

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE *Candida parapsilosis* E *Candida glabrata*  
DESENVOLVEREM RESISTÊNCIA FENOTÍPICA À PRÓPOLIS VERMELHA  
BRASILEIRA E AO FLUCONAZOL E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA EM ASSOCIAÇÃO COM FLUCONAZOL E ANIDULAFUNGINA**

BRUNA PIPPI

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Orientador:** Alexandre Meneghello Fuentefria

**Co-orientadora:** Gilsane Lino von Poser

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE *Candida parapsilosis* E *Candida glabrata*  
DESENVOLVEREM RESISTÊNCIA FENOTÍPICA À PRÓPOLIS VERMELHA  
BRASILEIRA E AO FLUCONAZOL E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA EM ASSOCIAÇÃO COM FLUCONAZOL E ANIDULAFUNGINA**

BRUNA PIPPI

Farmacêutica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola  
e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.**

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Fevereiro de 2014

***“A vida não me cansa porque amanhã ainda tenho  
um bocado de ilusões  
e um sonho doido para dar certo”  
(Ita Portugal)***

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,

**Valdiva e Moacir,**

pelo constante incentivo e apoio  
em todos os momentos.

Compartilho essa conquista com vocês!

## AGRADECIMENTOS

Considero a elaboração de uma dissertação de mestrado um projeto coletivo, embora sua escrita seja de responsabilidade individual. A todos que estiveram envolvidos nesse trabalho, o meu “muito obrigada”.

Agradeço ao Prof. Alexandre Fuentesfria, meu orientador, pela amizade demonstrada, por ter confiado em mim e permitido minha inclusão em seu grupo de pesquisa. Agradeço por todos os seus conselhos e valiosas sugestões. Sempre serei grata por me integrar de uma maneira muito estimulante ao “mundo da micologia”.

À professora Gilsane Lino von Poser, tão atenciosa e prestativa, por abrir as portas de seu laboratório e ter dado liberdade necessária para a realização deste trabalho, estando sempre disponível para orientar e corrigir minhas escolhas.

Agradeço à banca: Prof. Sydney Hartz Alves, Prof<sup>a</sup>. Patrícia Valente da Silva e Francisco Maikon Corrêa de Barros, pelas contribuições e tempo despendido.

Ao prof. George Ortega pelas suas reflexões criativas sobre nosso objeto de estudo, as quais muito nos ajudaram a realizar uma análise crítica sobre o assunto.

Agradeço a todos do Laboratório de Micologia Aplicada, um lugar onde conheci pessoas incríveis em que muitos laços de amizade se formaram. Só posso agradecer pelo privilégio de ter estudado em uma das maiores universidades do país ao lado de pessoas maravilhosas. Vocês fizeram a diferença na minha vida nesses dois últimos anos! Agradeço à Fê pelas discussões científicas, conversas amigas e por tornar meu dia-a-dia mais leve e divertido. À Dai pelos momentos de descontração, e também pela disposição e persistência em alguns trabalhos de bancada. À Rê por toda sua tranquilidade e companheirismo dentro e fora do laboratório. À Gabi agradeço pela amizade, conversas e companhia nos inúmeros domingos de trabalho. Aos queridos estagiários, Camila, Thayse e Edu, obrigada pela disposição em ajudar e pela dedicação em aprender. À Aícha pela amizade e conselhos. À Gabriella, que faz parte da nova geração da micologia, e demonstrou ser uma pessoa muito querida. Agradeço a Vanessa por me esperar sempre com um abraço carregado de carinho e amizade. Obrigada pelas risadas ao longo dos dias e por estar ao meu lado sempre. Obrigada por ser esta amiga e por me dar certeza que poderemos contar uma com a outra independente da situação. Agradeço imensamente a Aline por tudo, e quando falo tudo, é por todos os momentos que passamos juntas desde a faculdade. Obrigada pela amizade, conselhos e ajuda que recebi em diversas situações. Espero que nossa amizade se solidifique cada dia mais.

Agradeço à Camila Mahl, pelo companheirismo e paciência, por me escutar e aconselhar, por estar comigo em todas as horas, sejam elas boas ou ruins. Aos meus amigos, obrigada pela força e incentivo que vocês sempre me deram.

Ao professor Luís Flávio e a aluna Camila Güez, obrigada pela disponibilidade, atenção e ajuda que recebi em uma das etapas do meu trabalho.

Aos demais professores da pós-graduação, funcionários e colegas desta instituição, muitíssimo obrigada. Também agradeço à CAPES, pelo apoio financeiro.

À minha família que mesmo distante, me deu força para concluir este trabalho. Às minhas queridas sobrinhas, obrigada por cada sorriso. Às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais - Valdiva e Moacir - meus maiores exemplos e incentivadores. Obrigada por estarem sempre buscando o melhor para mim, muitas vezes abdicando seus sonhos em favor dos meus. Obrigada pelo estímulo pessoal e profissional, sempre acompanhando com orgulho e entusiasmo todos os passos dados. Obrigada por me impulsionarem a seguir a vida acadêmica, sem nunca ousar pensar em desistir deste ideal. Vocês, mais do que ninguém, fazem parte disso. Serei eternamente grata. Amo muito vocês!

# AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE *CANDIDA PARAPSILOSIS* E *CANDIDA GLABRATA* DESENVOLVEREM RESISTÊNCIA FENOTÍPICA A PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA E AO FLUCONAZOL E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM ASSOCIAÇÃO COM FLUCONAZOL E ANIDULAFUNGINA.<sup>1</sup>

Autora: Bruna Pippi

Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria

Co-orientadora: Gilsane Lino von Poser

## RESUMO

As taxas de mortalidade causadas por *Candida não-albicans* (CNA) aumentaram nas últimas décadas e a resistência aos fármacos é um desafio para tratamento dessas infecções, representando um problema de saúde pública. O uso indiscriminado de antifúngicos, principalmente fluconazol (FLZ) resulta no surgimento de cepas resistentes aos medicamentos entre populações anteriormente suscetíveis. Dessa forma mostra-se importante a realização de testes de aquisição de resistência *in vitro* na prospecção de um novo medicamento. Própolis é uma mistura resinosa complexa feita pelas abelhas e sua atividade antifúngica já foi intensamente investigada, entretanto, sua capacidade de indução de resistência em fungos ainda não havia sido avaliada. O objetivo principal desse estudo foi averiguar a capacidade de *C. parapsilosis* e *C. glabrata* desenvolverem resistência fenotípica à fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira e comparar ao FLZ, bem como investigar possível sinergismo quando esta fração é associada com FLZ e anidulafungina (AND). Para analisar o desenvolvimento de resistência, isolados suscetíveis foram cultivados em concentrações crescentes de FLZ e a fração de própolis. O aumento da concentração inibitória mínima (CIM) do FLZ foi evidenciado para todos isolados e a maioria desenvolveu resistência, enquanto que nenhum isolado tornou-se menos suscetível à própolis após a exposição. O sinergismo foi investigado pelo método *checkerboard*. Própolis e FLZ demonstraram sinergia para a maioria dos isolados com resistência induzida ao FLZ, e própolis e AND apresentaram aditividade ou indiferença para a maioria dos isolados. Em conclusão, a própolis demonstrou ser um produto não indutor de resistência, uma vez que não provocou o desenvolvimento de resistência *in vitro*, ao contrário do FLZ. Além disso, própolis mostrou importante efeito sinérgico com FLZ, apontando uma possível estratégia terapêutica para o tratamento de infecções relacionadas a *Candida* spp. resistentes ao FLZ.

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (145 p.) Fevereiro, 2014.

EVALUATION OF THE ABILITY OF *CANDIDA PARAPSILOSIS* AND *CANDIDA GLABRATA* DEVELOP PHENOTYPIC RESISTANCE TO BRAZILIAN RED PROPOLIS AND TO FLUCONAZOLE AND EVALUATION OF ITS ANTIFUNGAL ACTIVITY IN ASSOCIATION WITH FLUCONAZOLE AND ANIDULAFUNGIN.<sup>2</sup>

Authoress: Bruna Pippi

Supervisor: Alexandre Meneghello Fuentefria

Co- supervisor: Gilsane Lino von Poser

ABSTRACT

Mortality rates caused by non-*albicans Candida* (CNA) have increased in recent decades and drug resistance is a challenge to treat these infections, representing a public health problem. The indiscriminate use of antifungals, especially fluconazole (FLZ), results in the emergence of drug-resistant strains among previously susceptible populations. Thus it is important to develop tests of acquisition of resistance *in vitro* in prospecting of a new drug. Propolis is a complex resinous mixture made by bees and its antifungal activity has been intensively investigated, however, its ability to induce resistance in fungi has not yet been evaluated. The main aim of this study was to evaluate the ability of *C. parapsilosis* and *C. glabrata* develop phenotypic resistance to benzophenones enriched fraction of the Brazilian red propolis and compare to the FLZ, as well as investigate possible synergy when this fraction is associated with FLZ and anidulafungin (AND). To analyze the development of resistance, isolates susceptible to these antifungals were cultured in increasing concentrations of FLZ and propolis. The increase in FLZ Minimum inhibitory concentration (MIC) for all isolates was evident and the majority has developed resistance, whereas none isolated has become less susceptible to propolis after exposure. Synergism was investigated by checkerboard method. Propolis and FLZ demonstrated synergy for most isolates with induced resistance to the FLZ, and propolis and AND showed additivity or indifference to the majority of the isolates. In conclusion, propolis has demonstrated to be a product does not inductor resistance, since it has not caused the development of resistance *in vitro*, unlike the FLZ. In addition, propolis showed an important synergistic effect with FLZ, indicating a possible therapeutic strategy for the treatment of infections related to FLZ-resistant *Candida* spp.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Objetivo Geral	3
1.2	Objetivos Específicos	3
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
2.1	Fungos Patogênicos Resistentes	5
2.2	O gênero <i>Candida</i>	6
2.3	Terapia antifúngica e Mecanismo de Ação	15
2.4	Resistência aos Antifúngicos e Mecanismo de Resistência em <i>Candida</i> spp...	20
2.5	Terapia Antifúngica Mediante Associação de Fármacos	26
2.6	Terapia Antifúngica com substâncias ou compostos naturais	28
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>43</b>
3.1	Local da Realização da Pesquisa	43
3.2	Escolha da Amostra de Própolis para Elaboração do Estudo	43
3.3	Origem, Extração e Preparo da Amostra de Própolis Vermelha Brasileira	44
3.4	Preparo das Soluções dos Fármacos Antifúngicos	44
3.5	Seleção dos Micro-organismos	45
3.6	Teste de Suscetibilidade aos Agentes Antifúngicos	45
3.7	Indução da Resistência e Avaliação da sua Estabilidade	49
3.8	Avaliação da Resistência Cruzada	50
3.9	Estudo de Bomba de Efluxo ABC	50
3.10	Efeito Antimicrobiano da Fração Enriquecida em Benzofenonas da Própolis Vermelha Brasileira em Culturas Polimicrobianas de Espécies de <i>Candida</i> Resistentes ao Fluconazol	51
3.11	Avaliação da Atividade Antifúngica da Fração Enriquecida em Benzofenonas da Própolis Vermelha Brasileira em Combinação com Fluconazol e Anidulafungina	53
3.12	Estudo para Sugestão do Modo de Ação da Fração Enriquecida em Benzofenonas da Própolis Vermelha Brasileira em Espécies de <i>Candida</i>	56
3.13	Avaliação da Toxicidade da Fração Enriquecida em Benzofenonas da Própolis Vermelha Brasileira	57
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>61</b>
4.1	Desenvolvimento e Estabilidade da Resistência	61
4.2	Resistência Cruzada	63

4.3	Bomba de Efluxo ABC .....	64
4.4	Efeito da Fração Enriquecida em Benzofenonas da Própolis Vermelha Brasileira em Culturas Polimicrobianas de <i>Candida</i> Resistentes ao Fluconazol.....	66
4.5	Interação da fração enriquecida em benzofenonas da Própolis Vermelha com Fluconazol.....	68
4.6	Interação da Fração Enriquecida em Benzofenonas da Própolis Vermelha com Anidulafungina .....	77
4.7	Efeito do Ergosterol Exógeno.....	83
4.8	Efeito Sobre a Parede Celular .....	86
4.9	Viabilidade Celular e Ensaio Cometa .....	87
5	DISCUSSÃO .....	89
6	CONCLUSÕES .....	105
7	PERSPECTIVAS.....	108
8	REFERÊNCIAS.....	110
9	ANEXO 1.....	132

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. <i>Breakpoints</i> para definição do fenótipo de suscetibilidade dos isolados para os antifúngicos testados, conforme documento M24-S4 (CLSI, 2012).....	48
TABELA 2. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), em µg/mL, do fluconazol (FLZ) e fenótipos (Fen) de isolados de <i>C. parapsilosis</i> (CP) e <i>C. glabrata</i> (CG) antes e após a indução da resistência com exposição a concentrações crescentes de FLZ e após subcultivo em meio isento de antifúngico por 30 dias. ....	61
TABELA 3. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), em µg/mL, da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (ProVB) para os isolados de <i>C. parapsilosis</i> (CP) e <i>C. glabrata</i> (CG) antes e após a indução da resistência com exposição a concentrações crescentes desta fração. ....	62
TABELA 4. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM), em µg/mL, e o fenótipo (Fen) do itraconazol (ITZ), cetoconazol (CTZ), miconazol (MCZ) e fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (PropVB) dos isolados de <i>C. parapsilosis</i> (CP) e <i>C. glabrata</i> (CG) selvagens e dos mutantes (m) após indução da resistência ao fluconazol. ....	65
TABELA 5. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM), expressos em µg/mL, da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira frente a culturas polimicrobianas de isolados de <i>Candida</i> spp. resistentes ao fluconazol e contagem de células na CIM/2 expressa em Log. ....	67
TABELA 6. Dano celular da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (ProVB) combinada com fluconazol (FLZ) expressos em porcentagem (%). ....	68
TABELA 7. Efeito da combinação da fração enriquecida em benzofenona da própolis vermelha brasileira (ProVB) com fluconazol (FLZ) no ensaio <i>checkerboard</i> para os diferentes isolados. ....	71
TABELA 8. Efeito da combinação da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (ProVB) e fluconazol (FLZ) frente a culturas polimicrobianas de isolados de <i>Candida</i> resistentes ao FLZ. ....	75
TABELA 9. Dano celular da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (ProVB) combinada com anidulafungina (AND) expressos em porcentagem (%). ....	77

TABELA 10. Efeito da combinação da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (ProVB) com anidulafungina (AND) no ensaio <i>checkerboard</i> para os diferentes isolados.....	80
TABELA 11. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), em µg/mL, da anfotericina B (AnfB) para isolados cultivados em meio isento de ergosterol e em concentrações crescentes de ergosterol (µg/mL). ....	84
TABELA 12. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), em µg/mL, da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (PropVB) para isolados cultivados em meio isento de ergosterol e em concentrações crescentes de ergosterol (µg/mL).....	84
TABELA 13. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), em µg/mL, lidos em 2 e 7 dias da anidulafungina (AND) e da fração enriquecida da própolis vermelha brasileira (ProVB) para isolados cultivados em meio isento de sorbitol e em meio com 0,8M de sorbitol. ....	86

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Alvo dos antifúngicos.....	16
FIGURA 2. Mecanismos moleculares de resistência aos azóis. ....	25
FIGURA 3 Porcentagem de dano celular dos isolados no ensaio <i>checkerboard</i> frente à fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (ProVB) e fluconazol (FLZ) isoladamente e em combinação. ....	74
FIGURA 4. Porcentagem de dano celular dos isolados no ensaio <i>checkerboard</i> frente à fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (ProVB) e anidulafungina (AND) isoladamente e em combinação.....	83
FIGURA 5. Efeito das diferentes concentrações do ergosterol exógeno (50-250 µg/mL) na CIM de anfotericina B (preto) e da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (cinza) para as quatro espécies de <i>Candida</i> testadas. ....	85
FIGURA 6. Inviabilidade celular e dano no DNA.....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABC: *ATP-binding cassette*  
ABZ: albaconazol  
AND: anidulafungina  
AnfB: anfotericina B  
CAN: *Candida não-albicans*  
CFM: concentração fungicida mínima  
CIF: concentrações inibitórias fracionadas  
CIM: concentração inibitória mínima  
CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute  
CLZ: clotrimazol  
CSP: caspofungina  
CTZ: cetoconazol  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
ECZ: econazol  
EUA: Estados Unidos da América  
FLZ: fluconazol  
HBBS: solução tampão de *Hank*  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: água oxigenada  
ICIF: índice de concentração inibitória fracionada  
ITZ: itraconazol  
MCF: micafungina  
MCZ: miconazol  
MFS: *major facilitator superfamily*  
MOPS: *morpholinepropansulfonic acid*  
MTT: 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il ) -2,5 difenil-tetrazólio brometo  
NAT: natamicina  
NIT: nistatina  
NUBIOTOXIM: Núcleo de Pesquisa em Bioquímica, Toxicologia e Imunologia  
PBS: tampão fosfato-salina  
POZ: posaconazol  
RNA: ácido ribonucleico  
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*  
RS: Rio Grande do Sul  
RVZ: ravuconazol  
SDA: ágar sabouraud dextrose  
SDD: sensível dose dependente  
TBF: terbinafina  
UFC: Unidade Formadora de Colônia  
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS  
UNIPAMPA: Universidade Federal do Pampa, RS  
UTI: Unidade de Terapia Intensiva  
VRZ: voriconazol  
5FC: 5- flucitosina

## 1 INTRODUÇÃO

Infecções causadas por espécies de *Candida não-albicans* (CNA) mostraram um substancial aumento nas últimas décadas (Pereira et al., 2010; Ajenjo et al., 2011; Ortega et al., 2011; Kali et al., 2013). Resistência dessas espécies a agentes antifúngicos é um fator preocupante, pois prolonga a hospitalização e aumenta os custos das internações (Tortorano et al., 2006), com implicações importantes na taxa de morbidade e mortalidade (Balkis et al., 2002; Peman et al., 2009). O aumento da população de imunodeprimidos (Clark & Hajjeh, 2002), aliado ao uso de antifúngicos como tratamento profilático faz com que micro-organismos fiquem expostos a concentrações subinibitórias dos fármacos, propiciando o desenvolvimento da resistência (White et al., 1998; Tobudic et al., 2012). Diante dessa situação, existe uma clara necessidade de introduzir novas opções terapêuticas com capacidade de combater as estratégias de adaptação criadas por esses organismos. Atualmente a associação de antifúngicos com mecanismos de ação distintos está sendo utilizada clinicamente (Chamilos & Kontoyiannis, 2006) e também vem sendo alvo de pesquisas para averiguar a sua real eficácia, mostrando resultados satisfatórios para algumas combinações (Alves et al., 2012; Zeidler et al., 2013). Porém, o desenvolvimento de novos medicamentos ainda se faz necessário, impulsionando pesquisas com agentes antifúngicos de várias fontes, incluindo produtos naturais (Barros et al., 2013; Danielli et al., 2013).

Nesse contexto, a própolis tem sido foco de diversos estudos de atividade antimicrobiana, tendo sido relatada ação contra diferentes bactérias

(Stepanovic et al., 2003; Ugur & Arslan, 2004; Righi et al., 2011), fungos (Fernandes et al., 2007; Longhini et al., 2007; Siqueira et al., 2009; Agüero et al., 2010; Dalben-Dota et al., 2010; Righi et al., 2011; De Castro et al., 2013), vírus (Gekker et al., 2005; Bufalo et al., 2009) e protozoários (De Castro & Higashi, 1995; Dantas et al., 2006; Freitas et al., 2006; Lotfy, 2006; Menna-Barreto et al., 2009), mostrando o amplo espectro de ação desse produto. Além disso, isolados resistentes a antimicrobianos também demonstraram suscetibilidade a própolis (Stepanovic et al., 2003; Dalben-Dota et al., 2010; Shokri, Khosravi & Yalfani, 2011). A combinação de própolis aos antifúngicos disponíveis na clínica médica também é uma alternativa promissora, visto que sua associação com antimicrobianos já se mostrou efetiva em alguns estudos (Holderna & Kedzia, 1987; Stepanovic et al., 2003; Fernandes et al., 2005; Oksuz et al., 2005; Orsi et al., 2006; Onlen et al., 2007; Orsi et al., 2012), porém ainda são escassos os trabalhos científicos que demonstram os efeitos dessa interação.

Uma nova variedade de própolis, chamada de própolis vermelha, foi descoberta recentemente no nordeste brasileiro (Trusheva et al., 2006), e vem se mostrando mais efetiva farmacologicamente que outros tipos de própolis (Siqueira et al., 2009; De Almeida et al., 2013). Entretanto, pouco se sabe sobre sua atividade contra cepas resistentes, seu mecanismo de ação, sua associação com antifúngicos de uso comum, sua toxicidade e a sua capacidade de induzir o desenvolvimento de resistência em fungos. A avaliação *in vitro* da aquisição de resistência de micro-organismos a substâncias naturais é um tema incomum e de relevante importância,

considerando que quanto maior a propensão à indução da resistência *in vitro*, há uma hipotética desvantagem do seu uso *in vivo*, principalmente em tratamentos profiláticos. Portanto, mostram-se necessários mais estudos para uma melhor compreensão do modo de ação desse tipo de própolis e possíveis mecanismos de resistência, para possibilitar uma melhor estratégia no desenvolvimento de novos fármacos ativos.

### **1.1 Objetivo Geral**

Diante dessa abordagem, o objetivo geral desse estudo foi averiguar a capacidade de *C. parapsilosis* e *C. glabrata* desenvolverem resistência fenotípica à fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira em comparação ao fluconazol; bem como avaliar a atividade antifúngica desta fração isolada e em associação com fluconazol e anidulafungina.

### **1.2 Objetivos Específicos**

a) Induzir resistência à fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira e ao fluconazol em isolados de *C. parapsilosis* e *C. glabrata* e avaliar a capacidade de manutenção a resistência, bem como verificar a presença de resistência cruzada;

b) Investigar se as bombas de efluxo da família *ATP-binding cassette* estão relacionadas com os mecanismos de resistência desenvolvidos por estes micro-organismos;

c) Avaliar a atividade antifúngica da associação da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira com fluconazol e anidulafungina em *C. parapsilosis* e *C. glabrata* expostas ao fluconazol;

d) Avaliar a atividade antifúngica da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira e sua associação com fluconazol em cultura polimicrobiana formada de isolados de *Candida* não-*albicans* resistentes ao fluconazol;

e) Investigar possível modo de ação fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira sobre a membrana e a parede celular;

f) Avaliar a toxicidade da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira em células humanas.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Fungos Patogênicos Resistentes**

Um dos maiores avanços que definiu a era da medicina moderna foi o desenvolvimento de penicilina como o primeiro antibiótico eficaz utilizado contra micro-organismos (Sternbach & Varon, 1992). Entretanto, os isolados resistentes surgiram logo após o uso em larga escala da penicilina para tratar infecções bacterianas (Barber et al., 1948). Este ciclo foi repetido muitas vezes ao longo dos anos, paralelamente ao surgimento de novos antimicrobianos (Levy & Marshall, 2004), levando a uma preocupação sobre a eficácia contínua desses medicamentos para controlar doenças infecciosas (Alanis, 2005).

A resistência em fungos patogênicos é um problema de importância especial. A conservação da biologia celular eucariótica básica exibida por células fúngicas e aquelas de mamíferos limita a gama de antifúngicos descritos. Além disso, fungos mutantes são facilmente isolados e podem demonstrar resistência a uma grande variedade de antifúngicos, além daquele inicialmente utilizado para o tratamento. O número limitado de fármacos antifúngicos torna este fenótipo um problema grave na quimioterapia de infecções fúngicas (Gulshan & Moye-Rowley, 2007).

Além do grave problema relacionado à resistência, há diversas espécies fúngicas que eram previamente não patogênicas e estão emergindo como patógenos oportunistas (Pfaller & Diekema, 2004c; Johnson, 2009; Miceli et al., 2011). A emergência dessas micoses ocorre principalmente devido aos avanços dos cuidados médicos, os quais melhoram a sobrevivência de pacientes

em situação de risco e conseqüentemente aumentam a população de imunodeprimidos (Clark & Hajjeh, 2002).

As espécies de *Candida não-albicans* (CNA) eram até pouco tempo não comumente encontradas no diagnóstico clínico e foram as primeiras leveduras caracterizadas como emergentes (Miceli et al., 2011). *Candida* spp. residem como comensais, fazendo parte da microbiota normal dos indivíduos sadios. Todavia, quando há uma ruptura no balanço normal da microbiota ou os mecanismos de defesa do hospedeiro encontram-se comprometidos, as espécies desse gênero tendem a expressar sua virulência, tornando-se, assim, patogênicas (Sardi et al., 2013).

## **2.2 O gênero *Candida***

### **2.2.1 Aspectos Gerais**

O gênero *Candida* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales e Família Saccharomycetaceae (Guarro et al., 1999). Atualmente mais de 200 espécies de *Candida* foram descritas, e cerca de dezessete são conhecidas por ocasionar micoses superficiais ou invasivas em seres humanos (Sardi et al., 2013). Entretanto, mais de 90% das infecções invasivas por *Candida* spp. são atribuídas a cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Pfaller et al., 2007b).

Desde 1995, as espécies de *Candida* têm se tornado a quarta causa mais comum de infecção nosocomial da corrente sanguínea e estão associados a uma taxa de mortalidade de 39% (maior taxa de mortalidade

associada à infecção de corrente sanguínea). Já em unidades de terapia intensiva (UTIs), *Candida* spp. é a terceira causa mais frequente dessas infecções e está associada a uma taxa de mortalidade de 47% (Wisplinghoff et al., 2004). A epidemiologia de tais infecções varia entre diferentes regiões geográficas e até mesmo entre os centros médicos dentro da mesma região (Pfaller et al., 2004a; Colombo et al., 2013).

Nos Estados Unidos (EUA), durante o período de 1980 a 1990, o Centro de Controle de Doenças de Atlanta coletou dados de infecções fúngicas nosocomiais de 115 hospitais, relatando 30.477 infecções fúngicas; *C. albicans* foi o mais frequente patógeno, seguido de outras espécies de *Candida* (Beck-Sagué & Jarvis, 1993).

No período de 1991 a 2008 houve 529 episódios de candidemias registradas em um hospital de Barcelona. A taxa de mortalidade foi de 32% até 30 dias depois da detecção, e a predominância de CNA foi observada (52%) (Ortega et al., 2011). As espécies de CNA também foram predominantes (55,6%) em estudo realizado no Hospital Clínico da Universidade Católica do Chile (Ajenjo et al., 2011).

Entre janeiro de 2002 e dezembro 2003 foram detectados 345 casos de infecções sanguíneas causadas por esse gênero em 14 hospitais de Barcelona (0,53 episódios por 1.000 internações). *Candida albicans* foi a mais isolada (51%), seguida de *C. parapsilosis* (23%), *C. tropicalis* (10%), *C. glabrata* (9%) e *C. krusei* (4%). A terapia imunossupressora foi a mais comum entre as condições associadas (39% dos casos) e cateter venoso central estava presente em 89% dos pacientes (Almirante et al., 2005).

Entre Janeiro de 1994 e Junho de 1995, foram avaliados todos os episódios de fungemia em pacientes com câncer de três hospitais do Rio de Janeiro (Brasil), observando-se 43 casos. A espécie mais frequente foi *C. tropicalis* (48,5 %), seguida por *C. parapsilosis* (18,2%) e *C. albicans* (15,2%). O fator predisponente mais frequente presente foi a utilização profilática ou terapêutica de antibióticos (84,8%), seguido pelo uso de cateter venoso central (72,7%) e neutropenia (57,6%) (Nucci et al., 1998).

No Hospital Brigadeiro (São Paulo, Brasil) foram observados 50 casos de pacientes com fungemias no período de 2004 a 2008 (incidência de 2,4 candidemias por 1000 admissões hospitalares e taxa de mortalidade de 50%). As espécies mais frequentes foram *C. parapsilosis* (26%) e *C. tropicalis* (26%), seguida de *C. albicans* (18%) (Pereira et al., 2010).

Outro estudo realizado no Brasil, entre março de 2003 a dezembro de 2004, em 11 centros médicos acadêmicos localizados em nove cidades da região sul, sudeste e centro-oeste, *Candida* spp. foi o quarto mais frequente patógeno isolado de hemoculturas. Foram detectados 712 casos de candidemias, com uma incidência de 2,49 casos por 1.000 admissões, e mortalidade de 54% em 30 dias. Câncer foi documentado em 27% dos pacientes, 39% dos pacientes eram pós-cirúrgicos, 38% estavam em ventilação mecânica, 12% estavam recebendo diálise, 21% nutrição parenteral e 70% apresentavam um cateter venoso central. No momento da candidemia 17% estavam a recebendo um antifúngico sistêmico (Colombo et al., 2006).

Em estudo abrangendo sete países da Europa, realizado pela Confederação Europeia de Micologia Médica, foi constatado taxa de 0,20-0,38

candidemias por 1.000 admissões, num total de 1089 episódios. *Candida albicans* foi a espécie mais comum, seguida de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Candidemia foi frequentemente associada à intervenção cirúrgica (48%), tratamento de terapia intensiva (40%) e pacientes com câncer (35%). Entre as CNA, 5,32 % e 10,29 % eram resistentes a 5-flucitosina (5FC) e fluconazol (FLZ), respectivamente (Tortorano et al., 2006).

Em um estudo realizado em diversos países foi verificado que *C. albicans* era a espécie mais frequente; seguido de *C. parapsilosis* na América Latina, Europa e Rússia e *C. glabrata* nos EUA, Canadá, Ásia e Austrália; e que a maioria das infecções foi causada por espécies de CNA (Colombo et al., 2003).

Como foi observado nos estudos epidemiológicos citados acima, CNA estão emergindo como patógenos causadores de infecções nosocomiais da corrente sanguínea. Fungemias devido a espécies de CNA são de preocupação especial devido à virulência e patogenicidade de algumas espécies e à ocorrência de resistência aos antifúngicos disponíveis atualmente (Krcmery & Barnes, 2002). Esses fatores estabelecem um problema clínico, resultando numa elevada taxa de mortalidade, por vezes superior à mortalidade por *C. albicans*, bem como um problema econômico (Pelz et al., 2000; Leleu et al., 2002) devido ao prolongado tempo de internação (Tortorano et al., 2006). Além disso, a resistência de espécies de CNA para antifúngicos representa um grande desafio para as estratégias terapêuticas e profiláticas empíricas tipicamente prescritas na saúde pública brasileira (Krcmery & Barnes, 2002).

### 2.2.2 *Candida glabrata*

Em muitos centros médicos nos EUA, a espécie de CNA mais comum é *C. glabrata*, que responde por de um quarto a um terço de todos os casos de fungemia (Baddley et al., 2001; Malani et al., 2005).

*Candida glabrata* é claramente associada a infecções mais graves em idosos e pacientes com severa imunodeficiência (Moran et al., 2009; Pfaller et al., 2010b). Os fatores de risco mais comuns são uso de antibiótico de amplo espectro (Malani et al., 2005; Pfaller & Diekema, 2007a), utilização de cateter venoso central (Malani et al., 2005), permanência na UTI (Gumbo et al., 1999; Pfaller & Diekema, 2007a), recebimento de nutrição parenteral (Malani et al., 2005; Pfaller & Diekema, 2007a) e exposição prévia ao FLZ (Colombo et al., 2006). *Candida glabrata* tem tido importância médica aumentada devido a sua suscetibilidade reduzida ao FLZ e a outros agentes antifúngicos (Pfaller et al., 2004d; Pfaller et al., 2004a; Miranda-Zapico et al., 2011).

