAPES pela bolsa de estudos.

À UFOP, ENUT, PPGSN e aos professores do programa pela oportunidade e por todo aprendizado.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A candidíase é uma infecção fúngica causada por espécies do gênero *Candida*, potencialmente patogênicas, que vem acometendo muitos indivíduos devido ao crescente número de imunossuprimidos e à resistência aos antifúngicos comumente utilizados. Este estudo foi desenvolvido no intuito de gerar conhecimento que possa auxiliar na busca de alternativas para o tratamento de infecções fúngicas. O principal objetivo foi avaliar *in vitro* e *in vivo* a atividade de extratos de própolis verde e própolis vermelha contra espécies do gênero *Candida* spp. No teste *in vitro*, utilizou-se cepas padronizadas *American Type Culture Collection (ATCC)*: *C. albicans* ATCC SC5314 e ATCC 18804, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 20298, *C. glabrata* ATCC 2001 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, e 10 isolados clínicos pertencentes à Coleção de microorganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extrato de própolis verde e vermelha e cápsulas comerciais de própolis verde. Verificou-se a ação sinérgica de quatro extratos de própolis com fluconazol e com anfotericina B. do crescimento *C. albicans* pelas própolis na adesão de células bucais. Já a ação das própolis *in vivo* foi avaliada no ensaio de sobrevivência com as larvas de *Tenebrio molitor*. Nos resultados *in vitro*, observou-se que todos os extratos foram capazes de inibir ao menos uma das cepas testadas, se destacando os extratos de própolis vermelho a 25% e de própolis verde a 100% na inibição do crescimento de todas as *Candidas* padrões testadas, suas concentrações variaram de 125µg/mL a 1000µg/mL e 500µg/mL a 2000µg/mL, respectivamente. Foi também comprovado *in vitro* que as própolis possuem atividade sinérgica tanto com anfotericina B como com fluconazol. Nos resultados dos Testes de Adesão de Células Epiteliais Buciais, verificou-se inibição dos extratos GrProp50, GrProp28, GrProp100, RedProp25 (42,60,62 e 80%respectivamente, sendo esses resultados estatisticamente similar à inibição da anfotericina B ($p>0,05$). Já em relação à sobrevivência com as própolis testadas demonstraram ser eficazes no tratamento de larvas de *Tenebrio molitor*, aumentando sua sobrevivência. Esses resultados mostraram que tanto a própolis verde quanto a vermelha possuem grandes chances de ser empregado em tratamento de candidíase, devido à ação antifúngica isolada ou sinérgica com outras drogas antifúngicas.

Palavras chave: Própolis verde, Própolis vermelha, Candidíase, Sinergismo.

ABSTRACT

Candidiasis is a disease caused by pathogenic species of the genus *Candida*. This disease is of high incidence due to the increasing number of immunosuppressed people and the resistance of these fungi to the commonly used antifungals. The objective of this study was to generate knowledge that may help the treatment of fungal infections. For this, *in vitro* and *in vivo* evaluations of the properties of extracts of green propolis and of red propolis were carried out against species of the genus *Candida*. The following strains: *C. albicans* ATCC SC5314, *C. albicans* ATCC 18804, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 20298, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. parapsilosis* ATCC 22019, and also 10 clinical isolates were used in the *in vitro* experiments. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the green propolis extract and the red propolis and the commercial green propolis capsules were determined. A promising *in vitro* synergistic action of four extracts of propolis with the antifungal agents fluconazole and amphotericin B was observed. The action of green propolis (Red or both?) was also verified in relation to the adhesion of oral cells. The action of the two types of propolis was evaluated *in vivo* using the *Tenebrio molitor* larval survival assay. The extracts of 25% red propolis and 100% green propolis stood out in relation to the inhibition of the growth of all tested *Candida* standards, with concentrations varying from 125.0 to 1000.0 µg/mL and 500µg/mL to 2000µg / mL, respectively. In relation to inhibition of growth of all tested *Candida* standards (ATCC), the best results were found for extracts of 25% red propolis (125 to 1000 µg/mL) and 100% green propolis (500 to 2000 µg/mL). It has been proven that *in vitro* the propolis acts synergistically with both amphotericin B and fluconazole. Similar inhibition of amphotericin B ($p > 0.05$) was also seen of *C. albicans* growth by propolis in the adhesion of buccal cells. Regarding the survival with the propolis tested, they were shown to be effective in the treatment of *Tenebrio molitor* larva e, increasing their survival. Due to the antifungal action alone or synergistically with antifungal drugs the results showed that both red propolis and green propolis have great potential to be used in the treatment of candidiasis.

Keywords: Green propolis, Red propolis, Candidiasis, Synergism.

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1:** *Apis mellifera* coletando própolis de *Baccharis Dracunculifolia* para produção de própolis no Brasil e própolis verde *in natura*. 21
- Figura 2:** (A) origem botânica da própolis vermelha brasileira é *Dalbergia ecastophyllum*; (B) pigmentos de coloração intensamente coloridos proveniente da *Dalbergia ecastophyllum*, devido à presença de isoflavanas em sua composição química; (C) Abelhas *Apis mellifera* coletando exsudado vermelho da superfície de *D. ecastophyllum* para fabricar a própolis. 22
- Figura 3:** Esquema de microdiluição dos extratos e substâncias testadas 31
- Figura 4:** Porcentagem de inibição de *Candida albicans* SC5314 em células epiteliais bucais humanas. 40
- Figura 5:** Teste de toxicidade de própolis em larvas de *Tenebrio molitor* com própolis verde à 100% (GrProp100) nas dosagens de 1,3, 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevida em relação tempo em dias. 42
- Figura 6:** Teste com larvas de *Tenebriomolitor* infectadas com 1×10^5 leveduras *C. albicans* SC5314 e tratadas com própolis verde à 100%(GrProp100) com 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevida em relação tempo em dias. 43
- Figura 7:** Teste de toxicidade de própolis em larvas de *Tenebrio molitor* com própolis verde à 50%(GrProp50) com 1,3, 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevida em relação tempo em dias. 43
- Figura 8:** Teste com larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com 1×10^5 leveduras *C. albicans* SC5314 e tratadas com própolis verde à 50% (GrProp50) com 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevida em relação tempo em dias. 44
- Figura 9:** Teste de toxicidade de própolis em larvas de *Tenebrio molitor* com própolis verde à 28% (GrProp28) com 1,3, 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevida em relação tempo em dias. 45
- Figura 10:** Teste com larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com 1×10^5 leveduras *C. albicans* SC5314 e tratadas com própolis verde à 28% (GrProp28) com 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevida em relação tempo em dias. 45
- Figura 11:** Teste de toxicidade de própolis em larvas de *Tenebriomolitor* com própolis vermelha à 25% (RdProp25) com 1,3, 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevida em relação tempo em dias. 46
- Figura 12:** Teste com larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com 1×10^5 leveduras *C. albicans* SC5314 e tratadas com própolis vermelha à 25% (RdProp25) com 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevida em relação tempo em dias. 47

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Classificação atual das própolis brasileiras	20
Tabela 2: Amostras de própolis e respectivas concentrações utilizadas nos testes de atividade contra <i>Candida</i> spp	31
Tabela 3: Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL de extratos e cápsulas de própolis verde e vermelha capaz de inibir no mínimo 50% do crescimento de <i>Candida</i> spp.	38
Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima de extratos de própolis e substâncias capazes de inibir no mínimo 50% do crescimento dos isolados clínicos	39
Tabela 5: Índice da Concentração Inibitória Fracional (ICIF) de extratos de própolis verde e vermelha em combinação com fluconazol e anfotericina B contra <i>Candida albicans</i> SC5314.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD: Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC: American Type Culture Collection

C. albicans: *Candida albicans*

C. glabrata: *Candida glabrata*

C. krusei: *Candida krusei*

C. paraosilosis: *Candida paraosilosi*

C. tropicalis: *Candida tropicalis*

CEM: Celulas Epiteliais Bucais

CIM: Concentração Inibitória mínima

CLSI: *Clinical And Laboratory Standards Institute*

DMSO: Dimetilsulfóxido

GrProp100: Extrato de própolis verde à 100%

GrProp20: Extrato de própolis verde à 20%

GrProp28: Extrato de própolis verde à 28%

GrProp50: Extrato de própolis verde à 50%

HIV: Virus da Imunodeficiência Adquirida

MOPS: Ácido Morfolino-propanossulfônico

PBS: Solução Salina Tamponada

RdProp25: Extrato de própolis vermelha à 25%

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

T. molitor: *Tenebrio molitor*

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	XI
PÁGINA	XI
LISTA DE TABELA	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
INTRODUÇÃO	15
2. EMBASAMENTO TEÓRICO	18
2.1 PRÓPOLIS	18
2.2 <i>CANDIDA</i> E INFECÇÕES FÚNGICAS.....	22
2.2.1. TIPOS DE <i>CANDIDA</i> SPP.	23
2.3. TRATAMENTO	25
2.4. TESTE <i>IN VIVO</i> COM LARVAS DE <i>TENEBRIO MOLITOR</i>	26
3. OBJETIVOS DA PESQUISA	28
GERAL.....	28
ESPECÍFICOS	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 AMOSTRAS DE PRÓPOLIS	29
4.2 MICRORGANISMOS	29
4.3 PREPARO DO INÓCULO.....	30
4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE EXTRATOS E DAS CÁPSULAS COMERCIAIS DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA CONTRA <i>CANDIDA</i> SPP.....	30
4.5 CAPACIDADE DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS EM INIBIR A ADESÃO DE <i>C. ALBICANS</i> EM CÉLULAS EPITELIAIS BUCAIS.....	32
4.6 AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO ENTRE EXTRATOS DE PRÓPOLIS COM OS ANTIFÚNGICOS FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B.....	33
4.7 ENSAIO DE TOXICIDADE DE PRÓPOLIS EM <i>TENEBRIO MOLITOR</i>	33
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS EM LARVAS DE <i>TENEBRIO MOLITOR</i>	34
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
5. RESULTADOS	37
5.1 TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	37
5.1.2 TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>C.</i> <i>ALBICANS</i>	38

5.2 TESTE PARA VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS EM INIBIR A ADESÃO DA <i>C. ALBICANS</i> EM CÉLULAS EPITELIAIS BUCAIS	39
5.3 TESTE DE COMBINAÇÃO ENTRE OS EXTRATOS COM OS ANTIFÚNGICOS FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B	41
5.4 VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE DAS SUBSTÂNCIAS E SOBREVIVÊNCIA COM LARVAS <i>TENEBRIO MOLITOR</i>	41
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÕES	52
8. REFERÊNCIAS	53

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve um aumento considerável no número de infecções causadas por *Candida* spp. resistentes a agentes antifúngicos (TORTORANO et al., 2006; PFALLER, 2012). O número limitado de opções terapêuticas e o uso inapropriado de drogas antimicóticas causam a seleção de microrganismos resistentes (HUANG & KAO, 2012). Além de prolongar e aumentar os custos das hospitalizações (TORTORANO et al., 2006), a resistência é uma ameaça para pacientes imunossuprimidos ou aqueles internados em centros de tratamento intensivos, pois pode aumentar as taxas de morbidade e mortalidade associadas a essas infecções (PEMAN et al., 2009).

A literatura relata diversos benefícios farmacológicos de produtos naturais, dentre esses produtos destaca-se a própolis. A própolis tem atraído interesse devido às suas propriedades farmacológicas, tais como, antimicrobianas, imunomoduladoras, antiinflamatórias, antitumorais, entre outros (SFORCIN; BANKOVA, 2011). Dentre essas características está a atividade antifúngica que já foi relatada contra uma grande variedade de espécies (SIQUEIRA et al., 2009; DALBEN-DOTA et al., 2010).

O termo "própolis" tem sua origem na língua grega: ["pro" = em favor de] + ["polis" = cidade], significando "defesa de uma cidade", ou seja, é a defesa da colmeia (MIORIN et al., 2003; SALATINO et al., 2005; SILVA, 2015). A própolis é um composto resinoso oriundo de plantas, elaborada por abelhas *Apis mellifera*, cuja principal função é proteger a colmeia da invasão por parasitas, bactérias e vírus (BANKOVA, 2005; De FIGUEIREDO et al., 2014; De MENDONÇA et al., 2015; COSTA et al., 2016).

A própolis é constituída por diversos compostos, basicamente por resinas, ceras, óleos, pólen, minerais, vitaminas, aminoácidos, flavonoides e ácidos fenólicos (PARK et al., 2002; SANTOS, 2012). Com base na constituição química dos extratos de própolis, alguns autores observaram que existe uma grande variação na composição química da própolis. Essa variação está relacionada aos tipos e origens das plantas e a região geográfica onde a própolis é produzida (SOARES, 2014; POPOVA et al., 2012).

Atualmente, a própolis brasileira é classificada em 13 tipos diferentes, de acordo com suas propriedades físicas, origem botânica e área geográfica onde é

coletada (De MELO et al., 2014). Inicialmente, Park et al. (2000) coletaram amostras de própolis de diferentes regiões brasileiras e classificaram em 12 grupos. Posteriormente, outros pesquisadores (PINTO, PRADO, CARVALHO, 2011) descobriram o 13º tipo de própolis, ela possui composição química peculiar, localizada em manguezais no nordeste brasileiro e foi chamada de Própolis Vermelha Brasileira.

Tanto a própolis verde quanto a própolis vermelha conquistaram maior valorização no mercado mundial. No Japão, por exemplo, devido à tradição milenar de se utilizar alimentos e remédios naturais, a própolis é usada no desenvolvimento de alimentos e fármacos. A população é incentivada a consumir sucos e outras bebidas contendo própolis, como aliado à saúde. O produto também é aplicado em outras áreas distintas, como na área de cosmético e na conservação alimentar (De FIGUEIREDO et al., 2014, De FREITAS et al., 2018).

Própolis de diversas origens são encontradas no mercado mundial na forma de goma de mascar, tabletes, loções, sprays, antissépticos, produtos de beleza, extratos, cápsulas, produtos de higiene bucal (BURDOCK, 1998). Grande tem sido o interesse de investigadores em explorar as mais diversas utilidades da própolis. Assim, pesquisas em distintas áreas vêm sendo realizadas e resultados satisfatórios têm sido descobertos no tratamento de pacientes com diversas enfermidades (LEVYA, MESA, 2007, BRETZ et al., 2014).

Como já relatado anteriormente, a própolis tem importantes propriedades biológicas e farmacológicas, suas propriedades biológicas vêm sendo largamente estudadas nas últimas décadas, tanto em modelos experimentais *in vitro* como *in vivo*. Pesquisadores têm investigado ainda o isolamento dos compostos responsáveis pela sua ação (SFORCIN, BANKOVA, 2005; SOUZA et al., 2013; PETER et al., 2017).

