



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**NATHÁLIA KATHLEEN LEITE DA SILVA**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PRÓPOLIS BRASILEIRAS CONTRA *CANDIDA*  
*ALBICANS* E *CANDIDA KRUSEI***

**BRASÍLIA, 2023**

NATHÁLIA KATHLEEN LEITE DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PRÓPOLIS BRASILEIRAS CONTRA *CANDIDA*  
*ALBICANS* E *CANDIDA KRUSEI***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

**Orientadora: Farmacêutica Esp. Karolina Oliveira Gomes**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi**

BRASÍLIA, 2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SS586a Silva, Nathália Kathleen Leite da  
Atividade antifúngica de própolis brasileiras contra  
*Candida albicans* e *Candida krusei*. / Nathália Kathleen  
Leite da Silva; orientador Karolina Oliveira Gomes; co  
orientador Daniela Castilho Orsi. -- Brasília, 2023.  
57 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de  
Brasília, 2023.

1. Própolis. 2. *Candida albicans*. 3. *Candida krusei*. 4.  
Infecções fúngicas. 5. Agentes antifúngicos. I. Gomes,  
Karolina Oliveira, orient. II. Orsi, Daniela Castilho, co  
orient. III. Título.

NATHÁLIA KATHLEEN LEITE DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PRÓPOLIS BRASILEIRAS CONTRA *CANDIDA*  
*ALBICANS* E *CANDIDA KRUSEI***

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Farmacêutica Esp. Karolina Oliveira Gomes  
(PPGCTS/ Universidade de Brasília)

---

Coorientadora: Professora Dra. Daniela Castilho Orsi  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Farmacêutica Letícia Fernandes da Silva Rodrigues  
(PPGCTS/ Universidade de Brasília)

---

Farmacêutica Carla Azevedo Bilac  
(PPGCTS/ Universidade de Brasília)

---

Farmacêutica Marta Oliveira de Araújo  
(PPGCTS/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, 2023

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus, por seu amor, pelas bênçãos recebidas, e por me iluminar em todos os momentos de dificuldades ao decorrer do curso.

A minha família, principalmente aos meus pais Dulcimeire e Francisco, e meu irmão Matheus, que sempre me incentivaram e estiveram ao meu lado em todos os momentos bons e ruins da minha vida.

Aos amigos que ganhei durante o curso, obrigada pela alegria e companheirismo ao longo deste percurso. Aos professores da Universidade, grata pelos ensinamentos no meu processo de formação profissional.

A minha querida orientadora Karolina, por ser atenciosa, paciente, e que conduziu este trabalho com tanta dedicação. E por fim, a minha admirável professora Daniela, pelas oportunidades, generosidade, e que tanto contribuiu para realização deste trabalho.

## RESUMO

Devido ao surgimento contínuo de cepas resistentes aos agentes antifúngicos, é necessário investigar novos compostos com atividade contra esses patógenos oportunistas, preferencialmente com menos efeitos colaterais do que os atualmente disponíveis. Portanto, as atividades antimicrobianas de derivados naturais, como a própolis, têm sido pesquisadas nos últimos anos como alternativas para novas estratégias terapêuticas. O estudo objetivou determinar a atividade antifúngica de diferentes extratos de própolis (EP) brasileiras contra as leveduras *Candida albicans* e *Candida krusei*. Duas amostras de própolis *in natura* de Jataí (J) e Mandaçaia (M) foram obtidas em meliponários localizados na região Sul do Brasil. As outras sete amostras de própolis eram comerciais (4 EP verdes produzidos em apiários do Distrito Federal (PC, PW, A e TB), 2 EP de Jataí (JPC) e de Mandaçaia (MPC) produzidos em meliponário do Distrito Federal e 1 EP de Mandaçaia (MM) produzido em meliponário do Rio Grande do Sul). A atividade antifúngica por ensaio de disco-difusão apresentou halo de inibição para *C. krusei* com o uso do EP de Mandaçaia (MM) e dos EP verdes (PW, PC e TB). Nenhum dos extratos de própolis tiveram halo de inibição contra *C. albicans*. Na determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), os extratos de própolis apresentaram CBM de 0,20 a <0,06 mg/mL para *C. albicans* e CBM de 0,20 a 0,07 mg/mL para *C. krusei*. As CBMs dos EP verdes (PW, TB e A) apresentaram menor concentração em relação aos demais EP para ambas as leveduras testadas. Os EP de Jataí (J e JPC) não demonstraram atividade fungicida (CBM) contra *C. krusei*. O EP de Jataí (J) apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 0,02 mg/mL para *C. albicans* e 0,15 mg/mL para *C. krusei* e o EP de Jataí (JPC) apresentou CIM de 0,02 mg/mL para *C. krusei* e <0,01 mg/mL para *C. albicans*. Assim, os extratos de própolis brasileiros analisados neste estudo, especialmente os verdes, demonstraram ter atividade antifúngica contra *C. albicans* e *C. krusei*. A própolis é um produto natural, eficaz, de baixo custo e que está disponível para a população brasileira, podendo oferecer grande ajuda na prevenção e tratamento de candidíases.