Em um estudo realizado entre 1997 a 2003, em escala mundial, importantes variações e taxas elevadas de resistência foram observadas entre os isolados de *C. glabrata* (14,3 % a 22,8 %) (Pfaller et al., 2005b). A frequência desta espécie quando isolada de pacientes com candidemia varia de acordo com a região geográfica (Pfaller & Diekema, 2007a), e o mesmo acontece com a frequência da resistência ao FLZ (Pfaller et al., 2005b). Nas regiões onde *C. glabrata* é mais comum, como na América do Norte, a taxa de resistência é maior. Já na América Latina e Ásia-Pacífico, regiões em que esse micro-organismo é menos encontrado, os isolados apresentam menor resistência (Pfaller & Diekema, 2007a).

No Brasil, estudos epidemiológicos mostraram que a incidência de candidemia por *C. glabrata* é baixa (Nucci et al., 2010). Entretanto, um estudo retrospectivo recentemente realizado nesse país demonstrou que sua incidência está aumentando, e aparentemente está relacionada ao nível elevado do uso de FLZ em hospitais (Pasqualotto et al., 2008).

A resistência cruzada entre FLZ e os triazóis voriconazol (VRZ), posaconazol (POZ), e itraconazol (ITZ) pode ocorrer e está bem descrita entre os isolados de *C. glabrata* (Pfaller et al., 2004b; Borst et al., 2005; Pfaller et al., 2005a; Pfaller et al., 2005b; Sanguinetti et al., 2005). Essa resistência tem se manifestado clinicamente, demonstrando que pacientes com fungemia por *C. glabrata* e exposição prévia ao FLZ falharam ao tratamento com VRZ (Magill et al., 2006). Assim, a suscetibilidade desta espécie ao FLZ, ou outros azóis não é previsível e requer confirmação em clínica e ensaio de suscetibilidade aos antifúngicos (Pfaller & Diekema, 2007a).

### **2.2.3 *Candida parapsilosis***

A incidência de *C. parapsilosis* tem aumentado expressivamente, demonstrando ser, em muitos estudos, a segunda espécie de *Candida* mais comumente isolada de culturas de sangue (Rodero et al., 2005; Almirante et al., 2006; Brito et al., 2006; Fridkin et al., 2006). Há também alguns relatos de hospitais da Europa (Pfaller et al., 2001), Ásia (Nakamura & Takahashi, 2006) e América do Sul (Medrano et al., 2006) que mostram uma maior frequência desta em relação a *C. albicans*. No Brasil, em estudo realizado no estado do Ceará com 40 culturas de sangue de pacientes com candidemia foram

identificados 18 casos de *C. parapsilosis*, enquanto *C. albicans* representou apenas 14 dos casos (Medrano et al., 2006).

O aumento de infecções ocasionadas por *C. parapsilosis* tem sido atribuído a uma variedade de fatores de risco, incluindo a capacidade de crescimento em soluções de nutrição parenteral (Solomon et al., 1984; Trofa et al., 2008) e habilidade para formar biofilmes em cateteres e materiais de prótese (Levin et al., 1998; Kuhn et al., 2002; Shin et al., 2002). São as leveduras mais usualmente isoladas das mãos dos profissionais de saúde (Saiman et al., 2001; Bonassoli et al., 2005) e persistem em ambientes hospitalares (Clark et al., 2004; Kuhn et al., 2004; Sarvikivi et al., 2005), sendo frequentemente isoladas em unidades de dermatologia (Pfaller et al., 2008a). Além disso, *C. parapsilosis* é de especial preocupação em recém-nascidos criticamente doentes (Fridkin et al., 2006; Clerihew et al., 2007) onde é muitas vezes associada à mortalidade neonatal (Roilides et al., 2004; Clerihew et al., 2007).

Geralmente *C. parapsilosis* são suscetíveis a agentes antifúngicos (Pfaller et al., 2004b), mas alguns estudos recentes estão sugerindo sensibilidade diminuída aos azóis (Sarvikivi et al., 2005; Pfaller et al., 2008a) e equinocandinas (Pfaller et al., 2008b), com casos de multirresistência (Moudgal et al., 2005). Na Finlândia, o uso em longo prazo de FLZ para controlar infecções da corrente sanguínea em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal levou ao surgimento de uma cepa resistente ao FLZ, a qual foi responsável por infecções cruzadas que causaram candidemias por um período de 12 anos (Sarvikivi et al., 2005).

Um elevado grau de variação da suscetibilidade de *C. parapsilosis* ao FLZ foi observado de acordo com a região geográfica. Um total de 24 países foram estudados e os isolados da Europa apresentaram-se mais suscetíveis (95,8 % Sensíveis, 2,4 % Resistentes). Já os isolados da região da África e Oriente Médio foram aqueles que demonstraram menor suscetibilidade (79,3 % sensíveis, 15,5 % resistentes), sendo a África do Sul o país com mais isolados resistentes (74,2% sensíveis, 20,3% resistentes). No Brasil, a taxa de sensibilidade foi de 97,2% (Pfaller et al., 2008a).

#### **2.2.4 Candidemia Polimicrobiana**

Episódios de infecção na corrente sanguínea, bacteriana ou fúngica, são geralmente devidos a espécies individuais, ou seja, infecções monomicrobianas. Fungemias polimicrobianas consistem de várias espécies de fungos isolados a partir da mesma cultura de sangue e são pouco descritas, sendo a candidemia polimicrobiana considerada um evento clínico infrequente (Pulimood et al., 2002).

Conseqüentemente este tipo de infecção tem sido raramente investigado, recebendo pouca atenção (Boktour et al., 2004). No entanto, as diferentes espécies de *Candida* têm aparências morfológicas coloniais semelhantes em meios de cultura de rotina, e a frequência de candidemia polimicrobiana pode estar sendo subestimada (Boktour et al., 2004). Os resultados de um estudo conduzido por Ahmad et al. (2002) que utilizaram uma técnica molecular mais sensível (reação em cadeia da polimerase

*seminested*), sugerem que a frequência de candidemia polimicrobiana pode ser maior do que tem sido relatado.

*Candida albicans* é a espécie mais isolada. As outras espécies são principalmente *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. krusei* (Jensen et al., 2007). As combinações mais comuns são *C. albicans* e *C. glabrata* (Jensen et al., 2007; Nace et al., 2009), *C. albicans* e *C. parapsilosis* (Jensen et al., 2007; Nace et al., 2009), *C. glabrata* e *C. krusei* (Nace et al., 2009).

Ao contrário das infecções da corrente sanguínea devido a múltiplas bactérias, as quais estão associadas a uma maior mortalidade (Weinstein et al., 1986), a candidemia polimicrobiana não parece aumentar o risco de morte (Guerra-Romero et al., 1989; Komshian et al., 1989; Pulimood et al., 2002), embora alguns estudos demonstrem o contrário (Nace et al., 2009). Fatores comumente associados com candidemia polimicrobiana foram cateteres vasculares (Jensen et al., 2007), nutrição parenteral (Jensen et al., 2007), procedimentos gastrointestinais, hospitalização prolongada (Guerra-Romero et al., 1989) e uso de antibióticos (Jensen et al., 2007).

A caspofungina (CSP) vem sendo bastante utilizada para o tratamento de candidemia polimicrobiana, mas o FLZ é, ainda, o agente terapêutico mais comumente prescrito. A candidemia polimicrobiana pode representar um desafio terapêutico, pois o tratamento médico eficaz e, sobretudo seguro, deve visar mais de uma espécie (Nace et al., 2009). Em estudo realizado por Boktour et al. (2004), foi observado que pacientes com candidemia polimicrobiana que receberam tratamento com um único antifúngico

tiveram uma menor resposta terapêutica (35%) quando comparado com pacientes com candidemia relacionada a apenas *C. albicans* (69%). Em contraste, aqueles que receberam terapia combinada aparentemente tiveram melhores resultados.

### **2.3 Terapia antifúngica e Mecanismo de Ação**

O tratamento de infecções fúngicas tem diversas limitações devido a problemas com perfis de segurança do fármaco, resistência fúngica e eficácia do medicamento. Essas limitações restringem o número de fármacos usados na terapia de micoses invasivas (Carrillo-Muñoz et al., 2006).

Segundo Flevari et al. (2013), a terapia para infecções por *Candida* pode ser:

a) terapia profilática: geralmente é aplicada em pacientes que não apresentam sinais ou sintomas de infecções, porém são considerados de alto risco;

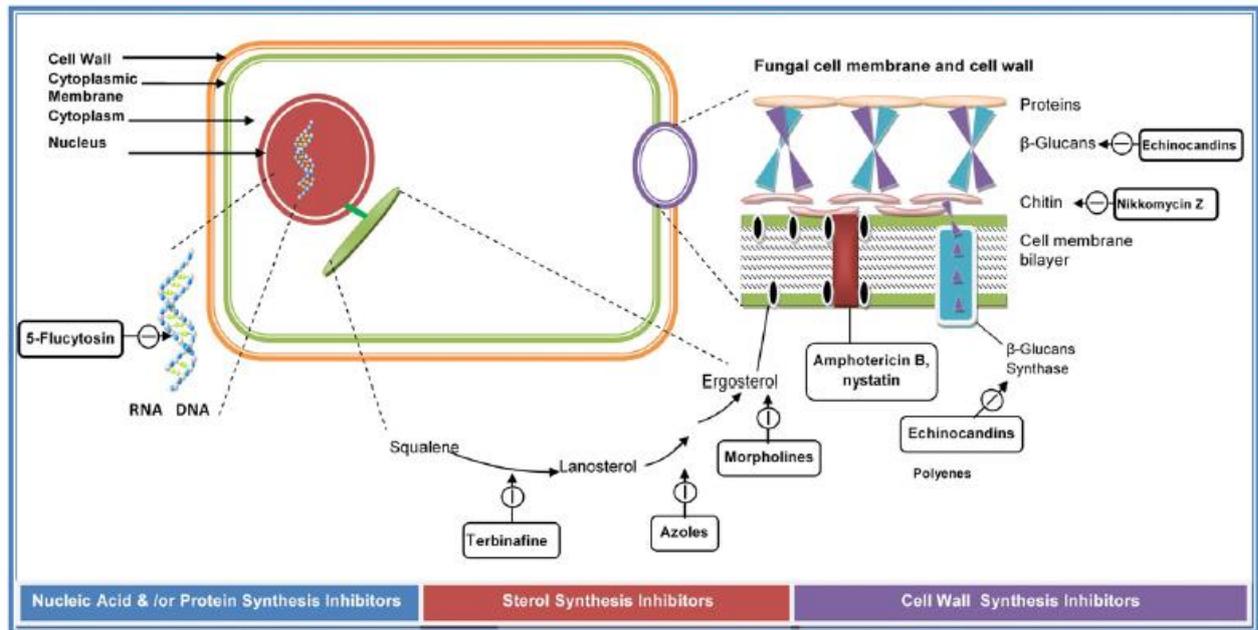
b) terapia de preferência: há a presença de marcadores inflamatórios positivos associados com fatores de risco;

c) terapia empírica: é realizada através de dados clínicos, mas sem saber o agente causador da infecção;

d) terapia direcionada: se aplica depois de diagnosticado o patógeno.

Atualmente são utilizados cinco classes de antifúngicos: polienos, análogos de pirimidina, azóis, equinocandinas e alilaminas (Flevari et al.,

2013). Os alvos desses grupos de medicamentos são ilustrados na figura 1 (Kathiravan et al., 2012).



**FIGURA 1.** Alvo dos antifúngicos.  
Fonte: (Kathiravan et al., 2012; com modificações).

### 2.3.1 Polienos

Os polienos são fungicidas de largo espectro produzidos pela bactéria do gênero *Streptomyces*, e apresentam porções hidrofílicas e hidrofóbicas em suas moléculas. Os fármacos que pertencem a este grupo têm alta afinidade com o ergosterol da membrana fúngica, se complexando e formando pequenos canais transmembranares, os quais alteram a permeabilidade da membrana. Esse efeito destrói o gradiente de prótons e permite a saída de componentes citoplasmáticos vitais, o que leva ao rompimento da membrana e morte celular (Andriole, 2000; Denning & Hope, 2010; Flevari et al., 2013).

A nistatina (NIT) foi descoberta em 1950 e ainda é usada na forma tópica, bem como a natamicina (NAT) que ainda é largamente utilizada como um agente oftálmico tópico. Anfotericina B (AnfB) é considerada o "padrão ouro" para o tratamento de diversas doenças invasivas fúngicas, porém apresenta sérios problemas de toxicidade, pois este fármaco tem pouca capacidade de diferenciar ergosterol da célula fúngica do colesterol das células de mamíferos. Atualmente existem três derivados lipídicos da AnfB - complexo lipídico de AnfB, AnfB de dispersão coloidal e AnfB lipossomal - os quais foram desenvolvidos para limitar a toxicidade, especialmente insuficiência renal. As três formulações apresentam boa atividade fungicida, sem diferença na eficácia, com a vantagem de mostrarem-se menos nefrotóxicas (Carrillo-Muñoz et al., 2006; Denning & Hope, 2010; Flevari et al., 2013).

### **2.3.2 Análogo da Pirimidina**

A 5FC, ou 5-fluorocitosina, é um agente antifúngico sintético ativo contra uma gama limitada de infecções fúngicas sistêmicas, sendo principalmente eficaz naquelas causadas por leveduras. Quando administrada isoladamente, é comum o desenvolvimento de resistência, por isso costuma ser usada em combinação com outros antifúngicos. A 5FC é transportada para o interior das células fúngicas pela citosina permease, onde é desaminada à 5-fluorouracil pela enzima citosina desaminase (ausente na células humanas). 5-fluorouracil é, eventualmente, convertido em 5-fluoro-basculante, que é um inibidor da timidilato sintase, uma enzima essencial para a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA). 5-fluorouracil também sofre fosforilação se

incorporando ao ácido ribonucleico (RNA) e produzindo nucleotídeos fluorados tóxicos, que resultam na interrupção da síntese proteica (Carrillo-Muñoz et al., 2006; Denning & Hope, 2010).

### 2.3.3 Derivados Azólicos

Os primeiros azóis que surgiram foram os imidazóis, os quais apresentam dois átomos de nitrogênio no anel azólico e atualmente são representados principalmente pelo cetoconazol (CTZ), econazol (ECZ), miconazol (MCZ) e clotrimazol (CLZ). Modificações no anel ativo, apresentando três átomos de nitrogênio, são denominados triazóis, como é o caso do ITZ e FLZ, e também dos novos derivados triazólicos como VRZ, POZ, ravuconazol (RVZ) e albaconazol (ABZ) (Denning & Hope, 2010).

O modo de ação dos derivados azólicos baseia-se na inibição da biossíntese de ergosterol da membrana fúngica. Os derivados azólicos interagem com o ferro da porção heme da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase (codificada pelo gene ERG11), uma enzima do citocromo P-450, inativando-a. Dessa maneira não ocorre a desmetilação do lanosterol, e há interrupção da síntese do ergosterol, o qual é essencial para manter a integridade da membrana fúngica. Como consequência, há acúmulo de 14 $\alpha$ -metilfecosterol (precursor do ergosterol) que gera o produto tóxico 14 $\alpha$ -metil-3,6-diol. Esses dois fatores contribuem para a inibição do crescimento celular (Carrillo-Muñoz et al., 2006; Denning & Hope, 2010; Flevari et al., 2013).

Fluconazol está entre os fármacos mais utilizados para a prevenção e tratamento de infecções superficiais e invasivas ocasionadas por *Candida*

(Denning & Hope, 2010). Esse fármaco é fungistático, tem boa penetração na barreira hemato-encefálica, praticidade de administração por via oral e baixa toxicidade. O uso profilático do FLZ levou a uma mudança no perfil de espécies de *Candida* resistentes (Henry et al., 2000; Flevvari et al., 2013).

O ITZ pode ser utilizado para o tratamento da candidíase oral e vulvovaginal e geralmente é prescrito quando há resistência ao FLZ, mas desde que não haja evidência laboratorial de resistência cruzada. O VRZ é muito utilizado em casos de infecção disseminada causada por *C. krusei* e *C. glabrata* resistentes ao FLZ, entretanto o seu custo faz com que seu uso seja ainda muito limitado (Denning & Hope, 2010).

#### **2.3.4 Equinocandinas**

Caspofungina, micafungina (MCF), e anidulafungina (AND) pertencem a essa classe. Estes compostos têm como alvo a parede celular de fungos pela inibição da enzima  $\beta$ -1,3-D-glucana sintase, conduzindo à instabilidade osmótica e lise celular. Equinocandinas são consideradas seguras, com poucos efeitos colaterais e estão disponíveis apenas para uso parenteral. Estes fármacos estão sendo cada vez mais utilizados para o tratamento de candidíase disseminada, pois são eficazes contra isolados de *Candida* com resistência intrínseca ou adquirida aos triazóis, podem ser usados com segurança em pacientes com insuficiência renal e hepática e têm poucas interações medicamentosas. Entretanto, após tratamento prolongado também podem ocasionar o desenvolvimento de resistência fúngica (Denning & Hope, 2010; Flevvari et al., 2013).

### **2.3.5 Alilaminas**

A terbinafina (TBF) é a principal alilamina. Seu mecanismo de ação consiste na inibição alostérica da enzima fúngica esqualeno oxidase (codificada pelo gene ERG1), com impedimento da conversão do esqualeno em 2,3-oxidoesqualeno. Com consequência, tem-se o acúmulo de quantidades tóxicas de esqualeno e redução do ergosterol (White et al., 1998).

## **2.4 Resistência aos Antifúngicos e Mecanismo de Resistência em *Candida* spp.**

As infecções fúngicas são comuns em pacientes imunodeprimidos, o que eleva a dependência de agentes antifúngicos para profilaxia e tratamento. Devido a sua segurança e facilidade de entrega, os derivados azólicos (principalmente o FLZ) são importantes fármacos do arsenal antifúngico e vastamente utilizados. Coincidindo com este aumento do uso, a resistência tem sido observada (White et al., 1998).

A falha na resposta à terapia antifúngica pode ocorrer devido à resistência microbiológica ou à resistência clínica. A resistência clínica é a persistência ou a progressão de uma infecção, apesar da terapia antimicrobiana apropriada. A resposta clínica bem sucedida não depende apenas da suscetibilidade do micro-organismo, mas também do sistema imune do hospedeiro, penetração e distribuição do medicamento e adesão do paciente ao tratamento correto (White et al., 1998; Tobudic et al., 2012).

Resistência microbiológica é a falta de suscetibilidade de um microrganismo a um determinado antimicrobiano. Essa avaliação é realizada através de testes *in vitro* e o micro-organismo é definido como resistente quando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fármaco ultrapassa os limites de suscetibilidade para esse organismo. A resistência microbiológica pode ser descrita como intrínseca ou extrínseca. A primeira é quando um micro-organismo é resistente a um fármaco antes da exposição, como é o caso de *C. krusei* e algumas cepas de *C. glabrata* ao FLZ; e a segunda, é o desenvolvimento da resistência em resposta à exposição a um agente antimicrobiano e é geralmente dependente da expressão gênica alterada (White et al., 1998; Tobudic et al., 2012).

Segundo White et al. (1998) vários fatores podem conduzir a presença de cepa resistente em um paciente:

- a) infecção inicial por uma cepa resistente intrinsecamente;
- b) a substituição para uma espécie mais resistente como *C. krusei* e *C. glabrata*: essas espécies podem estar presentes no indivíduo como organismos comensais, se tornando um problema quando este se torna imunodeprimido e faz uso dos azóis como profilaxia ou tratamento, levando a pressão seletiva (suprimento de isolados sensíveis e o crescimento daqueles resistentes);
- c) alterações genéticas que tornam a cepa resistente após exposição prolongada ao fármaco: numa grande população de leveduras sob pressão seletiva do medicamento, podem ocorrer mutações aleatórias

específicas que tornam a célula mais resistente, e esta ligeiramente se torna a população dominante;

d) expressão gênica transitória que processa uma célula temporariamente resistente: uma célula pode alterar o seu fenótipo, provavelmente através de expressão transiente de genes, tornando-se resistente na presença do fármaco. Porém o fenótipo de resistência pode reverter rapidamente a um fenótipo suscetível uma vez que a pressão do fármaco é eliminada. Esse fenômeno, chamado de resistência epigenética, é, entretanto, pouco conhecido;

e) capacidade de alternar entre várias formas diferentes, referidas como "*Phenotypic switching*". Esses fenótipos representam diferentes estados de uma levedura, cada uma expressando um conjunto de genes, e se manifestam como diferentes estruturas e morfologias celulares. Isso pode exibir uma diferente suscetibilidade.

Cinco mecanismos principais de resistência aos azóis têm sido descritos em espécies de *Candida*, como descritos a seguir, e mais de um mecanismo pode estar envolvido para conferir resistência em uma determinada cepa, podendo ter efeitos aditivos ou levar à resistência cruzada (Pfaller, 2012).

#### **2.4.1 Alteração dos lipídios da membrana**

Os componentes lipídicos da membrana plasmática podem sofrer modificações que conduzem a uma falta de penetração do fármaco. Como consequência não há acúmulo intracelular, impedindo o antifúngico de exercer o seu efeito sobre a célula (Barchiesi et al., 2000).

### **2.4.2 Superexpressão dos genes que codificam para as bombas de efluxo**

A indução de bombas de efluxo expulsa o fármaco para fora da célula, diminuindo sua concentração intracelular, o que resulta em baixa quantidade de fármaco no local de ação (Pfaller, 2012). As proteínas de transporte envolvidas na remoção dos azóis do citoplasma através das bombas de efluxo fazem parte da família ABC e *major facilitator superfamily* (MFS) (Tobudic et al., 2012). A resistência a azóis acontece quando há superexpressão dos genes CDR1, CDR2 e MDR1, os quais codificam essas proteínas de transporte. Os genes MDR codificam transportadores da família MFS específicos para o FLZ, portanto sua superexpressão confere resistência a apenas esse fármaco, não estando associada à resistência cruzada a outros azóis; os genes CDR codificam transportadores da família ABC e sua superexpressão torna uma célula resistente à classe dos azóis, estando intimamente ligada à resistência cruzada, e muitas vezes, apenas esse mecanismo é suficiente para conferir resistência (Pfaller, 2012; Tobudic et al., 2012).

### **2.4.3 Mutações pontuais no gene ERG11**

O gene ERG11 codifica a enzima alvo dos azóis, a lanesterol 14 $\alpha$ -demetilase (ou Erg11p) (Bueno-Silva et al., 2013). Portanto, mutações pontuais neste gene alteram o sítio de ligação dos azóis, resultando em uma afinidade reduzida ou incapacidade de ligação entre fármaco-enzima (Pfaller,

2012). A resistência intrínseca de *C. krusei* ao FLZ tem sido atribuída à diminuição da afinidade de ERG11p ao fármaco, pois mais de 80 substituições de aminoácidos na ERG11p foram detectados (Sanglard & Odds, 2002; Tobudic et al., 2012).

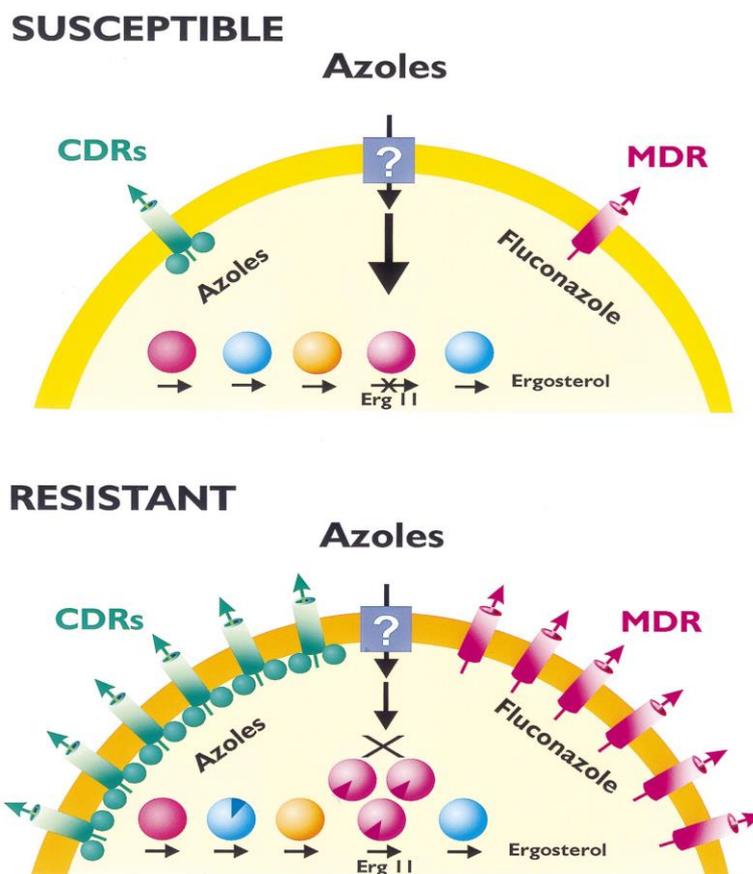
#### **2.4.4 Superexpressão do gene ERG 11**

Com a exposição ao FLZ pode haver um mecanismo de *feedback* em resposta à depleção do ergosterol, ocorrendo uma superexpressão do gene ERG11 (Tobudic et al., 2012). Com esse gene superexpresso há maior síntese da enzima lanesterol 14 $\alpha$ -demetilase, o que torna a biossíntese do ergosterol possível, mesmo na presença de FLZ. Esse mecanismo pode agravar o anterior, pois além da afinidade da enzima alvo estar reduzida aos azóis, ela também está superexpressa (Pfaller, 2012; Tobudic et al., 2012).

#### **2.4.5 Mutação do gene ERG3**

Além de alterações na lanesterol 14 $\alpha$ -demetilase, um mecanismo comum de resistência é uma alteração de outras enzimas da mesma via biossintética. A exposição aos azóis resulta na diminuição do ergosterol da membrana dos fungos e acúmulo do produto tóxico 14 $\alpha$ -metil-3,6-diol, o qual inibe o crescimento fúngico. Mutação do gene ERG3 impede a formação do produto tóxico 14 $\alpha$ -metil-3,6-diol a partir de 14 $\alpha$ -metilfecosterol, acumulando precursores que podem substituir o ergosterol da célula. Esses dois fatores levam a membranas funcionais e contribuem para o desenvolvimento da resistência (Tobudic et al., 2012).

Todos os mecanismos moleculares acima descritos encontram-se resumidos na Figura 2.



**FIGURA 2.** Mecanismos moleculares de resistência aos azóis.

Em uma célula suscetível, azóis entram na célula através de um mecanismo desconhecido, talvez por difusão passiva. Os azóis então inibem o gene ERG11 (círculo rosa), bloqueando a formação de ergosterol. Dois tipos de bombas de efluxo são expressas em níveis baixos. Os genes CDRs codificam proteínas da família ABC (tubos verdes), com dois domínios (círculos verdes). O gene MDR codifica proteína da família MFS (tubos vermelhos). Em um modelo de célula resistente, os azóis também entram na célula através de um mecanismo ainda desconhecido. Os azóis são menos eficazes contra ERG11 por duas razões: a enzima tem sido modificada por mutações pontuais específicas (fatias escuras em círculos cor de rosa) e/ou a enzima é abundante. Modificações nas outras enzimas na via de biossíntese de ergosterol contribuem para a resistência a azóis (fatias escuras em esferas azuis). Os componentes lipídicos da membrana plasmática são modificados (laranja mais escuro na membrana). Finalmente, os azóis são removidos da célula por superexpressão dos genes CDR (ABC) e MDR (MFS). Os genes CDR são eficazes contra muitos azóis, enquanto MDR parece ser específico para o FLZ. Fonte: (White et al., 1998, com modificações).

Em isolados clínicos é improvável que uma única mutação irá transformar uma cepa sensível em resistente. Resistência geralmente surge gradualmente após longos períodos na presença do antimicrobiano, sugerindo que várias alterações irão contribuir para o fenótipo de resistência final. Os mecanismos de resistência a fármacos antifúngicos ainda está em processo de evolução e provavelmente há diversos outros mecanismos que são desconhecidos, como por exemplo, alguma alteração na importação ou processamento do fármaco (White et al., 1998).

## **2.5 Terapia Antifúngica Mediante Associação de Fármacos**

O tratamento de infecções fúngicas invasivas apresenta diversas complicações devido à alta toxicidade de alguns fármacos utilizados, baixa tolerância a altas doses de antifúngicos e espectro de atividade estreito (Mukherjee et al., 2005). Para tentar solucionar essa problemática faz-se o uso da terapia combinada na clínica, porém mais estudos científicos da associação de fármacos estão sendo realizados para demonstrar a real eficácia desse tipo de tratamento (Mukherjee et al., 2005; Alves et al., 2012; Zeidler et al., 2013).

As principais justificativas para esses estudos são baseados em:

a) Distintos mecanismos de ação atuando juntos de forma a ter alvos complementares dentro das células fúngicas: inibição de diferentes estágios nas vias bioquímicas intracelulares fúngicas; aumento da penetração de um agente antifúngico, proporcionado por outro que tenha ação na membrana; inibição de proteínas carreadoras que possam exportar o fármaco da célula (Mukherjee et al., 2005);

b) Ampliação do espectro de ação, importante quando se desconhece o agente infeccioso e também para pacientes suspeitos de infecções mistas ou infectados por patógenos resistentes a um determinado fármaco (Vazquez, 2003; Gullo, 2009);

c) Obtenção de atividade fungicida ao associar dois agentes fungistáticos (Vazquez, 2003);

d) Diminuição na dosagem do fármaco, diminuindo sua toxicidade e seus efeitos colaterais, além de retardar a emergência de mutantes resistentes (Vazquez, 2003; Gullo, 2009);

e) Menor tempo de tratamento.

Esses fatores contribuem para uma maior segurança do tratamento e redução do número de organismos resistentes, com menor probabilidade de falha terapêutica, quando comparada com a monoterapia fúngica (Gullo, 2009). Entretanto nem todas as combinações trazem benefícios, pois pode haver interações antagônicas que diminuem a eficácia dos fármacos. A associação também pode aumentar a possibilidade de interações com outros medicamentos, além de elevar o custo do tratamento. Por isso, também são necessários estudos para verificar a estabilidade farmacocinética e as características farmacodinâmicas da combinação de fármacos (Vazquez, 2003; Johnson et al., 2004; Gullo, 2009).

Há diversos modelos experimentais para medir a eficácia *in vitro* da associação de antimicrobianos. O método mais conhecido para medir tais efeitos de combinação é o *checkerboard* (Johnson et al., 2004). Parecido com um tabuleiro de xadrez, o experimento faz com que, através de uma diluição

seriada bidimensional, um amplo cruzamento de concentrações entre os antifúngicos seja avaliado simultaneamente. O *checkerboard* baseia-se no cálculo do índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) para demonstrar sinergismo, aditividade, indiferença e antagonismo entre os antimicrobianos (Lewis et al., 2002; Alves et al., 2012).

Sinergismo é definido como uma melhora da atividade em uma magnitude maior que a soma dos efeitos de cada antifúngico individualmente. Aditividade é quando há uma melhora da atividade antifúngica, porém não maior que a soma dos efeitos dos fármacos. Indiferença refere-se à combinação que não demonstra melhor atividade antifúngica comparada quando o mais ativo dos agentes é utilizado sozinho. Antagonismo é quando a atividade antifúngica da combinação dos agentes é menor que a atividade do antifúngico menos ativo (Baddley & Pappas, 2005).