Muitos autores analisaram a relação entre as propriedades biológicas da própolis com seus componentes químicos e constataram que as ações antimicrobianas dos extratos etanólicos, possivelmente, estão relacionadas à concentração de alguns flavonóides, e do artepillin C, pois esses compostos estão em elevadas concentrações nos extratos etanólicos da própolis verde brasileira. Assim como a formononetina que é encontrada em concentrações mais elevadas

nos extratos etanólicos da própolis vermelha brasileira (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000; SANTOS et al., 2005; De FIGUEIREDO et al., 2015).

Por meio de vários estudos realizados com própolis, ficaram evidenciadas as vantagens do produto, tais como, preço acessível, facilidade de aquisição e manuseio descomplicado, quando comparado aos medicamentos comumente utilizados (BERNARDO et al., 1990; AURICCHIO et al., 2006; SANTOS, VIANNA, GAMBA, 2007; BARBOSA et al., 2009). De Castro (2001) ressalta o papel da própolis como um antibiótico natural, pois não possui eventos colaterais graves, quando comparada aos tratamentos sintéticos, e apresenta diversas propriedades farmacológicas.

Dentre os tratamentos sintéticos, observa-se que, atualmente, têm aumentado o número de isolados clínicos resistentes a alguns antifúngicos, até então, disponíveis para prescrição (SANTOS et al., 2016; GONÇALVES et al., 2016; VIEIRA, SANTOS, 2017). É necessário criar estratégias que impeçam a disseminação das linhagens resistentes (MENEZES, MENDES e CUNHA, 2009; LOPES, et al., 2013; SANTOS et al., 2016).

Autores, como Souza et al. (1989), Sforcin et al. (2000), Stepanovic et al. (2003), Vargas et al. (2004), Fernandes Junior et al. (2006) e Siqueira et al. (2009), reforçam a indicação da própolis como antifúngico ou como coadjuvante, este fato pode ser uma boa opção em relação aos demais tratamentos, pois o uso indiscriminado de antifúngicos pode gerar cepas resistentes aos fármacos entre populações que previamente são suscetíveis. A utilização da própolis pode se tornar uma alternativa para o tratamento de infecções persistentes causadas por *Candida* spp., caso sua eficácia seja comprovada.

2. EMBASAMENTO TEÓRICO

2.1 Própolis

Dados históricos apontam que a própolis é utilizada secularmente por diferentes povos. Os egípcios a utilizavam no embalsamento de mortos, evitando a putrefação dos cadáveres. Os gregos e romanos faziam uso da substância como produto antisséptico e cicatrizante. Já os incas a utilizavam como antipirético. No Brasil, indígenas direcionavam seu uso na produção de ferramentas e em sepultamentos (SFORCIN, BANKOVA, 2011, De MELO et al., 2014).

A composição da própolis é variável, normalmente é composta por cerca de 50 a 60% de resina e bálsamo, sua porção de ceras compreende em torno de 30 a 40%, os óleos essenciais e aromáticos situam-se entre 5 a 10%, o pólen, corresponde 5%, podendo ainda conter minerais (ferro, alumínio, cálcio, cobre, manganês) e vitaminas (B1, B2, B6, C e E). A literatura já relata mais de 400 tipos de compostos diferentes encontrados na própolis (KASKONIENE et al., 2014).

Os principais compostos químicos farmacologicamente ativos encontrados na própolis são flavonoides, isoflavonas, compostos fenólicos, xantonas (De MENDONÇA et al., 2015 e SIQUEIRA et al., 2009). Estes são responsáveis por atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anti-viral, antifúngica, ações anti-cancerígenas, hipotensora, cicatrizante, anestésico, anti-HIV, imunomoduladores, anti-cariogênico BURDOK, 1998; BARBOSA et al., 2009; SFORCIN, 2000, De FIGUEIREDO et al., 2014).

As propriedades biológicas da própolis estão diretamente relacionadas aos seus compostos químicos, sendo estes muito variados, muitas vezes esse fato, dificulta sua aplicabilidade terapêutica. Sabe-se que a composição química, as propriedades físicas e biológicas dependem da flora de cada região visitada pelas abelhas, do período de coleta e da variabilidade genética das abelhas produtoras (PINTO et al., 2001; FERNANDES JUNIOR et al., 2006; SILVA et al., 2015).

Em regiões de clima temperado como no território europeu, a fonte da própolis é o botão de álamo (*Populus nigra*), possuindo grande variedade de compostos fenólicos, esse tipo de álamo não se desenvolve bem em terras tropicais como as brasileiras (BANKOVA, 2005). Segundo o mesmo autor, a própolis da Europa

apresenta concentração maior de flavonoides do que as própolis de território tropical, como as do Brasil.

As própolis brasileiras, atualmente, estão classificadas em 13 grupos. Sendo cinco grupos do Sul, um do Sudeste e sete do Nordeste. Park et al. (2000) classificaram os doze grupos (Tabela 1). Em 2005, foi descoberto o 13º grupo na região Nordeste (PINTO, PRADO, CARVALHO, 2011).

Além da função biológica e cor, a própolis apresenta, odor e consistência variável. Em relação à cor, podem ser amareladas, esverdeada clara, marrom escuro, vermelha, verde escuro (Tabela 1). O sabor varia de suave a forte, amargo e picante. A consistência varia de acordo com a temperatura, se o ambiente estiver abaixo de 20°C, será rígida, se em temperaturas mais altas, a consistência da própolis poderá ser maleável a levemente rígida (BURDOCK, 1998; PINTO et al., 2001).

Ao analisar atividades fisiológicas de 12 tipos de própolis brasileira, foram constatadas várias atividades biológicas. Na própolis oriunda da região nordeste (grupo 6), foram obtidos os melhores resultados antimicrobianos, demonstrando alta atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, sendo seguida pela própolis da região sul (grupo 3), e a da região sudeste (grupo 12). Todos os grupos proporcionaram elevada atividade antioxidante, sendo superior a 80%, com exceção da própolis do grupo 9, a qual não demonstrou ação antioxidante. Foram verificadas também atividades citotóxicas e anti-HIV, ou seja as amostras classificadas nos grupos 6 e 7 apresentaram excelente função citotóxica contra tumores malignos, já os grupos 1 e 5 demonstraram atividade anti-HIV (PARK et al., 2000).

O tipo mais comum e mais estudado é a própolis verde (Figura 1), oriunda da *Baccharis dracunculifolia*, comumente chamada de “Alecrim do Campo” (PINTO, PRADO, CARVALHO, 2011). No entanto a própolis vermelha tem aguçado grande interesse, por ser uma variedade mais rara e com potencial farmacológico e composição rica em bioativos (BITTENCOURT et al., 2014, FREITAS et al, 2018). Em 2005, a própolis vermelha foi descoberta (classificada como grupo 13) na Paraíba. Essa própolis é originada da *Dalbergia ecastophyllum*, que vem sendo investigada por vários autores (PINTO, PRADO, CARVALHO, 2011). Pesquisadores relatam que as abelhas recolhem a substância vermelha da superfície de frestas

elaboradas por insetos no tronco da vegetação da *Dalbergia ecastophyllum* (Figura 2), conhecida popularmente como “rabo-de-bugio” (BATISTA et al., 2012, FREITAS et al., 2018).

Tabela 1. Classificação atual das própolis brasileiras

Extrato Etanólico de Própolis		
Grupos	Cor	Origem da própolis
Grupo 1	Amarelo	Região Sul
Grupo 2	Castanho claro	Região Sul
Grupo 3	Castanho escuro	Região Sul
Grupo 4	Castanho claro	Região Sul
Grupo 5	Marrom esverdeado	Região Sul
Grupo 6	Marrom avermelhado	Região Nordeste
Grupo 7	Marrom esverdeado	Região Nordeste
Grupo 8	Castanho escuro	Região Nordeste
Grupo 9	Amarelo	Região Nordeste
Grupo 10	Amarelo escuro	Região Nordeste
Grupo 11	Amarelo	Região Nordeste
Grupo 12	Verde ou Marrom esverdeado	Região Sudeste
Grupo 13	Vermelho	Região Norte

A Própolis Vermelha Brasileira desempenha atividades antimicrobiana (DAS NEVES et al., 2016; PIPPI et al., 2015), anti-inflamatória (BABAEI et al., 2016; FRANCHIN et al., 2016), antiparasitária (Do NASCIMENTO et al., 2016; OMAR et al., 2016), antioxidante (CABRAL et al., 2009; De MENDONÇA et al., 2015), antitumoral (Da SILVA FROZZA et al., 2016; FRANCHIN et al., 2016), nutracêutica (MORSY et al., 2016) e metabólica (TELES et al., 2015). Sendo essas atividades muito relacionadas com a composição química da própolis e o tipo de solvente utilizado na extração dos componentes bioativos (MELLO, PETRUS, HUBINGER, 2010).

A própolis verde contém vários compostos bioativos (BANKOVA, 2005). Tais como, derivados de *p*-cumárico e terpenóides que têm atividade antimicrobiana, o ácido cafeico atua como antiviral e anti-inflamatório, o flavonoide chrisina é um excelente antifúngico (TORETI et al., 2013). O composto fenólico Artepillin C (3,5-diprenil-4-ácido hidroxicinâmico), que é típico da própolis verde, foi evidenciado

como responsável pela função antitumoral e antioxidante (TORETI et al., 2013). Já a própolis vermelha, que é típica dos estados de Alagoas, Sergipe, Bahia, Paraíba e Pernambuco (Nordeste brasileiro), quimicamente é composta por isoflavonoides, chalcona, flavanona, neoflavonoide e isoflavonol (ALENCAR et al., 2007; OLDONI et al., 2011; FREITAS et al., 2018).

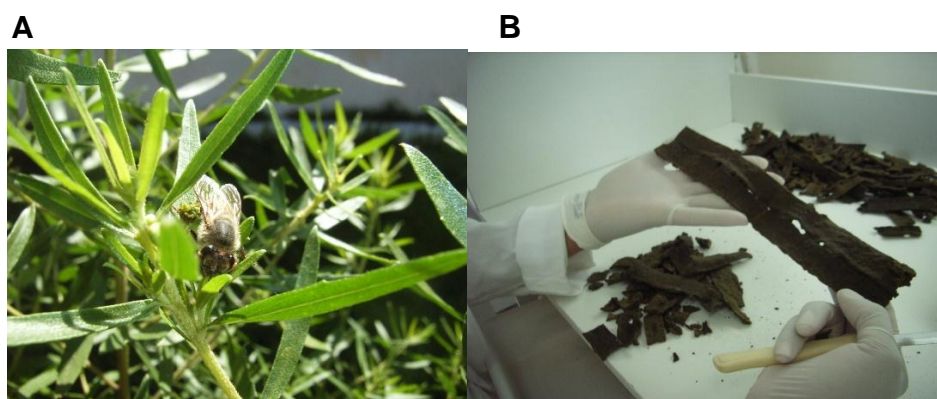


Figura 1: (A) *Apis mellifera* coletando própolis de *Baccharis dracunculifolia* para produção de própolis no Brasil. (B) e própolis verde *in natura*.
Fonte: Adaptado de Figueiredo et al., 2014.

Pippi et al. (2015) relataram que a própolis vermelha brasileira é uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de infecções relacionadas com *Candida* spp. resistente ao fluconazol. Muitos estudos demonstram a eficácia da própolis como adjuvante no tratamento de diversas enfermidades, entretanto há muitos compostos sendo descobertos que ainda precisam ter a sua eficácia comprovada. (De FIGUEIREDO et al., 2014).

Os mecanismos de como a própolis pode combater as leveduras do tipo *Candida* não estão bem elucidados (FERNANDES et al., 2007; BARBOSA et al., 2009). Alguns autores, como Pippi et al. (2015), sugerem a hipótese de que o mecanismo antifúngico da própolis brasileira sobre leveduras esteja relacionado à ação na parede celular do fungo. Esses autores destacam a necessidade de mais pesquisas para melhor compreensão do efeito da própolis sobre os biofilmes de *Candida* em dispositivos médicos, próteses, sobre células hospedeiras e ainda sobre os fatores de virulência (PIPPI et al., 2015).

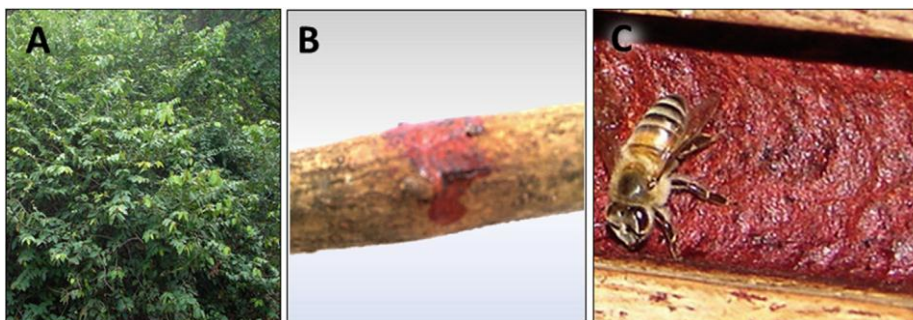


Figura 2: (A) origem botânica da própolis vermelha brasileira é *Dalbergia ecastophyllum*; (B) pigmentos de coloração intensamente coloridos proveniente da *Dalbergia ecastophyllum*, devido à presença de isoflavanas em sua composição química; (C) Abelhas *Apis mellifera* coletando exsudado vermelho da superfície de *D. ecastophyllum* para fabricar a própolis.

Fonte: Adaptado de Freires, Alencar e Rosalen, 2016.

2.2 *Candida* e infecções fúngicas

As leveduras e os fungos filamentosos pertencem à flora normal da mucosa e do esôfago, o que significa que crescem sem sinais aparentes e em equilíbrio com outros microrganismos, sem causarem qualquer problema. No entanto, fatores como, processos invasivos, práticas ineficientes de terapia antifúngica, resistência a antifúngicos e outros contribuem para a incidência de candidíase (LI, REDDING, DONGARI-BAGTZOGLU, 2007; GOMES et al., 2010; GARCIA-CUESTA, SARRION-PEREZ, BAGAN, 2014; SILVA et al., 2017). No Brasil, estes fatores são responsáveis por, aproximadamente, 80% das infecções fúngicas de pacientes em ambiente hospitalar (NAKAMURA, CALDEIRA, AVILA, 2013). A incidência de candidíase atinge 2,49 casos para cada mil internações hospitalares e 0,39 episódios por mil pacientes, diariamente. Este índice é superior aos valores observados nos Estados Unidos, Canadá, França, Itália, Espanha e outros países do primeiro mundo (RUIZ; RICHNI PEREIRA, 2016).