**Palavras-chave:** Própolis, *Candida albicans*, *Candida krusei*, infecções fúngicas, agentes antifúngicos.

## ABSTRACT

Due to the continuous emergence of strains resistant to antifungal agents, it is necessary to investigate new compounds with activity against these opportunistic pathogens, preferably with fewer side effects than those currently available. Therefore, the antimicrobial activities of natural derivatives, such as propolis, have been researched in recent years as alternatives for new therapeutic strategies. The study aimed to determine the antimicrobial activity of different extracts of Brazilian propolis (EP) against *Candida albicans* and *Candida krusei*. Two samples of propolis *in natura* from Jataí (J) and Mandaçaia (M) were obtained from meliponaries located in southern Brazil. The other seven propolis samples were commercial (4 green EP produced in apiaries in the Federal District (PC, PW, A and TB), 2 EP from Jataí (JPC) and Mandaçaia (MPC) produced in the Federal District and 1 EP from Mandaçaia (MM) produced in Rio Grande do Sul). The antifungal activity by disk-diffusion assay showed a halo of inhibition for *C. krusei* with the use of Mandaçaia EP (MM) and greens EP (PW, PC and TB). None of the propolis extracts had an inhibition zone against *C. albicans*. In determining the Minimum Bactericidal Concentration (MBC), the propolis extracts showed MBC from 0.20 to <0.06 mg/mL for *C. albicans* and MBC from 0.20 to 0.07 mg/mL for *C. krusei*. The CBMs of the green EP (PW, TB and A) showed a lower concentration compared to the other EP for both tested yeasts. The EP from Jataí (J and JPC) did not show fungicidal activity (CBM) against *C. krusei*. The EP from Jataí (J) presented a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 0.15 mg/mL for *C. krusei* and 0.02 mg/mL for *C. albicans* and the EP from Jataí (JPC) presented a MIC of 0.02 mg/mL for *C. krusei* and <0.01 mg/mL for *C. albicans*. Thus, the Brazilian propolis extracts analyzed in this study, especially the green ones, demonstrated antifungal activity against *C. albicans* and *C. krusei*. Propolis is a natural, effective, low-cost product that is available to the Brazilian population and can offer great help in the prevention and treatment of candidiasis.

**Keywords:** Propolis, *Candida albicans*, *Candida krusei*, fungal infections, antifungal agents.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - <i>Candida albicans</i> e <i>Candida krusei</i> .....	<b>17</b>
<b>Figura 2</b> - Abelha <i>Apis mellifera</i> .....	<b>18</b>
<b>Figura 3</b> - Abelha Jataí ( <i>Tetragonisca angustula</i> ).....	<b>19</b>
<b>Figura 4</b> - Abelha Mandaçaia ( <i>Melipona quadrifasciata</i> ).....	<b>19</b>
<b>Figura 5</b> - Própolis <i>in natura</i> .....	<b>22</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1</b> - Amostras ( <i>in natura</i> ) de extratos de própolis.....	<b>25</b>
<b>QUADRO 2</b> - Amostras (comerciais) de extratos de própolis.....	<b>25</b>

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Atividade antifúngica dos extratos de própolis, expressa em diâmetro dos halos (mm), obtida através do ensaio de disco-difusão..... **28**
- TABELA 2** - Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) e da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de própolis para as leveduras *C. albicans* e *C. krusei*..... **30**