## **2.6 Terapia Antifúngica com substâncias ou compostos naturais**

### **2.6.1 Aspectos gerais**

Apesar da terapia associada entre alguns fármacos convencionais ter se mostrado eficiente, existe uma clara necessidade de introduzir novos agentes antifúngicos no arsenal farmacêutico. No entanto, para o desenvolvimento de um novo antifúngico, é importante o conhecimento sobre seu potencial desenvolvimento da resistência. Novas classes de medicamentos antifúngicos ativos contra cepas resistentes aos azóis serão, evidentemente,

importantes para estratégias terapêuticas futuras (White et al., 1998; Chapman et al., 2008).

O sucesso do tratamento antifúngico não depende apenas do medicamento, mas de vários outros fatores, como o sistema imunológico do hospedeiro. A combinação de azóis e substâncias que sejam capazes de estimular o sistema imunológico do indivíduo pode ser uma importante estratégia. Outro alvo interessante são as bombas de efluxo. Qualquer substância que inibir a atividade destas bombas provavelmente irá aumentar a concentração intracelular de azóis, aumentando, assim, a eficácia. Por isso é provável que o futuro da terapia para infecções fúngicas resida em combinações de medicamentos (Tsuruo et al., 1981; White et al., 1998; Lerner-Marmarosh et al., 1999).

A descoberta de produtos naturais com propriedades antifúngicas ou, ainda, com atividade combinada com antifúngicos de uso comum, pode representar uma nova forma de tratamento e vir a solucionar os problemas relacionados à resistência microbiana (Shokri et al., 2011; Barros et al., 2013). Dessa forma, pode-se direcionar a indústria farmacêutica de forma a favorecer a produção e o uso de fitoterápicos como adjuvantes de determinados tratamentos.

Observam-se vários estudos bem-sucedidos com extratos, frações e moléculas isoladas de compostos naturais já testadas contra fungos (Gertsch et al., 2003; Ishida et al., 2006; Zhang et al., 2006; Escalante et al., 2008; Barros et al., 2013). No Brasil, um país com vasta biodiversidade, a própolis tem se destacado em estudos farmacológicos devido às suas inúmeras

propriedades biológicas (Freitas et al., 2006; Bufalo et al., 2009; Agüero et al., 2010; Bueno-Silva et al., 2013; De Castro et al., 2013), apresentando perspectivas positivas em relação à atividade antifúngica (Agüero et al., 2010; De Castro et al., 2013). Suas atividades imunomoduladora e anti-inflamatória também podem ser úteis para combater infecções causadas por fungos (Sforcin & Bankova, 2011).

### **2.6.2 Própolis**

Própolis, também conhecida como “cola de abelha”, é uma mistura resinosa complexa formada de substâncias que abelhas da espécie *Apis mellifera* coletam de diversas fontes botânicas, de diferentes partes das plantas, como ramos, flores, pólen, brotos e exudatos, as quais se misturam com ceras, enzimas e secreções salivares desses insetos (Ghisalberti, 1979; Burdock, 1998).

O produto possui aparência física variável, dependendo de sua procedência. A cor pode ser em tons de creme, amarelo, verde, marrom claro, escuro ou avermelhado. Algumas amostras têm características friáveis, de textura dura, enquanto que outras poderão ser elásticas e gomosas. Possui odor característico que pode variar dependendo da amostra (Ghisalberti, 1979; Salatino et al., 2005).

A palavra própolis deriva do grego (pro= a favor, na defesa; e polis= cidade) e significa uma substância em defesa da colmeia. A própolis é utilizada pelas abelhas para diversos fins: preencher rachaduras ou lacunas existentes nas colmeias e assim evitar a entrada de outros organismos, manter a

temperatura interna em torno de 35 °C, proteger a colônia de doenças e cobrir carcaças de invasores que foram mortos no local, evitando sua decomposição (processo semelhante ao embalsamamento). As paredes hexagonais e a entrada da colmeia também são forradas com própolis, o que torna a parede rígida, e também contribui para manter um ambiente interno asséptico (Ghisalberti, 1979).

Desde os tempos antigos, há pelo menos 300 a.C, a própolis tem sido empregada como recurso terapêutico. Egípcios, gregos, incas e romanos relataram o uso da própolis pelas suas características gerais de cura. Aristóteles recomendava o uso de própolis para tratar abscessos e feridas; Hipócrates empregava como cicatrizante interno e externo; Plínio, historiador romano, refere-se a ela como um medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar dores; soldados romanos usavam a própolis como um agente antisséptico e cicatrizante nos ferimentos causados pelas guerras; os egípcios embalsavam os mortos devido às propriedades antiputrefação; incas a utilizavam como antipirético; e mais recentemente um medicamento contendo vaselina e própolis (propolisin Vasogen) foi utilizado para o tratamento de feridas e regeneração tecidual durante a guerra Boer (Ghisalberti, 1979; Castaldo & Capasso, 2002; Salatino et al., 2005).

Nos tempos modernos, a própolis começou a ser reconhecida como forma de tratamento entre os anos de 1950 e 1960 na antiga União Soviética e países do Leste Europeu, como a Bulgária, Tchecoslováquia e Polônia (Salatino et al., 2005). Entretanto, apenas em meados de 1980 a própolis se popularizou nos países da Europa Ocidental, América do Norte e Sul e Japão

(principal importador de própolis atualmente, com preferência à própolis verde de origem brasileira), se tornando um produto importante na medicina complementar alternativa (Pereira et al., 2002; Lustosa et al., 2008). Até então, a própolis era considerada pelos apicultores um produto indesejado, já que diminuía a quantidade de mel obtido e não tinha valor de mercado. Atualmente, é tida como o principal produto para vários apicultores brasileiros. Como alternativa para aumentar seu rendimento, são feitas ranhuras longitudinais ao longo das caixas de madeiras onde são criadas as colônias de abelhas, para estas depositarem própolis nas aberturas que detectam, aumentando, assim, a produção (Salatino et al., 2005).

A própolis é considerada um produto animal, mas uma proporção considerável dos seus componentes, principalmente aqueles com atividade biológica, são derivadas de plantas (Salatino et al., 2005). A composição da própolis é extremamente complexa. De modo geral, contém 50% de resinas e bálsamos, 30 % de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de várias outras substâncias (Burdock, 1998) como flavonoides (galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenoides e fenilpropanoides (como os ácidos caféico e clorogênico), esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos e ácidos graxos (Lustosa et al., 2008).

Além de complexa, a composição química da própolis pode variar conforme a localização geográfica e fonte vegetal, o que torna difícil sua padronização, e acabam por influenciar na sua atividade (Burdock, 1998; Cunha et al., 2004; Bankova, 2005). Amostras de própolis da região tropical

têm mostrado diferenças significativas na composição química daquelas originárias de regiões temperadas, bem como, um aumento das atividades biológicas foi observado (Bankova, 2005; Trusheva et al., 2006). Park et al., (2000) realizaram uma pesquisa com 500 amostras de própolis de diferentes regiões do Brasil. Verificou-se que existe uma grande diversidade de própolis no país, explicado pelas diferentes vegetações existentes em cada região de coleta. Dessa maneira, a partir de suas características físico-químicas, composição química, propriedades biológicas e localização geográfica, a própolis brasileira foi classificada por esses pesquisadores em 12 grupos: cinco grupos originados do Sul do país, seis do nordeste, e um grupo do sudeste. A própolis verde, ou “própolis Alecrim”, com origem botânica de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) é o tipo de própolis mais popular no Brasil, bem como o mais estudado (Trusheva et al., 2006).

#### **2.6.2.1 Propriedades biológicas e terapêuticas da própolis**

Nas últimas décadas, o interesse por este produto apícola tem aumentado e diversos trabalhos científicos sobre as suas propriedades biológicas têm sido publicados, tornando-se atrativo para o desenvolvimento de novos medicamentos (Castaldo & Capasso, 2002; Lotfy, 2006; Sforcin & Bankova, 2011). Já foi descrita atividade antimicrobiana contra diferentes bactérias, fungos, vírus e parasitas, mostrando o amplo espectro de ação desse produto. Há vários relatos da atividade antimicrobiana da própolis para diversas espécies de bactérias gram positivas, porém há uma atividade limitada para as gram-negativas; entretanto, a atividade varia dependendo da origem da

amostra, da dosagem, e dos solventes de extração (Dobrowolski et al., 1991; Mirzoeva et al., 1997; Sforcin et al., 2000; Ugur & Arslan, 2004; Righi et al., 2011).

Algumas das bactérias sensíveis à própolis foram: *Escherichia coli*, *Brucella melitensis*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*, *Providencia stuartii*, *Morganella morgani* e *Providencia stuartii* (Kujumgiev et al., 1993; Mirzoeva et al., 1997; Stepanovic et al., 2003; Ugur & Arslan, 2004; Righi et al., 2011).

Em um artigo de revisão, Lotfy (2006) cita atividade contra *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, mostrando sua eficácia como um agente anti-úlceras. De Barros et al. (2007) também verificaram que a própolis pode servir como um protetor gástrico útil no tratamento e prevenção de úlceras.

Sobre a capacidade anti-protozoária, já foi constatado que própolis inibe *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis* e *Toxoplasma gondii*, entre outros (De Castro & Higashi, 1995; Dantas et al., 2006; Freitas et al., 2006; Lotfy, 2006; Lustosa et al., 2008; Menna-Barreto et al., 2009).

Vynograd et al. (2000), demonstraram que uma pomada contendo própolis foi capaz de curar lesões de herpes vaginal. Kujumgiev et al. (1999),

Gekker et al. (2005) e Bufalo et al. (2009) também encontraram ação antiviral nesse composto.

A atividade antifúngica já foi relatada por diversos autores, contra uma variedade de fungos, entre eles: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum*, *Candida* sp., *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium notatum*, *Geotrichum candidum*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon ovoides* e *Saccharomyces cerevisiae* (Kujumgiev et al., 1999; Lotfy, 2006; Fernandes et al., 2007; Agüero et al., 2010; Dalben-Dota et al., 2010; De Castro et al., 2013; Ota et al., 2001; Soares & Cury, 2001; Murad et al., 2002; Sawaya et al., 2002; Oliveira et al., 2006; Longhini et al., 2007; Salomao et al., 2008; Siqueira et al., 2009; Righi et al., 2011).

Em estudo realizado por Ota et al. (2001), em diferentes espécies de *Candida*, foi averiguado que *C. albicans* mostrou-se mais suscetível à própolis, seguida de *C. tropicalis*, *C. krusei*, e por último *C. guilhermondii*. Esse grupo também verificou que pacientes com prótese e que usaram extrato hidroalcoólico de própolis como enxaguante bucal, mostraram uma diminuição no número de levedura do gênero *Candida*.

Oliveira et al. (2006), encontraram menor suscetibilidade para as espécies de *C. lusitaniae* e *C. tropicalis* em comparação com *C. albicans* e *C. parapsilosis* isoladas de onicomicoses. Dalben-Dota et al. (2010) também avaliaram a atividade antifúngica de extrato de própolis em isolados de

onicomicoses e verificaram alta sensibilidade de *Candida* independente da espécie, incluindo uma cepa de *C. parapsilosis* resistente a NIT. Shokri et al. (2011) observaram que 14 cepas de *C. glabrata* resistentes ao FLZ eram suscetíveis à própolis.

Em pesquisas realizadas por De Castro et al. (2013), foi avaliada a tolerância de diferentes tipos morfo genéticos de *C. albicans* frente à própolis. Estes autores descobriram que o gene MCA1, que codifica uma metacaspase responsável pela morte celular induzida por estresse oxidativo de *C. albicans*, é importante para a morte celular mediada por própolis. Também foi verificado que a morte celular foi mediada via sinalização Ras, a qual está envolvida no controle do crescimento e diferenciação celular e acelera a apoptose. Outro parâmetro avaliado foi o dimorfismo: através da exposição a concentrações fungistáticas de própolis, foi visto que esta reduz drasticamente a transição da fase leveduriforme para a fase filamentosa e, ainda, a levedura exposta ao extrato foi capaz de emitir uma fluorescência verde acumulada na mitocôndria. No mesmo estudo, foi demonstrado que géis e cremes a base de própolis reduziram a carga fúngica em proporção semelhante ao CLZ em modelos de ratos com candidíase vulvovaginal, além de também apresentarem uma atividade na diminuição da formação do biofilme.

Takaisi-Kikuni & Schilcher (1994) identificaram possíveis mecanismos de ação antibacterianos e antifúngicos. Os autores observaram uma inibição da divisão celular na presença de própolis sugerindo que este pode agir através da inibição da replicação do DNA. Além disso, própolis mostrou ter capacidade de desorganizar a parede e membrana celular

causando lise. O mecanismo de ação da própolis mostrou-se complexo e uma simples analogia não pode ser feita para o modo de ação dos antimicrobianos clássicos. (Takaisi-Kikuni & Schilcher, 1994). Mirzoeva et al. (1997) relataram que a própolis contém constituintes que aumentam a permeabilidade da membrana e inibem a motilidade bacteriana.

Apesar de amostras de própolis de diferentes origens terem diferentes composições, dados da literatura mostram que estas têm efeitos antimicrobianos semelhantes. Portanto, não se pode apontar uma substância ou classe individual por ser responsável pela atividade, já que cada tipo de própolis tem substâncias majoritárias diferentes e, ainda, o extrato total muitas vezes apresenta resultados melhores quando comparado com aqueles de substâncias isoladas. Obviamente, dependendo da amostra, diferentes combinações de substância são essenciais para sua ação (Kujumgiev et al., 1999; Sawaya et al., 2002).

Além do vasto espectro de ação contra os micro-organismos, própolis pode apresentar efeitos sinérgicos quando em associação com fármacos antimicrobianos como cloranfenicol, tetraciclina, neomicina, ciprofloxacina, amoxicilina, ampicilina, cefalexina, estreptomicina, cloxacilina, gentamicina, netilmicina e clindamicina (Fernandes et al., 2005; Oksuz et al., 2005; Orsi et al., 2006; Onlen et al., 2007; Orsi et al., 2012).

Mirzoeva et al. (1997) verificaram que concentrações as quais não eram capazes de inibir *B. subtilis* e *E. coli* aumentaram a sensibilidade de *B. subtilis* para kanamicina, ácido nalidíxico, tetraciclina, penicilina G e ampicilina;

e de *E. coli* para tetraciclina e ácido nalidíxico, de forma dependente da concentração de própolis.

Estudos realizados com cepas de *S. aureus* resistentes a benzilpenicilina, tetraciclina e eritromicina mostraram efeito sinérgico quando qualquer um desses antibióticos foi associado à própolis (Shub et al., 1981). Cepas de *S. aureus* resistentes a ampicilina, ceftriaxona, doxaciclina, ácido nalidíxico e trimetoprima + sulfametaxazol, ficaram mais suscetíveis quando esses fármacos foram combinados com esse produto apícola; assim como ampicilina, ácido nalidíxico e trimetoprima + sulfametoxazol para *K. pneumoniae* (Stepanovic et al., 2003).

Pode-se observar que a associação de própolis com antibióticos utilizados no mercado gera efeitos sinérgicos relevantes. Entretanto, são escassos os estudos da associação da própolis com os fármacos antifúngicos. Stepanovic et al. (2003), constataram que a combinação melhora a ação da NIT contra isolados de *C. albicans*, assim como Holderna & Kedzia (1987), também verificaram isso quando em combinação com NAT.

Além da atividade antimicrobiana, uma abundância de outras propriedades farmacológicas têm sido determinadas para própolis. Recentemente um arsenal de artigos vem apresentando que a própolis pode agir como um imunomodulador, anti-inflamatório e analgésico (Hu et al., 2005; Paulino et al., 2006; Ramos & Miranda, 2007; Sforcin, 2007). Própolis pode aumentar a imunidade inata (Orsatti et al., 2010), elevar as citocinas pró-inflamatórias e o número de leucócitos circulantes no sangue periférico (Sforcin & Bankova, 2011), inibir a síntese de prostaglandinas e estimular a atividade

fagocitária de macrófagos (De Almeida et al., 2013). Além disso, mostrou ter capacidade adjuvante quando em associação com vacinas (Fischer et al., 2007).

A ação cicatrizante foi investigada em estudo comparando com sulfadiazina de prata, onde a própolis mostrou uma melhora rápida, assim como, menor inflamação no local (Gregory et al., 2002).

Esse composto também apresentou eficácia no alívio de sintomas de rinite alérgica através da inibição da liberação de histamina (Shinmei et al., 2009); ainda melhorou as funções ventilatórias e reduziu ataques noturnos de pacientes asmáticos (Khayyal et al., 2003).

Estudos também demonstraram que a própolis previne a destruição de células  $\beta$  do pâncreas, controla a glicemia, modulando o metabolismo de glicose e lipídios e reduz os níveis de insulina no sangue sem afetar os níveis de glicose. Esses achados apontam a própolis como um produto que pode vir a ser importante no tratamento e prevenção da diabetes (Matsushige et al., 1996; Fuliang et al., 2005).

As possíveis aplicabilidades terapêuticas da própolis são inúmeras. Além das citadas acima, há uma série de outras ações desse produto natural, desde agente cariostático, útil na prevenção de cáries (Hayacibara et al., 2005; Libério et al., 2009); como antioxidante, contribuindo para diminuir o estresse oxidativo das células (Frezza et al., 2013); e até atividade citotóxica contra células cancerígenas e ação antitumoral (Sforcin et al., 2002; Orsolich et al., 2004).

### 2.6.2.2 Própolis Vermelha

Própolis Vermelha recebe esse nome devido à coloração da própolis originária de Cuba, onde a sua fonte vegetal foi identificada como *Clusia nemorosa* (Clusiaceae), e da Venezuela, cuja fonte é *Clusia scrobiculata*. Mais recentemente esse tipo de própolis foi encontrado em colmeias localizadas ao longo do mar e costas de rios do nordeste do Brasil. Esta foi classificada como própolis do grupo 13, complementando os 12 tipos propostos por Park et al. (2000) (Trusheva et al., 2006).

Em 2006 foram isolados e identificados 14 compostos a partir da própolis vermelha brasileira, entre eles: álcoois triterpenos (típicos de própolis do Brasil), isoflavonoides (de distribuição restrita no reino vegetal, ocorrem quase que exclusivamente na família Leguminosae, sugerindo uma planta dessa família como origem botânica), benzofenonas polisopreniladas e uma epóxido-naftoquinona (isolada pela primeira vez a partir de uma fonte natural). Alguns compostos tinham sido, até então, encontrados apenas na própolis cubana (Trusheva et al., 2006). A maioria dos compostos comumente encontrados e utilizados como padrão nos 12 tipos de própolis brasileira não foram identificados na própolis vermelha brasileira (Cabral et al., 2009), com exceção de dois flavonoides (quercetina e crisina) e um ácido fenólico (ácido ferúlico) (Silva et al., 2008).

Em 2007, Dausch et al. (2008) coletaram amostras desse tipo na Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco e Paraíba e observaram que as abelhas recolhiam os exsudatos avermelhados sobre a superfície de *Dalbergia ecastophyllum* - uma espécie de Leguminosae – confirmado uma das hipóteses

de Trusheva et al. (2006). Foi comparado o perfil cromatográfico dessa própolis com o perfil dos exsudatos da *D. ecastophyllum*, indicando que foi exatamente o mesmo, e assumindo esta como uma das origens botânicas da própolis vermelha. Silva et al. (2008) também relatam essa planta como a origem da própolis vermelha.

Estudos mais recentes, realizados por Piccinelli et al. (2011), confirmaram esses achados, entretanto, sugerem *D. ecastophyllum* como fonte da própolis vermelha cubana também. Estes autores verificaram que a maioria dos compostos encontrados nesta própolis cubana estava presente na própolis vermelha brasileira e que a constituição química das própolis não muda em diferentes regiões do Nordeste do Brasil. Chalconas, pterocarpanos e isoflavonas foram os principais constituintes de amostras de própolis vermelha. Além disso, estes autores reconheceram presença de benzofenonas polisopreniladas apenas na própolis vermelha brasileira, não estando presente na própolis vermelha cubana, sugerindo que a amostra brasileira tem diferentes fontes vegetais (*D. ecastophyllum* e espécies pertencentes à família Clusiaceae). Cabral et al. (2009) e Trusheva et al. (2006) também observaram esses compostos na própolis vermelha brasileira; Cuesta-Rubio et al. (2002 e 2007) os observaram na própolis marrom cubana; e Trusheva et al. (2004) documentaram esses constituintes em amostras de própolis produzidas na Venezuela.

A descoberta desse novo tipo de própolis no Brasil levou a ter esse produto como alvo de investigações por grupos de pesquisa nacionais e internacionais. Já foi determinado que a própolis vermelha é seletivamente

citotóxica para diferentes linhagens de células tumorais, mostrando-se mais citotóxica do que a própolis verde numa variedade de linhagens de células humanas de leucemia (Awale et al., 2008; Li et al., 2008; Franchi et al., 2012; Frozza et al., 2013).

Em estudos recentes, extratos de própolis verde e vermelha foram incorporados em filmes de curativo à base de colágeno e verificou-se uma reparação tecidual mais rápida e melhor na cicatrização de queimaduras cutâneas em ratos, sem causar alergia ou efeitos tóxicos. A variedade vermelha foi a que proporcionou melhores resultados (De Almeida et al., 2013).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local da Realização da Pesquisa

Os ensaios e avaliações microbiológicas foram realizados nas dependências do Laboratório de Micologia Aplicada, na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Experimentos relacionados à extração da amostra foram feitos no Laboratório de Farmacognosia da mesma instituição e os ensaios de toxicidade foram realizados no Núcleo de Pesquisa em Bioquímica, Toxicologia e Imunologia (NUBIOTOXIM) da Universidade Federal do Pampa, Rio Grande do Sul (UNIPAMPA, RS).

#### 3.2 Escolha da Amostra de Própolis para Elaboração do Estudo

Em estudo prévio realizado pelo mesmo grupo de pesquisa em parceria com o Laboratório de Desenvolvimento Galênico, já havia sido constatada a atividade antifúngica de diferentes frações de própolis vermelha, verde e uma amostra coletada no RS, denominada própolis nativa, para as espécies de *Candida* (dados não mostrados). Nesse mesmo estudo, foi verificado que a fração hexânica enriquecida de benzofenonas da própolis vermelha apresentou melhor atividade frente a *Candida* spp. Desta forma, essa fração foi selecionada para o estudo da capacidade de desenvolvimento de resistência e associação com fármacos antifúngicos.

### 3.3 Origem, Extração e Preparo da Amostra de Própolis Vermelha Brasileira

A própolis vermelha brasileira foi adquirida comercialmente da empresa Natucentro® (laudo em anexo 1) localizada no centro-oeste do estado de Minas Gerais, Brasil. A própolis foi obtida na sua forma bruta e armazenada em local fresco e sem umidade. Sua principal origem botânica é *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub.

A amostra de própolis vermelha (20,284 g) foi extraída três vezes com 400 mL de *n*-hexano (Merck), seguida de filtração e evaporação do solvente em rota-vapor (Fisaton) a 45 °C. Para remoção da cera adicionou-se acetona (Merck). Após 30 minutos, a 4 °C, a fração solúvel em acetona foi filtrada e novamente levada à secura em evaporador rotatório, produzindo, assim, uma fração enriquecida em benzofenonas.

Esta fração foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO; Synth), obtendo-se uma solução estoque de 25 mg/mL. Volumes pequenos foram aliqotados para o armazenamento em freezer. A cada teste, uma solução de trabalho era preparada a partir da solução estoque na concentração desejada em caldo Roswell Park Memorial Institute 1640 sem bicarbonato de sódio (RPMI; Gibco) tamponado com *morpholinepropansulfonic acid* (MOPS; Sigma) e ajustado para pH 7,0.

### 3.4 Preparo das Soluções dos Fármacos Antifúngicos

Solução-estoque de FLZ (Cristália®, Brasil) foi preparada em água destilada estéril na concentração de 1024 µg/mL. As soluções-estoque de AND

(Pfizer®), ITZ (Cristália®), MCZ (Cristália®) e CTZ (Cristália®) foram preparadas em DMSO. A AND foi preparada nas concentrações de 3,3 mg/mL, e os outros três antifúngicos em 12,8 mg/mL. As soluções de trabalho foram preparadas no momento do uso e diluídas em caldo RPMI tamponado com MOPS e pH 7.

### **3.5 Seleção dos Micro-organismos**

Para a realização do estudo, foram selecionados cinco isolados de *C. parapsilosis* (CP RL01, CP RL07, CP RL11, CP RL13 e CP RL27) e cinco de *C. glabrata* (CG RL03, CG RL09, CG RL12, CG RL34 e CG RL37) sensíveis ao FLZ e à própolis vermelha brasileira. Os isolados são originados de cateter, urina, aspirado traqueal e cultura de sangue, e pertencem à coleção de fungos do laboratório de Micologia Aplicada da UFRGS. Todos foram identificados fenotipicamente através do sistema automatizado *Vitek Yeast Biochemical Card* (BioMerieuxVitek, Hazelwood, Mo.). Um isolado de *C. tropicalis* originado de candidíase oral (72A) foi incluso em alguns ensaios, assim como a cepa padrão de *C. krusei* ATCC 6258. Os isolados permaneceram armazenados em geladeira cultivados em ágar Sabouraud dextrose (SDA; Himedia).

### **3.6 Teste de Suscetibilidade aos Agentes Antifúngicos**

Foram realizados testes de suscetibilidade aos agentes antifúngicos e à fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha para confirmar a sensibilidade ou resistência para todos os isolados. As CIMs foram determinadas pela técnica da microdiluição em caldo de acordo com as normas

de padronização publicadas no documento de M27-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) levando em consideração as atualizações do documento M27-S4 (Quarto Suplemento Informativo, 2012).

### **3.6.1 Preparação do Inóculo Fúngico**

Para preparação do inóculo foram realizados subcultivos dos isolados em SDA e incubados a 35 °C por 24 h. A seguir as células foram suspensas em solução salina 0,85% estéril e ajustadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm, a fim de se obter transmitância equivalente ao tubo 0,5 na escala de McFarland ( $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  cels/mL). A partir desta suspensão, uma suspensão de trabalho era preparada fazendo-se uma diluição 1:50 seguida de uma diluição 1:20 em caldo RPMI 1640, resultando em concentração 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  cels/mL.

### **3.6.2 Microdiluição em Caldo**

A microdiluição em caldo foi realizada em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços (dispostos em 12 colunas e 8 linhas). As soluções de antifúngicos duas vezes mais concentradas foram depositadas na primeira coluna da microplaca e microdiluições seriadas em caldo RPMI 1640 foram realizadas até a décima coluna; totalizando 100 µL de 10 concentrações teste para cada agente antifúngico. Volumes de 100 µL de cada inóculo fúngico foram depositados nos poços já contendo igual volume do respectivo agente antifúngico. Na coluna 11 foi feito controle positivo de crescimento fúngico; na coluna 12, controle negativo, foi pipetado apenas meio RPMI 1640 servindo

como controle de esterilidade do ensaio. Os testes foram realizados em duplicatas e incubados a 35 °C por 48 h, para posterior leitura e determinação da CIM. A faixa de concentração de própolis vermelha testada foi de 0,977 a 500 µg/mL.

Para descartar a possibilidade de resultados falsos positivos devido ao DMSO, antes de iniciar os ensaios de suscetibilidade de todos os antifúngicos, DMSO 2% e DMSO 4% diluído em RPMI foram testados frente a todos os isolados incluídos neste trabalho e comparados com o controle positivo para demonstrar que estas concentrações de diluente não são capazes de inibir as células fúngicas.

### **3.6.3 Leitura e Interpretação do Resultados**

A leitura para determinação da CIM foi realizada visualmente. As CIMs para os azóis e AND foram consideradas as menores concentrações dos fármacos que promoveram 50% de inibição comparadas ao crescimento de cada isolado (CLSI, 2008); enquanto que para a AnfB (CLSI, 2008) e própolis vermelha foram as menores concentrações que promoveram 100% de inibição.

Os critérios de definição de suscetibilidade ao FLZ, ITZ e AND foram definidos conforme a CLSI levando em consideração o documento M27-S4; para MCZ e CTZ foram estabelecidos conforme estudos anteriores (Isham & Ghannoum, 2010; Bremenkamp et al., 2011). Todos os *breakpoints* utilizados neste trabalho estão demonstrados na tabela 1.

**TABELA 1.** *Breakpoints* para definição do fenótipo de suscetibilidade dos isolados para os antifúngicos testados, conforme documento M24-S4 (CLSI, 2012).

Antifúngico	Espécies	S	SDD	I	R
FLZ <sup>a</sup>	CP	≤ 2 µg/mL	4 µg/mL	-	≥ 8 µg/mL
	CG	-	≤ 32 µg/mL	-	≥ 64 µg/mL
	CT	≤ 2 µg/mL	4 µg/mL	-	≥ 8 µg/mL
ITZ	CP	≤ 0,125 µg/mL	0,25 - 0,5 µg/mL	-	≥ 1 µg/mL
	CG			-	
MCZ <sup>b</sup>	CP	≤ 8 µg/mL	-	-	≥ 16 µg/mL
	CG				
CTZ <sup>c</sup>	CP	≤ 8 µg/mL	-	-	≥ 16 µg/mL
	CG				
AND	CP	≤ 2 µg/mL	-	4 µg/mL	≥ 8 µg/mL
	CG	≤ 0,12 µg/mL		0,25 µg/mL	≥ 0,5 µg/mL

S: sensível; SDD: sensível dose dependente, I: intermediário; R: resistente; FLZ: fluconazol; ITZ: itraconazol; MCZ: miconazol; CTZ: cetoconazol; AND: anidulafungina; CP: *C. parapsilosis*; CG: *C. glabrata*; CT: *C. tropicalis*.

<sup>a</sup>*Breakpoint* do FLZ não se aplica a *C. krusei* (considerada intrinsecamente resistente ao FLZ)

<sup>b</sup> Adaptado de Isham & Ghannoum (2010)

<sup>c</sup> Adaptado de Bremenkamp et al. (2011)

### 3.6.4 Avaliação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a leitura da CIM, uma alíquota de 10 µL dos poços da menor concentração que promoveram 100% de inibição e duas concentrações imediatamente maiores foram subcultivadas em placa de Petri contendo SDA desprovidas de qualquer antifúngico, e incubadas a 35 °C por 24 h. Designou-se CFM a menor concentração do agente antifúngico em que não ocorreu crescimento fúngico visível. Os ensaios foram realizados em duplicata (Denning et al., 1992; Khan & Ahmad, 2011).

### 3.7 Indução da Resistência e Avaliação da sua Estabilidade

Para investigar a capacidade dos isolados de desenvolverem resistência ao FLZ e à fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha, os isolados foram expostos a concentrações crescentes desses agentes antifúngicos separadamente.

Seguindo a técnica desenvolvida por Fekete-Forgacs et al. (2000), com adaptações, uma única colônia de cada isolado foi incubada *overnight* a 32 °C em 10 mL de RPMI 1640 contendo 4% de glicose. Células foram adicionadas em frascos contendo 10 mL do meio de cultura até chegar a uma absorbância final de 0,1 ( $\lambda = 640$  nm) e incubadas por 10 h. Então 5 mL dessa suspensão fúngica foram adicionados em 5 mL do agente antifúngico para obter uma concentração final de antifúngico de 8  $\mu\text{g/mL}$ . Depois de 14 h de incubação, o último procedimento foi repetido três vezes consecutivas, com intervalos de 24 h de incubação. Após a terceira incubação, 20  $\mu\text{L}$  de cada cultura foram mantidos em SDA por 24 h. Uma alíquota de células foi subcultivada para determinação da CIM e estocada para testes futuros; essas células também foram adicionadas (até absorbância 0,1) a frascos contendo 10 mL do antifúngico 8  $\mu\text{g/mL}$  diluído em meio RPMI 1640 e incubado por 10 h. Um total de 5 mL dessa suspensão fúngica foi adicionado em 5 mL de antifúngico para obter a concentração final do antifúngico de 16  $\mu\text{g/mL}$ . Após 14 h de incubação, o último procedimento foi repetido três vezes consecutivas com intervalo de 24 h de incubação e 20  $\mu\text{L}$  de cada cultura foram subcultivados em SDA por 24 h. O experimento continuou sendo conduzido

dessa maneira, com a concentração de antifúngico sempre duplicando até alcançar 64 µg/mL.