A candidíase é uma infecção ocasionada por leveduras oportunistas do gênero *Candida* spp. (TORTORA et al., 2005; SANTOLAYA et al., 2013). As principais manifestações clínicas são: candidíase cutânea e de mucosas, candidíase sistêmica e candidíase mucocutânea crônica. No primeiro caso, o que propiciaria o desenvolvimento da *Candida* nas regiões de mucosa e pele são fatores de risco relacionados ao HIV/Aids, estado gestacional, diabetes, crianças e idosos e traumatismos. Pode ocorrer também vulvovaginite, que tem como característica

corrimento e irritação na região vaginal (BROOKS, BUTEL, MORSE, 2000; JOHANN et al., 2008; HARTMANN et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Na candidíase sistêmica pode ter como causa, uso de catéter, uso exacerbado de medicação intravenosa, lesões da pele ou do sistema gastrointestinal. Pacientes imunocomprometidos poderão desenvolver lesões em vários órgãos, como rins, pele, coração, meninges, olhos. No caso de candidíase mucocutânea crônica, geralmente, esta surge na infância, relacionada com a imunodeficiência celular e endocrinopatia, originando infecções na pele ou na mucosa (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Nas infecções causadas por *Candida*, identificar a espécie é essencial, partindo-se do pressuposto que, a patogenicidade e a sensibilidade a cada tipo de antifúngico variam conforme a espécies (MOREIRA et al., 2017).

2.2.1. Tipos de *Candida* spp.

O gênero *Candida* é formado de, aproximadamente, 200 espécies de leveduras, que vivem como comensal no organismo humano (ALVARES, et al, 2007). As espécies de *Candida* mais importantes são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guillierimondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* (AKPAN, MORGAN, 2002).

C. albicans é naturalmente encontrada no trato gastrointestinal, na região oral e vaginal. No entanto, quando há alteração nos mecanismos de defesa do hospedeiro poderá ocorrer um comportamento patogênico dessa levedura. Esse processo envolve o deslocamento do fungo para o sistema sanguíneo, podendo atingir órgãos vitais, levando a patologias graves (PRIETO et al., 2014). Essa levedura tem a capacidade de ser polimórfica e isso facilita sua penetração nos tecidos e a fuga de fagócitos (JACOBSEN et al., 2012).

C. albicans é o patógeno fúngico mais comum dos seres humanos e é responsável por infecções superficiais e invasivas, e a grande parte de seus isolados são sensíveis a antifúngicos de uso sistêmico (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). O estudo dessa espécie, bem como seu comportamento é de interesse biológico, assim como importante para estudo de caso clínico. Em pacientes imunocomprometidos, o fungo pode levar o indivíduo à infecção disseminada e

sistêmica, levando à morte (De CASTRO et al., 2013). A característica marcante da morfologia de *C. albicans* é a sua habilidade para proliferar e formar pseudo-hifas ou hifas (SUDBERY, 2011; CALDERONE, CLANCY, 2012).

A *C. tropicalis* é a segunda levedura mais isolada em amostras biológicas (MENEZES, CUNHA, CUNHA, 2011). Apresenta maior toxicidade que a *C. albicans* em pacientes hematológicos, com complicações malignas e infecções disseminadas, levando a altos índices de mortalidade (VANDEPUTTE et al., 2005; BARBEDO, SGARB, 2010). Sua virulência está relacionada com sua aderência à mucosa, com formação de biofilme, poder de secretar lipases e proteinases e pela disseminação facilitada (RINALDI, 1993).

As leveduras *C. parapsilosis* podem ter formatos redondos, ovais ou cilíndricos. Não são formadoras de hifas verdadeiras e podem existir na forma de levedura ou em forma de pseudo-hifas (TROFA, GÁCSE, NOSANCHUK, 2008). Faz-se presente em candidemias de neonatos, transplantados ou portadores de cateteres intravenosos e próteses e, também é encontrada em mãos de profissionais da saúde (ALANGADEN, 2011).

A espécie *C. krusei* é encontrada em forma de leveduras e pseudo-hifas (SAMARANAYAKE, SAMARANAYAKE, 1994). Estão relacionadas com infecções em casos de neoplasias hematológicas, transplante medular e neutropenia (BRILLOWSKA-DĄBROWSKA; SINIECKA, 2012).

Já a *C. glabrata* é o segundo agente que mais causa infecções na corrente sanguínea, isso se deve ao elevado número de indivíduos imunossuprimidos e ao uso difuso de antimicóticos (BIALKOVA, SUBIK, 2006). É também o segundo agente causador de candidíase vulvovaginal (BARBEDO; SGARBI, 2010). Representa elevada patogenicidade entre idosos com câncer e pacientes em uso de fluconazol (ALANGADEN, 2011). Os fatores de virulência expressos por esse gênero de fungos facilitam sua patogenicidade, pois interferem na capacidade de aderir às células epiteliais e a biomateriais (ANDREOLA et al., 2016).

As leveduras do gênero *Cândida* reproduzem por brotamento, de forma assexuada, e apresentam capacidade tanto fermentativa quanto assimilativa, sendo assim, desenvolvem-se em um grande número de substratos orgânicos e meios de cultura. Essas leveduras crescem geralmente entre 18° e 45°C, sendo classificadas como mesófilas (KURTZMAN et al., 2010).

2.3. Tratamento

Os principais fármacos utilizados no tratamento de infecções por *Candida* spp. são divididos em quatro classes: azóis, polienos, pirimidinas e equinocandinas (COLOMBO, 2000; VIEIRA, SANTOS, 2017).

O grupo azólico tem como representantes os fármacos voriconazol, miconazol, clotrimazol, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, setoconazol, bifonazol, econazol, terconazol e posaconazol. Seu mecanismo de ação se dá através inibição das enzimas P-450, responsáveis pela síntese do ergosterol das membranas dos fungos. Possuem ação fungistática de amplo espectro e apresentam alto índice de resistência (URBAN et al., 2016).

Os polienos englobam os fármacos nistatina e anfotericina B. Eles possuem pouca solubilidade em água (URBAN et al., 2016). A anfotericina B foi isolada pela primeira vez em 1955 (FILIPPIN, SOUZA, 2006). Sua ação está relacionada com a ligação aos esteróis da membrana, principalmente o ergosterol. Isso resultará na formação de poros na membrana que modificarão a permeabilidade, levando à perda de componentes citoplasmáticos, como, sódio, potássio e outros, consequentemente causam a destruição do fungo (GABLER et al., 2008).

Como o ergosterol fúngico e o colesterol das células dos mamíferos são estruturas molecularmente parecidos, os antifúngicos tem dificuldades em diferenciá-los (FILIPPIN, SOUZA, 2006). Vários efeitos tóxicos podem surgir com a terapia com anfotericina B, destacando-se problemas renais que apresentam evidente gravidade e são muito frequentes (BROOKS et al., 2005).

As pirimidinas, por sua vez, são constituídas por flucitosina, cuja ação é inibir a síntese de DNA e RNA (URBAN et al., 2016). As equinocandinas, representadas por caspofungina, micafungina e anidulafungina, são peptídeos cíclicos ligados a um ácido graxo de cadeia longa. Esses fármacos atuam na síntese de glicanos (URBAN et al., 2016). São fármacos antifúngicos semissintéticos que levam ao rompimento da parede fúngica, por meio do estresse osmótico, lise e morte do fungo (ANTACHOPOULOS, WALSH, 2005). Essa classe de medicamento exerce efeito fungicida contra as espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SILVA et al., 2011), porém contra *C. parapsilosis* são menos eficazes (REBOLI et al., 2007).

Os antifúngicos sintéticos encontrados na indústria farmacêutica podem ser limitados, produzindo efeitos adversos nos pacientes, assim como o desenvolvimento de resistência patogênica, ocasionados pelo uso sem controle dos mesmos. Assim, é evidente a necessidade da inclusão de compostos antipatogênicos alternativos no mercado (OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2017).

Atualmente, tem sido descrito um crescente número de isolados clínicos resistentes aos fármacos antifúngicos comerciais (GONÇALVES et al., 2016). A ampliação da resistência a antifúngicos sinaliza a necessidade de criar estratégias que impeçam a sua disseminação entre os fungos (MENEZES, MENDES, CUNHA, 2009).

Diante do grande número de estudos *in vitro* sobre a ação antimicrobiana da própolis e de seus componentes, torna-se relevante avaliar as possíveis propriedades dos extratos da própolis no controle do desenvolvimento da candidíase. Pois, a própolis tem sido cada vez mais recomendada e prescrita por médicos e dentistas para o controle de candidíases, como por exemplo, em casos de vulvovaginite por *Candida* e candidíase oral (SANTOS et al., 2005; SANTOS, 2012).

Diversas atividades antimicrobiana de própolis estão sendo comprovadas através da ciência, destacando sua função antifúngica contra *Candida* spp. (FREIRE et al., 2016; BOISARD et al, 2015; QUINTERO-MORA et al., 2008; STEPANOVIC et al., 2003). Tal atividade pode ser explicada pela concentração de flavonoides, associada com compostos fenólicos, dando à própolis destaque como composto antifúngico. No entanto, a qualidade e a quantidade de cada um dependem de sua fonte, variando de região para região. Os vários estudos com as propriedades antimicrobianas e antifúngicas inerentes a própolis estão propiciando sua utilização nos setores industriais farmacêuticas e alimentares (NEDJI, LOUCIF, 2014).

2.4. Teste *in vivo* com larvas de *Tenebrio molitor*

Os testes usando insetos hospedeiros possuem vantagens ética, logística e econômicas sobre os modelos mamíferos (LI et al., 2013). Enquanto os EUA têm vários fornecedores comerciais de larvas de *G. mellonella*, o Brasil não tem nenhum,

forçando pesquisadores a manter suas próprias larvas experimentais. Isso aumenta custos de experimentos e requer uma pessoa responsável por sua manutenção.

Um inseto hospedeiro em ascensão é larva *Tenebrio molitor* (Coleoptera), praga de grãos armazenados (SCHROECKENSTEIN et al., 1990), cujas larvas são usadas para alimentação de animais de estimação, bem como aves (BARKER, FITZPATRICK, DIERENFELD, 1998).

A morbidade, mortalidade e carga econômica associada a infecções fúngicas, juntamente com o surgimento de cepas de fungos resistentes a agentes antimicrobianos atuais, são necessárias ampliar nosso entendimento de patogênese fúngica e descobrindo novos agentes para tratar essas infecções. Usando hospedeiros de invertebrados, pois eles podem ajudar a atingir esses objetivos. A resposta entre invertebrados e mamíferos faz com que o uso desses hospedeiros seja simples e eficaz e o método de triagem mais rápido para identificação de fatores de virulência fúngica e teste de compostos antifúngicos potenciais (ARVANITIS, GLAVIS-BLOOM e MYLONAKIS, 2013).

A fim de verificar a ação antifúngica dos experimentos *in vivo*, utilizam-se larvas de *Tenebrio molitor*, devido ao baixo custo e fácil manutenção em laboratório (VIVAN et al., 2002). Outra vantagem também apresentada por esse modelo alternativo é que a larva de *T. molitor* mantém-se a temperaturas que variam de 25°C a 37 °C, assemelhando-se com a temperatura corporal, isso torna as larvas interessantes aos estudos de patógenos (Li et al., 2013). As larvas, geralmente são alimentadas com dieta à base de farelo de trigo, por essa ser a mais utilizada para a sua criação (ZAMPERLINI et al., 1992).

Larvas de *T. molitor* têm sido usadas para estudar infecções por *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* e até 2015, não havia dados na literatura sobre a utilização das larvas como modelo de hospedeiro para fungos que causam patologias humanas (SOUZA et al., 2015).

3. OBJETIVOS DA PESQUISA

Geral

Avaliar a atividade *in vitro* e *in vivo* de extratos de própolis verde e vermelha contra espécies do gênero *Candida* spp

Específicos

Determinar a Concentração Inibitória Mínima de extratos e das cápsulas comerciais de própolis verde e vermelha contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e frente a 10 isolados clínicos de *C. albicans*;

Testar a capacidade dos extratos de própolis em inibir a adesão de *C. albicans* em células epiteliais bucais;

Avaliar a combinação entre os extratos com os melhores resultados de atividade antifúngica *in vitro* com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B;

Verificar a toxicidade dos extratos de própolis em *Tenebrio molitor*;

Verificar a atividade antifúngica dos extratos de própolis na sobrevivência de *T. molitor* infectados com *C. albicans*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de própolis

As amostras de Própolis Verde Brasileira (GrProp) e de Própolis Vermelha Brasileira (RdProp) e de cápsulas de GrProp utilizadas nos experimentos foram gentilmente fornecidas pela Pharmanectar® e pelo laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de fungos da UFMG.

Foram utilizadas para verificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da própolis verde na concentração (m/v) de: 28% (GrProp28), 20% (GrProp20), 50% (GrProp50), 100% (GrProp100) e da própolis vermelha à 25% (RdProp25). Utilizaram-se também duas cápsulas comerciais da mesma empresa nas concentrações de 28% (CAP28) e 50% (CAP50). Os controles de antifúngicos foram anfotericina B e fluconazol, sendo adquiridos da empresa Sigma® (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Para os testes de Concentração Inibitória Mínima contra *C. albicans* de isolados de paciente, no teste *in vivo*; teste de sinergismo com anfotericina B e fluconazol; no teste de Inibição da adesão de células bucais foram utilizados os extratos: GrProp28, GrProp50, GrProp100 e RdProp25.

4.2 Microrganismos

Foram utilizadas nesse trabalho 10 cepas de *Candida* spp., obtidas de isolados clínicos e codificadas como: UFMG-CM-Y6071, UFMG-CM-Y6072, UFMG-CM-Y6073, UFMG-CM-Y6074, UFMG-CM-Y6075, UFMG-CM-Y6076, UFMG-CM-Y6077, UFMG-CM-Y13, UFMG-CM-Y6081, UFMG-CM-Y6082 pertencentes à Coleção de Microorganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (UFMG-MG/Br). Também foram utilizadas nos experimentos leveduras padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC): *C. albicans* ATCC 18804 e SC5314, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 20298, *C. glabrata* ATCC 2001 e *C. parapsilosis* ATCC 22019.

4.3 Preparo do inóculo

Os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens de *Candida*, com crescimento em *Ágar Sabouraud Dextrose* (ASD), durante 24 horas, a 35°C e então, ressuspendidas em tubos contendo solução salina (0,9%) estéril. Utilizando comprimento de onda de 530 nm, a transmitância dos inóculos foi ajustada para 73-75%, o que corresponde a 1×10^6 a 5×10^6 células/mL. Logo, este inóculo inicial foi diluído em RPMI (*Roswell Park Memorial Institute* 1640) (Sigma®) acrescido de ácido 3- (N-morfolino) propanossulfônico (MOPS) 0.165 mol/L, numa proporção de 1:50. Esta solução foi diluída, na proporção de 1:20, gerando uma suspensão contendo 1×10^3 a 1×10^5 células/mL. Este procedimento está de acordo com o protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008).