## LISTA DE APÊNDICES

<b>APÊNDICE 1</b> - Atividade antifúngica por ensaio de disco-difusão para <i>C. albicans</i> .....	<b>41</b>
<b>APÊNDICE 2</b> - CBM para levedura <i>C. albicans</i> .....	<b>46</b>
<b>APÊNDICE 3</b> - CBM para levedura <i>C. krusei</i> .....	<b>51</b>
<b>APÊNDICE 4</b> - Determinação da CIM utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular para <i>C. albicans</i> ..	<b>56</b>
<b>APÊNDICE 5</b> - Determinação da CIM utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular para <i>C. krusei</i> .....	<b>57</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EP	Extrato de própolis
J	Jataí
LB	Luria Bertani
M	Mandaçaia
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg/ml	miligramas por mililitro
mL	Mililitro
mm	milímetro
MS	Ministério da Saúde
m/v	Massa por volume
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
SUS	Sistema Único de Saúde
UFC	Unidade Formadora de Colônias
°C	Grau Celsius

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	<i>Candida albicans</i> e <i>Candida krusei</i> .....	16
2.2	Abelhas <i>Apis Mellifera</i> e Abelhas sem ferrão.....	18
2.3	Própolis: fonte botânica e características físico-químicas.....	20
2.4	Própolis: atividades biológicas.....	20
2.5	Própolis e legislação brasileira.....	21
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Objetivo geral.....	23
3.2	Objetivos específicos.....	23
4	JUSTIFICATIVA.....	24
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1	Obtenção dos extratos alcóolicos a partir de própolis <i>in natura</i> .....	25
5.2	Amostras comerciais de extratos de própolis.....	25
5.3	Preparo dos inóculos microbianos.....	25
5.4	Estudo da atividade antifúngica dos extratos de própolis por ensaio de disco-difusão.....	26
5.5	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	26
5.6	Análises estatísticas.....	27
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6.1	Atividade antifúngica por ensaio de disco-difusão dos extratos de própolis.....	28

6.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis para as leveduras <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> .....	30
7 CONCLUSÃO .....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
APÊNDICES .....	41

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* representa um conjunto de fungos leveduriformes pertencentes ao filo ascomiceto. As espécies do gênero *Candida* são principalmente organismos de vida livre, vivem de forma simbiote em indivíduos saudáveis, sendo encontradas na cavidade oral, tratos geniturinários e gastrointestinais (ROCHA *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2022).

As patologias geradas pelo gênero *Candida* vão desde micoses superficiais até infecções sistêmicas. O fato de uma determinada espécie de *Candida* se comportar como um patógeno oportunista ou comensal depende de uma série complexa de interações entre o microrganismo, o hospedeiro e a microbiota presente no local de interação (SANTOS *et al.*, 2018).

Segundo Turner e Butler (2014), as populações imunocomprometidas adquirem mais frequentemente infecções por *Candida*, e nesse grupo estão crianças e idosos, assim como, pessoas com a microbiota alterada e indivíduos com lesões na pele e mucosas.

Conforme Srivastava, Singla e Dubey (2018), a candidíase é um importante problema de saúde, especialmente para pessoas hospitalizadas. As espécies *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são frequentemente destacadas e identificadas como patógenos oportunistas. Estas cinco espécies estão agrupadas no que é conhecido como o complexo de espécies patogênicas de *Candida* (TURNER e BUTLER, 2014).

Devido ao surgimento contínuo de cepas resistentes aos agentes antifúngicos, é necessário investigar novos compostos com atividade contra esses patógenos oportunistas, preferencialmente com menos efeitos colaterais do que os atualmente disponíveis (SRIVASTAVA; SINGLA; DUBEY, 2018).

A própolis contém diversos compostos com propriedades biológicas, em particular flavonoides e compostos fenólicos. Entre as atividades biológicas atribuídas à própolis estão as antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes e capacidade anti-inflamatória (PAZIN *et al.*, 2017). Assim, as atividades antimicrobianas de derivados naturais, como a própolis, têm sido pesquisadas nos últimos anos como alternativas para novas estratégias terapêuticas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Candida albicans* e *Candida krusei*

O gênero *Candida* possui cerca de 150 a 200 espécies, às quais habitam diversas partes do corpo humano, podendo estar presentes na pele, trato gastrointestinal, mucosas do trato respiratório e sistema urogenital. Além de ser o principal grupo de leveduras responsáveis por causar infecções oportunistas no ser humano (PEREIRA *et al.*, 2021).

Dentre as infecções causadas pelas espécies de *Candida*, podemos destacar a candidíase vaginal, pois essa infecção fúngica principalmente quando de repetição, afeta milhões de mulheres no mundo, diminuindo a qualidade de vida dessa população (ARAUJO *et al.*, 2020).