Em paralelo, o mesmo processo foi também realizado sem a presença de qualquer agente antifúngico, para demonstrar que a resistência não é resultado de mutações espontâneas.

Para avaliar a estabilidade da resistência, os isolados resistentes obtidos foram subcultivados diariamente em SDA sem a presença de antifúngico, por 30 dias, e a CIM foi reavaliada.

### **3.8 Avaliação da Resistência Cruzada**

A resistência cruzada aos azóis foi avaliada através da determinação da CIM do ITZ, MCZ e CTZ para isolados expostos ao FLZ, as quais foram comparadas com a CIM antes da exposição. Também foi determinada a CIM da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira para esses isolados.

### **3.9 Estudo de Bomba de Efluxo ABC**

A superexpressão de bombas de efluxo foi avaliada adicionando verapamil (inibidor de bomba de efluxo ABC) na concentração de 100 µMol ao meio de cultura utilizado para realizar o teste de suscetibilidade. A resistência foi relacionada a esse mecanismo quando a CIM decresce na presença de verapamil (Pina-Vaz et al., 2005).

### 3.10 Efeito Antimicrobiano da Fração Enriquecida em Benzofenonas da Própolis Vermelha Brasileira em Culturas Polimicrobianas de Espécies de *Candida* Resistentes ao Fluconazol

Para analisar o efeito antifúngico da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha em culturas polimicrobianas, a fração foi testada contra múltiplas CNA resistentes ao FLZ cultivadas no mesmo meio. Os isolados usados nesse teste foram: *C. parapsilosis* RL27m e *C. glabrata* RL37m com resistência induzida ao FLZ, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. tropicalis* 72A originalmente resistentes.

O inóculo fúngico foi preparado de acordo com a CLSI (2008), entretanto, no estágio inicial de preparação, 1 mL de suspensão de células de cada isolado contendo 1 a  $5 \times 10^6$  cells/mL foi adicionado em um único tubo resultando em um *pool* de células dos quatro isolados, também contendo 1 a  $5 \times 10^6$  cells/mL. Posteriormente foram feitas as diluições 1:50 e 1:20 em caldo RPMI 1640.

Um total de 11 combinações de *pool* de isolados foi avaliado e o inóculo de cada isolado foi testado em paralelo para comparação, resultando em 15 inóculos diferentes:

- (1) *C. glabrata* RL37m
- (2) *C. parapsilosis* RL27m
- (3) *C. tropicalis* 72A
- (4) *C. krusei* ATCC 6258
- (5) *C. glabrata* RL37m + *C. parapsilosis* RL27m
- (6) *C. glabrata* RL37m + *C. tropicalis* 72A

(7) *C. glabrata* RL37m + *C. krusei* ATCC 6258

(8) *C. parapsilosis* RL27m + *C. tropicalis* 72A

(9) *C. parapsilosis* RL27m + *C. krusei* ATCC 6258

(10) *C. tropicalis* 72A + *C. krusei* ATCC 6258

(11) *C. glabrata* RL37m + *C. parapsilosis* RL2m7 + *C. tropicalis* 72A

(12) *C. parapsilosis* RL27m + *C. tropicalis* 72A + *C. krusei* ATCC

6258

(13) *C. tropicalis* 72A + *C. krusei* ATCC 6258 + *C. glabrata* RL37m

(14) *C. glabrata* RL37m + *C. parapsilosis* RL27m + *C. krusei* ATCC

6258

(15) *C. glabrata* RL37m + *C. parapsilosis* RL27m + *C. tropicalis* 72A

+ *C. krusei* ATCC 6258

O teste de suscetibilidade foi realizado para avaliar a CIM e a CFM da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira contra os inóculos mencionados acima. Depois de determinada a CIM, 100 µL do poço contendo a maior concentração subinibitória (CIM/2) foram adicionados em 9,9 mL de água destilada estéril (diluição 1:100). Um volume de 50 µL desta diluição foi espalhado em placa de Petri contendo chromagar (Difco) usando alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 32 °C durante 48 h; a contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC) foi feita para cada uma das espécies de *Candida*, mostrando qual espécie prevalece em concentrações subinibitórias quando há policulturas tratadas com fração enriquecida em benzofenonas obtida a partir da própolis vermelha.

### **3.11 Avaliação da Atividade Antifúngica da Fração Enriquecida em Benzofenonas da Própolis Vermelha Brasileira em Combinação com Fluconazol e Anidulafungina**

A associação da fração enriquecida em benzofenonas obtidas a partir do extrato hexânico da própolis vermelha brasileira com FLZ e AND foi testada frente aos isolados que foram submetidos à indução da resistência ao FLZ. A associação da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha com FLZ também foi testada para a cultura polimicrobiana de número 15 mencionada no item acima.

O efeito da combinação foi avaliado usando o método *Checkerboard* (Johnson et al., 2004) com algumas modificações. Diversas concentrações do antifúngico (FLZ ou AND) e da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha foram associadas entre si totalizando 30 combinações de concentrações analisadas para a fração da própolis vermelha e FLZ e também para esta fração e AND. As diluições dos antifúngicos foram preparadas de modo que se obtivessem concentrações quatro vezes maiores que as concentrações finais desejadas. Volumes de 50 µL de cada concentração da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha foram combinados com outros 50 µL de cada concentração de FLZ. A esse volume foram adicionados 100 µL de inóculo que foram depositados em cada poço da microplaca. Os ensaios foram realizados em quadruplicatas. A preparação do inóculo, tempo de incubação e temperatura foram iguais aos utilizados no teste de suscetibilidade.

Após o tempo de incubação e observação visual do efeito da associação de FLZ e própolis vermelha sobre a cultura polimicrobiana, 10 µL de cada quadruplicata foram adicionados em um único tubo contendo 3,96 mL de água destilada estéril (diluição 1:100). Um volume de 25 µL desta diluição foi espalhado em placa de Petri contendo chromagar usando alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 32 °C durante 48 h; a contagem de UFC foi feita para cada uma das espécies de *Candida* em cada uma das combinações acima mencionadas, mostrando qual espécie prevalece em cada associação.

Para verificar o dano celular das associações, as células crescidas nas microplacas foram, então, coradas com MTT [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difenil-tetrazólio brometo] (Sigma). Para isso, o sobrenadante foi descartado e as leveduras foram incubadas durante 3 h a 32 °C em uma suspensão de MTT em RPMI 1640 (0,05 mg/mL de MTT). MTT é um sal tetrazolium reduzido por enzimas desidrogenases, formando cristais de formazana solúveis em álcool. A suspensão de MTT foi retirada das microplacas e as leveduras coradas permaneceram no fundo. Os cristais de formazana de MTT (responsáveis pela coloração) foram extraídos da célula com 150 µL de álcool isopropílico (Vetec) e 100 µL da cada poço foram transferidos para uma nova microplaca. A absorbância foi medida (EnVisison 2104 Multilabel Reader, PerkinElmer) em duplo comprimento de onda: 570 nm e 690 nm (Chiou et al., 2001).

A partir disso, a porcentagem de dano celular foi calculada para as quadruplicatas de cada combinação da fração enriquecida em benzofenonas de própolis vermelha com os antifúngicos e a média dos danos celulares foi

usada para assumir o dano da combinação. O dano celular foi calculado pela seguinte equação:

$$\% \text{ Dano Celular} = \left[ 1 - \frac{(A570 - A690 \text{ sem antifúngico})}{(A570 - A690 \text{ com antifúngico})} \right] \times 100$$

Para avaliar a interação entre a fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha e os fármacos, o ICIF foi determinado para as combinações com menores concentrações das duas amostras testes e que foram capazes de inibir o isolado. Esse índice foi calculado através da soma das concentrações inibitórias fracionadas (CIF) de cada antifúngico para cada combinação (Johnson et al., 2004):

$$\text{ICIF} = \text{CIF}^A + \text{CIF}^B$$

$$\text{ICIF} = \frac{\text{CIM A em comb. com B}}{\text{CIM A Sozinho}} + \frac{\text{CIM B em comb. com A}}{\text{CIM B Sozinho}}$$

A interação foi considerada sinérgica quando  $\text{ICIF} \leq 0,5$ ; aditivas para  $0,5 < \text{ICIF} < 1$ ; indiferentes para  $1 \leq \text{ICIF} < 4$ ; e antagonistas quando  $\text{ICIF} \geq 4$  (Lewis et al., 2002; Alves et al., 2012).

Os dados foram analisados estatisticamente por One-Way ANOVA e teste Tukey de comparações múltiplas.  $P \leq 0,05$  foi considerado significativo.

### **3.12 Estudo para Sugestão do Modo de Ação da Fração Enriquecida em Benzofenonas da Própolis Vermelha Brasileira em Espécies de *Candida***

Para sugerir algum modo de ação deste produto, dois alvos foram avaliados: membrana e parede celular, conforme os dois ensaios descritos abaixo.

#### **3.12.1 Efeito do Ergosterol Exógeno**

Para avaliar se a fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira tem efeito se complexando com o ergosterol da membrana de espécies de *Candida*, a CIM foi determinada para dois isolados de *C. parapsilosis* (CP RL13m e CP RL27m) e *C. glabrata* (CG RL03m e CG RL37m) e um isolado de *C. tropicalis* (CT 72A) e de *C. krusei* (CK ATCC 6258) na presença e na ausência de ergosterol exógeno.

Esta metodologia foi desenvolvida da mesma maneira que a determinação de CIM descrita acima, entretanto, com adição de concentrações crescentes (50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL) de ergosterol comercial (Sigma) dissolvido em dimetilformamida (Sigma) e diluído em meio RPMI 1640 de forma que a concentração final do solvente fosse de 0,1%. A faixa de concentração testada foi de 0,977 - 500µg/mL. A AnfB foi testada em paralelo, nas mesmas condições, como controle positivo do método, numa faixa de concentração de 0,03125 a 16 µg/mL. A leitura foi realizada em 48 h (Escalante et al., 2008).

### 3.12.2 Efeito sobre a Parede Celular

Segundo Frost et al. (1995), a parede celular é dispensável se os fungos estão protegidos por barreira osmótica, em condições específicas. Portanto, para avaliar se a fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira tem algum efeito sobre a parede celular de espécies de *Candida*, a CIM foi determinada para dois isolados de *C. parapsilosis* (CP RL13m e CP RL27m) e *C. glabrata* (CG RL03m e CG RL37m) e um isolado de *C. tropicalis* (CT 72A) e de *C. krusei* (CK ATCC 6258) na presença e na ausência de sorbitol (protetor osmótico).

### 3.13 Avaliação da Toxicidade da Fração Enriquecida em Benzofenonas da Própolis Vermelha Brasileira

Os leucócitos de sangue venoso humano heparinizado foram separados utilizando 2 mL de dextrano 5%. Após 45 min em temperatura ambiente, o sobrenadante foi centrifugado a 3500 rpm por 10 min. O sedimento foi lavado com igual volume de tampão fosfato-salina (PBS) e suspenso em 2 mL de solução tampão de Hank (HBBS) ajustando para  $2 \times 10^3$  leucócitos / mL.

Um volume de 500  $\mu$ L de solução de leucócitos periféricos foi incubado durante 1 hora com 500  $\mu$ L da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira em cinco concentrações finais diferentes: 500  $\mu$ g/mL, 250  $\mu$ g/mL, 125  $\mu$ g/mL, 31,25  $\mu$ g/mL e 7,81  $\mu$ g/mL. PBS foi utilizado como controle negativo, água oxigenada ( $H_2O_2$ ) 4 mM como controle positivo e DMSO a 2% como controle do diluente. Após a incubação, foram realizados

dois ensaio de toxicidade: ensaio de Viabilidade Celular, utilizado para verificar dano nas células; e Ensaio Cometa, usado para detectar dano no DNA. Os ensaios foram realizados em triplicata conforme protocolo de Güz et al. (2012).

### **3.13.1 Ensaio de Viabilidade Celular**

Depois da incubação, 400  $\mu\text{L}$  de cada suspensão das amostras foram adicionados à solução contendo 300  $\mu\text{L}$  de tampão HBBS e 50  $\mu\text{L}$  de corante Azul de Tripán 0,4% por 8 min. A viabilidade celular foi determinada em microscópio óptico (400x) e as células foram classificadas em duas categorias (1) células viáveis, que apresentam auto-fluorescência; (2) células inviáveis, que incorporam o corante apresentando-se com membranas disformes e núcleo corado de azul.

One-Way ANOVA e teste Tukey de comparações múltiplas foram usados para comparar as diferentes concentrações de amostra e controles.  $P \leq 0,05$  foi considerado significativo.

### **3.13.2 Ensaio Cometa**

Após a incubação, 10  $\mu\text{L}$  de cada solução de leucócitos contendo as amostras foram misturados com 90  $\mu\text{L}$  de agarose (abaixo do ponto de fusão) e colocados em lâmina de microscópio previamente cobertas com agarose 1,5% e imediatamente lamínulas foram sobrepostas. As lâminas foram mantidas em gelo por 5 min.

As lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise gelada (solução detergente com altas concentrações de sais, que promove a desintegração das membranas celulares) e mantidas a 4 °C protegidas da luz por 14 h.

As lâminas foram posteriormente colocadas dentro da cuba de eletroforese e imediatamente o tampão de eletroforese (NaOH 300 mM/1 mM EDTA) foi adicionado. Foi deixado a 4 °C durante 20 min para o desenovelamento do DNA e submetidas a eletroforese por 20 min a 300 mA e 25 V (Electrophoresis Power Supply, Loccus Biotecnologia), proporcionando a migração dos segmentos de DNA livres (resultantes de quebras) para fora do núcleo.

Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em tampão Tris 0,4 M (pH 7,5 ) por 5 min e lavadas três vezes em água destilada. Depois de secas, estas foram colocadas por 10 min em 1000 mL de solução fixadora (composta de ácido tricloroacético 15%, sulfato de Zinco 5% e glicerol 5%), lavadas três vezes com água destilada e colocadas em estufa a 37 °C até secar. As lâminas foram hidratadas com água destilada por 5 min e permaneceram em solução de coloração a 37 °C por 30 min (60 mL de Solução A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5% + 60 mL de Solução B: nitrato de amônia 0,1%; nitrato de prata 0,1%; 0,25% ácido tungstosilícico; 0,15% formaldeído). Foram realizadas três lavagens com água destilada e, posteriormente, as lâminas foram colocadas em solução de parada (ácido acético 1%) e novamente lavadas com água destilada.

As células foram analisadas em microscópio óptico (400x) e classificadas visualmente em diferentes níveis de dano. As células que apresentaram um núcleo redondo foram identificadas como normais (sem dano detectável no DNA). As células identificadas visualmente por uma espécie de cauda formada pelos fragmentos de DNA foram classificadas como lesadas. O nível do dano no DNA foi classificado de 0 a 4 (0 sendo completamente sem dano e 4 representando o dano máximo).

Foi utilizado o One-Way ANOVA e teste de múltiplas comparações de Bonferroni para comparar os grupos.  $P \leq 0,05$  foi considerado significativo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Desenvolvimento e Estabilidade da Resistência

As tabelas 2 e 3 demonstram os valores de CIM determinados para o FLZ e para a fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira antes e após a indução da resistência com exposição a concentrações crescentes de cada agente antifúngico. Foram observados padrões distintos de resistência, onde apenas a suscetibilidade ao FLZ foi alterada (tabela 2). A CIM da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha se manteve constante para todos os isolados após cada etapa da indução da resistência (tabela 3).

**TABELA 2.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM), em  $\mu\text{g/mL}$ , do fluconazol (FLZ) e fenótipos (Fen) de isolados de *C. parapsilosis* (CP) e *C. glabrata* (CG) antes e após a indução da resistência com exposição a concentrações crescentes de FLZ e após subcultivo em meio isento de antifúngico por 30 dias.

Isolado	CIM do fluconazol/Fen					
	Inicial	Evolução das concentrações de exposição ao FLZ				
		8 $\mu\text{g/mL}$	16 $\mu\text{g/mL}$	32 $\mu\text{g/mL}$	64 $\mu\text{g/mL}$	Subcultivo isento de FLZ/ 30 dias
CP RL01	0,5/S	0,5/S	0,5/S	0,5/S	4/SDD	2/S
CP RL07	0,5/S	0,5/S	0,5/S	0,5/S	1/S	1/S
CP RL11	0,5/S	0,5/S	8/R	8/R	32/R	32/R
CP RL13	0,5/S	1/S	8/R	8/R	64/R	32/R
CP RL27	1/S	1/S	16/R	16/R	64/R	32/R
CG RL03	0,5/SDD	4/SDD	8/SDD	32/SDD	64/R	32/SDD
CG RL09	0,5/SDD	8/SDD	8/SDD	8/SDD	32/SDD	16/SDD
CG RL12	0,5/SDD	8/SDD	8/SDD	8/SDD	64/R	32/SDD
CG RL34	1/SDD	1/SDD	2/SDD	2/SDD	64/R	32/SDD
CG RL37	1/SDD	1/SDD	1/SDD	8/SDD	128/R	64/R

S: sensível; R: resistente; SDD: sensível dose dependente.

**TABELA 3.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM), em  $\mu\text{g/mL}$ , da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (ProVB) para os isolados de *C. parapsilosis* (CP) e *C. glabrata* (CG) antes e após a indução da resistência com exposição a concentrações crescentes desta fração.

Isolado	CIM da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira				
	Inicial	Evolução das concentrações de exposição à ProVB			
		8 $\mu\text{g/mL}$	16 $\mu\text{g/mL}$	32 $\mu\text{g/mL}$	64 $\mu\text{g/mL}$
<b>CP RL01</b>	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625
<b>CP RL07</b>	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625
<b>CP RL11</b>	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625
<b>CP RL13</b>	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625
<b>CP RL27</b>	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625
<b>CG RL03</b>	3,906	3,906	3,906	3,906	3,906
<b>CG RL09</b>	3,906	3,906	3,906	3,906	3,906
<b>CG RL12</b>	7,813	7,813	7,813	7,813	7,813
<b>CG RL34</b>	7,813	7,813	7,813	7,813	7,813
<b>CG RL37</b>	7,813	7,813	7,813	7,813	7,813

Na tabela 2 pode-se observar que o fenótipo de três isolados de *C. parapsilosis* foi alterado após exposição a 16  $\mu\text{g/mL}$  de FLZ (equivalente a oito dias de exposição). Após exposição a 64  $\mu\text{g/mL}$  (equivalente a 16 dias de exposição), quatro isolados de *C. glabrata* e um isolado de *C. parapsilosis* apresentaram modificação do seu fenótipo. Portanto, ao final do processo, três isolados de *C. parapsilosis* e quatro isolados de *C. glabrata* desenvolveram resistência, e um isolado de *C. parapsilosis* apresentou fenótipo sensível dose dependente (SDD). Os isolados CP RL07 e CG RL09 apresentaram apenas diminuição de suscetibilidade ao FLZ, porém sem alteração de fenótipo. Após a indução da resistência, foi acrescentado a letra “m” (mutante) ao final dos códigos de cada isolado exposto ao FLZ.

A respeito da estabilidade da resistência desenvolvida pelos isolados, três isolados de *C. parapsilosis* e os cinco isolados de *C. glabrata* tiveram suscetibilidade aumentada ao FLZ após subcultivo em meio isento de antifúngico por 30 dias. Apesar disso, os isolados de *C. parapsilosis* resistentes continuaram apresentando o fenótipo de resistência, e o isolado com fenótipo SDD passou a sensível novamente. Entre a espécie de *C. glabrata*, três isolados perderam seu fenótipo de resistência, entretanto as CIMs permaneceram elevadas em comparação às células iniciais sem exposição. Para todos os isolados não foi observada redução da CIM superior a uma diluição.

Além disso, todos os isolados de *C. parapsilosis* expostos ao fluconazol apresentaram também mudanças macromorfológicas (*Phenotypic switching*) enquanto que, quando expostos à própolis, não visualizou-se essa alteração.

Em relação aos isolados incubados sucessivamente sem FLZ e fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha, os valores de CIM mantiveram-se constantes ao longo do período de estudo, demonstrando que nenhum dos isolados desenvolveu resistência espontaneamente durante subcultura repetida na ausência de antifúngico.

#### **4.2 Resistência Cruzada**

A fim de observar o desenvolvimento de resistência cruzada dos isolados cultivados em FLZ, testes de suscetibilidade com três agentes antifúngicos azólicos e também com a fração enriquecida em benzofenonas da

própolis vermelha foram realizados, conforme demonstrado na tabela 4. A CIM para o ITZ aumentou para quatro isolados de *C. glabrata*, dos quais três (CG RL12m, CG RL34m e CG RL37m) se tornaram resistentes a esse antifúngico. Três isolados de *C. parapsilosis* também diminuíram sua suscetibilidade, entretanto um deles manteve-se com fenótipo de sensibilidade outro passou a expressar fenótipo SDD e um deles tornou-se resistente (CP RL27m).

Apenas pequenas variações de CIM de CTZ e MCZ foram observadas para os isolados cultivados em FLZ (tabela 4). A CIM do CTZ aumentou para quatro isolados de *C. parapsilosis* e três de *C. glabrata*, entretanto nenhum deles foi capaz de expressar fenótipo de resistência. Da mesma maneira, três isolados de *C. parapsilosis* e três de *C. glabrata* mostraram suscetibilidade diminuída ao MCZ, mas sem mudança de fenótipo.

Ao contrário dos antifúngicos azólicos testados, a fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha não mostrou alteração de suscetibilidade para os isolados após exposição ao FLZ, demonstrando que não há relação de resistência cruzada desses dois agentes antifúngicos (tabela 4).

### **4.3 Bomba de Efluxo ABC**

Após a incubação com verapamil, uma diminuição dos valores de CIM foi observada para apenas um isolado de *C. parapsilosis* (CP RL27m). Entretanto o decréscimo da CIM foi de apenas uma diluição e o padrão de resistência permaneceu estável.

**TABELA 4.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM), em µg/mL, e o fenótipo (Fen) do itraconazol (ITZ), cetoconazol (CTZ), miconazol (MCZ) e fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (PropVB) dos isolados de *C. parapsilosis* (CP) e *C. glabrata* (CG) selvagens e dos mutantes (m) após indução da resistência ao fluconazol.

Cepa	Agentes Antifúngicos				
	ITZ	CTZ	MCZ	PropVB	
	CIM/Fen	CIM/Fen	CIM/Fen	CIM	CFM
CP RL01	0,0625/S	0,125/S	0,125/S	15,625	>62,5
CP RL01m	0,125/S	0,25/S	0,125/S	15,625	>62,5
CP RL07	0,125/S	0,125/S	0,125/S	15,625	>62,5
CP RL07m	0,125/S	0,25/S	0,25/S	15,625	>62,5
CP RL11	0,0625/S	0,015625/S	0,5/S	15,625	>62,5
CP RL11m	0,25/SDD	0,0625/S	2/S	15,625	>62,5
CP RL13	0,125/S	0,0625/S	0,5/S	15,625	>62,5
CP RL13m	0,125/S	0,0625/S	0,5/S	15,625	>62,5
CP RL27	0,5/SDD	0,015625/S	0,5/S	15,625	>62,5
CP RL27m	1/R	0,125/S	1/S	15,625	>62,5
CG RL03	0,125/S	0,125/S	0,25/S	3,906	>15,625
CG RL03m	0,125/S	0,5/S	1/S	3,906	>15,625
CG RL09	0,03125/S	0,125/S	0,125/S	3,906	>15,625
CG RL09m	0,125/S	0,125/S	0,5/S	3,906	>15,625
CG RL12	0,0625/S	0,25/S	0,03125/S	7,813	>31,25
CG RL12m	1/R	8/S	0,5/S	7,813	>31,25
CG RL34	0,25/SDD	0,5/S	0,125/S	7,813	>31,25
CG RL34m	1/R	0,5/S	0,125/S	7,813	>31,25
CG RL37	0,125/S	0,125/S	0,25/S	7,813	>31,25
CG RL37m	1/R	0,5/S	0,25/S	7,813	>31,25

S: sensível; R: resistente; SDD: sensível dose dependente

#### **4.4 Efeito da Fração Enriquecida em Benzofenonas da Própolis Vermelha Brasileira em Culturas Polimicrobianas de *Candida* Resistentes ao Fluconazol**

Além da própolis vermelha brasileira se mostrar ativa contra *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* resistentes ao FLZ, esse produto também demonstrou ser ativo frente culturas polimicrobianas formadas da combinação desses isolados resistentes (tabela 5). As espécies tornaram-se mais suscetíveis à fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha quando cultivadas com *C. glabrata*, a qual apresenta CIM menor. *Candida tropicalis* e *C. krusei* também aumentaram sua suscetibilidade quando cultivadas juntas ou quando cultivadas com *C. parapsilosis*. Esses resultados mostraram que cultura polimicrobiana de *Candida* pode aumentar a suscetibilidade microbiana à própolis vermelha. A contagem de células na concentração CIM/2 demonstra que *C. glabrata* não está presente (ou presente em menor quantidade) nesta concentração; e que *C. tropicalis* é a espécie que predomina na maioria das combinações polimicrobianas.

A contagem de células da cultura polimicrobiana sem a presença de própolis demonstrou que *C. tropicalis* também foi a espécie com maior crescimento, seguida de *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, respectivamente.

**TABELA 5.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM), expressos em µg/mL, da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira frente a culturas polimicrobianas de isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol e contagem de células na CIM/2 expressa em Log.

Isolados	CIM	CFM	Contagem na CIM/2*
CG RL37m	3,906	>15,625	6,17
CP RL27m	15,625	>62,5	6,16
CT 72A	31,25	62,5	6,29
CK ATCC 6258	31,25	125	7,3
CG RL37m + CP RL27m	7,813	>31,25	4,7 + 5,73
CG RL37m + CT 72A	3,906	>15,625	ZERO + 7,03
CG RL37m + CK ATCC 6258	7,813	>31,25	4,95 + 6,27
CP RL27m + CT 72A	15,625	>62,5	5,3 + 6,35
CP RL27m + CK ATCC 6258	15,625	>62,5	6,35 + 5,6
CT 72A + CK ATCC 6258	15,625	>62,5	7,25 + 6,1
CG RL37m + CP RL27m + CT 72A	7,813	31,25	ZERO + 5,3 + 7,01
CP RL27m + CT 72A + CK ATCC 6258	15,625	>62,5	4,6 + 7,25 + 5,08
CT 72A + CK ATCC 6258 + CG RL37m	7,813	>31,25	7,09 + 5,58 + ZERO
CG RL37m + CP RL27m + CK ATCC 6258	7,813	>31,25	ZERO + 5,94 + 4,3
CG RL37m + CP RL27m + CT 72A + CK ATCC 6258	7,813	>31,25	ZERO + 4,3 + 5 + 6,87

*C. glabrata* (CG); *C. parapsilosis* (CP); *C. tropicalis* (CT); *C. krusei* (CK).

CIM do fluconazol para CT 72A: 128 µg/mL; CIM do fluconazol para CK ATCC 6258: 32 µg/mL

\* Contagem na CIM/2: Contagem na maior concentração subinibitória, ou seja, contagem na concentração uma diluição menor que CIM.

#### 4.5 Interação da fração enriquecida em benzofenonas da Própolis Vermelha com Fluconazol

Após realizada a leitura com MTT e calculado o dano celular de todas as combinações (dados não mostrados) foi verificado se cada combinação dos agentes antifúngicos aumenta o dano celular em comparação aos agentes antifúngicos sozinhos. A tabela 6 demonstra até quatro combinações de concentrações da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira e FLZ escolhidas para cada isolado e cultura polimicrobiana que melhoraram a atividade antifúngica e que tiveram dano celular superior a 50%. A análise estatística realizada para cada isolado comprovou que todos os danos celulares das combinações demonstradas na tabela 6 apresentam porcentagens significativamente maiores que os agentes antifúngicos sozinhos ( $p < 0,05$ ).

**TABELA 6.** Dano celular da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (ProVB) combinada com fluconazol (FLZ) expressos em porcentagem (%).