4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de extratos e das cápsulas comerciais de própolis verde e vermelha contra *Candida* spp.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada contra as espécies de *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) de acordo com protocolo M27-A3 estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* - CLSI (CLSI, 2008). Os extratos de própolis GrProp28, GrProp20, GrProp50, GrProp100, RdProp25 e duas cápsulas comerciais CAP28 e CAP50, foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%, em seguida, realizou-se diluições seriadas em meio RPMI 1640 (Sigma®). Utilizando microplacas de 96 poços; distribuiu-se 200 µL de cada diluição. Para o controle de crescimento utilizou-se 100 µL do inóculo da levedura mais 100 µL de RPMI, para o controle de esterilidade usou-se o meio de cultura (Figura 3). Conforme demonstrado na Tabela 2, as faixas intervalares de concentrações nos extratos e substâncias sintéticas foram: GrProp20 (800 – 1,56 µg/mL); GrProp28 e CAP28 (1120 – 2,19 µg/mL); GrProp50 e CAP50 (2000 – 3,9 µg/mL); RdProp25 (1000 – 1,95 µg/mL); GrProp100 (4000 – 7,81 µg/mL). O fluconazol e a anfotericina B, foram os controles positivos dos antifúngicos, tendo suas faixas intervalares entre 64 – 0,125 µg/mL e 8 – 0,0015µg/mL, respectivamente. Realizada a etapa de preparo das placas, todos os

poços das diluições e controles, com exceção do controle negativo, receberam 100µL de inóculo de *Candida* spp. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e tiveram 3 repetições (Figura 3). As placas foram incubadas por 48 horas e sua leitura realizada, sendo que a CIM foi considerada como a inibição de pelo menos 50% do crescimento quando comparado ao grupo controle. Para a leitura do fluconazol considerou-se inibição de 80% do crescimento em relação ao controle e para anfotericina B, considerou-se uma inibição de 100%.

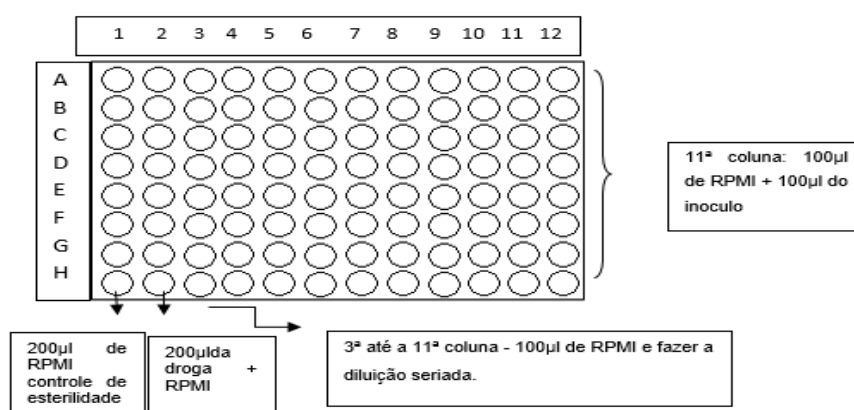


Figura 3: Esquema de microdiluição dos extratos e substâncias testadas

Para melhor visualização amostras de própolis e respectivas concentrações utilizadas nos testes de atividade contra *Candida* spp, criou-se a tabela abaixo:

Tabela 2: Amostras de própolis e respectivas concentrações utilizadas nos testes de atividade contra *Candida* spp.

Amostra	Faixa de concentração (µg/mL)
GrProp20	800 – 1,56
GrProp28 e CAP28	1120 – 2,19
GrProp 50 e CAP50	2000 – 3,90
RdProp25	1000 – 1,95
GrProp100	4000,00 – 7,81
Fluconazol*	64,00 – 0,125
Anfotericina B*	8,00 – 0,0015

* Antifúngicos utilizados como padrão positivo.

As leituras de determinação de ponto final foram realizadas visualmente com base na comparação do crescimento nos poços contendo os extratos diluídos com o do controle do crescimento. Para a combinação, o CIM foi definido como a concentração mais baixa mostrando inibição de crescimento proeminente (uma queda no crescimento correspondente a, aproximadamente, 50% do controle do crescimento).

4.5 Capacidade dos extratos de própolis em inibir a adesão de *C. albicans* em células epiteliais bucais

Os extratos utilizados nesse teste contra *C. albicans* SC 5314, foram, própolis verde 28% (GrProp28), 50% (GrProp50) e 100% (GrProp100) e própolis vermelha à 25% (RdProp25). As substâncias sintéticas foram anfotericina B e fluconazol. Repicou-se as leveduras em Ágar Sabouraud 24 hs antes do experimento, em seguida dissolveu-se os extratos em DMSO (conforme CLSI). O fluconazol foi dissolvido em solução salina.

As Células Endoteliais Buciais (CEB) de pessoas saudáveis foram coletadas com auxílio de um swab e preservadas em 10mL de tampão fosfato, as células foram lavadas 4 vezes em PBS esterilizado para a remoção de microrganismos aderidos. As CEB foram suspensas em uma concentração de 10⁵ células/mL.

Realizou-se uma suspensão das *C. albicans* SC 5314 com 70% de transmitância em comprimento de onda de 530 nm. Dessa suspensão de leveduras, adicionou-se 1 mL a tubos contendo 4 mL de caldo Sabouraud (controle) e em tubos com 4 mL de caldo mais a solução dos extratos 10⁶ a 10⁷ células/mL). Os tubos foram incubados a 37°C por uma hora. Em seguida foi realizada a lavagem para remoção dos tratamentos. Para isso, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, repetiu-se essa etapa com PBS Esterilizado e foram adicionados 3 mL de caldo Sabouraud.

Preparou-se uma mistura de 0,5mL da suspensão de CEB e 0,5 mL da suspensão de leveduras delicadamente. Logo após foi incubado sob agitação a 37°C por uma hora. Essa mistura foi filtrada adicionando 100 mL de PBS para remoção das leveduras não aderidas.

O material aderido no filtro foi pressionado em lâmina de vidro, em seguida, seco, fixado e corado com cristal violeta. Esse processo foi realizado para possibilitar a contagem, em microscópio óptico, do número de leveduras aderidas a 50 CEB.

4.6 Avaliação da combinação entre extratos de própolis com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B

Foram preparadas 7 diluições seriadas dos produtos experimentais GrProp28, GrProp50, GrProp100 e RdProp25 e a faixa intervalar foi escolhida de acordo com os resultados encontrados no ensaio da CIM. Também foram preparadas 7 diluições do fluconazol e da anfotericina B (Sigma[®]). Posteriormente, 50 µL de cada diluição dos extratos foram adicionadas nas placas de 96 poços em orientação vertical e, 50 µL das diluições do fluconazol foram adicionadas em posição horizontal. Assim sendo, cada placa apresentou várias combinações de concentrações da substância a ser testada com fluconazol. O mesmo procedimento foi realizado em combinação com anfotericina B. O inóculo foi preparado de acordo com o item 2.2 e 100 µL foram adicionados às placas, as quais foram incubadas a 35°C por um período de 48 horas. A concentração inibitória fracional (CIF) foi calculada pela combinação da CIM da substância com anfotericina B (ou fluconazol) dividida pela CIM da substância sozinha e da CIM da anfotericina B (ou fluconazol) sozinha. O índice de CIF (ICFI) foi calculado pela soma das CIFs da anfotericina B e da substância experimental. Valores de ICFI $\leq 0,5$ indicam interação sinérgica; valores $>0,5$ até 4,0 ausência de interação e $>4,0$ indica antagonismo (CUENCA-ESTRELLA, 2004). Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata, com o isolado SC5314 de *C. albicans*.

4.7 Ensaio de toxicidade de própolis em *Tenebrio molitor*

A fim de verificar as concentrações de extratos de própolis a serem trabalhados no teste *in vivo* com invertebrados, dez larvas por grupo de *Tenebrio molitor* com

peso e tamanho similares (aproximadamente 200 mg) e sem manchas foram utilizadas num ensaio de toxicidade. Foram formados quatro grupos que receberam as dosagens de extratos de própolis estabelecidas: 1mg/Kg, 3mg/Kg, 5mg/Kg e 10mg/Kg. Além desses, foram incluídos grupos controles: um controle de trauma físico que recebeu a injeção com apenas PBS e o outro que não recebeu injeção como um controle para a viabilidade geral. Após as injeções, as larvas foram transferidas para uma placa de Petri e incubadas no escuro a 37°C. A sobrevivência foi monitorada diariamente e as larvas mortas eram removidas da placa. Foram realizados dois experimentos independentes.

4.8 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos de própolis em larvas de *Tenebrio molitor*

Foi utilizado o isolado de referência *C. albicans* SC5314, repicado com 24hs de antecedência, na infecção das larvas de *T. molitor*. As larvas foram inoculadas com o patógeno de interesse, usando uma seringa de Hamilton (701 N, calibre 26). A inoculação foi obtida por injeção do inóculo na segunda ou terceira esternite visível acima das pernas no ventre. As larvas receberam injeções com 10 µL de inóculo preparado em PBS resultando em 1×10^5 leveduras/larva.

Para cada extrato foram utilizados 7 grupos de 12 larvas de *Tenebrio molitor*, sendo 1 grupo controle de viabilidade, 1 grupo controle de traumas que recebeu PBS estéril, 1 grupo não infectado que recebeu o extrato de própolis verde na dose de 5mg/kg, 1 grupo não infectado que recebeu o extrato de própolis verde a 10mg/Kg, 1 grupo infectado que recebeu apenas PBS, 1 grupo infectado que recebeu tratamento com o extrato de própolis verde à 5mg/Kg e 1 grupo infectado que recebeu tratamento com o extrato de própolis verde à 10mg/Kg. Foi realizado o mesmo procedimento para a própolis vermelha. As larvas foram então incubadas a 37°C em placas de Petri e o número de larvas mortas foi registrado diariamente durante 10 dias. Para estabelecer a morte das larvas, observou-se resposta a estímulos físicos por suaves toques. Foram realizados 2 experimentos independentes utilizando 12 larvas por grupo.

4.9 Análises estatísticas

Para avaliar a diferença estatística entre os grupos do teste de Adesão de células epiteliais bucais, utilizou-se o teste Newman-Keuls e ANOVA one-way.

Para os testes de Sobrevivência em *Tenebrios*, os resultados foram analisados com Graph Pad Prism 5, dispostos em uma curva de sobrevivência usando o método de Kaplan-Meier e a análise estatística foi realizada usando o teste log-rank. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

No teste de CIM, observa-se que o extrato GrProp28 foi capaz de inibir o crescimento fúngico de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Porém este extrato não foi ativo contra *C. tropicalis* nas condições testadas (Tabela 3). O extrato GrProp20 se destacou como um dos menores CIM encontrados de 500µg/mL contra *C. albicans* SC5314. As cápsulas comerciais de GrProp (CAP28 e CAP50) apresentaram melhores resultados contra *C. krusei* com CIM de, aproximadamente, 500µg/mL. A CAP50 se destacou por apresentar atividade também contra *C. glabrata* (250 µg/mL) (Tabela 3).

A GrProp100 apresentou atividade contra todas as espécies testadas, mas, no entanto, os valores de CIM não foram os menores encontrados, estes variaram entre 500-2000 µg/mL. Já a RdProp25 inibiu o crescimento de, no mínimo, 50% de todas os fungos testados, apresentando o melhor resultado. (Tabela 3).

Quanto aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol, observou-se que a anfotericina B inibiu 100% do crescimento fúngico nas concentrações 0,5 µg/mL (*C. albicans*) e 2 µg/mL (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*), porém todas as leveduras testadas apresentaram resistência ao fluconazol com CIM igual ou maior que 64 µg/mL (Tabela 3).

Tabela 3. Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL de extratos, cápsulas de própolis verde e vermelha e substâncias capazes de inibir no mínimo 50% do crescimento de *Candida* spp.

Extrato (µg/mL)	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
GrProp	560	1120	1120	1120	>1120
GrProp20	500	>800	800	>800	>800
CAP28	>1120	>1120	560	>1120	>1120
CAP50	>2000	250	500	>2000	>2000
GrProp50	>2000	125	1000	2000	>2000
RdProp25	500	125	250	1000	1000
GrProp100	1000	1000	500	2000	1000
AnfoB	0,5	2	2	2	2
Fluconazol	64	64	64	>64	>64

Legenda: GrProp28= Extrato de própolis verde à 28%, GrProp20 = Extrato de própolis verde à 20%, CAP28 = Cápsula de própolis verde à 28%, CAP50 = Cápsula de própolis verde à 50%, GrProp50 = extrato de própolis verde à 50%, RdProp25 = Extrato de própolis vermelha à 25%, GrProp100 = Extrato de própolis verde à 100%, Anfo B= anfotericina B, >=máxima concentração dos extratos testada e não ocasionou inibição do inóculo.

5.1.2 Teste de Concentração Inibitória Mínima contra isolados clínicos de *C. albicans*.

A eficácia dos extratos de própolis verde e vermelha em isolados de pacientes foi realizado por meio da CIM contra doze (12) microorganismos, sendo dez isolados de pacientes e mais duas leveduras padrão, pertencentes à Coleção de microorganismos e células da UFMG-MG/BR.

No ensaio da CIM, o extrato GrProp28 foi capaz de inibir em, no mínimo, 50% do crescimento fúngico de 11 dos 12 (92%) isolados em teste, porém para o isolado UFMG-CM-Y6075, seria necessária uma concentração maior que 1120 µg/mL. O extrato GrProp50 comprovou ação antifúngica contra 11 (92%) dos isolados clínicos com concentrações variando entre 500-1000 µg/mL. No experimento com o extrato GrProp100, percebeu-se que esse desempenhou inibição de no mínimo 50% em de 11 (92%) dos isolados, apresentando valores de CIM entre 1000-4000 µg/mL. Dos isolados verificados, três (UFMG-CM-Y6074, UFMG-CM-Y6075, UFMG-CM-Y6076)

não tiveram inibição do crescimento quando tratados com extrato de própolis vermelha à 25% (GrProp 25). No entanto esse extrato foi capaz de inibir o crescimento dos isolados de *Candidas* (UFMG-CM-Y6071, UFMG-CM-Y6082, UFMG-CM-Y6081, UFMG-CM-Y6072, UFMG-CM-Y6073, UFMG-CM-Y6077, UFMG-CM-I13) e contra as cepas padrões *SC5314 E ATCC 18804*, o que não ocorreu utilizando o fluconazol (Tabela 4).

Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima de extratos de própolis e substâncias capazes de inibir no mínimo 50% do crescimento dos isolados clínicos

ISOLADOS	Extratos e substâncias					
	GrProp28 (µg/mL)	GrProp50 (µg/mL)	RdProp25 (µg/mL)	GrProp100 (µg/mL)	AnfoB (µg/mL)	Fluco (µg/mL)
UFMG-CM -Y6071	560	1000	1000	1000	0,5	>64
UFMG-CM -Y6082	560	1000	500	2000	0,25	>64
UFMG-CM -Y6081	1120	>2000	500	4000	0,25	>64
UFMG-CM -Y6072	560	2000	1000	2000	2	>64
UFMG-CM -Y6073	560	2000	500	2000	2	>64
UFMG-CM -Y6074	560	2000	> 1000	2000	0,25	16
UFMG-CM -Y6075	560	1000	> 1000	2000	0,25	>64
UFMG-CM -Y6076	>1120	2000	> 1000	> 4000	2	16
UFMG-CM -Y6077	1120	1000	1000	2000	0,25	>64
UFMG - I13	560	1000	1000	2000	0,25	>64
SC 5314	560	1000	1000	1000	0,5	>64
ATCC 18804	560	500	500	1000	0,5	64

Legenda: ATCC- *American Type Culture Collection*. GrProp28= Extrato de própolis verde à 28%, GrProp50 = Extrato de própolis verde à 50%, RdProp25 = Extrato de própolis vermelha à 25%, GrProp100 = Extrato de própolis verde à 100% em micrograma/mililitro (µg/mL).