Espécies de *Candida* desencadeiam infecções superficiais nas mucosas e na pele, e causam candidemia quando alcançam a corrente sanguínea, e em tecidos mais profundos ocasionam a candidíase invasiva. Há também casos de candidíase sistêmica quando ocorre disseminação hematogênica ou inoculação direta num local estéril (VIEIRA e NASCIMENTO, 2017). O Ministério da Saúde (MS) relata que anualmente a candidíase invasiva afeta mais de 250 mil pessoas mundialmente, sendo responsável por mais de 50 mil mortes (BRASIL, 2022).

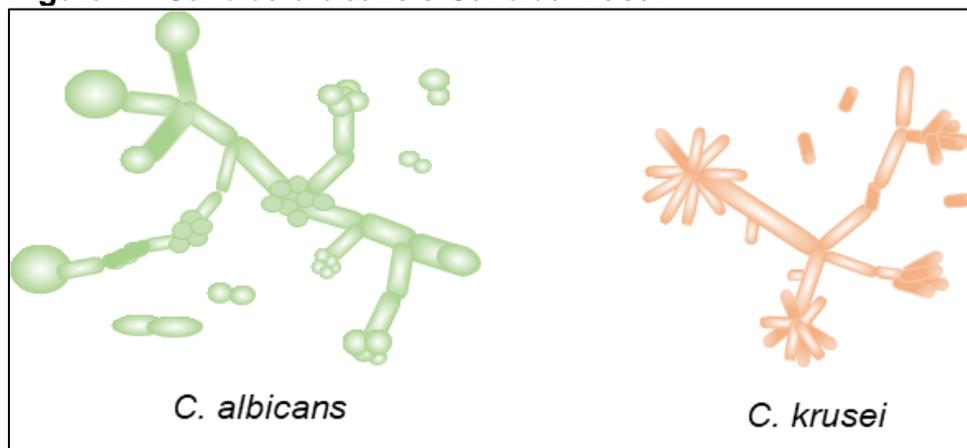
*Candida albicans* é um fungo que foi descrito pela primeira vez por Langenbeck em 1830, como uma estomatite cremosa de paciente com febre tifoide (ALMEIDA, 2016). *C. albicans* é uma levedura diploide com diferentes características morfológicas e fenotípicas, que transita entre as formas de leveduras, pseudo-hifas e hifas (SOARES *et al.*, 2019). *C. albicans* é o agente etiológico mais frequente da candidíase causando cerca de 35-65% dos casos de candidemia, embora outras espécies de *Candida* também sejam relevantes no cenário clínico (GRAVIRIA e MONTES, 2020).

*Candida krusei* possui células cilíndricas com até 25 µm de comprimento (SILVA *et al.*, 2021). Faz parte das espécies emergentes de *Candida* sendo um agente causador de aproximadamente 5% dos casos relatados de candidíase sistêmica (NAVARRO-ARIAS *et al.*, 2019). É frequentemente encontrada em pacientes que tiveram exposição prévia ao fluconazol (LARA e GIL, 2017).

Na atualidade, o tratamento de candidíase consiste na administração de medicamentos, tanto tópicos quanto de uso sistêmicos, isolados ou associados,

conforme as manifestações clínicas (SOBREIRA *et al.*, 2020). O surgimento de cepas resistentes de *C. albicans* e *C. krusei* (Figura 1) geram inúmeras intercorrências de saúde, uma delas é a diminuição por opções de tratamentos para infecções fúngicas.

**Figura 1** - *Candida albicans* e *Candida krusei*.



Fonte: autoria própria (2023).

Sachivkina, Podoprigora e Bokov (2021) apontam que muitas vezes são necessárias concentrações elevadas de alguns antifúngicos, como a anfotericina B, para anular a atividade metabólica dos biofilmes de *Candida*, sendo importante o surgimento de novas opções de tratamentos de infecções com formação de biofilmes. A preservação de muitas espécies é garantida pela ajuda do biofilme, que oferece proteção física contra o sistema imunológico e dificulta a penetração de antimicrobianos, ajudando na resistência a essas drogas (SACHIVKINA, PODOPRIGORA e BOKOV, 2021).