Isolado		Combinação ProVB + FLZ							
		Comb 1		Comb 2		Comb 3		Comb 4	
		ProVB	FLZ	ProVB	FLZ	ProVB	FLZ	ProVB	FLZ
CP RL01m	C ( $\mu\text{g/mL}$ )	7,813	2	7,813	1	3,906	2	-	-
	DCS (%)	27,8 <sup>E</sup>	41,3 <sup>D</sup>	27,8 <sup>E</sup>	3,9 <sup>G</sup>	18,5 <sup>EF</sup>	41,3 <sup>D</sup>	-	-
	DCC (%)	93,9 <sup>A</sup>		57,3 <sup>C</sup>		78,3 <sup>*B</sup>		-	
CP RL07m	C ( $\mu\text{g/mL}$ )	7,813	2	3,906	2	-	-	-	-
	DCS (%)	22,1 <sup>D</sup>	62,7 <sup>B</sup>	11,1 <sup>E</sup>	62,7 <sup>B</sup>	-	-	-	-
	DCC (%)	92,5 <sup>A</sup>		90,2 <sup>*A</sup>		-		-	

Continuação da TABELA 6

Isolado		Combinação ProVB + FLZ							
		Comb 1		Comb 2		Comb 3		Comb 4	
		ProVB	FLZ	ProVB	FLZ	ProVB	FLZ	ProVB	FLZ
<b>CP RL11m</b>	C (µg/mL)	7,813	32	7,813	16	-	-	-	-
	DCS (%)	5,0 <sup>D</sup>	71,6 <sup>B</sup>	5,0 <sup>D</sup>	37,8 <sup>C</sup>	-	-	-	-
	DCC (%)	93,6 <sup>A</sup>		86,4 <sup>*A</sup>		-		-	
<b>CP RL13m</b>	C (µg/mL)	7,813	32	7,813	16	3,906	32	3,906	16
	DCS (%)	48,7 <sup>CD</sup>	46,3 <sup>D</sup>	48,7 <sup>CD</sup>	20,6 <sup>E</sup>	0,9 <sup>F</sup>	46,3 <sup>D</sup>	0,9 <sup>F</sup>	20,6 <sup>E</sup>
	DCC (%)	93,2 <sup>A</sup>		83,3 <sup>B</sup>		55,0 <sup>C</sup>		52,1 <sup>*CD</sup>	
<b>CP RL27m</b>	C (µg/mL)	7,813	32	7,813	16	3,906	32	3,906	16
	DCS (%)	40,6 <sup>C</sup>	44,8 <sup>C</sup>	40,6 <sup>C</sup>	40,7 <sup>C</sup>	6,1 <sup>D</sup>	44,8 <sup>C</sup>	6,1 <sup>D</sup>	40,7 <sup>C</sup>
	DCC (%)	82,2 <sup>A</sup>		75,2 <sup>AB</sup>		77,7 <sup>AB</sup>		69,2 <sup>*B</sup>	
<b>CG RL03m</b>	C (µg/mL)	1,953	8	0,977	16	0,977	8	0,977	4
	DCS (%)	32 <sup>D</sup>	28,2 <sup>D</sup>	3,7 <sup>E</sup>	33,1 <sup>D</sup>	3,7 <sup>E</sup>	28,2 <sup>D</sup>	3,7 <sup>E</sup>	24,0 <sup>D</sup>
	DCC (%)	67,5 <sup>BC</sup>		79,8 <sup>AB</sup>		65,3 <sup>C</sup>		60,3 <sup>*C</sup>	
<b>CG RL09m</b>	C (µg/mL)	1,953	16	0,977	16	0,977	8	-	-
	DCS (%)	35,8 <sup>C</sup>	45,5 <sup>C</sup>	7,0 <sup>D</sup>	45,5 <sup>C</sup>	7,0 <sup>D</sup>	14,5 <sup>D</sup>	-	-
	DCC (%)	66,3 <sup>B</sup>		81,0 <sup>A</sup>		59,4 <sup>*B</sup>		-	
<b>CG RL12m</b>	C (µg/mL)	3,906	32	3,906	16	1,953	32	1,953	16
	DCS (%)	24,2 <sup>E</sup>	41,7 <sup>D</sup>	24,2 <sup>E</sup>	18,2 <sup>E</sup>	4,7 <sup>F</sup>	41,7 <sup>D</sup>	4,7 <sup>F</sup>	18,2 <sup>E</sup>

Continuação da TABELA 6

Isolado		Combinação ProVB + FLZ							
		Comb 1		Comb 2		Comb 3		Comb 4	
		ProVB	FLZ	ProVB	FLZ	ProVB	FLZ	ProVB	FLZ
	DCC (%)	80,8 <sup>A</sup>		68,0 <sup>B</sup>		74,3 <sup>AB</sup>		53,2 <sup>*C</sup>	
<b>CG RL34m</b>	C (µg/mL)	3,906	32	3,906	16	1,953	32	1,953	16
	DCS (%)	35,6 <sup>D</sup>	29,8 <sup>DE</sup>	35,6 <sup>D</sup>	5,5 <sup>F</sup>	22,9 <sup>E</sup>	29,8 <sup>DE</sup>	22,9 <sup>E</sup>	5,5 <sup>F</sup>
	DCC (%)	81,7 <sup>A</sup>		63,6 <sup>B</sup>		80,9 <sup>A</sup>		53,1 <sup>*C</sup>	
<b>CG RL37m</b>	C (µg/mL)	3,906	64	3,906	32	1,953	64	1,953	32
	DCS (%)	25,5 <sup>D</sup>	36,8 <sup>C</sup>	25,5 <sup>D</sup>	30,1 <sup>CD</sup>	8,7 <sup>E</sup>	36,8 <sup>C</sup>	8,7 <sup>E</sup>	30,1 <sup>CD</sup>
	DCC (%)	87,5 <sup>A</sup>		59,4 <sup>B</sup>		55,7 <sup>B</sup>		56,3 <sup>*B</sup>	
<b>Policultura</b>	C (µg/mL)	3,906	32	3,906	16	1,953	16	0,978	32
	DCS (%)	31,2 <sup>D</sup>	39,6 <sup>D</sup>	31,2 <sup>D</sup>	18,5 <sup>E</sup>	19,0 <sup>E</sup>	18,5 <sup>E</sup>	6,6 <sup>F</sup>	39,6 <sup>D</sup>
	DCC (%)	79,7 <sup>A</sup>		67,7 <sup>B</sup>		50,9 <sup>*C</sup>		51,6 <sup>C</sup>	

C: concentrações dos agentes antifúngicos; DCS: dano celular dos agentes antifúngicos sozinhos; DCC: dano celular dos agentes antifúngicos combinados;

Letras diferentes acima do dano celular representa diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

\*combinação de agentes antifúngicos utilizada para calcular o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) Comb 1-4: quatro combinações de concentrações da ProVB e FLZ escolhidas para cada isolado e cultura polimicrobiana que melhoraram a atividade antifúngica e que tiveram dano celular superior a 50%.

Quando foi constatada menos de quatro combinações com aumento do dano celular da combinação, há a representação por um traço (-).

Policultura: *C. glabrata* RL37m + *C. parapsilosis* RL27m + *C. tropicalis* 72A + *C. krusei* ATCC 6258

A tabela 7 representa o efeito da combinação da fração enriquecida em benzofenona da própolis vermelha brasileira com FLZ a partir do cálculo do ICIF. Essa associação apresentou efeito sinérgico para cinco isolados de *C. glabrata*, dois isolados de *C. parapsilosis* e para a cultura polimicrobiana. O

efeito de aditividade foi observado em um isolado de *C. parapsilosis* e indiferença foi observada em dois isolados dessa espécie.

**TABELA 7.** Efeito da combinação da fração enriquecida em benzofenona da própolis vermelha brasileira (ProVB) com fluconazol (FLZ) no ensaio *checkerboard* para os diferentes isolados.

Isolado	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )		CIM combinação ( $\mu\text{g/mL}$ )		CIF		ICIF	Interação
	ProVB	FLZ	ProVB	FLZ	ProVB	FLZ		
CP RL01m	15,625	4	3,906	2	0,25	0,5	0,75	Ad
CP RL07m	15,625	2	3,906	2	0,25	1	1,25	Ind
CP RL11m	15,625	32	3,906	16	0,5	0,5	1,00	Ind
CP RL13m	15,625	64	3,906	16	0,25	0,25	0,50	Sin
CP RL27m	15,625	64	3,906	32	0,25	0,25	0,5	Sin
CG RL03m	3,906	64	0,977	4	0,25	0,0625	0,3125	Sin
CG RL09m	3,906	32	0,977	8	0,25	0,25	0,5	Sin
CG RL12m	7,813	64	1,953	16	0,25	0,25	0,5	Sin
CG RL34m	7,813	64	1,953	16	0,25	0,25	0,5	Sin
CG RL37m	7,813	128	1,953	32	0,25	0,25	0,5	Sin
Policultura	7,813	128	1,953	16	0,25	0,125	0,375	Sin

As interações foram classificadas como Sinergismo (Sin), Aditividade (Ad), Indiferença (Ind) e Antagonismo (Ant).

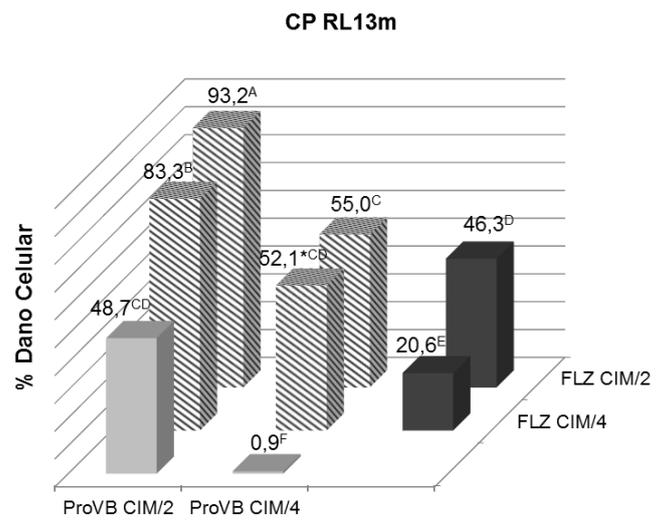
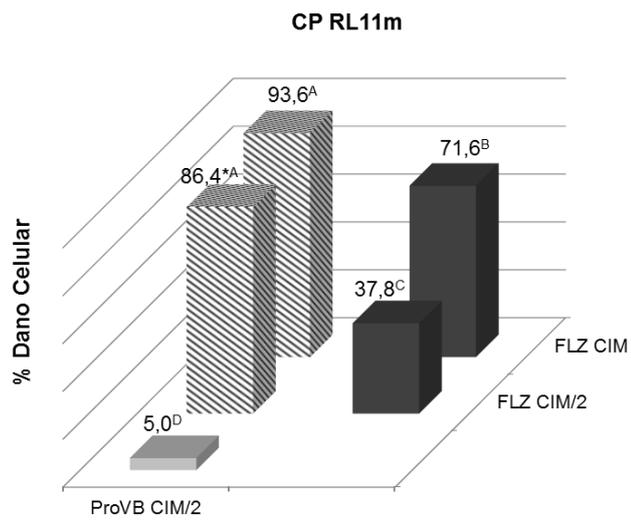
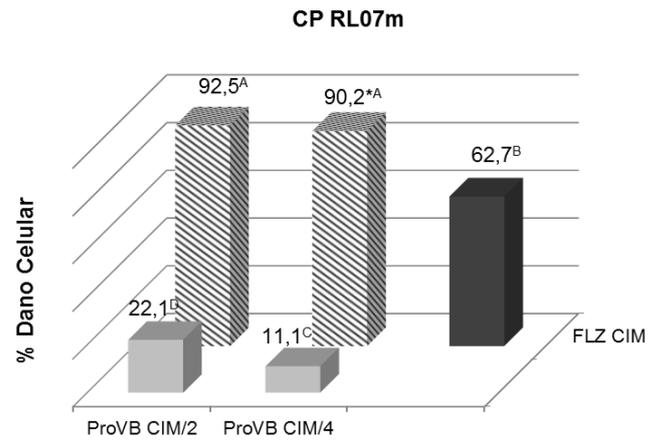
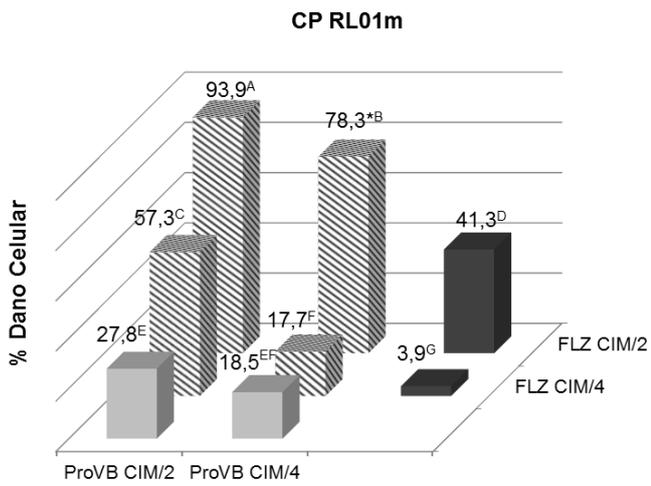
CIM; concentração fungicida mínima

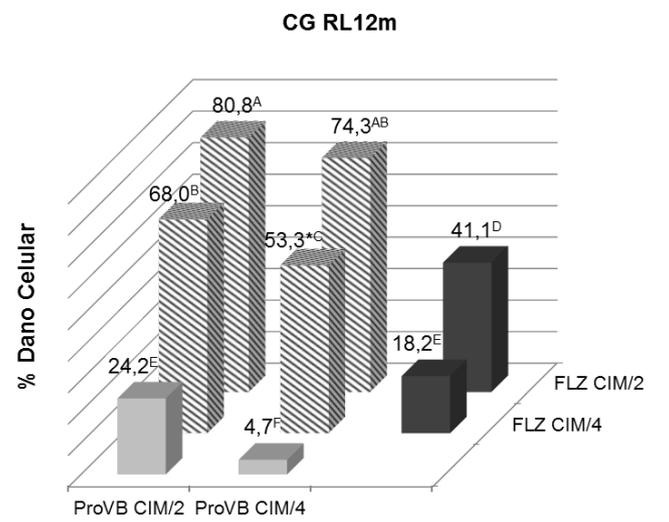
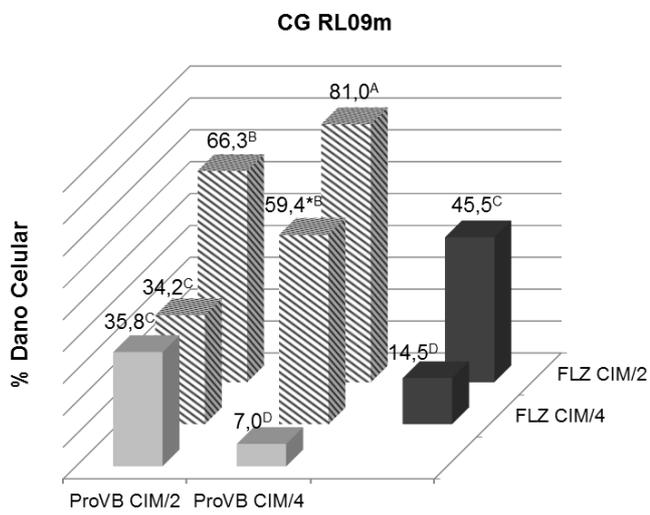
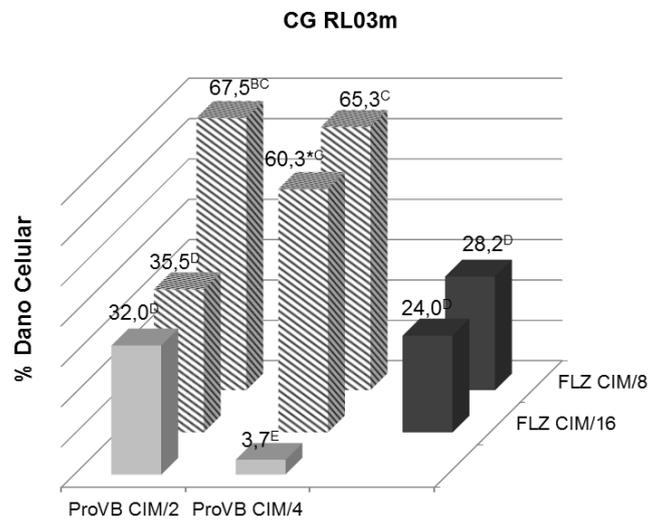
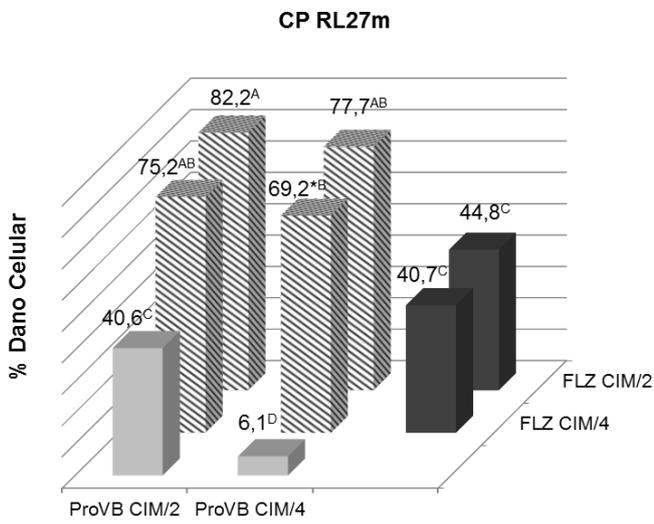
CIF: concentração inibitória fracionada

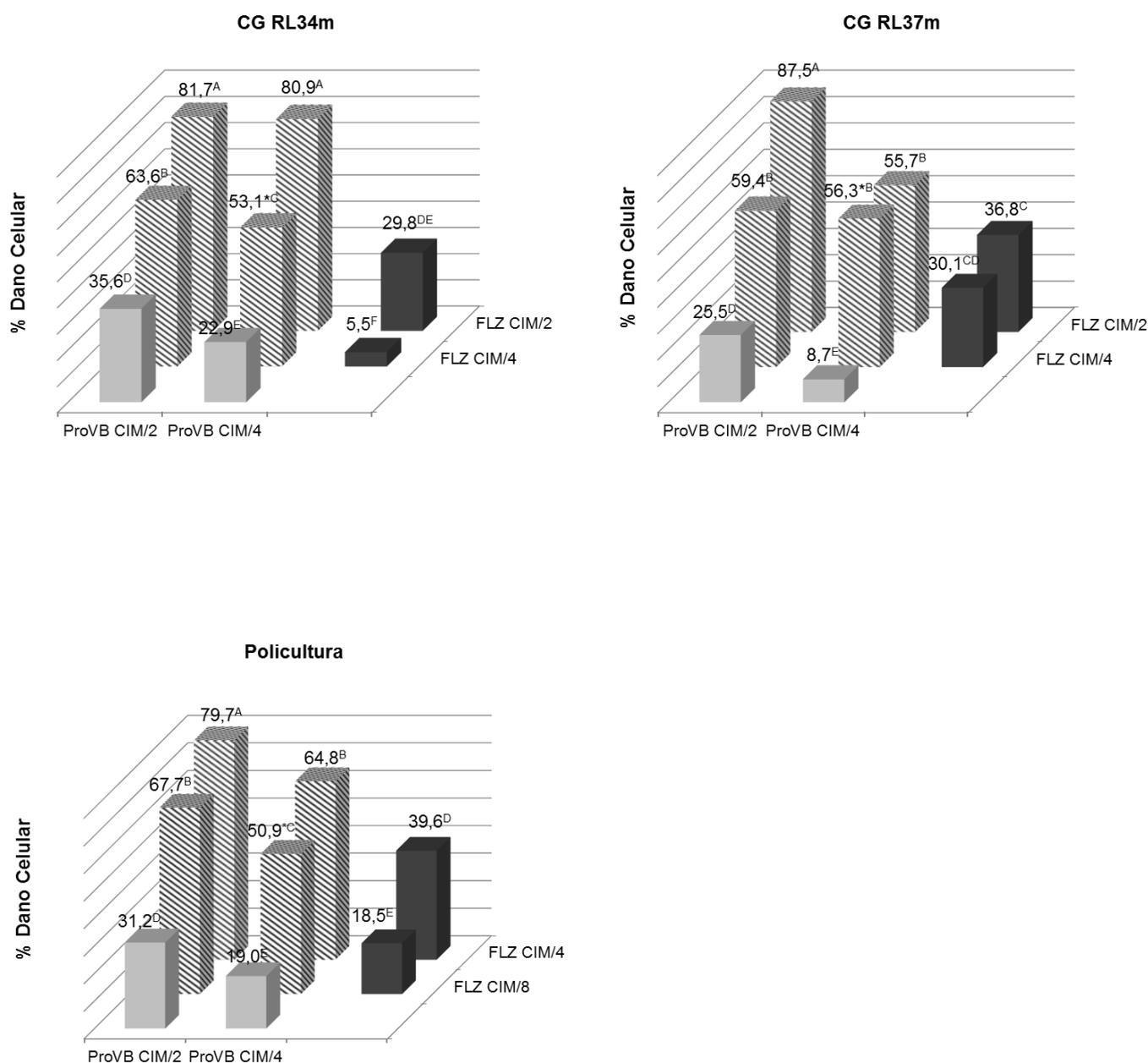
ICIF: índice da concentração inibitória fracionada

Policultura: *C. glabrata* RL37m + *C. parapsilosis* RL27m + *C. tropicalis* 72A + *C. krusei* ATCC 6258

Os gráficos representados na figura 3 expressam o comportamento de todos os isolados e da cultura polimicrobiana frente à combinação de própolis vermelha brasileira e FLZ. Pode-se observar que várias combinações de concentrações apresentaram um maior dano celular e, quando em combinação, FLZ diminuiu até oito vezes suas CIMs (MIC/8).







**FIGURA 3** Porcentagem de dano celular dos isolados no ensaio *checkerboard* frente à fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (ProVB) e fluconazol (FLZ) isoladamente e em combinação.

O eixo horizontal demonstra a concentração da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha representada de forma proporcional a sua concentração inibitória mínima (CIM). O eixo de profundidade demonstra a concentração de FLZ representada de forma proporcional a sua CIM. O eixo vertical representa o dano celular. O código do isolado é mostrado acima de cada gráfico.

Letras diferentes acima do dano celular representam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

\*Combinação utilizada para o cálculo do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF)

A contagem das espécies da cultura polimicrobiana, cultivada em chromagar após o tempo de incubação do ensaio *checkerboard*, é demonstrada na tabela 8. Conforme essa tabela pode-se observar que a combinação da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira com FLZ pode apresentar efeito fungicida frente às quatro espécies de *Candida* resistentes ao FLZ, principalmente quando FLZ estiver em alta concentração. *Candida parapsilosis* se mostrou presente na maioria das combinações, geralmente em maior número que as outras espécies, e *C. tropicalis* apenas esteve presente em duas combinações.

**TABELA 8.** Efeito da combinação da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (ProVB) e fluconazol (FLZ) frente a culturas polimicrobianas de isolados de *Candida* resistentes ao FLZ.

Combinação de ProVB e FLZ		Cultura Polimicrobiana			
Concentração (µg/mL)		Contagem das Espécies (log)			
ProVB	FLZ	CG	CP	CT	CK
31,25	128	ZERO	ZERO	ZERO	ZERO
31,25	64	ZERO	ZERO	ZERO	ZERO
31,25	32	ZERO	4,3	4,6	ZERO
31,25	16	ZERO	5	ZERO	ZERO
31,25	8	ZERO	4,8	ZERO	ZERO
15,625	128	ZERO	ZERO	ZERO	ZERO
15,625	64	ZERO	ZERO	ZERO	ZERO
15,625	32	ZERO	ZERO	ZERO	ZERO
15,625	16	4,3	ZERO	ZERO	4,3
15,625	8	ZERO	5,4	ZERO	ZERO

Continuação da TABELA 8

Combinação de ProVB e FLZ		Cultura Polimicrobiana			
Concentração (µg/mL)		Contagem das Espécies (log)			
ProVB	FLZ	CG	CP	CT	CK
7,813	128	ZERO	ZERO	ZERO	ZERO
7,813	64	ZERO	ZERO	ZERO	ZERO
7,813	32	4,9	5,4	ZERO	5,7
7,813	16	4,6	ZERO	ZERO	ZERO
7,813	8	4,3	5,2	ZERO	4,8
3,906	128	ZERO	ZERO	ZERO	ZERO
3,906	64	ZERO	ZERO	ZERO	ZERO
3,906	32	ZERO	5,4	4,3	5,3
3,906	16	4,9	5,8	ZERO	5,3
3,906	8	5,3	5,8	ZERO	5,1
1,953	128	ZERO	5	ZERO	ZERO
1,953	64	ZERO	ZERO	ZERO	ZERO
1,953	32	ZERO	6,5	ZERO	ZERO
1,953	16	5,9	4,6	ZERO	ZERO
1,953	8	ZERO	6,5	ZERO	ZERO
0,978	128	ZERO	6,4	ZERO	ZERO
0,978	64	ZERO	4,3	ZERO	4,9
0,978	32	ZERO	5,6	ZERO	4,9
0,978	16	4,8	6,1	ZERO	5,1
0,978	8	5,8	6,5	ZERO	4,6

CG: *C. glabrata*; CP: *C. parapsilosis*; CT: *C. tropicalis*; CK: *C. krusei*.

Concentração inibitória mínima (CIM) de FLZ para CT (72A): >128 µg/mL

CIM de FLZ para CK (ATT6258): 32 µg/mL

#### 4.6 Interação da Fração Enriquecida em Benzofenonas da Própolis Vermelha com Anidulafungina

Após realizada a leitura com MTT e calculado o dano celular do ensaio *checkerboard*, as combinações da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha e AND foram analisadas comparando com o dano ocasionado por esses agentes antifúngicos sozinhos. A tabela 9 demonstra até quatro combinações de concentrações da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira e AND escolhidas para cada isolado que melhoraram a atividade antifúngica e que tiveram dano celular superior a 50%. Para dois isolados de *C. parapsilosis* (CP RL01m e CP RL07m), essa combinação demonstrou diminuição no dano celular comparado aos agentes antifúngicos sozinhos e para um isolado dessa mesma espécie (CP RL13m) todas as combinações não apresentaram diferença estatística. Essas combinações de concentrações também estão expostas na tabela 9.

A análise estatística realizada para cada isolado comprovou que os danos celulares de todos os isolados de *C. glabrata* e de dois isolados de *C. parapsilosis* foram significativamente maiores na associação ( $p < 0,05$ ).

**TABELA 9.** Dano celular da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (ProVB) combinada com anidulafungina (AND) expressos em porcentagem (%).

Isolado	Combinação ProVB + AND								
	Comb 1		Comb 2		Comb 3		Comb 4		
	ProVB	AND	ProVB	AND	ProVB	AND	ProVB	AND	
CP RL01m	C ( $\mu\text{g/mL}$ )	31,25	0,5	15,625	0,5	31,25	0,03125	-	-
	DCS (%)	90,6 <sup>A</sup>	93,1 <sup>A</sup>	85,6 <sup>A</sup>	93,1 <sup>A</sup>	90,6 <sup>A</sup>	3,8 <sup>C</sup>	-	-

Continuação da TABELA 9

Isolado	Combinação ProVB + AND								
	Comb 1		Comb 2		Comb 3		Comb 4		
	ProVB	AND	ProVB	AND	ProVB	AND	ProVB	AND	
	DCC (%)	57,9 <sup>B</sup>		50,1 <sup>B</sup>		90,0 <sup>*A</sup>		-	
<b>CP RL07m</b>	C (µg/mL)	15,625	0,25	15,625	0,125	15,625	0,0625	1,953	0,5
	DCS (%)	78,1 <sup>B</sup>	44,2 <sup>D</sup>	78,1 <sup>B</sup>	17,5 <sup>F</sup>	78,1 <sup>B</sup>	7,9 <sup>G</sup>	6,0 <sup>G</sup>	95,7 <sup>A</sup>
	DCC (%)	35,2 <sup>E</sup>		45,5 <sup>CD</sup>		50,4 <sup>C</sup>		94,5 <sup>*A</sup>	
<b>CP RL11m</b>	C (µg/mL)	7,813	0,0625	3,906	0,0625	-	-	-	-
	DCS (%)	17,1 <sup>B</sup>	19,4 <sup>B</sup>	10,2 <sup>C</sup>	19,4 <sup>B</sup>	-	-	-	-
	DCC (%)	55,2 <sup>A</sup>		53,4 <sup>*A</sup>		-	-	-	-
<b>CP RL13m</b>	C (µg/mL)	1,953	0,25	-	-	-	-	-	-
	DCS (%)	6,1 <sup>B</sup>	93,2 <sup>A</sup>	-	-	-	-	-	-
	DCC (%)	96,0 <sup>*A</sup>		-	-	-	-	-	-
<b>CP RL27m</b>	C (µg/mL)	7,813	0,01563	7,813	0,03125	3,906	0,125	1,953	0,125
	DCS (%)	35,7 <sup>D</sup>	4,3 <sup>H</sup>	35,7 <sup>D</sup>	5,9 <sup>GH</sup>	14,9 <sup>F</sup>	30,3 <sup>DE</sup>	12,9 <sup>FG</sup>	30,3 <sup>DE</sup>
	DCC (%)	92,3 <sup>*AB</sup>		90,9 <sup>AB</sup>		88,6 <sup>B</sup>		61,1 <sup>C</sup>	
<b>CG RL03m</b>	C (µg/mL)	1,953	0,01563	1,953	0,00784	-	-	-	-
	DCS (%)	32,5 <sup>B</sup>	17,6 <sup>C</sup>	32,5 <sup>B</sup>	12,0 <sup>D</sup>	-	-	-	-
	DCC (%)	56,4 <sup>A</sup>		53,2 <sup>*A</sup>		-	-	-	-
<b>CG RL09m</b>	C (µg/mL)	1,953	0,01563	-	-	-	-	-	-
	DCS (%)	27,0 <sup>B</sup>	9,5 <sup>C</sup>	-	-	-	-	-	-

Continuação da TABELA 9

Isolado		Combinação ProVB + AND							
		Comb 1		Comb 2		Comb 3		Comb 4	
		ProVB	AND	ProVB	AND	ProVB	AND	ProVB	AND
	DCC (%)	51,9* <sup>A</sup>		-		-		-	
<b>CG RL12m</b>	C (µg/mL)	3,906	0,03125	3,906	0,01563	1,953	0,01563	-	-
	DCS (%)	21,6 <sup>D</sup>	10,0 <sup>E</sup>	21,6 <sup>D</sup>	8,7 <sup>E</sup>	7,5 <sup>E</sup>	8,7 <sup>E</sup>	-	-
	DCC (%)	73,9 <sup>A</sup>		55,5 <sup>C</sup>		65,3* <sup>B</sup>		-	
<b>CG RL34m</b>	C (µg/mL)	3,906	0,03125	3,906	0,01563	1,953	0,03125	1,953	0,01563
	DCS (%)	33,4 <sup>D</sup>	70,6 <sup>C</sup>	33,4 <sup>D</sup>	13,9 <sup>E</sup>	20,8 <sup>E</sup>	70,6 <sup>C</sup>	20,8 <sup>E</sup>	13,9 <sup>E</sup>
	DCC (%)	95,8 <sup>A</sup>		93,4 <sup>AB</sup>		83,5 <sup>B</sup>		90,8* <sup>AB</sup>	
<b>CG RL37m</b>	C (µg/mL)	3,906	0,015625	3,906	0,00784	3,906	0,00392	1,95	0,01563
	DCS (%)	28,8 <sup>D</sup>	15,1 <sup>F</sup>	28,8 <sup>D</sup>	11,0 <sup>FG</sup>	28,8 <sup>D</sup>	5,9 <sup>H</sup>	8,3 <sup>GH</sup>	15,1 <sup>F</sup>
	DCC (%)	95,1 <sup>A</sup>		76,3 <sup>B</sup>		53,8 <sup>C</sup>		93,1* <sup>A</sup>	

C: concentrações dos agentes antifúngicos; DCS: dano celular dos agentes antifúngicos sozinhos; DCC: dano celular dos agentes antifúngicos combinados;

Letras diferentes acima do dano celular representa diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

\*combinação de agentes antifúngicos utilizada para calcular o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) Comb 1-4: quatro combinações de concentrações da ProVB e AND escolhidas para cada isolado que melhoraram a atividade antifúngica e que tiveram dano celular superior a 50%. Quando foi constatada menos de quatro combinações com aumento do dano celular da combinação, há a representação por um traço (-).

Para os isolados CP RL01 m, CP RL07m e CP RL13m, nenhuma das combinações de concentrações testaram aumentaram o dano celular, também demonstrado na tabela.