5.2 Teste para verificação da capacidade dos extratos de própolis em inibir a adesão da *C. albicans* em células epiteliais bucais

Nesse teste a levedura SC5314 foi previamente exposta aos extratos de própolis por 1 hora, posteriormente, lavada e, então foram colocadas em contato com as células bucais. No tratamento com a própolis vermelha (RdProp25) observou-se houve maior inibição fúngica aderidas em células epiteliais bucais (78%), quando comparada ao fluconazol (70%) e se aproxima da inibição ocasionada por anfotericina B (82%), contra *C. albicans* SC5314 em células epiteliais bucais humanas (Figura 4.). Em seguida, a GrProp100 apresentou taxa de inibição fúngica semelhante ao fluconazol (70%). A faixa de concentração dos extratos de própolis verde (GrProp28 e GrProp50) apresentaram inibição fúngica em células epiteliais bucais com menor intensidade, ou seja, de 60% e 45%, respectivamente. Todos os extratos testados tiveram poder inibitório igual ao fluconazol e a anfotericina B, não havendo diferença significativa entre o tratamento com os extratos em relação à anfotericina B e ao fluconazol.

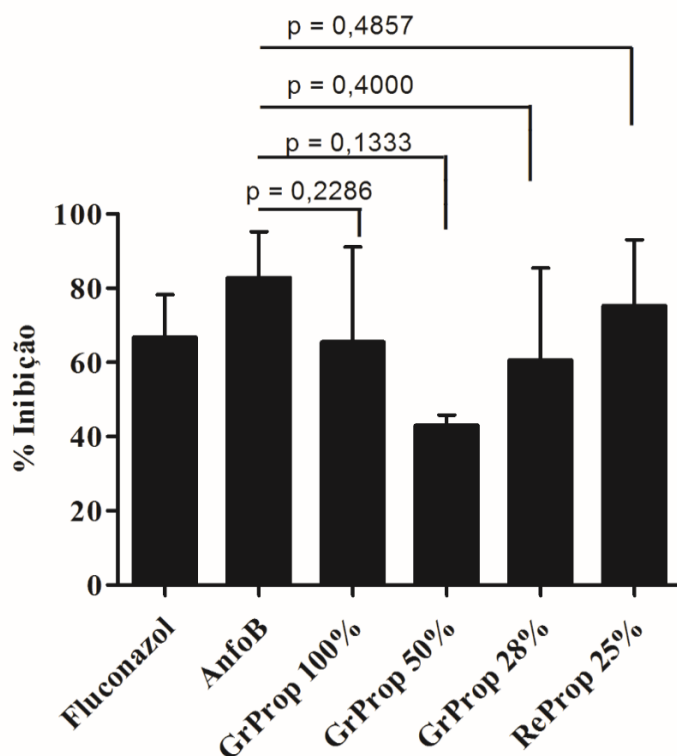


Figura 4. Porcentagem de inibição de *Candida albicans* SC5314 em células epiteliais bucais humanas. **Legenda:** Não houve diferença significativa quando foram comparados os efeitos inibitórios utilizando a própolis e a anfotericina ($p > 0,05$) e utilizando a própolis e o fluconazol ($p > 0,05$).

5.3 Teste de combinação entre os extratos com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B

Quando os extratos de própolis GrProp100, GrProp50, GrProp28 e RdProp25 foram testados em combinação com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol, observamos que todos os extratos testados apresentaram sinergismo com os antifúngicos testados, com valores de ICIF menores que 0,5. Com destaque para o extrato GrProp 50 com os menores valores de ICIF de 0,0625 para fluconazol e de 0,09125 para a anfotericina B.

TABELA 5. Índice da Concentração Inibitória Fracional (ICIF) de extratos de própolis verde e vermelha em combinação com fluconazol e anfotericina B contra *Candida albicans* SC5314.

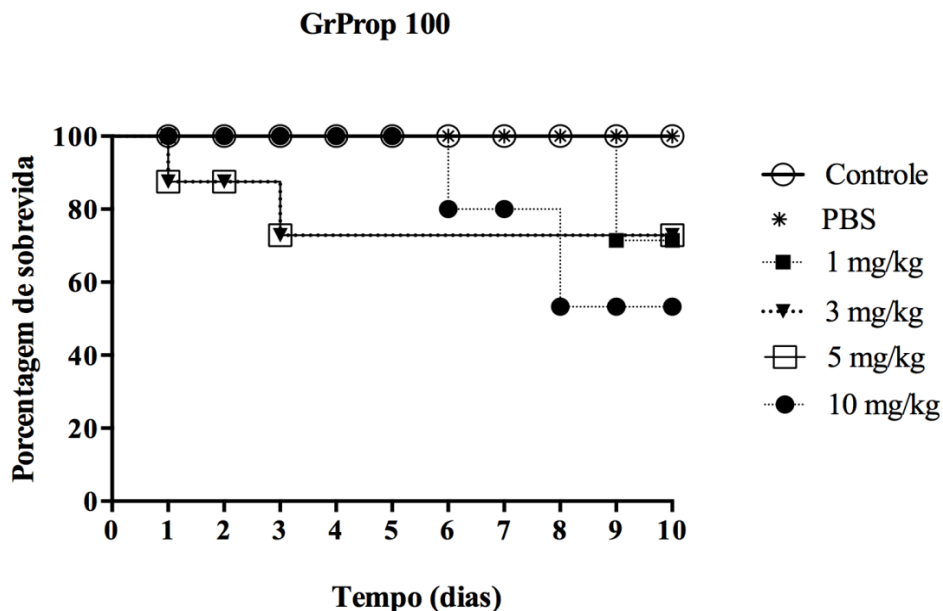
	Combinação (Índice CIF)			
	Fluconazol	Interação	Anfotericina B	Interação
GrProp100	0,15625	Sin.	0,185	Sin.
GrProp28	0,0625	Sin.	0,1225	Sin.
GrProp50	0,0625	Sin.	0,09125	Sin.
RdProp25	0,09375	Sin.	0,1225	Sin.

Legenda: Sin = Sinergismo (ICIF < 0,5).

5.4 Verificação da toxicidade das substâncias e sobrevida com larvas *Tenebrio molitor*.

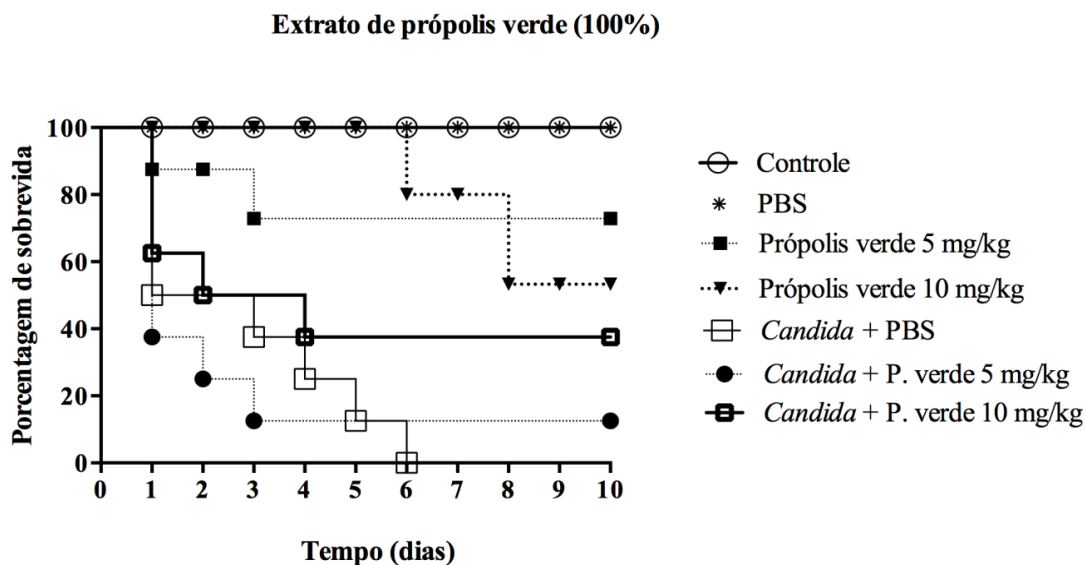
Neste experimento foi, primeiramente, realizada a verificação de qual dosagem da própolis poderia oferecer toxicidade as larvas de *T. molitor* (Figura 5). Observou-se, na figura abaixo, que as concentrações 1, 3 e 5 mg/Kg de GrProp100 as larvas tiveram uma sobrevida de mais de 70% até o décimo dia observado. No entanto, a dose de 10 mg/Kg do extrato GrProp100 apresentou uma queda de sobrevida para 53%.

Figura 5: Teste de toxicidade de própolis em larvas de *Tenebrio molitor* com própolis verde à 100% (GrProp100) nas dosagens de 1,3, 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevida em relação ao tempo em dias.



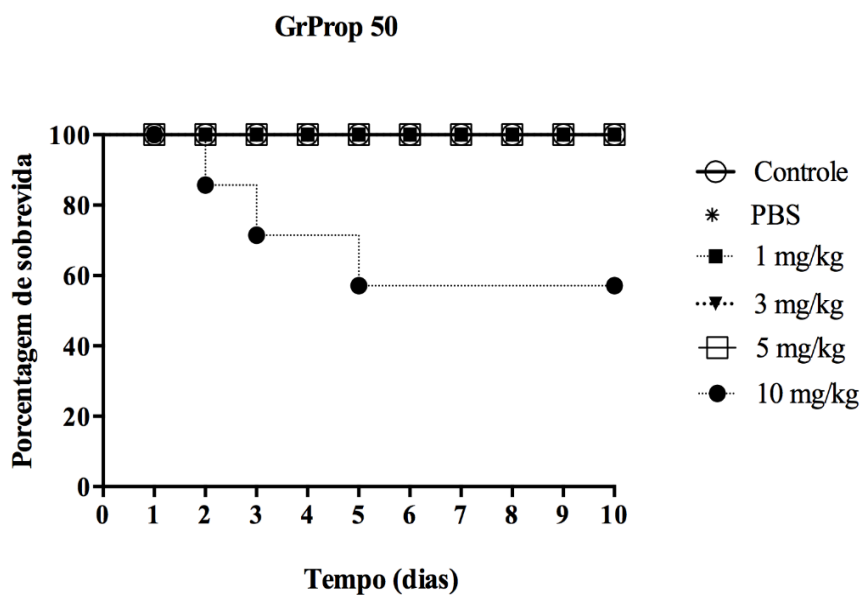
A partir dos resultados de toxicidade acima apresentados utilizamos os extratos de própolis GrProp28, GrProp50, GrProp100 e RdProp25 nas dosagens de 5 e 10mg/Kg, para se observar se ocorria um aumento da sobrevida das larvas tratadas com este extrato e infectadas com *C. albicans* SC5314. Observa-se na Figura 6 que as larvas infectadas e tratadas com própolis verde na dose de 5 mg/Kg apresentaram aumento da sobrevida de 10% do 3º ao 10º dia em relação ao controle de infecção (larvas infectadas e tratadas somente com PBS). Em contrapartida, as larvas infectadas que receberam 10mg/Kg de GrProp100 obtiveram um aumento na sobrevida de, aproximadamente, 37% do 4º ao 10º dia.

Figura 6: Teste com larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com 1×10^5 leveduras *C. albicans* SC5314 e tratadas com própolis verde à 100% com 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevivência em relação tempo em dias.



No tratamento com extrato GrProp50, observou-se que quando se administrou 1, 3 e 5mg/Kg do extrato não houve morte das larvas até 10^o dia analisado, equiparando-se aos grupos controle com 100% de sobrevivência, porém na aplicação da dosagem de 10 mg/Kg, a sobrevivência foi em torno de 57% do 5 – 10^o dia (Figura7).

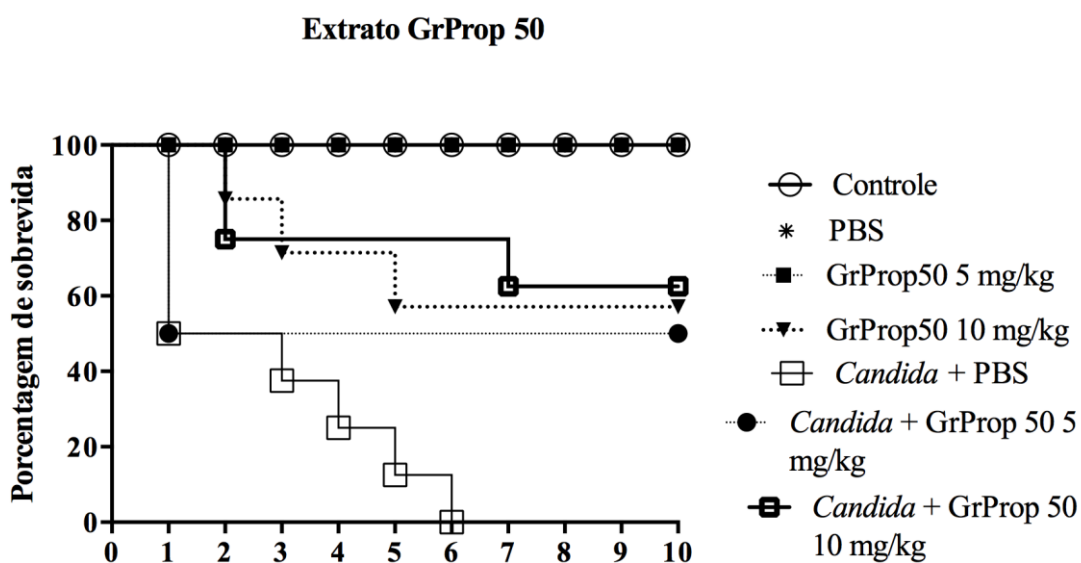
Figura 7: Teste de toxicidade de própolis em larvas de *Tenebrio molitor* com própolis verde à 50% (GrProp500) com 1,3, 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevivência em relação tempo em dias.