Embora *C. albicans* seja considerada mais patogênica, a *C. krusei* possui maior prevalência em dados epidemiológicos (VIEIRA e NASCIMENTO, 2017). Graviria e Montes (2020) afirmam que as terapias antifúngicas padrões para infecções sistêmicas causadas por *C. krusei* apresentam baixa resposta e alta taxa de mortalidade entre 40-50%. No Brasil, os dados apontam para a ocorrência de 2,5 casos de candidemia para cada mil internações hospitalares (BRASIL, 2022).

Devido à dificuldade em realizar o diagnóstico das infecções hospitalares causadas por *Candida*, frequentemente ocorre atrasos na escolha terapêutica e isso leva ao agravamento da infecção (VIEIRA e NASCIMENTO, 2017). Embora existam drogas com atividade contra várias espécies de *Candida*, seu uso é limitado devido ao surgimento de cepas resistentes e a estreita margem de segurança para muitos desses compostos (SRIVASTAVA; SINGLA; DUBEY, 2018).

## 2.2 Abelhas *Apis Mellifera* e Abelhas sem ferrão

As abelhas *Apis mellifera* (Figura 2) se destacam dentre todas as espécies de abelhas por serem as mais eficientes na produção de própolis, cerca de 100 a 300 gramas de própolis são extraídas de cada colmeia anualmente. Existe uma classificação para os tipos de própolis produzidos pelas abelhas *A. mellifera*, baseada na origem botânica, coloração e composição química. A própolis verde é extensamente estudada, tendo como matéria prima o alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) (CRUZ *et al.*, 2021).

As abelhas africanizadas do gênero *Apis* são um híbrido resultante do cruzamento entre a subespécie *A. mellifera* Linnaeus, originalmente introduzida no Brasil para produção de mel e a subespécie africana *A. mellifera scutellata* Lepeletier importada para melhorar a produtividade (SUREK *et al.*, 2021).

**Figura 2** – Abelha africanizada (*Apis mellifera*).



Fonte: Modificado de Prudek (2017).

As abelhas do gênero *Melipona* são encontradas em regiões tropicais como o Brasil, e geralmente produzem à própolis acrescida de terra, gerando a geoprópolis (CRUZ *et al.*, 2021). Existem cerca de 350 a 600 espécies de abelhas do gênero *Melipona* no Brasil, e entre elas estão às abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*) e Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) (CARDOZO, 2015).

Amplamente distribuída no território brasileiro, a meliponínea *Tetragonisca angustula*, popularmente conhecida como abelha Jataí (Figura 3), é uma das espécies mais abundantes nos neotrópicos. A Jataí é uma espécie de pequeno porte importante

para os ecossistemas devido ao seu potencial polinizador e produz mel e própolis com relevantes propriedades medicinais, sendo por isso alvo de pesquisas científicas (BARREIRAS *et al.*, 2020).

**Figura 3** - Abelha Jataí (*Tetragonisca anguscula*).



Fonte: Modificado de Turrini (2018).

A abelha popularmente conhecida como Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) (Figura 4) é encontrada em várias regiões do Brasil e bastante utilizada para produção de mel. Apresenta uma produção de mel de 2 a 3 litros/colmeia/ano, sendo este um produto diferenciado, apreciado e de fácil comercialização. Também é polinizadora dos grandes ecossistemas brasileiros, tendo papel importante na conservação da diversidade ecológica (AVILA *et al.*, 2016).

**Figura 4** - Abelha Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*),



Fonte: Modificado de Margraf (2022).

### 2.3 Própolis: fonte botânica e características físico-químicas

As abelhas produzem a própolis a partir de materiais balsâmicos coletados das plantas (CRUZ *et al.*, 2022). As partes das plantas utilizadas pelas abelhas para essa coleta são de botões de flores, sépalas e pétalas, folhas, caules e cascas de árvores (PEREIRA *et al.*, 2021). Assim, diferentes tipos de própolis variam em sua composição química pelo fato de possuírem diferentes origens de espécies vegetais, o que modifica os metabólitos secundários (CRUZ *et al.*, 2021).

Na obtenção da própolis o apicultor realiza a coleta através da raspagem da colmeia (PORTILHO *et al.*, 2013) e a composição química da própolis varia conforme as condições ambientais, época de colheita, clima e área geográfica (LÓPEZ, 2014). Os flavonoides, assim como os ácidos fenólicos, cetonas, ésteres e aldeídos fenólicos são os compostos mais importantes com atividade antimicrobiana encontrados na própolis (PEREIRA *et al.*, 2021).