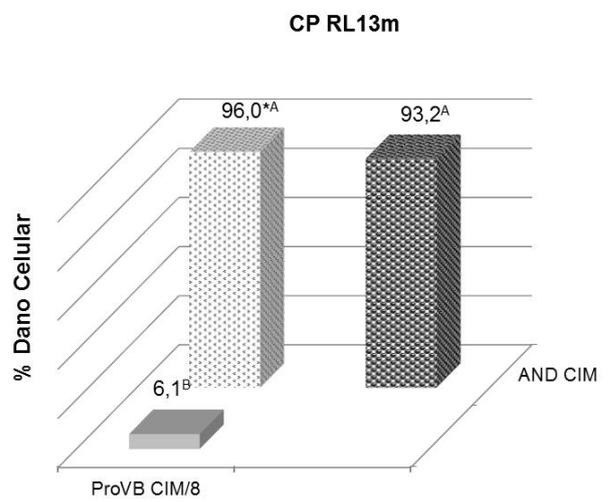
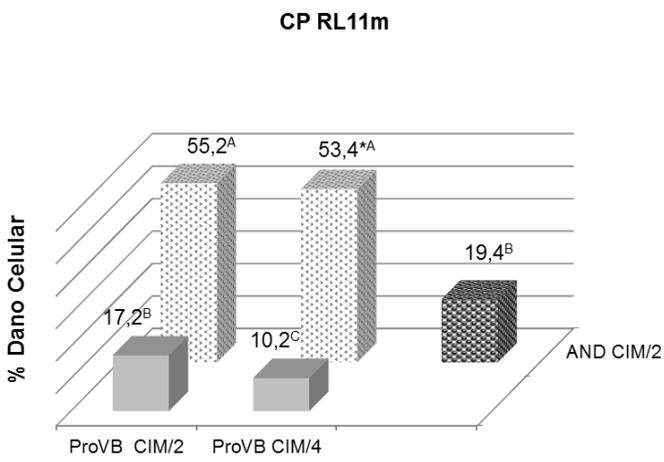
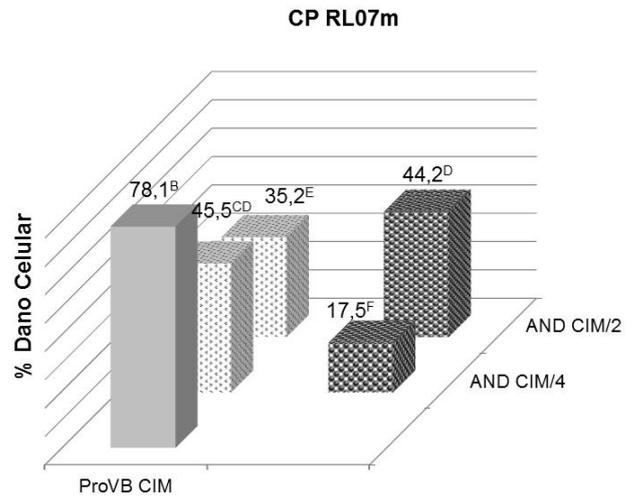
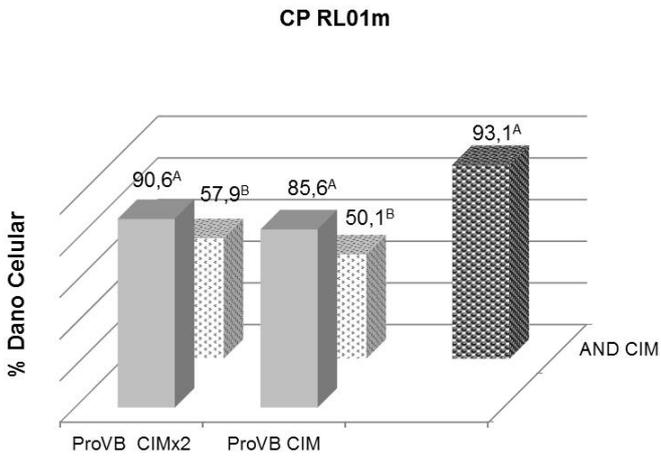
A tabela 10 representa o efeito da combinação da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira com a AND a partir do cálculo do ICIF. Essa associação apresentou efeito sinérgico para apenas um isolado de *C. glabrata*. O efeito de aditividade esteve presente para dois isolados de *C. parapsilosis* e para três de *C. glabrata*. Os outros quatro isolados se mostraram indiferentes frente a essa associação.

**TABELA 10.** Efeito da combinação da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (ProVB) com anidulafungina (AND) no ensaio *checkerboard* para os diferentes isolados.

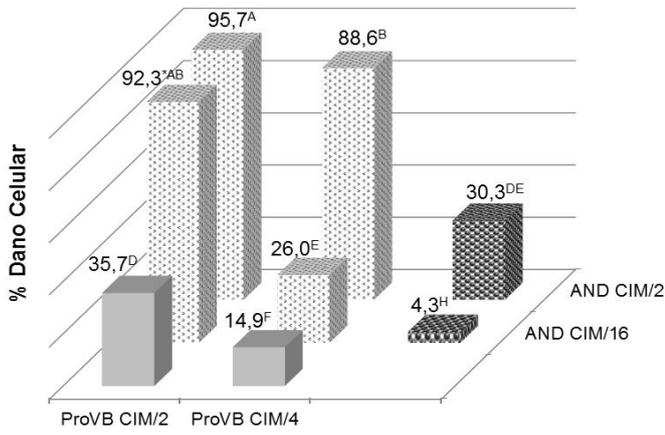
Isolado	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )		CIM combinação ( $\mu\text{g/mL}$ )		CIF		ICIF	Interação
	ProVB	AND	ProVB	AND	ProVB	AND		
<b>CP RL01m</b>	15,625	0,5	31,25	0,031	2	0,0625	2,0625	Ind
<b>CP RL07m</b>	15,625	0,5	1,953	0,5	1	0,125	2,125	Ind
<b>CP RL11m</b>	15,625	0,125	3,906	0,0625	0,25	0,5	0,75	Ad
<b>CP RL13m</b>	15,625	0,25	1,953	0,25	0,125	1	1,125	Ind
<b>CP RL27m</b>	15,625	0,25	7,813	0,015625	0,5	0,0625	0,5625	Ad
<b>CG RL03m</b>	3,906	0,03125	1,953	0,00784	0,5	0,25	0,75	Ad
<b>CG RL09m</b>	3,906	0,03125	1,953	0,015625	0,5	0,5	1,00	Ind
<b>CG RL12m</b>	7,813	0,0625	1,953	0,03125	0,25	0,5	0,75	Ad
<b>CG RL34m</b>	7,813	0,03125	1,953	0,015625	0,25	0,5	0,75	Ad
<b>CG RL37m</b>	7,813	0,0625	1,953	0,015625	0,25	0,25	0,5	Sin

As interações foram classificadas como Sinergismo (Sin), Aditividade (Ad), Indiferença (Ind) e Antagonismo (Ant).  
 CIM; concentração fungicida mínima  
 CIF: concentração inibitória fracionada  
 ICIF: índice da concentração inibitória fracionada

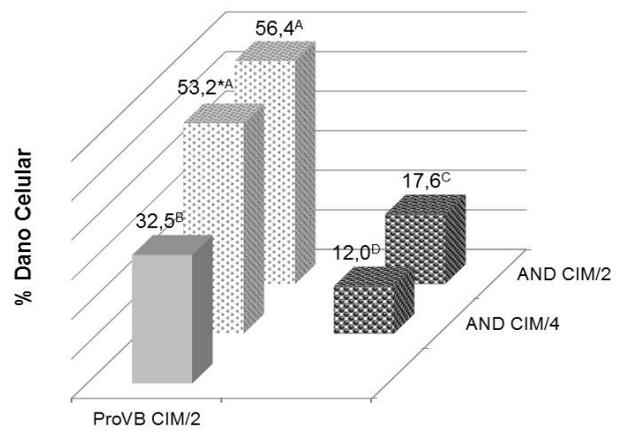
Os gráficos representados na figura 4 expressam o comportamento de todos os isolados frente à combinação da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha e AND. Pode-se observar que várias combinações de concentrações apresentaram um maior dano celular e, quando em combinação, FLZ diminuiu até 16 vezes sua concentração inibitória mínima (MIC/16).



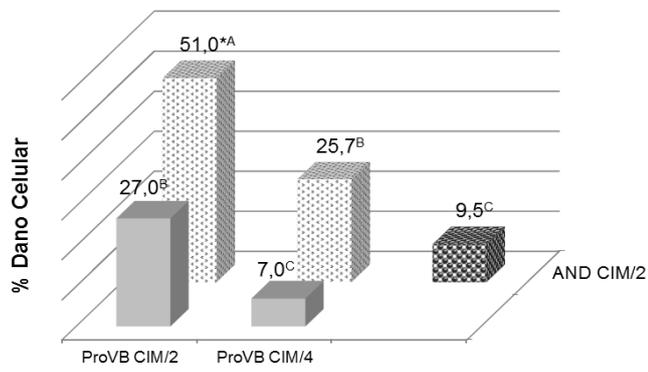
**CP RL27m**



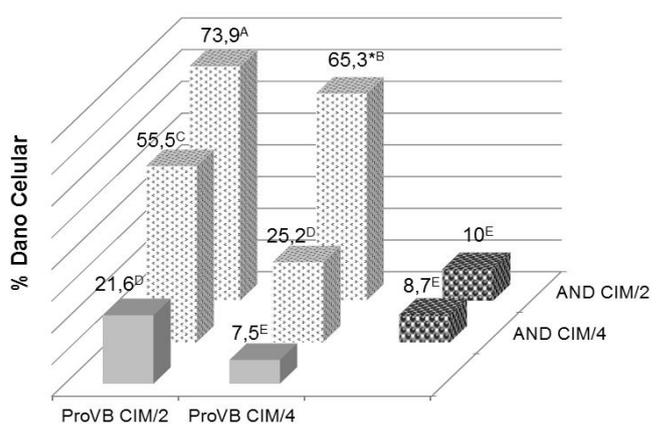
**CG RL03m**

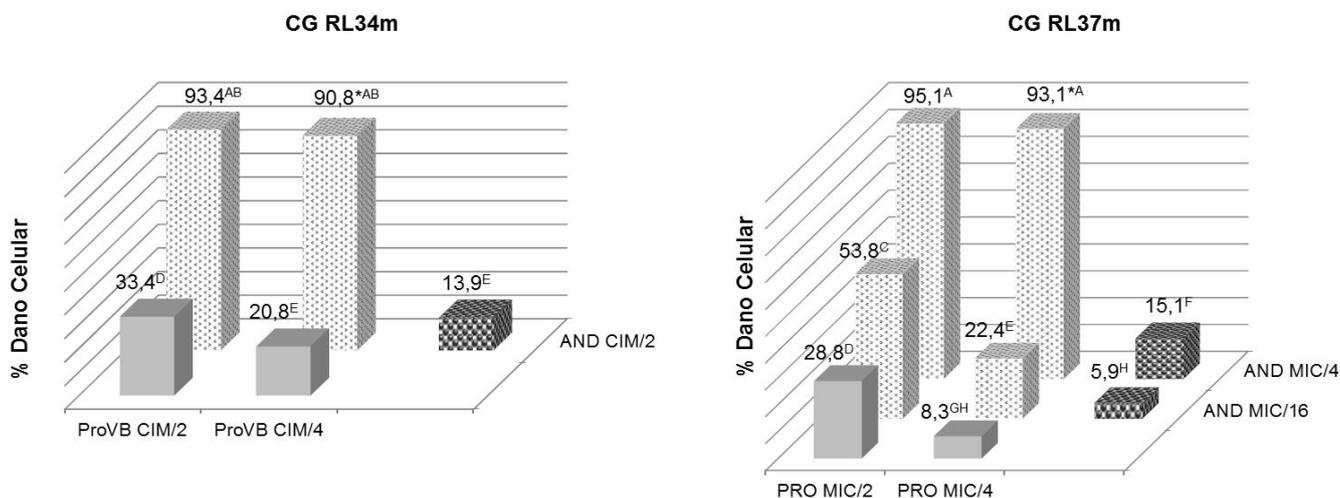


**CG RL09m**



**CG RL12m**





**FIGURA 4.** Porcentagem de dano celular dos isolados no ensaio *checkerboard* frente à fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (ProVB) e anidulafungina (AND) isoladamente e em combinação.

O eixo horizontal demonstra a concentração da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha representada de forma proporcional a sua concentração inibitória mínima (CIM). O eixo de profundidade demonstra a concentração de FLZ representada de forma proporcional a sua CIM. O eixo vertical representa o dano celular. O código do isolado é mostrado acima de cada gráfico.

Letras diferentes acima do dano celular representam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

\*Combinação utilizada para o cálculo do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF)

#### 4.7 Efeito do Ergosterol Exógeno

A propriedade da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira se ligar diretamente ao ergosterol foi avaliada pela adição de concentrações variadas de ergosterol exógeno para a determinação da CIM. A presença de excesso de ergosterol demonstrou aumentar de 16 a 128 vezes os valores de CIM para AnfB (fármaco usada como controle), conforme demonstra a tabela 11. A presença de ergosterol exógeno não diminuiu a

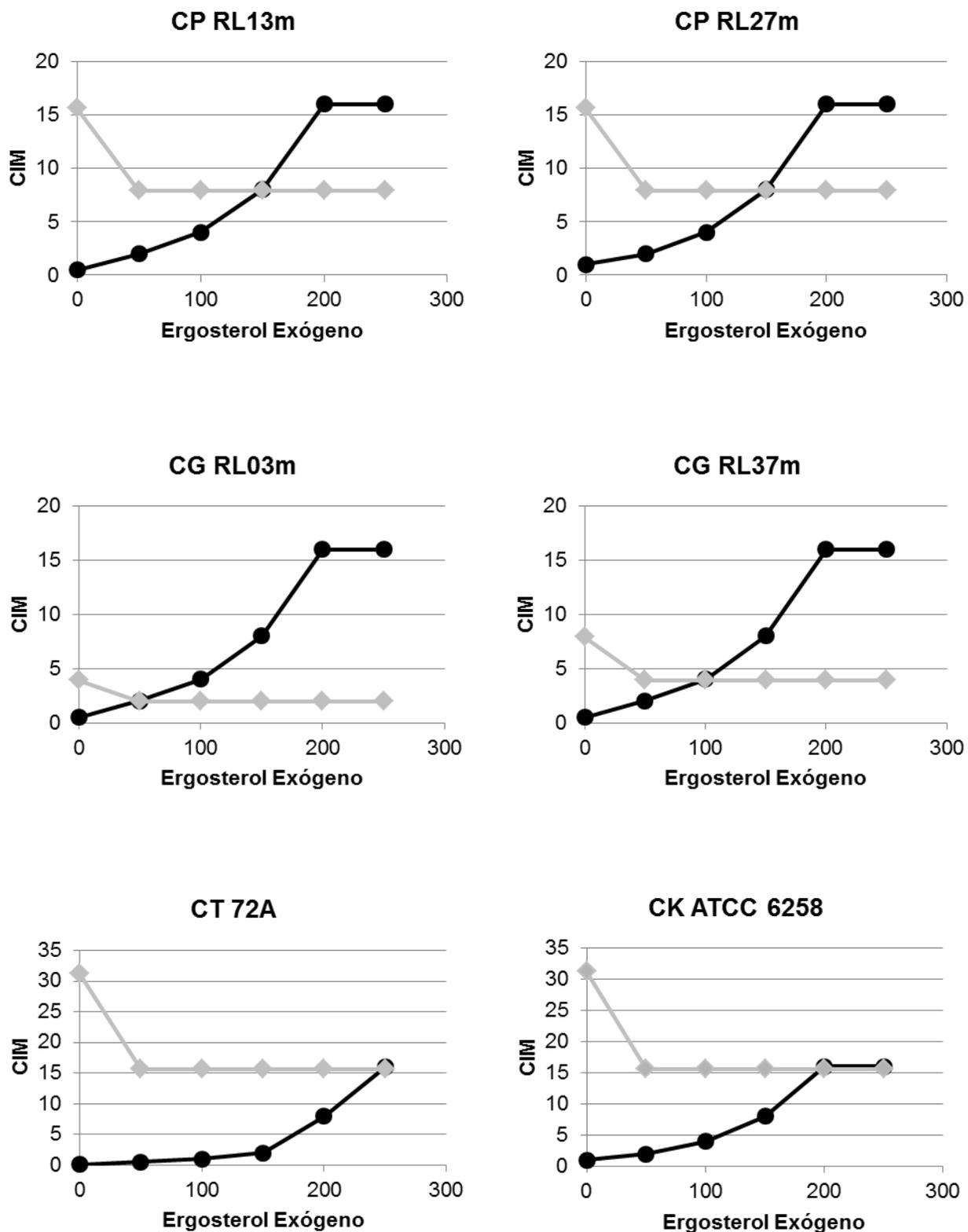
suscetibilidade dos isolados frente à fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha (tabela 12), sugerindo que este produto não atue se complexando ao ergosterol da célula. Todas as espécies testadas se comportaram da mesma maneira, como demonstra a figura 5.

**TABELA 11.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM), em  $\mu\text{g/mL}$ , da anfotericina B (AnfB) para isolados cultivados em meio isento de ergosterol e em concentrações crescentes de ergosterol ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Isolado	CIM AnfB					
	Concentração de Ergosterol Exógeno					
	0	50	100	150	200	250
CP RL13m	0,5	2	4	8	16	16
CP RL27m	1	2	4	8	16	16
CG RL03m	0,5	2	4	8	16	16
CG RL37m	0,5	2	4	8	16	16
CT 72A	0,125	0,5	1	2	8	16
CK ATCC 6258	1	2	4	8	16	16

**TABELA 12.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM), em  $\mu\text{g/mL}$ , da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (PropVB) para isolados cultivados em meio isento de ergosterol e em concentrações crescentes de ergosterol ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Isolado	CIM PropVB					
	Concentração de Ergosterol Exógeno					
	0	50	100	150	200	250
CP RL13m	15,625	7,813	7,813	7,813	7,813	7,813
CP RL27m	15,625	7,813	7,813	7,813	7,813	7,813
CG RL03m	3,906	1,953	1,953	1,953	1,953	1,953
CG RL37m	7,813	3,906	3,906	3,906	3,906	3,906
CT 72A	31,25	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625
CK ATCC 6258	31,25	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625



**FIGURA 5.** Efeito das diferentes concentrações do ergosterol exógeno (50-250 µg/mL) na CIM de anfotericina B (preto) e da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira (cinza) para as quatro espécies de *Candida* testadas. Os códigos dos isolados são mostrados acima de cada gráfico.

#### 4.8 Efeito Sobre a Parede Celular

A presença do sorbitol como estabilizador osmótico da parede celular promove aumento do valor de CIM dos compostos que atuam sobre a parede (ESCALANTE et al., 2008). Os valores de CIM para as amostras de própolis no ensaio com adição de sorbitol podem ser observados na tabela 13.

Na presença de sorbitol no meio de cultura, os isolados diminuíram de 8 a 64 vezes sua suscetibilidade a AND. Quando a fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira foi testada contra os isolados em um meio suplementado com sorbitol, os valores de CIM aumentaram de 8 a 32 vezes, o que é um indício que os compostos presentes nesta fração afetam a parede celular de espécies de *Candida*.

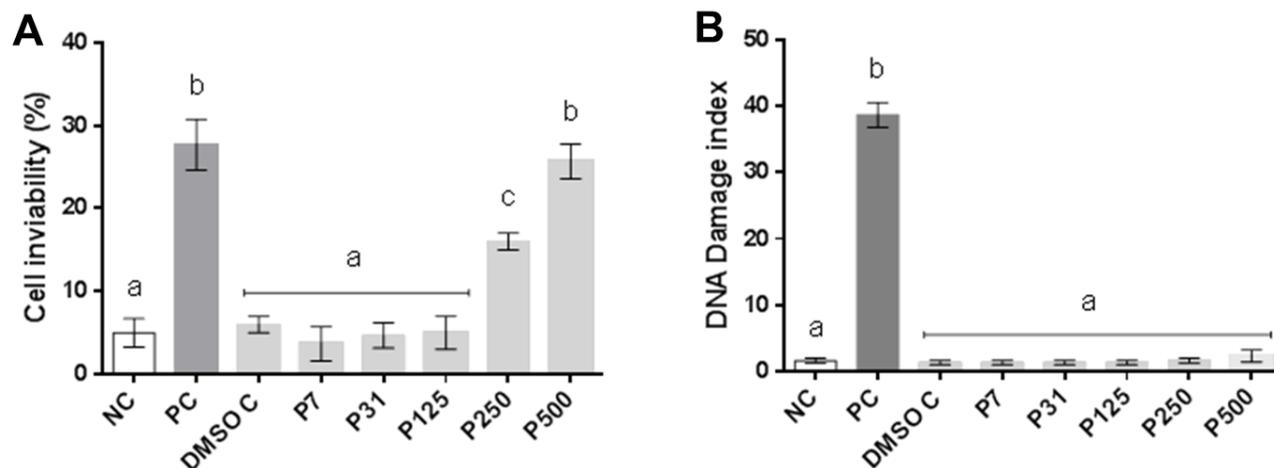
**TABELA 13.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM), em µg/mL, lidos em 2 e 7 dias da anidulafungina (AND) e da fração enriquecida da própolis vermelha brasileira (ProVB) para isolados cultivados em meio isento de sorbitol e em meio com 0,8M de sorbitol.

Isolados	CIM AND		CIM ProVB	
	2 dias/ 7 dias		2 dias/ 7 dias	
	Sem Sorbitol	Com Sorbitol	Sem Sorbitol	Com Sorbitol
<b>CP RL13m</b>	0,25/ 0,25	0,25/ 2	15,625/ 31,25	15,625/ 1000
<b>CP RL27m</b>	0,25/ 0,25	0,25/ >2	15,625/ 15,625	15,625/ 250
<b>CG RL03m</b>	0,03125/ 0,03125	0,0625/ 0,25	3,906/ 7,813	15,625/ 125
<b>CG RL37m</b>	0,03125/ 0,03125	0,0625/ 0,25	7,813/ 15,625	15,625/ 125
<b>CT 72A</b>	0,03125/ 0,03125	0,25/ >2	15,625/ 31,25	62,5/ 500
<b>CK ATCC 6258</b>	0,03125/ 0,03125	0,0625/0,25	15,625/ 15,625	62,5/ 250

#### **4.9 Viabilidade Celular e Ensaio Cometa**

A Figura 6 mostra a porcentagem de células de leucócitos humano inviáveis e o índice de dano no DNA para o controle negativo (NC), controle positivo (PC), controle do diluente utilizado nos ensaios (DMSOC) e para cinco concentrações da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira.

Conforme a figura 6A, as três concentrações mais baixas de própolis apresentaram poucas células inviáveis, significativamente menores que o controle positivo ( $p < 0,05$ ) e sem diferença estatística do controle negativo. Entretanto a concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  mostrou-se tão tóxica quanto o controle positivo e a concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  apresentou inviabilidade intermediária ( $p < 0,05$ ). Com relação à análise do ensaio cometa, representado na figura 6B, as concentrações da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha analisadas não mostraram dano no DNA, com diferenças significativas do controle positivo ( $p < 0,05$ ) e não demonstrando diferença estatística significativa quando comparado com o controle negativo.



**FIGURA 6.** Inviabilidade celular e dano no DNA.

A) Inviabilidade celular para a fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira em cinco diferentes concentrações; B) Índice de dano no DNA verificado através do Ensaio Cometa. NC: controle negativo (PBS); PC: controle positivo (água oxigenada); DMSO C: controle do diluente utilizado nos ensaios (DMSO 2%); P7: fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha na concentração de 7,813  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; P31: 31,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; P125: 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; P250: 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; P500: 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Letras diferentes implicam diferença estatística significativa.

## 5 DISCUSSÃO

Apesar da introdução de uma nova geração de agentes antifúngicos, uso de terapia combinada e melhor padronização dos testes de susceptibilidade, a resistência aos fármacos ainda é um desafio para tratamento de infecções fúngicas (Kanafani & Perfect, 2008; Chapeland-Leclerc et al., 2010; Pfaller, 2012). Provavelmente o motivo do aumento na frequência de isolamento de espécies de CNA seja a redução da suscetibilidade dessas espécies frente aos antifúngicos (Pfaller & Diekema, 2010a; Pfaller, 2012). O uso generalizado de agentes antimicrobianos resulta no surgimento de cepas resistentes aos medicamentos entre populações anteriormente suscetíveis. Essas cepas resistentes surgem na população durante a exposição aos agentes antimicrobianos através de um processo de evolução adaptativa. Por seleção natural, o mutante se expande na população até se tornar o clone dominante (Huang & Kao, 2012). Resistência ao FLZ entre *Candida* spp. tem sido relatada quando o fármaco é usado extensivamente (Richardson, 2005; Pasqualotto et al., 2008).

A aquisição de resistência *in vitro* de *C. albicans* aos azóis devido à exposição a esses agentes tem sido extensivamente investigada, assim como os mecanismos de resistência (White, 1997; Marr et al., 1998; Sanglard et al., 1998; Sanglard et al., 1999; Marr et al., 2001). Apesar da emergência de CNA na última década, ainda são poucos os estudos relacionados ao desenvolvimento de resistência nessas espécies (Barchiesi et al., 2000; Borst et al., 2005; Pinto E Silva et al., 2009).

Os resultados do nosso estudo ressaltam a capacidade de espécies de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* adquirirem resistência *in vitro* ao FLZ após exposição a esse fármaco (tabela 2), como demonstrado em estudos anteriores realizados com espécies de *Candida* (Marr et al., 2001; Pinto e Silva et al., 2009). Três dos cinco isolados de *C. parapsilosis* desenvolveram resistência quando expostos a concentrações de 16 µg/mL de FLZ e, no final do processo, os isolados aumentaram de duas a 128 vezes o valor de CIM. O isolado CP RL07 permaneceu sensível e o isolado CP RL01 passou a fenótipo SDD. Pinto e Silva et al. (2009) também demonstraram aquisição de resistência dessas espécies após exposição a 16 µg/mL de FLZ, porém os cinco isolados testados em seu trabalho apresentaram essa característica. Entretanto, deve-se ressaltar que o tempo de exposição dos isolados em nosso trabalho foi de 16 dias, enquanto que Pinto e Silva et al. (2009) expuseram os isolados ao FLZ por 30 dias.

Em nosso estudo, verificamos que os isolados de *C. glabrata* apresentaram uma elevação de CIM superior aos isolados de *C. parapsilosis* após exposição a 8 µg/mL de FLZ. Porém os isolados de *C. glabrata* só desenvolveram o fenótipo de resistência depois de expostos a 64 µg/mL, aumentando de 64 a 128 vezes os valores das CIMs. O *breakpoint* de resistência ao FLZ para *C. parapsilosis* é menor que para *C. glabrata* (tabela 1), de acordo com o documento M27-S4 (CLSI, 2012), e isso pode contribuir para uma mais rápida mudança de fenótipo observada na primeira espécie.

Borst et al. (2005), ao analisarem o desenvolvimento de resistência em três isolados de *C. glabrata*, observaram o aparecimento do fenótipo de

resistência em dois isolados após exposição a 16 µg/mL de FLZ. O terceiro apenas tornou-se resistente quando cultivado em meio contendo 64 µg/mL, assim como se comportaram quatro dos cinco isolados dessa espécie estudados em nosso laboratório. As mutações espontâneas são muito infrequentes. Os constantes valores de CIM ao longo do processo para as linhagens incubadas em meio isento de antifúngico apoiam fortemente essa hipótese.

Adicionalmente, quando os isolados foram cultivados em meio livre de FLZ por 30 dias, as CIMs para esses isolados reverteram para valores mais baixos, porém continuavam elevados comparados às CIMs antes da indução da resistência (tabela 2). Os três isolados de *C. parapsilosis* mantiveram-se resistentes corroborando com os resultados encontrados por Pinto e Silva et al. (2009), que também demonstraram diminuição de apenas uma diluição nos valores de CIM sem alteração de fenótipo, quando *C. parapsilosis* resistentes foram subcultivadas livres de FLZ. Embora três isolados de *C. glabrata* tenham perdido seu fenótipo de resistência, essa espécie continuou apresentando valores de CIMs 32 a 64 vezes maiores que as CIMs iniciais (tabela 2). Borst et al. (2005) ao subcultivarem os isolados de *C. glabrata* com resistência adquirida ao FLZ em meio isento de fármaco por 122 dias, observaram perda do fenótipo de resistência apenas para um dos quatro isolados testados. A CIM deste isolado diminuiu apenas uma diluição e manteve-se estável por 73 dias de cultivo. Porém esse decréscimo de CIM ocorreu no tempo que coincide com a alteração das condições de subcultura de meio líquido para meio sólido. Essa questão tem importância ao correlacionar com os resultados do nosso trabalho,

onde o subcultivo foi realizado diretamente em meio sólido e a perda do fenótipo também foi verificada.

Tobudic et al. (2007) compararam a resistência adquirida *in vitro* de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* para FLZ, VRZ e CSP. Esses autores observaram que esses três fármacos induzem resistência facilmente a *C. tropicalis*, e *C. albicans* tornou-se rapidamente resistente ao VRZ, enquanto *C. krusei* e *C. glabrata* mostraram CIM estáveis após exposição. Barchiesi et al. (2000) também observaram o rápido desenvolvimento de resistência em *C. tropicalis* ao FLZ, podendo ser observada após a primeira subcultura na presença do fármaco.

A resistência cruzada ao triazol ITZ foi observada para três isolados de *C. glabrata* (tabela 4), assim como demonstram estudos anteriores realizados por Borst et al. (2005), e para um isolado de *C. parapsilosis*. Apesar de não desenvolverem fenótipo de resistência, outros três isolados apresentaram aumento de CIM, um deles passando de sensível a SDD (CP RL11m).

Nenhum isolado apresentou resistência cruzada aos representantes imidazólicos (MCZ e CTZ) utilizados nesse estudo, entretanto aumento da CIM foi evidenciada para esses dois fármacos (tabela 4). Diversos estudos demonstram a resistência cruzada entre os triazóis (Marr et al., 1998; Barchiesi et al., 2000; Marr et al., 2001; Borst et al., 2005) nas espécies de *Candida*, entretanto a resistência cruzada aos imidazóis é pouco relatada. Marr et al. (1998, 2001) observaram resistência cruzada em *C. albicans* ao CTZ e Ghannoum et al. (2011), após um estudo da exposição de espécies de *Candida*

ao MCZ, demonstrou aumento de CIM sem alteração de fenótipo; e mesmo isolados resistentes ao FLZ não demonstraram desenvolvimento de resistência para o MCZ, sugerindo que não existe risco de resistência cruzada entre esses dois fármacos.

Além disso, todos os isolados de *C. parapsilosis* expostos ao FLZ apresentaram também mudanças macromorfológicas (*Phenotypic switching*) no presente trabalho. Vargas et al. (2000) relacionaram *Phenotypic Switching* a níveis elevados de resistência aos antifúngicos - incluindo 5FC, VCZ, FLZ, e AnfB em *C. albicans*, evidenciando que essas mudanças podem ter efeito sobre a sensibilidade aos fármacos. *Phenotypic switching* é bastante estudado em *C. albicans*, e alguns autores já relataram esse fenômeno para *C. parapsilosis* (Laffey & Butler, 2005; Bliss et al., 2012). *Phenotypic switching* foi descrita pela primeira vez em *C. parapsilosis* por Lott et al. (1993) e posteriormente por Enger et al. (2001). As diferenças na morfologia da colônia foram associadas com variações nas proporções das células, distribuição de quitina na parede celular, brotamento e presença de *pseudo*-hifas (Enger et al., 2001; Laffey & Butler, 2005). Estudos demonstram que essa característica pode estar relacionada com a virulência, aderência e também com a capacidade de formação de biofilme (Laffey & Butler, 2005).

Estudos demonstram que a dinâmica de aquisição de resistência entre as espécies de *Candida* varia. *Candida albicans* necessita de um maior tempo de exposição para adquirir esse fenótipo e a resistência é considerada transitória (Marr et al., 1998). Apesar do mecanismo de resistência não ter sido elucidado neste trabalho, a ativação das bombas de efluxo parece ser o

mecanismo de resistência mais importante aos azóis (Sanglard & Odds, 2002). Os antifúngicos CTZ, FLZ, ITZ e VRZ são facilmente transportados por essas bombas (Chau et al., 2004).

A resistência a *C. albicans* está intimamente associada ao aumento do RNAm para os genes CDR que codificam transportadores de bomba de efluxo da família ABC (Marr et al., 1998; Marr et al., 2001). A resistência a *C. tropicalis* tem sido relacionada ao aumento da expressão dos genes CDR1 e MDR1 (Barchiesi et al., 2000).

Em estudo de indução de resistência *in vitro* de *C. glabrata*, foi observado que a expressão dos genes de efluxo, CDR1 e CDR2, foi mínima nos isolados iniciais e consideravelmente mais elevada nos mutantes resistentes (Borst et al., 2005), mesmo após a remoção do FLZ do meio de cultura; e alterações na expressão de ERG11, o gene que codifica a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase, eram pequenas. Os genes superexpressos nos isolados mutantes do estudo mencionado acima são os responsáveis pela ativação das bombas de efluxo da família ABC e estas bombas não demonstraram estar relacionadas com a resistência adquirida pelos isolados de *C. glabrata* estudados em nosso trabalho. Apesar de Borst et al. (2005) relacionarem a resistência dessa espécie à ativação das bombas de efluxo e não encontrarem relação com a superexpressão de ERG 11, outros estudos têm associado a superexpressão desse gene à resistência aos azóis em *C. glabrata* (Henry et al., 2000; Redding et al., 2003), demonstrando que mecanismos diferentes podem estar associados à resistência dentro de uma mesma espécie.