No tratamento com *Candida* mais 5mg/Kg de GrProp50, a sobrevivência ficou estabilizada em torno de 50% do 1^o ao 10^o dia, logo para tratamento com *Candida*

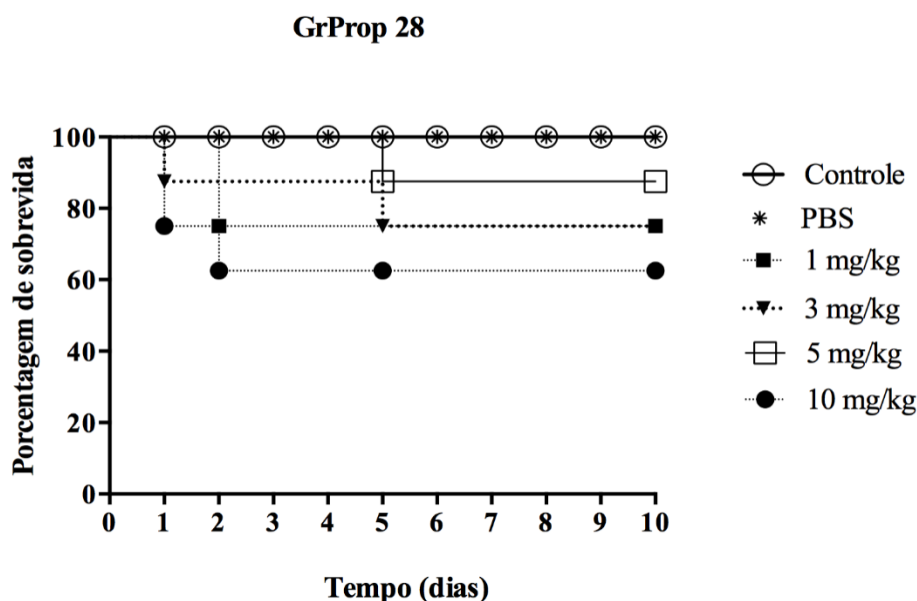
mais 10mg/Kg de própolis, as larvas mantiveram uma sobrevivência de cerca de 62% entre 7-10º dia, quando comparado com o controle, que já não sobreviviam no 6º dia todas (Figura 8).

Figura 8: Teste com larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com 1×10^5 leveduras *C. albicans* SC5314 e tratadas com própolis verde à 50% (GrProp50) com 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevivência em relação tempo em dias.



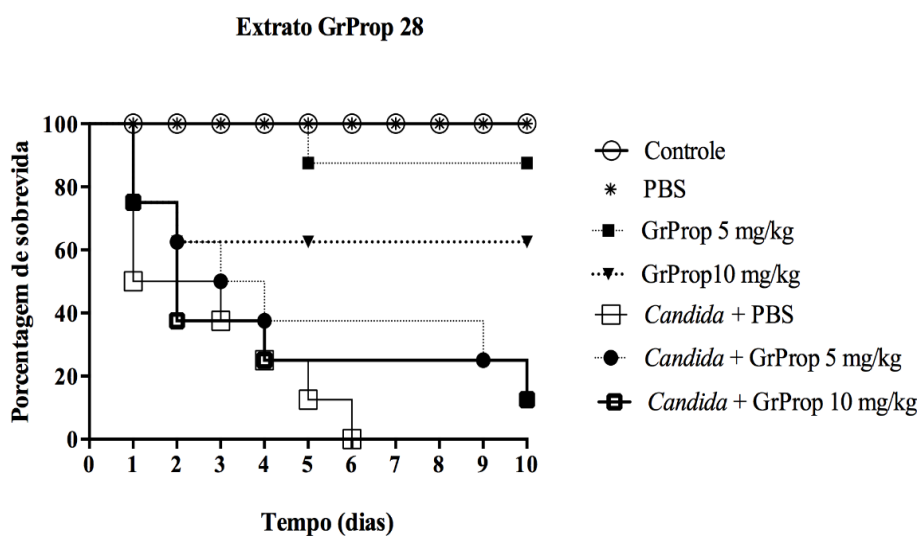
As larvas que receberam o GrProp28 na dosagem de 10mg/Kg, obtiveram uma sobrevivência constante em torno de 65% do 2-10º dia, no grupo que recebeu 5mg/Kg a sobrevivência foi cerca de 90% do 5-10º dia. Porém os grupos que receberam 1 e 3 mg/Kg de GrProp28, tiveram uma sobrevivência em cerca de 75% (Figura 9).

Figura 9: Teste de toxicidade de própolis em larvas de *Tenebrio molitor* com própolis verde à 28% (GrProp28) com 1,3, 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevivida em relação tempo em dias.



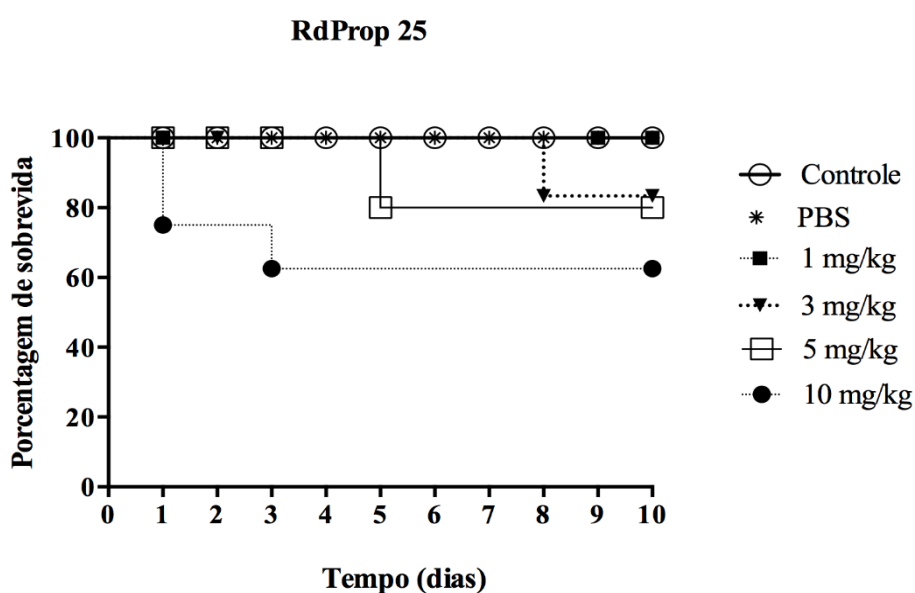
Quando foi adicionado ao experimento o inóculo e PBS todas as larvas morreram no 6º dia (sobrevida zero). As larvas que receberam *Candida* mais 5mg/Kg de extrato de própolis sobreviveram até o 9º dia com uma porcentagem de 25%, equiparando seu efeito com a aplicação de 10mg/Kg do extrato de própolis GrProp28 do 4º ao 10º dia (Figura 10).

Figura 10: Teste com larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com 1×10^5 leveduras *C. albicans* SC5314 e tratadas com própolis verde à 28% (GrProp28) com 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevivida em relação tempo em dias.



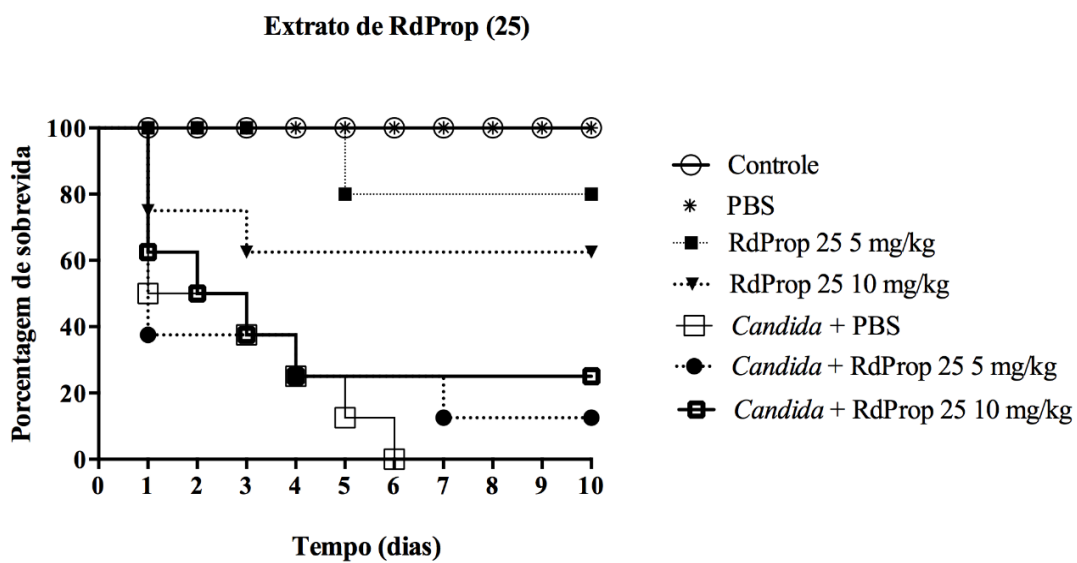
Por meio do Figura 11, infere-se que os *T. molitor* que receberam a aplicação de RdProp25 na dosagem de 10mg/Kg apresentaram sobrevida do grupo cerca de 62%. No entanto a sobrevida para os que receberam dosagem 5mg/Kg foi maior, ficando em torno de 80% do 5-10º dia, já os que receberam 1 e 3mg/Kg mantiveram sobrevida acima de 80%.

Figura 11: Teste de toxicidade de própolis em larvas de *Tenebrio molitor* com própolis vermelha à 25% (RdProp25) com 1,3, 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevida em relação tempo em dias.



Observa-se que o grupo que recebeu a levedura mais o extrato RdProp25 a 10mg/Kg manteve uma diferença de sobrevida em torno de 10% em relação às larvas que foram tratadas com a levedura mais o extrato RdProp25 com 5mg/Kg, já os *T. molitor* que receberam RdProp25 a 1 e 3mg/Kg, tiveram sobrevida superior à 82% (Figura 12).

Figura 12: Teste com larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com 1×10^5 leveduras *C. albicans* SC5314 e tratadas com própolis vermelha à 25% (RdProp25) com 5 e 10mg/Kg, porcentagem de sobrevivida em relação tempo em dias.



6. DISCUSSÃO

Após avaliar a atividade *in vitro* e *in vivo* de extratos de própolis verde e vermelha contra espécies do gênero *Candida* spp., pode-se observar que a determinação a Concentração Inibitória Mínima dos extratos e das cápsulas de própolis verde e vermelha contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusey*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* frente a maioria dos isolados clínicos apresentou poder inibitório neste estudo, assim como em estudos descritos por Stepanovic et al., 2003; Quintero-Mora et al., 2008; Boisard et al., 2015; Freire et al., 2016. Além disso, nossos resultados também expressam inibição similar à anfotericina B ($p > 0,05$) no crescimento *C. albicans* pelas própolis testadas na adesão de células bucais.

Neste estudo, houve cepa que apresentou resistência ao fluconazol (Tabela 3), pois a resistência é caracterizada por uma CIM $\geq 64 \mu\text{g/mL}$. Dado interessante a ser destacado em comparação às própolis testadas.

Diversas atividades antimicrobianas da própolis estão sendo evidenciadas por meio da ciência, destacando sua função antifúngica contra *Candida* spp. (FREIRE et al., 2016; BOISARD et al., 2015; QUINTERO-MORA et al., 2008; STEPANOVIC et al., 2003). Conforme salienta Dantas Silva e colaboradores (2017), tal atividade pode ser explicada pela concentração de flavonoides, associada com compostos fenólicos, dando à própolis destaque como composto antifúngico. No entanto, a qualidade e a quantidade de cada um, depende de sua fonte, variando de região para região. Os vários estudos com as propriedades antimicrobianas e antifúngicas inerentes a própolis estão propiciando sua utilização nos setores industriais farmacêuticas e alimentares (NEDJI, LOUCIF, 2014; DANTAS SILVA et al., 2017).

As cápsulas CAP28, CAP50 e o extrato de própolis GrProp50 não apresentaram inibição do inóculo testado (Tabela 3). Dantas de Almeida et al. (2012) justificam que quando há resultados controversos diante de leveduras de mesma espécie, esse se deve à presença de diferentes fatores de virulência, outra justificativa seria a diferença fenotípica das espécies, em que, a resposta frente a utilização de própolis pode ser diferente, conforme observado no presente ensaio.

Em relação à Concentração Inibitória Mínima, foi constatado que a partir da concentração $125 \mu\text{g/mL}$ e $500 \mu\text{g/mL}$ de própolis RdProp25 e GrProp100, respectivamente, houve inibição de crescimento fúngico após o período de incubação de 48 horas. Ao estudar extratos etanólicos de própolis verde de distintas

regiões brasileiras, Ota et al. (2001) obtiveram as concentrações mínimas fungicidas de 3800 µg/mL em *C. albicans* e 9000 µg/mL em *Candida spp.*, respectivamente. Comparado a esses dados, percebe-se que os resultados obtidos nesse trabalho são significativos. Isso pode ser devido ao tipo de própolis estudado, pois em cada região as concentrações dos princípios ativos presentes nas própolis são diferentes, Uma vez que, a própolis verde e vermelhas possuem princípios ativos que se destacam em diversas pesquisas já realizadas (ALENCAR et al., 2007; FIGUEIREDO et al, 2015, FREITAS et al., 2018)

Herrera et al. (2010), demonstraram que 6 tipos de própolis comerciais analisados demonstraram atividade antifúngica contra *Candida spp*, variando apenas no valor da CIM entre 278 µg/mL para *C. albicans* e 117 µg/mL para *C. glabrata*. Esses autores salientam que muitas vezes é difícil comparar estudos, devido à variedade de metodologia empregada em cada experimento.

Mani et al. (2006) estudaram amostras de própolis encontradas no Sudeste do Brasil por Cromatografia Gasosa, revelando que seus principais componentes foram compostos fenólicos, di e triterpenos e óleos essenciais. Os autores afirmam que os flavonoides das própolis brasileira estão presentes em pequenas quantidades, sugerindo que suas várias atividades estão relacionadas a seus diferentes constituintes, variando com a estação, origem botânica e geográfica, principalmente, no caso da própolis verde e vermelha, com é o caso deste estudo.

Nesse trabalho ao efetuar as CIMs contra os 10 isolados clínicos e 2 cepas padrão (ATCC 18804 e SC 5314), observou-se grande número de isolados inibidos pelas própolis, corroborando com os estudos de Longhini et al. (2007), que também mostraram em seus experimentos resultados promissores da própolis como antifúngico contra 67 leveduras de interesse clínicos e uma cepa padrão ATCC 90028.

Nos testes *in vitro* com própolis vermelha observou-se inibição de todas as cepas padrão testadas (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. Krusey*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*), esses resultados corroboram com os trabalhos de Junior et al. (2012), e Das Neves et al. (2016), os quais comprovaram a ação antifúngica da própolis vermelha em 100% das cepas de leveduras testadas.

A própolis também pode demonstrar efeitos sinérgicos com antimicrobianos e sua associação a drogas comerciais é uma área interessante para o

desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (SFORCIN e BANKOVA, 2011). Essa informação vem de encontro com os achados desse estudo, onde pode ser verificada a ação sinérgica, tanto da anfotericina B com as amostras de própolis GrProp100, GrProp28, GrProp50 e RdProp25, como com o fluconazol. Pippi et al. (2015) estudaram a própolis vermelha e observaram que ela pode ter alguns efeitos sinérgicos importantes quando usado em combinação com drogas antimicrobianas.