As própolis brasileiras produzidas pelas abelhas *A. mellifera* podem ser classificadas em 13 tipos, baseada em suas características físico-químicas, como, cor, textura e perfil químico (FREIRES *et al.*, 2016). Assim, a fonte botânica de onde as abelhas coleta a resina está entre os fatores responsáveis pelas propriedades físicas, químicas e biológicas da própolis (CAMPOS *et al.*, 2015).

A própolis verde tem como principal fonte vegetal, o alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). A artepilina C é um composto químico bastante descrito, um ácido cinâmico com propriedades antimicrobianas, antitumorais e anti-inflamatórias, encontrado principalmente na própolis verde (CRUZ *et al.*, 2021).

Já as própolis produzidas pelas abelhas sem ferrão necessitam de mais estudos para determinação de fonte botânica e composição química. Cardozo (2015) identificou maior presença de derivados do ácido benzoico, diterpenos e triterpenos na composição química das própolis produzidas pelas abelhas sem ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí coletadas em diversos locais do Brasil.

### 2.4 Própolis: atividades biológicas

A própolis é popularmente conhecida em todo o mundo como um produto natural, e tem sido amplamente aceita em muitos países como um suplemento

alimentar para promover a saúde e prevenir doenças (ANDRE *et al.*, 2022). Assim suas atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral e imunomoduladora resultam em grande interesse tanto pela indústria farmacêutica como alimentícia (CRUZ *et al.*, 2021).

A própolis possui atividade inibitória contra microrganismos através de diferentes mecanismos e função imunomoduladora, conseguindo modificar a resposta imune das células do hospedeiro (ALMUHAYAWI, 2020). Os mecanismos inibitórios da própolis sobre os microrganismos podem se dar por capacidade de alteração da permeabilidade da membrana celular, inibição da divisão celular, redução da capacidade de formar biofilmes, e redução da resistência a certos antibióticos convencionais (BOUCHELAGHEM, 2022).

A descoberta de novos compostos químicos com potentes atividades contra biofilmes fúngicos tem sido de grande interesse na área médica, devido à toxicidade dos antifúngicos atuais, sua resistência microbiana e efeitos colaterais (FREIRES *et al.*, 2016). Vários estudos foram realizados comprovando a atividade antimicrobiana da própolis, destacando-se por promover um tratamento potencialmente eficaz, seguro e de baixo custo (PEREIRA *et al.*, 2021).

Além de fornecer efeitos antifúngicos, a própolis também proporciona alívio precoce dos sintomas causados pelas candidíases devido às suas propriedades anestésicas, e sua eficácia tem se mostrado satisfatória em comparação ao antifúngico nistatina (PASUPULETI *et al.*, 2017).

## **2.5 Própolis e legislação brasileira**

A própolis é um dos produtos utilizados na apiterapia para promoção e manutenção da saúde, incluída pelo Ministério da Saúde (MS) através da Portaria nº 702 de março de 2018, nas novas práticas da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no âmbito do SUS (BRASIL, 2018). Os medicamentos de uso tópico à base de própolis possuem indicações como cicatrizante, anti-inflamatório, e antisséptico para uso na cavidade bucal (BRASIL, 2016).

Segundo Malaspina e Palma (2015), apenas produtos registrados no MS podem conter bula ou indicação terapêutica, já os produtos registrados no Ministério

da Agricultura, Pecuária e Abastecimento devem ser comercializados apenas como complemento alimentar sem indicação terapêutica.

Na legislação brasileira o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade da própolis foi aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2001, porém sem estabelecer métodos de análises da própolis. Contudo, verificam-se os requisitos físico-químicos do extrato de própolis, onde o extrato seco deve conter o mínimo de 11% (m/v) (BRASIL, 2001). Soares e colaboradores (2017) aponta que no Brasil atualmente um dos principais parâmetros para analisar a própolis é pela porcentagem de extrato seco na amostra.

A legislação brasileira define a própolis (Figura 5) como sendo composta de resinas, óleos essenciais, produtos balsâmicos, pólen, microelementos e cera, e que o extrato de própolis possua os compostos solúveis da própolis em solução hidroalcoólica. Outro fator importante na legislação é a definição do extrato de própolis como produto proveniente da extração dos componentes solúveis da própolis em álcool neutro, por processo tecnológico adequado (BRASIL, 2001).