Sobre o mecanismo de resistência investigado, os isolados de *C. parapsilosis* também não apresentaram ativação da bomba de efluxo ABC, corroborando com Pinto e Silva et al. (2009). Esses autores não verificaram relação entre os isolados de *C. parapsilosis* com resistência *in vitro* ao FLZ à atividade das bombas de efluxo e levantaram a hipótese de que a resistência induzida dessa espécie pode ser devido a uma mutação nos genes que codificam enzimas da via da biossíntese do ergosterol. Segundo eles, sensibilidade diminuída do alvo é provavelmente o mecanismo de resistência principal a azóis em *C. parapsilosis*.

Resistência a quase todos os principais agentes antifúngicos tem sido relatada em isolados clínicos de *Candida* spp. (Sanglard & Odds, 2002), o que representa um grande problema de saúde pública, ainda mais que o arsenal de agentes antifúngicos é limitado. Dessa forma mostra-se importante realizar testes de aquisição de resistência *in vitro* na etapa de prospecção de um novo medicamento. Devido à alta necessidade da introdução de novos antifúngicos eficazes, diversas substâncias naturais estão sendo estudadas quanto à atividade antifúngica (Barros et al., 2013; Danielli et al., 2013), porém não encontram-se na literatura estudos da capacidade dessas substâncias induzirem resistência em fungos.

Em nosso trabalho pudemos observar que a própolis vermelha brasileira, além de apresentar resultados satisfatórios quanto à inibição de espécies de *Candida*, também demonstrou ser um produto não indutor de resistência de *in vitro*. Isso pôde ser demonstrado através dos valores constantes de CIM após exposição de espécies de *C. glabrata* e *C. parapsilosis*

a concentrações crescentes desse produto. Em nenhuma etapa do processo de indução de resistência, os isolados mostraram-se menos suscetíveis. Os valores de CIM para *C. glabrata* foram de 3,906 e 7,813 µg/mL (dependendo do isolado) e 15,625 µg/mL para *C. parapsilosis* (tabela 3). Righi et al. (2011) e Trusheva et al. (2006) também demonstraram atividade antifúngica relevante da própolis vermelha brasileira para esse gênero. Além disso, os isolados com resistência induzida ao FLZ continuaram apresentando os mesmos valores de CIM para a fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha, demonstrando que o mecanismo de resistência desenvolvida ao FLZ por esses isolados possivelmente não se aplica à própolis vermelha brasileira.

O modo de ação dos agentes antifúngicos pode ser um fator que contribui para o surgimento de resistência aos medicamentos. Andes et al. (2006), observaram que a atividade fungicida/bactericida dos antimicrobianos pode efetivamente reduzir o tamanho da população dos patógenos e, assim, diminuir a frequência de mutações. Um agente fungistático reduz em menor grau a dimensão da população, possivelmente conduzindo a uma população mais heterogênea contendo vários mutantes. Entretanto, parece que esta relação não é a justificativa para os isolados não desenvolverem resistência à fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha, visto que esta apresentou características fungistáticas nas concentrações testadas neste estudo (tabela 4).

Porém deve-se ressaltar que a própolis é uma substância complexa, possivelmente contendo várias substâncias com propriedades antifúngicas. Além disso, Takaisi-Kikuni & Schilcher (1994) verificaram a presença de

diversos possíveis mecanismos de ação para a própolis. Foi observada atividade na membrana, parede celular e na replicação do DNA, entre outros mecanismos ainda desconhecidos. Dessa maneira, a evolução da resistência pode ser mais difícil, uma vez que vários mecanismos de adaptações deveriam ser desenvolvidos pelos fungos, exigindo várias mutações concomitantes.

Essa hipótese nos levou a pesquisar a atividade antifúngica desse produto frente a uma cultura polimicrobiana formada por diferentes espécies de *Candida* resistentes ao FLZ. Os mecanismos de resistência para essas quatro espécies não foram elucidados em nosso estudo, porém acredita-se que diferentes mecanismos estejam envolvidos.

Há relatos da atividade de própolis frente a micro-organismos resistentes (Ugur et al., 2000; Raghukumar et al., 2010; Shokri et al., 2011), entretanto nenhum estudo foi conduzido para investigar se a própolis vermelha brasileira demonstra ser efetiva para espécies de *Candida* resistentes, e a influência desse produto em culturas polimicrobianas formada por esses micro-organismos. Shokri et al. (2011) verificaram que extrato etanólico de própolis originado do Iran apresentou atividade frente a 14 isolados de *C. glabrata* resistentes ao FLZ. Os valores de CIM para esse produto variaram de 0,5 mg/mL a 5 mg/mL. Yarfani et al. (2010), em pesquisa realizada no mesmo país com dois tipos diferentes de própolis, verificaram que a CIM frente a cepas de *C. albicans* resistentes ao FLZ variavam de 2 a 20 mg/mL. Nas duas situações as própolis apresentaram propriedades antifúngicas, entretanto foram observados valores de CIM muito superiores aos encontrados em nosso estudo. Essa variação de CIM frente a *Candida* sp. resistentes ao FLZ

observada entre as amostras de própolis de diferentes origens, possivelmente se atribui aos compostos químicos encontrados em cada uma delas. Yarfani et al. (2010) e Shokri et al. (2011) encontraram polifenóis (principalmente ácido fenólico) como os constituintes majoritários, enquanto em nossa amostra de própolis foram encontradas benzofenonas polisopreniladas (Fasolo et al., 2014). Nesse contexto, mostra-se a importância da própolis vermelha brasileira frente a isolados resistentes ao FLZ.

Ao testar a própolis frente a espécies de *Candida* cultivadas juntas, observamos sua ótima atividade frente a culturas polimicrobianas formadas de isolados resistentes ao FLZ (tabela 5), e, por isso, podemos afirmar que provavelmente este produto consegue contornar, ao mesmo tempo, diferentes estratégias de adaptação/resistência desenvolvidas por espécies de *Candida*.

Ainda, observamos que a sensibilidade de algumas espécies pode ser alterada na presença de outras e melhorar a resposta. O isolado mais sensível à própolis incluído nessa pesquisa foi *C. glabrata* RL37m, e todos os isolados diminuíram a CIM quando cultivados junto a esse. O isolado de *C. krusei* ATCC 6258 e o isolado de *C. tropicalis* 72A, os quais apresentaram menor suscetibilidade em monocultura, também diminuíram a CIM quando cultivados juntos, ou com o isolado de *C. parapsilosis* RL27m (tabela 5).

Segundo Thein et al. (2009), interação de duas espécies de *Candida* pode inibir o crescimento das espécies devido à competição pelos nutrientes ou metabólitos tóxicos produzidos por uma das espécies. Já foi constatada interação antagônica entre *C. albicans* e *C. krusei* (Thein et al., 2007), e *C.*

*albicans* e *C. dubliniensis* (Kirkpatrick et al., 2000). Estudos de culturas mistas de CNA são escassos.

Entretanto, em nosso estudo, os resultados de redução de CIM das espécies na presença de *C. glabrata* não podem ser explicados por competição de nutrientes, visto que a contagem de células da cultura polimicrobiana sem a presença de própolis demonstrou que *C. glabrata* (o isolado mais sensível) foi aquela com menor grau de crescimento. A produção de um fator de inibição (metabólitos secundários) por uma espécie em resposta à perda por competição de nutrientes pode ser uma hipótese, assim como a produção de fatores de inibição por mais de uma espécie ao mesmo tempo. Porém, uma investigação mais aprofundada do metabolismo desses micro-organismos é necessária para uma melhor compreensão.

A contagem de células em uma concentração uma diluição menor que a CIM da própolis demonstrou que a maioria das combinações de policulturas, antes de sua inibição total, apresentava *C. tropicalis* em maior quantidade. Entretanto, isso pode ter ocorrido devido a sua suscetibilidade à própolis ser menor, como também devido a sua vantagem de crescimento em relação às outras espécies. Entretanto, apesar desta apresentar vantagem de crescimento, a CIM foi diminuída para todas as policulturas onde ela estava presente, fortalecendo a hipótese de que fatores de inibição possam estar envolvidos.

Este não é o único estudo que demonstra aumento de sensibilidade à própolis quando micro-organismos são cultivados juntos. Al-Waili et al. (2012) observaram que *Staphylococcus aureus* mostrou-se mais suscetível quando

cultivado junto a *Escherichia coli* e *C. albicans*, assim como *C. albicans* também mostrou aumento da suscetibilidade. Entretanto, a causa desse comportamento ainda não foi pesquisada.

Outro resultado particularmente interessante desse trabalho é que além da resistência ao FLZ em espécies de *Candida* não ter influência sobre a suscetibilidade a fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha, este produto pode, ainda, aumentar a suscetibilidade destes isolados ao FLZ (tabela 6). Os resultados encontrados no ensaio *checkerboard* desmontaram que a CIM do FLZ pode diminuir até 16 vezes quando em associação com concentrações subinibitórias desta fração de própolis (figura 3). Foi constatado o efeito sinérgico de própolis e FLZ para a maioria dos isolados (tabela 7). E, embora o efeito sinérgico não tenha sido observado em três dos 10 isolados, a análise do dano celular deixou claro que a combinação foi significativamente ( $p < 0,005$ ) mais efetiva para todos eles. Esses achados apoiam os resultados encontrados por outros autores sobre ação sinérgica de própolis com antimicrobianos (Fernandes et al., 2005; Onlen et al., 2007; Orsi et al., 2012). Já existem, também, relatos da própolis diminuir a resistência em bactérias (Mirzoeva et al., 1997; Nostro et al., 2006; Orsi et al., 2006). Estudos da associação desse produto com antifúngicos são ainda pouco abordados. Holderna & Kedzia (1987) observaram que a combinação de própolis com NAT melhora a ação em *C. albicans* e Stepanovic et al. (2003) relataram a melhora da ação nessa espécie quando própolis foi combinada com NIT. Porém, é complexo comparar os resultados de diferentes estudos, visto que variações nas composições de própolis são encontradas e isso provavelmente leva a

diferentes ações na combinação com os fármacos, além de métodos de extração que também divergem.

A associação da fração enriquecida em bezofenonas da própolis vermelha e FLZ também revelou sinergia para a cultura polimicrobiana formada de isolados resistentes ao FLZ (tabela 7). Ao contrário dos resultados apresentados para a própolis sozinha (tabela 5), a associação de própolis e FLZ mostrou ser mais efetiva para a *C. tropicalis* em policultura, observando que em apenas duas combinações esta esteve presente (tabela 8). É importante salientar que este isolado foi o menos suscetível ao FLZ sozinho e à própolis sozinha em monocultura. A competição de nutrientes novamente não se aplica aqui, visto que *C. tropicalis* foi a espécie em maior número no controle realizado sem os agentes antifúngicos. Própolis também demonstrou sinergia com mel em estudo realizado por Al-Waili et al. (2012) em culturas polimicrobianas, entretanto o efeito da associação da própolis a fármacos antifúngicos em culturas polimicrobianas não foi avaliado anteriormente. Nosso estudo também demonstrou que a associação de própolis e FLZ, ambas fungistáticas nas concentrações testadas, quando agindo juntas em culturas polimicrobianas podem ocasionar um efeito fungicida. Isso pode ocorrer devido aos diferentes alvos de ação, que quando atuando juntos possivelmente proporcionem lise celular.

Ao contrário do FLZ, a AND não mostrou efeitos sinérgicos relevantes (tabela 10). A associação da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha com AND só apresentou efeito sinérgico para um isolado de *C. glabrata*. Para todos os outros isolados, essa combinação demonstrou

aditividade ou indiferença. Ao analisarmos a inviabilidade celular através do MTT (tabela 9), verificamos que sete dos isolados apresentaram dano celular significativamente aumentado frente à associação. Segundo Baddley & Pappas (2005), três combinações de mecanismos antifúngicos podem resultar em efeitos sinérgicos: (1) uma substância com ação na membrana celular pode aumentar a penetração de substâncias com ação no DNA ou na síntese proteica - AnfB ou azóis combinados a 5FC; (2) combinação de agentes que inibam diferentes etapas na via bioquímica – TBF e azóis; (3) substância com ação na parede celular em associação com substância com ação na membrana – Equinocandinas com azóis ou AnfB.

Como já foi mencionado anteriormente, acredita-se que vários mecanismos estejam envolvidos no modo de ação da própolis frente a microorganismos (Takaisi-Kikuni & Schilcher, 1994). Entretanto, o mecanismo de ação da própolis vermelha brasileira frente a fungos ainda não foi investigado. Os resultados do ensaio do ergosterol exógeno realizados em nosso trabalho demonstraram que a fração da própolis avaliada não tem ação se complexando ao ergosterol da membrana (figura 5). É possível, como observado por outros autores (Takaisi-Kikuni & Schilcher, 1994; Mirzoeva et al., 1997), que a própolis possa interferir na membrana fúngica, porém estudos envolvendo outros mecanismos relacionados a essa estrutura são necessários para demonstrar essa ação.

O ensaio do sorbitol demonstrou que a fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira tem forte ação na parede celular. A AND inibe a formação de  $\beta$ -1,3-D-glucana, componente essencial da parede

(Flevari et al., 2013). O efeito aditivo ou indiferente encontrado para a associação da fração da própolis estudada e AND (tabela 10) pode ser explicado pela semelhança no modo de ação desses agentes antifúngicos sobre as espécies de *Candida*, levando a soma das atividades ou não interferência. Porém testes adicionais, como análise e quantificação dos componentes da parede celular, devem ser realizados para reforçar essa teoria.

Além disso, essa ação relevante na parede celular pode facilitar a penetração de FLZ na célula, elevando sua concentração intracelular e permitindo maior resposta ao FLZ. Mesmo se bombas de efluxo estivessem superexpressas (principal mecanismo de resistência relacionado a *Candida* sp.), a relação entrada/saída do FLZ aumentaria na presença de própolis, aumentando também a probabilidade do FLZ ligar-se a sua enzima alvo. Ressalta-se que a própolis é uma mistura complexa formada por diversas substâncias, e a possibilidade de alguma delas ligar-se ao FLZ havendo formação de uma nova molécula com maiores propriedades antifúngicas não é descartada. Somado a isso, é possível que melhores resultados sejam demonstrados *in vivo*, visto que já foi constatado que própolis possui propriedade anti-inflamatória e imunomoduladora (Sforcin & Bankova, 2011), e estas podem vir a contribuir na resposta terapêutica do indivíduo.

Cabe destacar que estas explicações são apenas suposições, pois os mecanismos de resistência ao FLZ dos isolados aqui testados ainda não foram elucidados, bem como todos os possíveis mecanismos de ação da própolis também não foram avaliados. Portanto, estudos mais aprofundados

devem ser conduzidos para melhor entender os mecanismos envolvidos nessa associação.

Sobre o ensaio de viabilidade celular realizado (figura 6), é altamente relevante notar que as duas concentrações mais altas da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha, as quais apresentaram leucócitos inviáveis, são aproximadamente de 15 a 128 vezes (dependendo do isolado) maiores que as CIMs. Pode-se observar que mesmo concentrações 8 a 31 vezes mais elevadas (125 µg/mL) que as CIMs não demonstraram toxicidade celular *in vitro*. Está bem documentado na literatura que mutações genéticas podem agir por diferentes etapas no processo de carcinogênese e alguns testes, como o teste cometa, identificam agentes genotóxicos e substâncias com potenciais riscos para a saúde humana (De Flora et al., 1996; Ross & Margolis, 2005). Os resultados encontrados nesse estudo sugerem que a própolis vermelha brasileira não causa lesão significativa ao aparelho celular genético humano em nenhuma das concentrações testadas.

Enfim, os resultados expostos no presente trabalho foram estimulantes, uma vez que *Candida* spp. podem ser resistentes a diversos agentes antifúngicos, e a fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira demonstrou ser estável frente a mecanismos de resistência desenvolvidos por ela. Embora estudos clínicos controlados sejam necessários para definir a real eficácia, a própolis ou a associação desta com FLZ pode constituir uma alternativa para o tratamento desses patógenos resistentes.

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível inferir que:

✓ A fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira não diminuiu sua atividade frente a espécies de *Candida* após repetidas exposições a esse agente antifúngico, não provocando o desenvolvimento de resistência *in vitro*. Ao contrário, o antifúngico mais amplamente utilizado - FLZ, foi capaz de induzir a resistência na maioria dos isolados e isso pode estar relacionado a alta frequência de isolados resistentes a esse fármaco encontrados na clínica médica.

✓ A resistência adquirida ao FLZ não foi correlacionada à ativação das bombas de efluxo ABC, sugerindo que os genes CDR1 e CDR2 não estão superexpressos nesses isolados; e que outros mecanismos de resistência, como ativação de bombas de efluxo da família MFS ou mutações em genes relacionados à biossíntese do ergosterol possam estar envolvidos;

✓ Resistência adquirida mostrou-se estável para a espécie de *C. parapsilosis* e a maioria dos isolados de *C. glabrata* perderam seu fenótipo de resistência depois de subcultivo em meio livre de FLZ, demonstrando que diferentes mecanismos de resistência podem estar envolvidos nas duas espécies;

✓ A diminuição de suscetibilidade dos isolados expostos ao FLZ foi verificada ao ITZ, MCZ e CTZ, e a resistência cruzada ao ITZ foi evidenciada em alguns isolados;

✓ A fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira mostrou-se ativa para os isolados resistentes ao FLZ, sem mudança na CIM, e sugere possivelmente uma maior margem de segurança quanto à ameaça de resistência cruzada entre esses dois agentes antifúngicos;

✓ A cultura polimicrobiana formada de espécies de *Candida* resistentes ao FLZ mostrou-se sensível à fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira, demonstrando a possibilidade da própolis ser capaz de combater diferentes estratégias de adaptação criadas por esses micro-organismos;

✓ A combinação da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira com FLZ demonstrou efeitos sinérgicos para a maioria dos isolados e para a cultura polimicrobiana formada de espécies de *Candida* resistentes ao FLZ. Entretanto, a combinação desta fração com AND demonstrou efeitos aditivos ou indiferentes para a maioria dos isolados. Esse estudo possibilita determinar o potencial uso medicinal da própolis em combinação com FLZ no combate a espécies de *Candida* e, uma vez que é comum isolados desse gênero apresentarem resistência, o sinergismo relatado aqui é de relevância e pode constituir uma alternativa para o tratamento das infecções ocasionadas por esses patógenos;

✓ A fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira não apresentou aumento da CIM quando ergosterol foi adicionado ao meio de cultura, propondo que esta não tem capacidade de se ligar ao ergosterol; e, quando o protetor osmótico sorbitol foi adicionado ao meio, a CIM

aumentou, indicando um mecanismo de ação na parede celular de espécies de *Candida*;

✓ A fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira não demonstrou ser uma substância capaz de causar dano ao DNA de células humanas e estas tornaram-se inviáveis apenas em concentrações muito superiores as concentrações com atividade antifúngica, demonstrando ser, provavelmente, um produto com ampla margem de segurança.

## 7 PERSPECTIVAS

O aumento de imunocomprometidos e de doentes em estado crítico tem conduzido ao elevado número de infecções fúngicas invasivas, crescendo também o interesse científico em novos agentes antifúngicos ou substâncias que possam ser úteis como adjuvantes no tratamento dessas infecções. O interesse por produtos naturais com efeito antifúngico e espectro de ação contra cepas resistentes tem sido alvo de buscas por parte de muitos pesquisadores. No presente trabalho, que precedeu o estudo pré-clínico, a fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira mostrou-se promissora para ser utilizada associada ao FLZ ou isoladamente. Portanto, formulações farmacêuticas associadas a fármacos antifúngicos padrões, a partir do presente trabalho, se tornaram um novo desafio.

Além disso, diante dos resultados obtidos, uma série de outros estudos podem ser guiados:

- ✓ Avaliação da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira em associação com os principais agentes das outras diferentes classes de antifúngicos, incluindo TBF, AnfB e 5FC, os quais são fármacos utilizados para o tratamento de infecções ocasionadas por espécies de *Candida* e que possuem relatos relacionados à resistência;

- ✓ Caracterização do mecanismo de ação da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira com identificação de seu alvo de ação na parede celular; além disso, investigar outros possíveis mecanismos que possam estar envolvidos concomitantemente através de testes que avaliam enzimas específicas, assim como testes que incluam dano da síntese

proteica e DNA, e também uso de ferramentas de microscopia para visualização do dano ocasionado pela fração.

✓ Verificar se a associação da fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira e FLZ também é capaz de demonstrar resultados satisfatórios em testes *in vivo*;

✓ Avaliação das alterações no genoma das células expostas ao FLZ para possível identificação dos mecanismos de resistência, bem como avaliar possível repressão gênica ocasionada pelo tratamento com a fração enriquecida em benzofenonas da própolis vermelha brasileira sobre estas células;

✓ Investigar o metabolismo das diferentes espécies de *Candida* quando elas são cultivadas juntas para verificar se realmente há a produção de fatores de inibição por alguma(s) espécie(s) e a influência desses fatores associados ao tratamento com a fração enriquecida em benzofenonas de própolis vermelha brasileira;

✓ O estudo de outras espécies de *Candida não-albicans* também pode ser bastante importante, uma vez que o uso generalizado de terapias antifúngicas no combate às infecções provocadas por fungos tem levado ao aparecimento de novas espécies atuando como patógenos e aumentando a resistência aos antifúngicos utilizados na clínica médica;

✓ Por fim, avaliar o efeito da exposição à concentrações subinibitórias dessa fração em outros fatores de virulência de espécies de *Candida*, como a produção de enzimas hidrolíticas, adesão às células epiteliais, imunomodulação e interação com macrófagos;

## 8 REFERÊNCIAS

AGUERO, M.; GONZALEZ, M.; LIMA, B.; SVETAZ L.; SANCHEZ M.; ZACCHINO S.; et al. Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) exudates: phytochemical characterization and Antifungal Activity. **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 194-201, 2010.

AHMAD, S.; KHAN, Z.; MUSTAFA, A.S.; KHAN, Z.U. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 2483-2489, 2002.

AJENJO, M.C.; ANDRES, A.S.; ANA, M.G.D.; HELENA, P.M.; MARIO, C.A.; CLAUDIA, C.V.; et al. Epidemiological profile of invasive candidiasis in intensive care units at a university hospital. **Rev Chil Infectol**, v. 28, p. 118-122, 2011.

ALANIS, A.J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Arch Med Res**, v.36, p. 697-705, 2005.

ALMIRANTE, B.; RODRIGUEZ, D.; PARK, B.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A.; ALMELA, M.; et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 1829-1835, 2005.

ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; et al. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **J Clin Microbiol**, v. 44, p. 1681-1685, 2006.

ALVES, I.; BANDEIRA, L.; MARIO, D.; DENARDI, L.; NEVES, L.; SANTURIO, J.; et al. Effects of antifungal agents alone and in combination against *Candida glabrata* strains susceptible or resistant to fluconazole. **Mycopathologia**, v. 174, p. 215-22, 2012.

AL-WAILI, N.; AL-GHAMDI, A.; ANSARI, M.J.; AL-ATTAL, Y.; SALOM, K. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. **Int J Med Sci**, v. 9, p. 793-800, 2012.

ANDES, D.; FORREST, A.; LEPAK, A.; NETT, J.; MARCHILLO, K.; LINCOLN, L. Impact of antimicrobial dosing regimen on evolution of drug resistance in

vivo: fluconazole and *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 2374-2383, 2006.

ANDRIOLE, V. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. **Int J Antimicrob Agents**, v. 16, p. 317-321, 2000.

AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorg Med Chem**, v. 16, p. 181-189, 2008.

BADDLEY, J.W.; SMITH, A.M.; MOSER, S.A.; PAPPAS, P.G.; Trends in frequency and susceptibilities of *Candida glabrata* bloodstream isolates at a university hospital. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 39, p. 199-201, 2001.

BADDLEY, J.W. & PAPPAS, P.G. Antifungal combination therapy - Clinical potential. **Drugs**, v. 65, p. 1461-1480, 2005.

BALKIS, M.; LEIDICH, S.; MUKHERJEE, P.; GHANNOUM, M. Mechanisms of fungal resistance - An overview. **Drugs**, v.62, p.1025-1040, 2002.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **J Ethnopharmacol**, v. 100, p. 114-117, 2005.

BARBER, M.; ROZWADOWSKA-DOWZENKO, M.; ROZWADOWSKA-DOWZENKO, M. Infection by *penicillin*-resistant *staphylococci*. **Lancet**, v. 2, p. 641-644, 1948.

BARCHIESI, F.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D.; DI FRANCESCO, L.F.; CASELLI, F.; GIANNINI, D.; et al. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, p. 1578-1584, 2000.

BARROS, F.; PIPPI, B.; DRESCH, R.; DAUBER, B.; LUCIANO, S.; APEL, M.; et al. Antifungal and antichemotactic activities and quantification of phenolic compounds in lipophilic extracts of *Hypericum* spp. native to South Brazil. **Ind Crops Prod**, v. 44, p. 294-299, 2013.

BECK-SAGUÉ, C. & JARVIS, W.R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. **J Infect Dis**, v. 167, p. 1247-1251, 1993.

BLISS, J.M.; WONG, A.Y.; BHAK, G.; LAFORCE-NESBITT, S.S.; TAYLOR, S.; TAN, S.; et al. *Candida* virulence properties and adverse clinical outcomes in neonatal candidiasis. **J Pediat**, v. 161, p. 441-442, 2012.

BOKTOUR, M.R.; KONTOYIANNIS, D.P.; HANNA, H.A.; HACHEM, R.Y.; GIRGAWY, E.; BODEY, G.P.; et al. Multiple-species candidemia in patients with cancer. **Cancer**, v. 101, p. 1860-1865, 2004.

BONASSOLI, L.A.; BERTOLI, M. & SVIDZINSKI, T.I. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **J Hosp Infect**, v. 59, p. 159-162, 2005.

BORST, A.; RAIMER, M.T.; WARNOCK, D.W.; MORRISON, C.J.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A. Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 783-787, 2005.

BREMENKAMP, R.M.; CARIS, A.R.; JORGE, A.O.; BACK-BRITO, G.N.; MOTA, A.J.; BALDUCCI, I. et al. Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. **Arch Oral Biol**, v. 56, p. 549-555, 2011.

BRITO, L.R.; GUIMARÃES, T.; NUCCI, M.; ROSAS, R.C.; ALMEIDA, P.L.; DA MATTA, D.A. et al. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Med Mycol**, v. 44, p. 261-266, 2006.

BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S.; KOO, H.; IKEGAKI, M.; SILVA, G.; NAPIMOGA, M. et al. Anti-Inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol Isolated from Brazilian red propolis. **J Agric Food Chem**, v. 61, p. 4546-50, 2013.

BUFALO, M.; FIGUEIREDO, A.; DE SOUSA, J.; CANDEIAS, J.; BASTOS, J.; SFORCIN, J. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. **J Appl Microbiol**, v. 107, p. 1669-1680, 2009.

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

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; DE ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quím Nova**; v. 32, p. 1523-1527, 2009.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P.A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Rev Esp Quimioter**, v. 19, p. 130-139, 2006.

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

CHAMILOS, G. & KONTOYIANNIS, D.P. The rationale of combination antifungal therapy in severely immunocompromised patients: empiricism versus evidence-based medicine. **Curr Opin Infect Dis**, v. 19, p. 380-385, 2006.

CHAPELAND-LECLERC, F.; HENNEQUIN, C.; PAPON, N.; NOEL, T.; GIRARD, A.; SOCIE, G. et al. Acquisition of flucytosine, azole, and caspofungin resistance in *Candida glabrata* bloodstream isolates serially obtained from a hematopoietic stem cell transplant recipient. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, p. 1360-1362, 2010.

CHAPMAN, S. W.; SULLIVAN, D. C.; CLEARY, J. D. In search of the holy grail of antifungal therapy. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, v. 119, p. 197-216, 2008.

CHAU, A.S.; MENDRICK, C.A.; SABATELLI, F.J.; LOEBENBERG, D.; MCNICHOLAS, P.M. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, p. 2124-2131, 2004.

CHIOU, C.C.; MAVROGIORGOS, N.; TILLEM, E.; HECTOR, R.; WALSH, T.J. Synergy, pharmacodynamics, and time-sequenced ultrastructural changes of the interaction between nikkomycin Z and the echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 3310-3321, 2001.

CLARK, T.A. & HAJJEH R.A. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. **Curr Opin Infect Dis**, v. 15, p. 569-574, 2002.

CLARK, T.A.; SLAVINSKI, S.A.; MORGAN, J.; LOTT, T.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; BRANDT, M.E. et al. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 4468-4472, 2004.

CLERIHEW, L.; LAMAGNI, T.L.; BROCKLEHURST, P.; MCGUIRE, W. *Candida parapsilosis* infection in very low birthweight infants. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v. 92, p. F127-F129, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI Document M27-A3. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI Document M27-S4. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2012.

COLOMBO, A.; PERFECT, J.; DINUBILE, M.; BARTIZAL, K.; MOTYL, M.; HICKS, P. et al. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: Results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 22, p. 470-474, 2003.

COLOMBO, A.; NUCCI, M.; PARK, B.; NOUER, S.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D.; et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical Centers. **J Clin Microbiol**, v. 44, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A.; GARNICA, M.; CAMARGO, L.; DA CUNHA, C.; BANDEIRA, A.; BORGHI, D. et al. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. **Med Mycol**, v. 51, p. 38-44, 2013.

CUESTA-RUBIO, O.; FRONTANA-URIBE, B.A.; RAMIREZ-APAN, T.; CARDENAS, J. Polyisoprenylated benzophenones in cuban propolis: biological activity of nemorosone. **Z Naturforsch**, v. 57, p. 372-378, 2002.

CUESTA-RUBIO, O.; PICCINELLI, A.L.; FERNANDEZ, M.C.; HERNÁNDEZ, I.M.; ROSADO A.; RASTRELLI L. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. **J Agric Food Chem**, v. 55, p. 7502-7509, 2007.

CUNHA, I.B.S.; SAWAYA, A.; CAETANO, F.M.; SHIMIZU, M.T.; MARCUCCI, M.C.; DREZZA, F.T.; et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **J Braz Chem Soc**, v. 15, p. 964-970, 2004.

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**, v. 16, p. 285-290, 2010.

DANIELLI, L.J.; DOS REIS, M.; BIANCHINI, M.; CAMARGO, G.S.; BORDIGNON, S.A.L.; GUERREIRO, I.K.; et al. Antidermatophytic activity of volatile oil and nanoemulsion of *Stenachaenium megapotamicum* (Spreng.) Baker. **Ind Crops Prod**, v. 50, p. 23-28, 2013.

DANTAS, A.P.; OLIVIERI, B.P.; GOMES, F.H.M.; DE CASTRO, S.L. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infected mice with propolis promotes changes in the immune response. **J Ethnopharmacol**, v. 103, p. 187-93, 2006.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.; FORT, P.; PARK, Y. Brazilian red propolis chemical composition and botanical origin. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 5, p. 435-441, 2008.

DE ALMEIDA E.,; CARDOSO, J.; DE LIMA, A.; DE OLIVEIRA, N.; DE PONTES, N.; LIMA, S. et al. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. **J Ethnopharmacol**, v. 147, p. 419-25, 2013.

DE BARROS, M.; SOUSA, J.; BASTOS, J.; DE ANDRADE, S. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 110, p. 567-571, 2007.