Amparados pelas pesquisas de Pereira (2016), e Santos et al. (2016) que sugerem a combinação dos extratos de própolis com antimicrobianos sintéticos possa levar a redução da dosagem clínica de determinados fármacos. Dessa forma, pode-se reduzir a incidência de eventos colaterais, ao mesmo tempo em que potencializa a terapia medicamentosa no tratamento de infecções nas quais a resistência é determinante. Além disso, há um amplo campo de ação, pois a própolis pode ter efeitos sinérgicos importantes quando usado em combinação com drogas antimicrobianas (ORSI et al, 2012).

Nossos resultados expressaram significativa ação das própolis testadas em inibir *C. albicans*, pois não houve diferença estatística com anfotericina B em todos os testes realizados ($p > 0,05$), ou seja, verificou-se inibição similar à anfotericina B quando comparado o crescimento *C. albicans* pelas própolis na adesão de células bucais (Figura 4). O mecanismo deste fato não foi estudado, mas sugere-se que no processo de adesão às células epiteliais, a produção de proteinase pode elevar a capacidade de colonizar e penetrar no tecido do hospedeiro, destruindo seu sistema imune (KANTARCIOGLU e YUCEL, 2002). Então, enzimas como fosfolipases, penetram na célula do hospedeiro, aumentando a adesão às células epiteliais, conseqüentemente, ocorre a invasão epitelial oral, facilitando as infecções por leveduras do gênero *Candida* (TREVINO-RANGEL et al., 2015). Este processo pode ser inibido pela própolis testadas neste estudo.

No presente trabalho, observou-se que dos quatro extratos testados em larvas de *T. molitor* (GrProp100, GrProp50, GrProp28 e RdProp25), todos com a dosagem de 10mg/Kg foram superiores aos grupos controles e ao grupo que recebeu 5mg/Kg, mantendo porcentagens de sobrevivência em cerca de 40%, 60%, 10% e 25%, respectivamente. Demonstrando mais uma vez, o potencial antifúngico de extratos de própolis em modelos *in vivo*. Essa informação vai de encontro com os dizeres de Souza et al. (2015) que relatam que *T. molitor* pode ser uma ferramenta alternativa

útil para selecionar linhagens clínicas de levedura patogênica com características distintas de virulência. Não foram encontrados na literatura dados de experimentos realizados com as larvas de *Tenebrio molitor* e própolis que verificasse a ação antifúngica da própolis, não sendo possível fazer comparações relacionadas a sobrevivência de *Tenebrio molitor* infectados com *Candida albicans* e tratados com própolis. Podendo ser esse trabalho significativo para a sociedade acadêmica.

Portanto, observa-se que a própolis verde ou vermelha apresenta resultados satisfatórios e pode ser mais analisada em estudos clínicos, pois ela demonstrou ser uma terapêutica viável para o tratamento das infecções fúngicas.

7. CONCLUSÕES

Após avaliar a atividade *in vitro* e *in vivo* de extratos de própolis verde e vermelha contra espécies do gênero *Candida spp* pôde-se concluir que estas própolis apresentam atividade antifúngica contra *Candida albicans* e algumas cepas de *Candida* não *albicans*, demonstrando ser uma terapêutica viável para o tratamento das infecções fúngicas.

Os resultados aqui encontrados mostraram que os extratos de própolis testados atuaram na inibição do crescimento de leveduras, tanto de cepas padrão, quanto de isolados clínicos.

Devido à ação antifúngica isolada ou de forma sinérgica com fármacos antifúngicos, os resultados mostraram que tanto a própolis vermelha quanto a própolis verde, possuem grande potencial para serem empregadas no tratamento de candidíase.

Resultados positivos também se verificaram na inibição da adesão de células bucais, sendo similar aos resultados com anfotericina B e o teste de sobrevivência demonstrou ser eficaz no tratamento de larvas de *Tenebrio molitor*, aumentando sua sobrevida.

A própolis vermelha e a própolis verde possuem grande potencial para serem empregadas no tratamento de candidíase.

8. REFERÊNCIAS

- AKPAN, A; MORGAN, R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 78:455–459, 2002.
- ALANGADEN, G.J. Nosocomial Fungal Infections: epidemiology, infection control, and prevention. *Infectious Disease Clinics of North America*, 25: 201-225, 2011.
- ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J Ethnopharmacol*, 113: 278–283, 2007.
- ÁLVARES, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.L.E. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência. *J Bras Patol Med Lab.* 43(5):319-327, 2007.
- ANDREOLA, P.; DEMATHÉ, A.; GALAFASSI, D.; ELSEMANN, E. B., ELSEMANN, R. B.; GAZZONI, A.F. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. *Revista de Odontologia da UNESP*, 45(4), 219-226, 2016.
- ANTACHOPOULOS, C; WALSH, T.J. New agents for invasive mycoses in children. *Invasive mycoses.* 17, 78-87, 2005.
- ARVANITIS, M.; GLAVIS-BLOOM, J.; MYLONAKIS, E. Invertebrate models of fungal infection☆*Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 1832 (9): 1378-1383, 2013.
- AURICCHIO, M.T.; BUGNO, A.; ALMÓDOVAR, A.A.B.; PEREIRA, T.C. Avaliação da atividade antimicrobiana de preparações de própolis comercializadas na cidade de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 65(3): 209-12, 2006.
- BABAEI, S.; RAHIMI, S.; KARIMI TORSHIZI, M.A.; TAHMASEBI, G.; KHALEGHI MIRAN, S.N. Effects of propolis, royal jelly, honey and bee pollen on growth performance and immune system of Japanese quails. *Veterinary Research Forum*, 7(1): 13–20, 2016.
- BANKOVA, V.S. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence based Complementary and Alternative Medicine.* 2: 29–32, 2005.
- BARBEDO, L.S.; SGARB, D.B.G. Candidíase. *DTS: Jornal Brasileiro de Doenças sexualmente transmissíveis.* 22: 22-38, 2010.
- BARBOSA, M.H.; ZUFFI, F.B.; MARUXO, H.B.; JORGE, L.L.R. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paul Enferm.* 22(3):318-22, 2009.
- BARKER, D.; FITZPATRICK, M. P.; DIERENFELD, E. S. Nutrient composition of selected whole invertebrates. *Zoo Biology.* 17 (2): 123-134, 1998.

BATISTA, L.L.V.; CAMPESATTO, E.A.; ASSIS, M.L.; BARBOSA, A.P.; GRILLO, L.A.; DORNELAS, C.B. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. *Rev. Col. Bras. Cir.* 39(6): 515-520, 2012.

BERNARDO, C.L.E.; SOUZA, I.A.F.; COLAVITTI, C; GARCIA, C. Própolis: cicatrizante e antibiótico natural. *Rev Bras Enferm.* 43(1/4): 101-106, 1990.

BIALKOVA, A.; SUBIK, J. Biology of the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Folia Microbiologica.* 51: 3–20, 2006.

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.* 10(10), 2014.

BOISARD S.; LE RAY, A.M.; LANDREAU, A., KEMPF, M.; CASSISA, V.; FLURIN, C.; RICHOMME, P. Antifungal and anti-bacterial metabolites from a French poplar type propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 1:1-10, 2015.

BRETZ, W.A.; PAULINO, N.; NÖR, J.E.; MOREIRA, A. The Effectiveness of Propolis on Gingivitis: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Alternative and Complementary Medicine.* 20(12): 943-948, 2014.

BRILLOWSKA-DĄBROWSKA, A.; SINIECKA, A. Molecular detection of *Candida krusei*. *International Research Journal of Microbiology (IRJM).* 3(8): 275-277, 2012.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. *Microbiologia Médica.* 22ª Edição, Mc Graw-Hill. 2005.

BROOKS, GF; BUTEL, JS; MORSE, A.S. *Microbiologia médica de Jawetz, Melnick & Adelberg.* 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 486. 2000.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem. Toxicol.* 36: 347-363, 1998.

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M. ; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova.* 32(6): 1523-1527, 2009.

CALDERONE, R.A.; CLANCY, C.J. *Candida* and Candidiasis. ASM Press, Washington, DC. 225-242, 2012.

CALDERONI, RA; FONZI, WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology.* 9(7):327-35, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3. Wayne, PA, USA, 2008.

COLOMBO, A.L. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. *Braz. J. Infect. Dis.* 4: 113-118, 2000.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* sp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 36 (5): 599-607, 2003.

COSTA, L.A.M.A.; BARBOSA, S.R.M.; GARDÊNIA C HOLANDA, G.C.; FLACH, A. Teor de fenólicos e atividade antioxidante de própolis em áreas de floresta e savana de Roraima. *Revista de ciências e tecnologia.* 2(3), 2016.

Da SILVA FROZZA, C.O.; BRUM, E.S.; ALVING, A.; MOURA, S.; HENRIQUES, J.A.P.; ROESCH-ELY, M. LC-MS analysis of Hep-2 and Hek-293 cell lines treated with Brazilian red propolis reveals differences in protein expression. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 68(8): 1073–1084, 2016.

DALBEN-DOTA, K.; FARIA, M.; BRUSCHI, M.; PELLOSO, S.; LOPES CONSOLARO, M.; SVIDZINSKI, T. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. *J Altern Complement Med.* 16: 285–290, 2010.

DANTAS de ALMEIDA, L.F.; CAVALCANTI, Y.W.; LIRA-JÚNIOR, R.; LIMA, E.O.; CASTRO, R.D. Efeito antifúngico de tinturas de própolis e romã sobre espécies de *Candida*. *Rev Cubana de Estomatol.* 26(2): 99-106, 2012.

DAS NEVES, M.V.M., DA SILVA, T.M.S., LIMA, E.O., DA CUNHA, E.V.L., OLIVEIRA, E.J. Isoflavone formononetin from RdPropolis acts as a fungicide against *Candida* sp. *Brazilian Journal of Microbiology.* 47(1):159–166, 2016.

DE CASTRO, P.A.C.; 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*. *Virulence* 4(2):119–128, 2013.

De CASTRO, S.L. Propolis: Biological and Pharmacological Activities. Therapeutic Uses of This Bee-Product. *ARBS Annual Review of Biomedical Sciences.* 3: 49-83, 2001.

De FIGUEIREDO, S.M.; ALMEIDA, B.; ABREU, S.R.L.; ABREU, J.A.S.; A.; FILHO, S.A.V.; BINDA, N.S.; CALIGIORNE, R. B.. Immunomodulatory properties of green propolis. *Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery.* 8(2), 2014.

De FIGUEIREDO, S.M.; BINDA, N.S.; ALMEIDA, B.D.E. M.; LEMOSABREU, S.R.; SILVA DE ABREU, J.A.; PASTORE, G.M.; SATO, H.H.; TORETI, V.C.; TAPIA, E.V.; PARK, Y.K.; VIEIRA FILHO, S.A.; CALIGIORNE, R.B. Green Propolis: Thirteen Constituents of Polar Extract and Total Flavonoids Evaluated During Six Years through RP-HPLC. *Curr Drug Discov Technol.* 12(4):229-39, 2015.

De MELO, A.A.M.; MATSUDA, A.H.M.; FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Capacidade antioxidante da própolis. *Pesq. Agropec. Trop. Goiania*. 44(3): 341-348, 2014.

De MENDONÇA, I.C.G.; PORTO, I.C.C.M.; DO NASCIMENTO, T.G.; DE SOUZA, N.S.; OLIVEIRA, J.M.S.; ARRUDA, R.E.S.; BARRETO, F. S. Brazilian RdPropolis: phyto chemical screening, antioxidante activity and effect against câncer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.15: 357, 2015.

DO NASCIMENTO, T.G.; Da SILVA, P.F.; AZEVEDO, L.F.; Da ROCHA, L.G.; DE LIMA E MOURA, T.F.; BASÍLIO-JÚNIOR, I.D.; GRILLO, L.A.; DORNELAS, C.B.; FONSECA, E.J.; DE JESUS OLIVEIRA, E.; ZHANG, A.T.; WATSON, D.G. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. *Nanoscale Research Letters*. 11(1): 301, 2016.

FERNANDES JUNIOR, A.; LOPES, M.R.L.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A.C.M.; VIEIRA, E.P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria*. 36(1):294-297, 2006.

FERNANDES, F.F.; DIAS, A.L.; RAMOS, C.L.; IKEGAKI, M.; De SIQUEIRA, A.M.; FRANCO, M.C. The in vitro antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Ver Inst Med Trop. São Paulo*. 49(2): 93-5, 2007.

FILIPPIN, F.B.; SOUZA, L.C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 42 (2):167-194, 2006.

FRANCHIN, M.; CÓLON, D.F.; CASTANHEIRA, F.V.; DA CUNHA, M.G.; BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S.M.; CUNHA, T.M.; ROSALEN, P.L. Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis Inhibits Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Elucidation of the Mechanism of Action. *Journal of Natural Products*. 79 (4): 954-960, 2016.

FREIRE, I.A.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 110: 267- 279, 2016.

FREIRES, I.A.; QUEIROZ, V.C.P.P.; FURLETTI, V.F.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; DUARTE, M.C.T.; ROSALEN, P.L. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida spp*. *Journal Mycol. Med*. 26(2):122-132, 2016.

FREITAS, M.C.D.; De OLIVEIRA, D.T.; De MIRANDA, M.B.; VIEIRA-FILHO, S.A.; CALIGIORNE, R.B. De FIGUEIREDO, S.M. Biological activities of red propolis: a review. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2018.

GABLER, I.G.; BARBOSA, A.C.; VELELA, R.R.; LYON, S.; ROSA, C.A. Incidence and anatomic localization of oral candidiasis in patients with Aids hospitalized in a

public hospital in Belo Horizonte, MG, Brazil. Journal applied oral Science.16 (4):247-50, 2008.

GARCIA-CUESTA, C.; SARRION-PEREZ, M.G.; BAGAN, J.V. Current treatment of oral candidiasis: A literatura review. J. Clin. Exp. Dent. 6: 576–582, 2014.

GOMES, C.L.; CAVALCANTE, J.E.; CUNHA, F.A.; AMORIM, L.N.; MENEZES, E.A. Identificação e perfil de sensibilidade de *Candida* spp. isoladas de urina de pacientes com candidúria em Iguatu-Ceará. Rev Bras Anal Clin. 42: 223-225, 2010.

GONÇALVES, S.S.; SOUZA, A.C.R.; CHOWDHARY, A.; MEIS, J.F.; COLOMBO, A.L. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. Mycoses. 59: 198–219, 2016.

HARTMANN, A.; MISSIO, R.; HAMMAD, M.P.; ALVES, I.A. Incidência de *Candida* spp. na mucosa oral de pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) no município de Santo Ângelo-RS. Rev. Epidemiol Control Infec, Santa Cruz do Sul. 6(3):125-130, 2016.

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. Cienc e Inv. Agra. 37(1): 75-84, 2010.

HUANG, M.; KAO, K.C. Population dynamics and the evolution of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett. 333: 85–93, 2012.

JACOBSEN, I.D. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. Expert Review of Anti-infective Therapy. 10: 85- 93, 2012.