Processos como limpeza e seleção são etapas obrigatórias na produção da própolis e extrato de própolis, submetidos às normas higiênicas sanitárias para produtos de abelhas estabelecidas pelo MAPA e Secretaria de Defesa Agropecuária através da Portaria/SDA nº486/2021 (BRASIL, 2021).

**Figura 5** – Própolis *in natura*.



Fonte: Modificado de Auhustsinovich (2022).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo dessa pesquisa foi determinar a atividade antifúngica de diferentes extratos de própolis brasileiras (própolis verde de abelhas *Apis mellifera* e própolis de abelhas Jataí e Mandaçaia) contra as leveduras *Candida albicans* e *Candida krusei*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Estudo da atividade antifúngica dos extratos de própolis por ensaio de disco-difusão;
- Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- Determinação Concentração Inibitória Mínima (CIM).

#### 4 JUSTIFICATIVA

Recentemente, muitas leveduras patogênicas do gênero *Candida* spp. desenvolveram diferentes mecanismos de resistência contra agentes antifúngicos. Muitas infecções nosocomiais estão associadas ao uso de dispositivos médicos (por exemplo, cateteres), que são locais propícios para o desenvolvimento de biofilmes criados por fungos. O biofilme fúngico tem função de proteção contra antimicrobianos e o sistema imunológico do hospedeiro. Assim, tanto a candidíase sistêmica quanto a candidíase relacionada com biofilme são difíceis de curar e requerem tratamento prolongado, que muitas vezes leva ao desenvolvimento de resistência da levedura a drogas antifúngicas comuns.

Todos os aspectos apresentados acima indicam claramente que há uma necessidade urgente de desenvolver novos agentes antifúngicos eficazes, baratos e não abrangidos pelos mecanismos de resistência atualmente existentes. Produtos naturais de diversas origens constituem um grupo promissor, mas ainda subestimado, de potenciais agentes antifúngicos, e entre eles, a própolis parece ser especialmente interessante. De acordo com Gucwa *et al.* (2018), polifenóis e flavonoides são alguns dos compostos presentes na própolis que possuem elevada atividade antimicrobiana.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Obtenção dos extratos alcóolicos a partir de própolis *in natura*

Duas amostras de própolis bruta (uma de Jataí e outra de Mandaçaia) foram obtidas em meliponários localizados na região Sul do Brasil. Os extratos contendo 30% (p/v) de própolis *in natura* foram preparados por maceração etanólica (96°GL) sob agitação mecânica, a temperatura ambiente por 18 horas. O extrato obtido foi filtrado em papel de filtro e submetido as análises de atividade antimicrobiana. O Quadro 1 apresenta a identificação das própolis *in natura* do estudo.

**QUADRO 1** - Amostras (*in natura*) dos extratos de própolis

<b>Amostra</b>	<b>Tipo</b>	<b>Procedência</b>
Jataí (J)	Jataí <i>in natura</i>	Paraná
Mandaçaia (M)	Mandaçaia <i>in natura</i>	Santa Catarina

Fonte: autoria própria (2022).

### 5.2 Amostras comerciais de extratos de própolis

Foram utilizados sete extratos de própolis comerciais que são apresentados no Quadro 2.

**QUADRO 2** - Amostras (comerciais) dos extratos de própolis

<b>Amostra</b>	<b>Tipo</b>	<b>Procedência</b>
Jataí (JPC)	Jataí (comercial)	Distrito Federal
Mandaçaia (MPC)	Mandaçaia (comercial)	Distrito Federal
Mandaçaia (MM)	Mandaçaia (comercial)	Rio Grande do Sul
Verde (PW)	Verde (comercial)	Distrito Federal
Verde (PC)	Verde (comercial)	Distrito Federal
Verde (A)	Verde (comercial)	Distrito Federal
Verde (TB)	Verde (comercial)	Distrito Federal

Fonte: autoria própria (2022).

### 5.3 Preparo dos inóculos microbianos

Os inóculos utilizados foram cepas dos fungos *Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida krusei* ATCC 6258. Os inóculos foram preparados através de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani (LB) com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ( $1,0 \times 10^6$  -  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica a 625 nm em espectrofotômetro.

#### **5.4 Estudo da atividade antifúngica dos extratos de própolis por ensaio de disco-difusão**

O método de ensaio de disco-difusão foi realizado utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Para realizar o ensaio de disco-difusão, com o auxílio da alça de drigalski, o inóculo fúngico foi semeado na superfície de uma placa de ágar Muller-Hinton, até a obtenção de um espalhamento uniforme. Após a secagem do inóculo, foram aplicados discos de papel de filtro, com 6 mm de diâmetro, impregnados com 20 µL dos extratos de própolis. Os testes foram realizados em duplicata e as leituras foram realizadas após 24 horas de incubação a 37°C, por meio da medição dos halos de inibição do crescimento em milímetros de diâmetro.