DE CASTRO, P.A.; BOM, V.L.P.; BROWN, N.A.; ALMEIDA, R.S.C.D.; RAMALHO, L.N.Z.; SAVOLDI, M. et al. Identification of the cell targets important for propolis induced cell death in *Candida albicans*. **Fungal Genet and Biol**, v. 60, p. 74-86, 2013.

DE CASTRO, S.L. & HIGASHI, K.O. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosome cruzi*. **J Ethnopharmacol**, v. 46, p. 55-58, 1995.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; RANDEATH, K.; RANDEATH, E.; BARTSCH, H.; NAIR J.; et al. DNA adducts and chronic degenerative disease. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. **Mutat Res**, v. 366, p. 197-238, 1996.

DENNING, D.W.; HANSON, L.H.; PERLMAN, A.M.; STEVENS, D.A. In vitro susceptibility and synergy studies of *Aspergillus* species to conventional and new agents. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 15, p. 21-34, 1992.

DENNING, D. & HOPE, W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends Microbiol**, v. 18, p. 195-204, 2010.

DOBROWOLSKI, J.; VOHORA, S.; SHARMA, K.; SHAH, S.; NAQVI, S.; DANDIYA, P. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **J Ethnopharmacol**, v. 35, p. 77-82, 1991.

ENGER, L.; JOLY, S.; PUJOL, C.; SIMONSON, P.; PFALLER, M.; SOLL, D.R. Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. **J Clin Microbiol**, v. 39, p. 658-669, 2001.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PEREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **J Nat Prod**, v. 71, p. 1720-1725, 2008.

FASOLO, D.; PIPPI, B.; HOLZSCHUH M.H.; FUENTEFRIA, A.; TEIXEIRA, H.; VON POSER, G.; Bioassay-guided fractionation and antifungal activity from three Brazilian propolis linked by UPLC/MS identification of lipophilic components from red type. **Ind Crops Prod**, 2014, Submetido.

FEKETE-FORGACS, K.; GYURE, L. & LENKEY, B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 43, p. 273-279, 2000.

FERNANDES, A.; BALESTRIN, E.; ELAINE, J.; BETONI, C.; ORSI, R.; DA CUNHA, M.; et al. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. **Mem Instit Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 563-566, 2005.

FERNANDES, F.F.; DIAS, A.L.T.; 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*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 49, p. 93-95, 2007.

FISCHER, G.; CONCEICAO, F.R.; LEITE, F.P.L.; DUMMER, L.A.; VARGAS, G.D.; HUBNER, S.D. et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV- 1. **Vaccine**, v. 25, p. 1250-1266, 2007.

FLEVARI, A.; THEODORAKOPOULOU, M.; VELEGRAKI, A.; ARMAGANIDIS, A.; DIMOPOULOS G. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. **Clin Interv Aging**, v. 8, p. 1199-1208, 2013.

FRANCHI, G.C.; MORAES, C.S.; TORETI, V.C.; DAUGSCH, A.; NOWILL, A.E.; PARK, Y.K. Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p.1-6, 2012.

FREITAS, S.; SHINOHARA, L.; SFORCIN, J.; GUIMARAES, S. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine**, v. 13, p. 170-175, 2006.

FRIDKIN, S.K.; KAUFMAN, D.; EDWARDS, J.R.; SHETTY, S.; HORAN, T. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995-2004. **Pediatrics**, v. 117, p. 1680-1687, 2006.

FROST, D.J.; BRANDT, K.D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **J Antibiot**, v. 48, p. 306-310, 1995.

FROZZA, C.; GARCIA, C.; GAMBATO, G.; DE SOUZA, M.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food Chem Toxicol**, v. 52, p. 137-142, 2013.

FULIANG, H.U.; HEPBURN, H.R.; XUAN, H.X.; CHEN, M.L.; DAYA, S.; RADLOFF, S.E. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. **Pharmacol Res**, v. 51, p. 147-152, 2005.

GEKKER, G.; HU, S.X.; SPIVAK, M.; LOKENSGARD, J.R.; PETERSON, P.K. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. **J Ethnopharmacol**, v. 102, n. 2, p.158-63, 2005.

GERTSCH, J.; TOBLER, R.T.; BRUN, R.; STICHER, O.; HEILMANN, J. Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal properties of justicidin B and a new aryinaphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. **Planta Med**, v.69, p. 420-424, 2003.

GHANNOUM, M.A.; HERBERT, J. & ISHAM, N. Repeated exposure of *Candida* spp. to miconazole demonstrates no development of resistance. **Mycoses**, v.54, p.E175-E7, 2011.

GHISALBERTI, E. Propolis - Review. **Bee World**, v. 60, p. 59-84, 1979.

GREGORY, S.; PICCOLO, N.; PICCOLO, M.; PICCOLO, M.; HEGGERS, J. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. **J Altern Complement Med**, v. 8, p. 77-83, 2002.

GUARRO, J.; GENÉ, J. & STCHIGEL, A.M. Developments in fungal taxonomy. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, p. 454-500, 1999.

GUERRA-ROMERO, L.; TELENTI, A.; THOMPSON, R.L.; ROBERTS, G.D. Polymicrobial fungemia: microbiology, clinical features, and significance. **Rev Infect Dis**, v. 11, p. 208-212, 1989.

GÜEZ, C.M.; WACZUK, E.P.; PEREIRA, K.B.; QUEROL, M.V.M.; DA ROCHA, J.B.T.; DE OLIVEIRA, L.F.S. *In vivo* and *in vitro* genotoxicity studies of aqueous extract of *Xanthium spinosum*. **Braz J Pharm Sci**, v. 48, p. 461-467, 2012.

GULLO, A. Invasive fungal infections the challenge continues. **Drugs**, v. 69, p. 65-73, 2009.

GULSHAN, K. & MOYE-ROWLEY, WS. Multidrug resistance in fungi. **Eukaryotic Cell**, v. 6, p. 1933-1942, 2007.

GUMBO, T.; ISADA, C.M.; HALL, G.; KARAFI, M.T.; GORDON, S.M. *Candida glabrata* fungemia. Clinical features of 139 patients. **Medicine**, Baltimore, v. 78, p. 220-227, 1999.

HAYACIBARA, M.F.; KOO, H.; ROSALEN, P.L.; DUARTE, S.; FRANCO, E.M.; BOWEN, W.H.; et al. *In vitro* and *in vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **J Ethnopharmacol**, v. 101, p. 110-115, 2005.

HENRY, K.; NICKELS, J. & EDLIND, T. Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, p. 2693-2700, 2000.

HOLDERNA, E. & KEDZIA, B. Investigations upon the combined action of propolis and antimycotic drugs on *Candida albicans*. **Herba Polonica**, v. 33, p. 145-151, 1987.

HU, F.L.; HEPBURN, H.R.; LI, Y.H.; CHEN, M.; RADLOFF, S.E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **J Ethnopharmacol**, v. 100, p. 276-283, 2005.

HUANG, M. & KAO, K.C. Population dynamics and the evolution of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 333, p. 85-93, 2012.

ISHAM, N. & GHANNOUM, M.A. Antifungal activity of miconazole against recent *Candida* strains. **Mycoses**, v. 53, n. 5, p. 434-7, 2010.

ISHIDA, K.; DE MELLO, J.C.P.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS, B.P.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **J Antimicrob Chemother**, v. 58, p. 942-949, 2006.

JENSEN, J.; MUNOZ, P.; GUINEA, J.; RODRIGUEZ-CREIXEMS, M.; PELAEZ, T.; BOUZA, E. Mixed fungemia: incidence, risk factors, and mortality in a general hospital. **Clin Infect Dis**, v. 44, p. E109-E114, 2007.

JOHNSON, M., MACDOUGALL, C., OSTROSKY-ZEICHNER, L., PERFECT, J., REX, J. Combination antifungal therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, p. 693-715, 2004.

JOHNSON, E.M. Rare and emerging *Candida* species. **Epidemiology and Clinical Lab Issues**, v. 3, p. 152-159, 2009.

KALI, A.; CHARLES, M.P.; NOYAL, M.J.; SIVARAMAN, U.; KUMAR, S.; EASOW, J.M. Prevalence of *Candida* co-infection in patients with pulmonary tuberculosis. **Australas Med J**, v. 6, p. 387-391, 2013.

KANAFANI, Z.A. & PERFECT, J.R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clin Infect Dis**, v. 46, p. 120-128, 2008.

KATHIRAVAN, M.K.; SALAKE, A.B.; CHOTHE, A.S.; DUDHE, P.B.; WATODE, R.P.; MUKTA, M.S. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorg Med Chem**, v. 20, p. 5678–5698, 2012.

KHAN, M.S. & AHMAD, I. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 90, p. 1083-1094, 2011.

KHAYYAL, M.T.; EL-GHAZALY, M.A.; EL-KHATIB, A.S.; HATEM, A.M.; DE VRIES, P.J.F.; EL-SHAFEI, S.; et al. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 17, p. 93-102, 2003.

KIRKPATRICK, W.R.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; MCATEE, R.K.; PATTERSON, T.F. Growth competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under broth and biofilm growing conditions. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 902-904, 2000.

KOMSHIAN, S.V.; UWAYDAH, A.K.; SOBEL, J.D.; CRANE, L.R. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. **Rev Infect Dis**, v. 11, p. 379-390, 1989.

KRCMERY, V. & BARNES, A.J. Non- *albicans Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **J Hosp Infect**, v. 50, p. 243-260, 2002.

KUHN, D.M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infect Immun**, v. 70, p. 878-888, 2002.

KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; CLARK, T.A.; PUJOL, C.; CHANDRA, J.; HAJJEH, R.A. et al. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. **Emerg Infect Dis**, v. 10, p. 1074-81, 2004.

KUJUMGIEV, A.; BANKOVA, V.; IGNATOVA, A.; POPOV, S. Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. **Pharmazie**, v. 48, p. 785-786, 1993.

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

LAFHEY, S.F. & BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. **Microbiology**, v. 151, p. 1073-1081, 2005.

LELEU, G.; AEGERTER, P. & GUIDET, B. Systemic candidiasis in intensive care units: a multicenter, matched-cohort study. **J Crit Care**, v. 17, p. 168-175, 2002.

LEVIN, A.S.; COSTA, S.F.; MUSSI, N.S.; BASSO, M.; SINTO, S.I.; MACHADO, C. et al. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 30, p. 243-249, 1998.

LEVY, S.B. & MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nat Med**, v. 10, p. S122-S129, 2004.

LEWIS, R.E.; DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; PFALLER, M.A.; KLEPNER, M.E. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **J Antimicrob Chemother**, v. 49, p. 345-351, 2002.

LERNER-MARMAROSH, N.; GIMI, K.; URBATSCH, I. L.; GROS, P.; SENIOR, A. E. Large scale purification of detergent-soluble P-glycoprotein from *Pichia pastoris* cells and characterization of nucleotide binding properties of wild-type, Walker A, and Walker B mutant proteins. **J Biol Chem**, v. 274, p. 34711-34718, 1999.

LI, F.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure- activity relationship. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5434-5440, 2008.

LIBÉRIO, S.A.; PEREIRA, A.L.A.; ARAÚJO, M.J.A.M.; DUTRA, R.P.; NASCIMENTO, F.R.F.; MONTEIRO-NETO, V.; et al. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group *streptococci*. **J Ethnopharmacol**, v. 125, p. 1-9, 2009.

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. **Rev bras Farmacogn**, v. 17, p. 388-395, 2007.

LOTFY, M. Biological activity of bee propolis in health and disease. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 7, p. 22-31, 2006.

LOTT, T.J.; KUYKENDALL, R.J.; WELBEL, S.F.; PRAMANIK, A.; LASKER, B.A. Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. **Curr Genet**, v. 23, p. 463-467, 1993.

LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; ROLIM NETO, P.J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev bras Farmacogn**, v. 18, p. 447-454, 2008.

MAGILL, S.S.; SHIELDS, C.; SEARS, C.L.; CHOTI, M.; MERZ, W.G. Triazole cross-resistance among *Candida* spp.: case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. **J Clin Microbiol**, v. 44, p. 529-535, 2006.

MALANI, A.; HMOUD, J.; CHIU, L.; CARVER, P.L.; BIELACZYK, A.; KAUFFMAN, C.A. *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. **Clin Infect Dis**, v. 41, p. 975-981, 2005.

MARR, K.A.; LYONS, C.N.; RUSTAD, T.R.; BOWDEN, R.A.; WHITE, T.C. Rapid, transient fluconazole resistance in *Candida albicans* is associated with increased mRNA levels of CDR. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, p. 2584-2589, 1998.

MARR, K.A.; LYONS, C.N.; HA, K.; RUSTAD, T.R.; WHITE, T.C. Inducible azole resistance associated with a heterogeneous phenotype in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 52-59, 2001.

MATSUSHIGE, K.; BASNET, P.; HASE, K.; KADOTA, S.; TANAKA, K.; NAMBA, T. Propolis protects pancreatic beta-cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). **Phytomedicine**, v. 3, p. 203-209, 1996.

MEDRANO, D.J.A.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.D.A.; ROCHA, M.F.G.; RABENHORST, S.H.B.; SIDRIM, J.J.C. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 48, p. 17-20, 2006.

MENNA-BARRETO, R.F.; SALOMÃO, K.; DANTAS, A.P.; SANTA-RITA, R.M.; SOARES, M.J.; BARBOSA, H.S.; et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron**, v. 40, p. 157-168, 2009.

MICELI, M.; DIAZ, J. & LEE, S. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infect Dis**, v. 11, p. 142-151, 2011.

MIRANDA-ZAPICO, I.; ERASO, E.; HERNÁNDEZ-ALMARAZ, J.L.; LÓPEZ-SORIA, L.M.; CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; HERNÁNDEZ-MOLINA, J.M.; et al. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, p. 2315-2322, 2011.

MIRZOEVA, O.; GRISHANIN, R. & CALDER, P. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiol Res**, v. 152, p. 239-246, 1997.

MORAN, C.; GRUSSEMEYER, C.A.; SPALDING, J.R.; BENJAMIN, D.K.; REED, S.D. *Candida albicans* and non-*albicans* bloodstream infections in adult and pediatric patients: comparison of mortality and costs. **Pediatr Infect Dis J**, v. 28, p. 433-435, 2009.

MOUDGAL, V.; LITTLE, T.; BOIKOV, D.; VAZQUEZ, J.A. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 767-469, 2005.

MUKHERJEE, P.; SHEEHAN, D.; HITCHCOCK, C.; GHANNOUM, M.; Combination treatment of invasive fungal infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, p. 163-194, 2005.

MURAD, J.M.; CALVI, S.A.; SOARES, A.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Ethnopharmacol**, v. 79, p. 331-334, 2002.

NACE, H.L.; HORN, D. & NEOFYTOS, D. Epidemiology and outcome of multiple- species candidemia at a tertiary care center between 2004 and 2007. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 64, p. 289-294, 2009.

NAKAMURA, T. & TAKAHASHI, H. Epidemiological study of *Candida* infections in blood: susceptibilities of *Candida* spp. to antifungal agents and clinical features associated with the candidemia. **J Infect Chemother**, v. 12, p. 132-138, 2006.

NOSTRO, A.; CELLINI, L.; DI BARTOLOMEO, S.; CANNATELLI, M.A.; DI CAMPLI, E.; PROCOPIO, F. et al. Effects of combining extracts (from propolis or *Zingiber officinale*) with clarithromycin on *Helicobacter pylori*. **Phytother Res**, v. 20, p. 187-190, 2006.

NUCCI, M.; SILVEIRA, M.; SPECTOR, N.; SILVEIRA, F.; VELASCO, E.; MARTINS, C.; et al. Fungemia in cancer patients in Brazil: Predominance of non-*albicans* species. **Mycopathologia**, v. 141, p. 65-68, 1998.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBON, A.; RESTREPO, A.; COLOMBO A. Epidemiology of opportunistic fungal infections in latin america. **Clin Infect Dis**, v. 51, p. 561-570, 2010.

OKSUZ, H.; DURAN, N.; TAMER, C; CETIN, M.; SILICI, S. Effect of propolis in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* keratitis in rabbits. **Ophthalmic Res**; v. 37, p. 328-334, 2005.

OLIVEIRA, A.; SHINOBU, C.; LONGHINI, R.; FRANCO, S.; SVIDZINSKI, T. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 493-7, 2006.

ONLEN, Y.; TAMER, C.; OKSUZ, H.; DURAN, N.; ALTUG, M.; YAKAN, S. Comparative trial of different anti-bacterial combinations with propolis and ciprofloxacin on *Pseudomonas* keratitis in rabbits. **Microbiol Res**, v. 162, p. 62-8, 2007.

ORSATTI, C.L.; MISSIMA, F.; PAGLIARONE, A.C.; BACHIEGA, T.F.; BUFALO, M.C.; ARAUJO, J.P.; et al. Propolis immunomodulatory action *in vivo* on toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. **Phytother Res**, v. 24, p. 1141-1146, 2010.

ORSI, R.; SFORCIN, J.; FUNARI, S.; FERNANDES, A.; BANKOVA, V. Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella typhi*. **Braz J Microbiol**, v. 37, p. 108-112, 2006.

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**, v. 26, p. 430-437, 2012.

ORSOLIC, N.; KNEZEVIC, A.; SVER, L.; TERZIC, S.; BASIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **J Ethnopharmacol**, v. 94, p. 307-315, 2004.

ORTEGA, M.; MARCO, F.; SORIANO, A.; ALMELA, M.; MARTÍNEZ, J.A.; LÓPEZ, J. et al. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. **J Hosp Infect**, v. 77, p. 157-61, 2011.

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

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

PASQUALOTTO, A.C.; ZIMERMAN, R.A.; ALVES, S.H.; AQUINO, V.R, BRANCO, D.; WILTGEN, D.; et al. Take control over your fluconazole prescriptions: the growing importance of *Candida glabrata* as an agent of candidemia in Brazil. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 29, p. 898-899, 2008.

PAULINO, N.; TEIXEIRA, C.; MARTINS, R.; SCREMIN, A.; DIRSCH, V.; VOLLMAR, A.; et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. **Planta Med**, v. 72, p. 899-906, 2006.

PELZ, R.K.; LIPSETT, P.A.; SWOBODA, S.M.; DIENER-WEST, M., POWE, N.R., BROWER, R.G.; et al. *Candida* infections: Outcome and attributable ICU costs in critically ill patients. **J Intensive Care Med**, v. 15, p. 255-261, 2000.

PEMAN, J.; CANTON, E. & ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 7, p. 453-60, 2009.

PEREIRA, A.D.S.; SEIXAS, F.R.M.S. & DE AQUINO NETO, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quím Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

PEREIRA, G.; MULLER, P.; SZESZS, M.; LEVIN, A.; MELHEM, M. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Med Mycol**, v. 48, p. 839-842, 2010.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; JONES, R.N.; SADER, H.S.; FLUIT, A.C.; HOLLIS, R.J.; et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. **J Clin Microbiol**, v. 39, p. 3254-3259, 2001.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 3142-3146, 2004a.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; RICE, C.; TENDOLKAR, S. et al. *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 48, p. 201-205, 2004b.

PFALLER, M.A. & DIEKEMA D.J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 4419-4431, 2004c.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. & GROUP, I.F.S.P. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. **Clin Microbiol Infect**, v. 10, p. 11-23, 2004d.

PFALLER, M.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; MESSER, S.A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D.J. *In vitro* susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 3807-3810, 2005a.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; RINALDI, M.G.; BARNES, R.; HU, B.; VESELOV, A.V. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 5848-59, 2005b.

PFALLER, M. & DIEKEMA, D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, p. 133-166, 2007a.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; PROCOP, G.W.; RINALDI, M.G. Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. **J Clin Microbiol**, v. 45, p. 3522-3528, 2007b.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; NG, K.P.; COLOMBO, A. et al. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **J Clin Microbiol**, v. 46, p. 842-849, 2008a.

PFALLER, M.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; KROEGER, J.; MESSER, S.A.; TENDOLKAR, S. et al. *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp.

to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. **J Clin Microbiol**, v. 46, p. 150-156, 2008b.

PFALLER, M.A. & DIEKEMA D.J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Crit Rev Microbiol**, v. 36, p. 1-53, 2010a.

PFALLER, M.A.; ANDES, D.; DIEKEMA, D.J.; ESPINEL-INGROFF, A.; SHEEHAN, D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. **Drug Resist Updat**, v. 13, p. 180-195, 2010b.

PFALLER, M. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **Am J Med**, v. 125, p. S3-S13, 2012.

PICCINELLI, A.L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; FERNANDEZ, M.C.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J Agric Food Chem**, v. 59, p. 6484-6491, 2011.

PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RICARDO, E.; MARDH, P.A. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, p. 678-685, 2005.

PINTO E SILVA, A.T., COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; SILVA-DIAS, A.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G. Dynamics of *in vitro* acquisition of resistance by *Candida parapsilosis* to different azoles. **FEMS Yeast Res**, v. 9, p. 626-633, 2009.

PULIMOOD, S.; GANESAN, L.; ALANGADEN, G.; CHANDRASEKAR, P. Polymicrobial candidemia. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 44, p. 353-357, 2002.

RAGHUKUMAR, R.; VALI, L.; WATSON, D.; FEARNLEY, J.; SEIDEL, V. Antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of pacific propolis and isolated prenylflavanones. **Phytother Res**, v. 24, p. 1181-1187, 2010.

RAMOS, A. & MIRANDA, J. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. **J Ven Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 13, p. 697-710, 2007.

REDDING, S.W.; KIRKPATRICK, W.R.; SAVILLE, S.; COCO, B.J.; WHITE, W.; FOTHERGILL, A.; et al. Multiple patterns of resistance to fluconazole in *Candida glabrata* isolates from a patient with oropharyngeal candidiasis receiving head and neck radiation. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 619-622, 2003.

RICHARDSON, M.D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, p. 5-11, 2005.

RIGHI, A.; ALVES, T.; NEGRI, G.; MARQUES, L.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **J Sci of Food Agric**, v. 91, p. 2363-2370, 2011.

RODERO, L.; DAVEL, G.; SORIA, M.; VIVOT, W.; CÓRDOBA, S.; CANTEROS, C.E; et al. Multicenter study of fungemia due to yeasts in Argentina. **Rev Argent Microbiol**, v. 37, p. 189-95, 2005.

ROILIDES, E.; FARMAKI, E.; EVDORIDOU, J.; DOTIS, J.; HATZIOANNIDIS, E.; TSIVITANIDOU, M.; et al. Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility, and molecular typing of causative isolates. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 23, p. 745-50, 2004.

ROSS, C. & MARGOLIS, R. Neurogenetics: insights into degenerative diseases and approaches to schizophrenia. **Clin Neurosci Res**, v. 5, p. 3-14, 2005.

SAIMAN, L.; LUDINGTON, E.; DAWSON, J.D.; PATTERSON, J.E.; RANGEL-FRAUSTO, S.; WIBLIN, R.T. et al. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. **Pediatr Infect Dis J**, v. 20, p. 1119-1124, 2001.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2, p. 33-38, 2005.

SALOMAO, K.; PEREIRA, P.; CAMPOS, L.; BORBA, C.; CABELLO, P.; MARCUCCI, M.; et al. Brazilian propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **Evid Based Complement Alternat Medn**, v. 5, p. 317-324, 2008.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; CALABRESE, D.; MAJCHERCZYK, P.A.; BILLE, J. The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, p. 2753-2765, 1999.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; KOYMANS, L.; BILLE, J. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 $\alpha$  - demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, p. 241-253, 1998.

SANGLARD, D. & ODDS, F. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infect Dis**, v. 2, p. 73-85, 2002.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, R.; FADDA, G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 668-679, 2005.

SARDI, J.C.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES GIANNINI, M.J. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol**, v. 62, p. 10-24, 2013.

SARVIKIVI, E.; LYYTIKAINEN, O.; SOLL, D.R.; PUJOL, C.; PFALLER, M.A.; RICHARDSON, M.; et al. Emergence of fluconazole resistance in a *Candida parapsilosis* strain that caused infections in a neonatal intensive care unit. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 2729-2735, 2005.

SAWAYA, A.; PALMA, A.M.; CAETANO, F.M.; MARCUCCI, M.C.; CUNHA, I.B.D.; ARAUJO, C.E.P. et al. Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. **Lett Appl Microbiol**, v. 35, p. 203-207, 2002.

SFORCIN, J. & BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **J Ethnopharmacol**, v. 133, p. 253-60, 2011.

SFORCIN, J.; FERNANDES, A.; LOPES, C.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**, v. 73, p. 243-249, 2000.

SFORCIN, J. Propolis and the immune system: a review. **J Ethnopharmacol**, v. 113, p. 1-14, 2007.

SFORCIN, J.M.; KANENO, R. & FUNARI, S.R.C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. **J Ven Anim Toxins**, v. 8, p. 19-29, 2002.

SHIN, J.H.; KEE, S.J.; SHIN, M.G.; KIM, S.H.; SHIN, D.H.; LEE, S.K. et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 1244-1248, 2002.

SHINMEI, Y.; YANO, H.; KAGAWA, Y.; IZAWA, K.; AKAGI, M.; INOUE, T.; et al. Effect of Brazilian propolis on sneezing and nasal rubbing in experimental

allergic rhinitis of mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v.31, p.688-893, 2009.

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

SHUB, T.A.; KAGRAMANOVA, K.A.; VOROPAEVA, S.D.; KIVMAN, G.I.A. Effect of propolis on *Staphylococcus aureus* strains resistant to antibiotics. **Antibiotiki**, v. 26, p. 268-271, 1981.

SILVA, B.B.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A.; et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 5, p. 313-316, 2008.

SIQUEIRA, A.; GOMES, B.; CAMBUIM, I.; MAIA, R.; ABREU, S.; SOUZA-MOTTA, C.; et al. *Trichophyton* species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Lett Appl Microbiol**, v. 48, p. 90-96, 2009.

SOARES, M. & CURY, A.E.; *In vitro* activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with tinea pedis. **Braz J Microbiol**, v. 32, p. 130-134, 2001.

SOLOMON, S.L.; KHABBAZ, R.F.; PARKER, R.H.; ANDERSON, R.L.; GERAGHTY, M.A.; Furman RM, et al. An outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in patients receiving parenteral nutrition. **J Infect Dis**, v. 149, p. 98-102, 1984.

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

STERNBACH, G. & VARON, J. Alexander Fleming: The spectrum of penicillin. **J Emerg Med**, v. 10, p. 89-91, 1992.

TAKAISI-KIKUNI, N.B. & SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Med**, v. 60, p. 222-227, 1994.

THEIN, Z.M.; SAMARANAYAKE, Y.H. & SAMARANAYAKE, L.P. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. **Arch Oral Biol**, v. 52, n. 12, p. 1200-8, 2007.

THEIN, Z.M.; SENEVIRATNE, C.J.; SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. **Mycoses**, v. 52, p. 467-475, 2009.

TOBUDIC, S.; KRATZER, C; GRANINGER, W; GEORGOPOULOS, A. Induction of resistance and cross-resistance of fluconazole, voriconazole, caspofungin and cationic antimicrobials against *Candida* species. **Int J Antimicrob Agents**, v. 29, p. S567, 2007.

TOBUDIC, S.; KRATZER, C. & PRESTERL, E. Azole-resistant *Candida* spp. - emerging pathogens? **Mycoses**, v. 5, p. 24-32, 2012.

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

TROFA, D.; GACSER, A. & NOSANCHUK J. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clin Microbiol Rev**, v. 21, p. 606-625, 2008.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.; MIORIN, P, et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 3, p. 249-254, 2006.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; NAYDENSKI, H.; TSVETKOVA, I.; GREGORIO RODRIGUEZ, J.; BANKOVA, V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. **Fitoterapia**, v. 75, p. 683-689, 2004.

TSURUO, T.; IIDA, H.; TSUKAGOSHI, S.; SAKURAI, Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. **Cancer Res**, v. 41, p. 1967-1972, 1981.

UGUR, A. & ARSLAN, T. An *in vitro* study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. **J Med Food**, v. 7, p. 90-94, 2004.

UGUR, A.; BARLAS, M.; CEYHAN, N.; TURKMEN, V. Antimicrobial effects of propolis extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains resistant to various antibiotics and some microorganisms. **J Med Food**, v. 3, p. 173-180, 2000.

VARGAS, K.; MESSER, S.A.; PFALLER, M.; LOCKHART, S.R.; STAPLETON, J.T.; HELLSTEIN, J. et al. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 3595-3607, 2000.

VAZQUEZ, J. Combination antifungal therapy against *Candida* species: the new frontier - are we there yet? **Med Mycol**, v. 41, p. 355-368, 2003.

VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I & SOSNOWSKI, Z. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, v. 7, p. 1-6, 2000.

WEINSTEIN, M.P.; RELLER, L.B. & MURPHY, J.R. Clinical importance of polymicrobial bacteremia. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 5, p. 185-196, 1986.

WHITE, T.; MARR, K. & BOWDEN, R. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, p. 382-402, 1998.

WHITE, T.C. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, p. 1482-1487, 1997.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis**, v. 39, p. 309-317, 2004.

YARFANI, R.; KHOSRAVI, A.R. & SHOKRI, H. The antifungal activity of Iranian propolis samples against fluconazole-resistant *Candida albicans* strains isolated from HIV+ patients with oropharyngeal candidiasis. **Journal of ApiProduct & ApiMedical Science**, v. 2, p. 161-166, 2010.

ZEIDLER, U.; BOUGNOUX, M.; LUPAN, A.; HELYNCK, O.; DOYEN, A.; GARCIA, Z.; et al. Synergy of the antibiotic colistin with echinocandin antifungals in *Candida* species. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, p. 1285-96, 2013.

ZHANG, J.D.; XU, Z.; CAO, Y.B.; CHEN, H.S.; YAN, L.; AN, M.M. et al. Antifungal activities and action mechanisms of compounds from *Tribulus terrestris* L. **J Ethnopharmacol**, v. 103, p. 76-84, 2006.

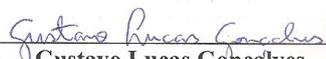
## 9 ANEXO 1



**SETOR DE CONTROLE DA QUALIDADE  
LAUDO DE ANÁLISE**

Produto: **Própolis Vermelha**  
 Lote: **43 / 11**  
 Produzido em: **Agosto / 2011**  
 Validade: **Agosto / 2013**  
 Fabricante: **Natucentro Indústria e Apiários Centro Oeste Ltda.**  
 SIF: **4059**

ANÁLISES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Massa mecânica	Máx. 40 % (m/m)	34,94%
Cera	Máx. de 25 % (m/m)	2,43%
Sólidos solúveis	Mín. de 35 % (m/m)	49,13 %
Atividade de oxidação	Máx. de 22 seg	13 seg
Flavonóides expressos em quercetina (Protocolo do Cloreto de Alumínio)	Mín. 0,5 % (m/m)	26,59 mg/g 2,66 %
Minerais	Máx. De 5 % (m/m)	1,27 %
Umidade	Máx. De 8 % (m/m)	7,1 %

  
 Gustavo Lucas Gonçalves  
 Técnico em Laboratório  
 CRQ-MG 02202372

Date: 18 / 11 / 11

Referência Bibliográfica:

- Instrução Normativa nº 3 de 19/01/2001 – Ministério da Agricultura e do Abastecimento –  
 DIPOA – Regulamento Técnico de Identidade e qualidade da própolis, anexo VI.  
 REGULAMENTO PELO MINISTER

Rua Jair Miranda 80 • 38900-000 • Bambuí • Minas Gerais  
 (37) 3431-1098 • Fax (37) 3431-2152 • natucentro@natucentro.com.br •  
 www.natucentro.com.br