JOHANN, S., SILVA, D.L., MARTINS, C.V.B., ZANI, C.L., PIZZOLATTI, M.G., RESENDE, M.A. Inhibitory effect of extracts from Brazilian medicinal plants on the adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells. World J. Microb. Biot. 24: 2459-2464, 2008.

JUNIOR W.B., MIRANDA E.O., ALVINO V., ARAUJO B., SILVA D.W., PORFIRIO Z. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. Semina.33:03–10, 2012.

KANTARCIOGLU, A.S.; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. Mycoses. 45(5-6): 160-5, 2002.

KASKONIENE, V.; PAULIUS KAŠKONAS, P.; MARUŠKA, A.; KUBILIENĖ, L. Chemometric analysis of volatiles of propolis from different regions using static headspace GC-MS. Central European Journal of Chemistry. 12(6): 736-46, 2014.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. The Yeasts: A taxonomic study. Elsevier Science Publisher, Amsterdam. 5: 1075, 2010.

LEVYA, S.B.; MESA, X.M.C. Efectividad del uso del propóleo em el tratamiento de la estomatite aftosa. Rev. Cub Estomatol. 44(3), 2007.

LI, D.-D.; DENG, L.; HU, G.-H.; ZHAO, L.-X.; HU, D.-D.; JIANG, Y.-Y.; WANG, Y. Using *Galleria mellonella* – *Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. Biol. Pharm. Bull. 36, 1482–1487, 2013.

LONGHINI, R.; RAKSA, S.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; SVIDZINSKI, T.I.E.; FRANCO, S.L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. Revis Bras Farmacogn. 17(3): 388-395, 2007.

LOPES, G.; PINTO, E.; ANDRADE, P.B.; VALENTAO, P. Antifungal activity of phlorotannins against dermatophytes and yeasts: approaches to theme chanismo faction and influence on *Candida albicans* virulence factor. 8(8): 1-10, 2013.

MANI, F., DAMASCENO, H.C.R.; NOVELLI, E.L.B.; MARTINS, E.A.M.; SFORCIN, J.M. Propolis: effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. JEthnopharmacol.105:95-8. 2006.

MELLO, B.C.B.S.; PETRUS, J.C.C.; HUBINGER, M.D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nano filtration. Journal of Food Engineering. 96(4): 533–539, 2010.

MENEZES, E.A.; MENDES, L.G.; CUNHA, F.A. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 42(3): 354-355, 2009.

MENEZES, E.A.; CUNHA, M.C.S.O.; CUNHA, F.A. Identificação Preliminar de Algumas Espécies do Gênero *Candida* spp. em Meio Cromógeno: Resultados de Dois Anos de um Estudo Multicêntrico Realizado no Ceará. Revista Patologia Tropical. 40: 297-303, 2011.

MIORIN, P.L.; LEVY JUNIOR, N.C.; CUSTODIO, A.R.; BRETZ, W.A.; MARCUCCI, M.C. Antibacterial activity of honey and própolis from *Apis mellifera* and *tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Microbiology. 95: 913-920, 2003.

MOREIRA, L.S.; DORIA, A.C.O.C.; SANTOS, T.B.; FERNANDA RAMOS FIGUEIRA, F.R.; SORGE, C.P.C.; SILVA, A.M.; KHOURI, S. Estudo da resistência aos antifúngicos de leveduras isoladas de candidúrias de um hospital de médio porte. Revista Univap. 23(43), 2017.

MORSY, A.S.; SOLTAN, Y.A.; SALLAM, S.M.; ALENCAR, S.M.; ABDALLA, A.L. Impact of Brazilian red propolis extract on blood metabolites, milk production, and lamb performance of Santa Inês ewes. Tropical Animal Health and Production. 48(5): 1043–1050, 2016.

NAKAMURA, H.M.; CALDEIRA, S.M.; AVILA, M.A.G. incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos: uma abordagem retrospectiva. Rev. sobecc, São Paulo. 18(3): 49-58, 2013.

NEDJI, N.; LOUCIF-AYAD, W. Antimicrobial activity of Algerian propolis in food borne pathogens and its quantitative chemical composition. *Asian Pac J Trop Dis.* 4(6): 433–437, 2014.

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

OLIVEIRA-JÚNIOR, J.K.; VIEIRA, L.E.M.; BARNABÉ, L.E.G.; SANTOS, M.L.; FIGUEIREDO, V.S.A.; SILVA, D.F.; LIMA, E.O. Análise Do Efeito Antifúngico Da Própolis Sobre Espécies De *Candida albicans* E Não-albicans. *Revista UNINGÁ.* 30 (3): 45-51, 2017.

OMAR, R. M. K.; IGOLI, J.; GRAY, A.I.; EBILOMA, G.U.; CLEMENTS, C.; FEARNLEY, J.; EBEL, R.A.; ZHANG, T.; DE KONING, H.P., WATSON D.G. Chemical characterisation of Nigerian red propolis and its biological activity against *Trypanosoma Brucei*. *Phytochemical analysis: PCA.* 27(2): 107–115, 2016.

ORSI, R., FERNANDES, A., BANKOVA, V.; SFORCIN, J. The effects of Brazilian and Bulgarian propolis in vitro against *Salmonella typhi* and their synergism with antibiotics acting on the ribosome. *Nat Prod Res.* 26, 430 –437, 2012.

OTA, C.; UNTERKIRCHER, C.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M.T. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses.* 44: 375-378, 2001.

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.* 2: 997-1003, 2002.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação da própolis brasileira a partir dessas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce.* 58: 3-7, 2000.

PEMAN, J.; CANTON, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 7: 453–460, 2009.

PEREIRA, D.S.; ABRANTES, M.R.; COELHO, W.A.C.; FREITAS, M.O.; 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.* 11(3): 151-158, 2016.

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). *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 37(7): 667-675, 2017.

PFALLER, M.A. Antifungal Drug Resistance: mechanisms, epidemiology and consequences for treatment. *American Journal of Medicine*. 125: 3–13, 2012.

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

PINTO, M.S.; FARIA, J.E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C.S.; GIOSO, M.M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 38 (6): 278-283, 2001.

PIPI, B; LANA, A.J.; MORAES, R.C.; GÜEZ, C.M.; MACHADO, M.; DE OLIVEIRA, L.F.; LINO VON POSER, G.; FUENTEFRIA, A.M. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. *Journal Appl Microbio*. 118 (4): 839–850, 2015.

POPOVA, M.P.; BANKOVA, V.S.; BOGDANOV, S.B.; TSVETKOVA, I.; NAYDENSKI, C.N.; MARCAZZAN, G.L. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*. 38:306–311, 2012.

PRIETO, D.; ROMÁN, E.; CORREIA, I.; PLA, J. The HOG pathway is critical for the colonization of the mouse gastrointestinal tract by *Candida albicans*. *PlosOne*. 9(1), 2014.

QUINTERO-MORA, M.L.; LONDOÑO-OROZCO, A.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F.; MANZANO-GAYOSSO, P.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, R.; SOTO-ZÁRATE, C.I.; CRUZ-SÁNCHEZ, T.A. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. *Rev Iberoam de Micol*. 25(1): 22-26, 2008.

REBOLI, A.C.; ROTSTEIN, C.; PAPPAS, P.G.; CHAPMAN, S.W.; KETT, D.H.; KUMAR, D.; BETTS, R.; WIBLE, M.; GOLDSTEIN, B.P.; SCHRANZ, J.; KRAUSE, D.S.; WALSH, T.J. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *New England Journal of Medicine*. 356: 2472–2482, 2007.

RINALDI, M.G. Biology and Pathogenicity of *Candida* species. In *Candidiasis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment*/Gerald Bodey. New York: 2 ed. Raven Press, 1993.

RUIZ, L.S.; RICHNI PEREIRA, V.B. Importância dos fungos no ambiente hospitalar Núcleo de Ciências Biomédicas-Centro de Laboratórios Regionais de Bauru II-Instituto Adolfo Lutz. *Bollnst Adolfo Lutz*. 26(2): 2016.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G. and MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2(1), 2005.

SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P. Review Article: *Candida krusei* biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *Journal Medical Microbiology*. 41: 295-310, 1994.

SANTOLAYA, M.E.; ALVARADO MATUTE, T.; DE QUEIROZ TELLES, F.; COLOMBO, A.L.; ZURITA, J.; TIRABOSCHI, I.N.; CORTES, J.A.; THOMPSON-MOYA, L.; GUZMAN-BLANCO, M.; SIFUENTES, J.; ECHEVARRÍA, J.; NUCCI, M. Latin America Invasive Mycosis Network. Recommendations for the management of candidemia in neonates in Latin America. *Revista Iberoamericana de micologia*. 30(3): 171–178, 2013.

SANTOS, J.E.F.; JUNIOR, A.A.S., BARBOSA, R.N.; SANTOS, A.C.S.; LOPES, D.H.G.; OLIVEIRA, N.T. AND GOMES, B.S. Atividade antifúngica in vitro de plantas medicinais frente a leveduras isoladas de secreção vaginal sabios: *Rev. Saúde e Biol*. 11(3):34-44, 2016.

SANTOS, M.J.; VIANNA, L.A.C.; GAMBA, M.A. Avaliação da eficácia da pomada de própolis em portadores de feridas crônicas. *Acta Paul Enferm*. 20(2):199-204, 2007.

SANTOS, V.R.; Pimenta, F.J.; Aguiar, M.C.; do Carmo, M.A.; Naves, M.D.; Mesquita, R.A.. Oral Candidiasis Treatment with Brazilian Ethanol Propolis Extract. *Phytother. Res*. 19: 652–654, 2005.

SANTOS, V.R. Propolis: Alternative Medicine for the Treatment of Oral Microbial Diseases. *Alternative Medicine*. 7: 133-169, 2012.

SCHROECKENSTEIN, DAVID C., SUSAN MEIER-DAVIS, AND ROBERT K. BUSH.. Occupational sensitivity to *Tenebrio molitor* Linnaeus (yellow mealworm). *Journal of allergy and clinical immunology* 86.2: 182-188, 1990.

SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*. 133: 253–260, 2011.

SFORCIN, J.M. Seasonal effecton Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*.73 (1-2): 43-249, 2000.

SFORCIN, J.M.; ORSI, R.O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source planton anti body production. *Journal of Ethnopharmacology, Lausanne*. 98(3): 301–305, 2005.

SILVA, A.C.C.; RICARTE, F.S.; MACHADO, A.V.; COSTA, R. O. Sensibilidade de Agentes Bacterianos Patogênicos Frente à Ação Antibacteriana da Própolis. *Revista Brasileira de Agrotecnologia (Garanhuns – PE - Brasil)*. 5 (1): 07-13, 2015.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in Microbiology*. 19: 241-247, 2011.

SILVA, S.; RODRIGUES, C.F.; ARAÚJO, D.; RODRIGUES, M.E. Henriques, M. *Candida* Species Biofilms Antifungal Resistance. *J. Fungi*. 3: 8, 2017.

SIQUEIRA, A.B.S.; GOMES, B.S.; CAMBUIM, I.; MAIA, R.; ABREU, S.; SOUZA-MOTTA, C.M.; QUEIROZ, L.A.; PORTO, A.L.F. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. *Lett Appl Microbiol*. 48, 90–96, 2009.

SOARES, A.C. Potencial terapêutico do extrato de própolis na sepse experimental. 2014. 70 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas em Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

SOUZA, E.T.; NETO, B.A.; LILENBAUM W.; SANTOS C.S.; SILVA L.C.S. Ação da própolis perante *Candida albicans*. Cienc. Med. 8: 39-42, 1989.

SOUZA, G.; PFENNING, L.; MOURA, F.; SALGADOM, M.; J. TAKAHASHI, "Isolation, identification and antimicrobial activity of propolis - associated fungi," Nat Prod Res. 27 (18): 1705-1707, 2013.

SOUZA, P.C.; MOREY, A.T.; CASTANHEIRA, G.M.; BOCATE, K.P.; PANAGIO, L.A.; ITO, F.A.; FURLANETO, M.C.; YAMADA-OGATTA, S.F.; MORA-MONTES, H.M.; ALMEIDA, R.S. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. Journal of Microbiological Methods. 118: 182-186, 2015.

STEPANOVIĆ, S.; ANTIĆ, N.; DAKIĆ, I., SVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. In vitro antimicrobial activity of própolis and synergism between própolis and antimicrobial drugs. Microbiol Research. 158 (4): 353-357, 2003.

SUDBERY, P.E. Growth of *Candida albicans* hyphae. Nat Rev Microbiol. 9:737-48, 2011.

TELES, F.; DA SILVA, T.M.; JÚNIOR, F.P.C.; HONORATO, V.H.; COSTA, H.O.; BARBOSA, A.P.F.; OLIVEIRA, S.G.; PORFÍRIO, Z.; LIBÓRIO, A.B.; BORGES, R.L.; FANELLI, C. Brazilian red propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model. 10(1), 2015.

TORETI, V. C.; SATO, H. H.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM. 2013.

TORTORA, G.J; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia, 8ª Edição, Editora Artmed, Rio de Janeiro, 2005.

TORTORANO, A.; KIBBLER, C.; PEMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; GRILLOT, R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. Int J Antimicrob Agents. 27, 359–366, 2006.

TREVINO-RANGEL, R.D.E. J.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, I.P.; ROSAS-TARACO, A.G.; HERNÁNDEZ-BELLO, R.; GONZÁLEZ, J.G.; GONZÁLEZ, G.M. Biofilm formation and genetic variability of BCR1 gene in the *Candida parapsilosis* complex. Mycol. 32(3):180-4. 2015.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J.D. *Candida parapsilosis*, na emerging fungal pathogen. Clinical Microbiology Reviews. 21(4): 606-625, 2008.

URBAN, A.M.; FARAGO, P.V.; NEPPELENBROEK, K.H.; URBAN, V.M. Efetividade antifúngica de fármacos complexados com ciclo dextrinas antifungal effectiveness of

drugs complexed with cyclodextrin selectividade antifúngica de fármacos complexados com ciclodextrinas. *RevistaSaúde*. 10 (1-2), 2016.

VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGÈS, T.; RENIER, G.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J.P. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (11): 4608-4615, 2005.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico e própolis. *Ciência Rural*. 34 (1): 159-163, 2004.

VIEIRA, A.J.H.; SANTOS, J.I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. *RBAC*. 49(3): 235-9, 2017.

VIVAN, L.M.; TORRES, J.B.; VEIGA, A.F.S.L.; ZANUNCIO, J.C. Comportamento de predação e conversão alimentar de *Podisusnigrispinus* sobre a traça-do-tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37: 581-587, 2002.

ZAMPERLINI, B.; ZANUNCIO, J.C.; LEITE, J.E.M.; BRAGANÇA, M.A.L. Influência da alimentação de *Tenebrio molitor* L. 1758(Coleoptera: Tenebrionidae) no desenvolvimento ninfal de *Podisusconnexivus* Bergroth, 1891 (Hemiptera: Pentatomidae). *Revista Árvore*. 16: 224-203, 1992.