#### **5.5 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de reduzir a contagem microbiana em 99,9%. Foram realizadas diluições em caldo LB dos inóculos na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland na ordem de 1:150, resultando em uma concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL.

Então, adicionou-se em tubos eppendorff 0,2 mL do inóculo na concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e 0,2 mL das diferentes concentrações de extratos de própolis, resultando em uma concentração final de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL.

Como controle positivo (com crescimento dos fungos) foi utilizado 0,2 mL do inóculo na concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e 0,2 mL de caldo LB. Como controle

negativo (inibição do crescimento dos fungos) foi utilizado 0,2 mL do caldo LB e 0,2 mL de extrato de própolis.

Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas e então as diluições foram plaqueadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37°C por 18-24 horas e a CBM foi determinada na menor concentração dos extratos de própolis onde não foram observadas colônias nas placas.

De acordo com a CLSI (2015), a Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento de um microrganismo determinado por turbidez em testes de sensibilidade por diluição em caldo. A metodologia para a determinação da CIM foi modificada de acordo com Ristivojević *et al.* (2018).

Após o período de incubação das diferentes diluições do agente antimicrobiano com o inóculo do fungo, o método colorimétrico da resazurina sódica 0,01% foi utilizado, aplicando-se 20 µL da solução de resazurina em 100 µL de cada teste, para realizar a leitura visual dos resultados, em que a cor azul caracteriza a inatividade e a cor rosa o crescimento das leveduras.

Portanto a CIM foi definida como a menor concentração dos extratos de própolis que inibiram o crescimento microbiano e apresentaram cor azul na presença da resazurina.

## 5.6 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata. O valor de p calculado foi obtido por meio do teste de ANOVA não pareado e quando as médias foram significativamente diferentes a  $p < 0,05$ , o teste de Tukey foi usado para comparação das médias. O coeficiente de variação foi determinado, em porcentagem, a fim de analisar a dispersão dos dados em torno da média. Os dados foram analisados com uso do software STATISTICA<sup>®</sup>, versão 10.0.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Atividade antifúngica por ensaio de disco-difusão dos extratos de própolis

A Tabela 1 apresenta os resultados do ensaio de disco-difusão dos extratos de própolis para as leveduras *C. albicans* e *C. krusei*. Apenas a levedura *C. krusei* apresentou halos de inibição para os extratos de própolis verdes comerciais do Distrito Federal (PW, PC e TB) e para o EP comercial de Mandaçaia do Rio Grande do Sul (MM). Além disso, a amostra de EP verde TB apresentou a melhor atividade antifúngica (halo de 19 mm) em relação aos demais EPs (halos de 5 a 12 mm). Nenhum dos extratos de própolis (Verdes e abelhas sem ferrão) obtiveram inibição do crescimento fúngico para *C. albicans*.

**TABELA 1** - Atividade antifúngica dos extratos de própolis, expressa em diâmetro dos halos (mm), obtida através do ensaio de disco-difusão

Procedência/Tipo de Própolis	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>
	Halo (mm)	Halo (mm)
<b>Extratos de própolis de abelhas sem ferrão</b>		
1 SC/M	N	N
2 PR/J	N	N
3 DF/ JPC	N	N
4 DF/ MPC	N	N
5 RS/ MM	N	5 a
<b>Extratos comerciais de própolis verdes</b>		
6 DF/ PW	N	12 b
7 DF/ PC	N	6 a
8 DF/ A	N	N
9 DF/ TB	N	19 c

Fonte: Autoria própria. Notas: M = Mandaçaia in natura Santa Catarina. J = Jataí in natura Paraná. JPC = Jataí comercial Distrito Federal. MPC = Mandaçaia comercial Distrito Federal. MM = Mandaçaia comercial Rio Grande do Sul. PW = Verde comercial Distrito Federal. PC = Verde comercial Distrito Federal. A = Verde comercial Distrito Federal. TB = Verde comercial Distrito Federal. Os resultados

foram expressos como média de análises em triplicata  $\pm$  desvio padrão. (N) não houve halo de inibição; as médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes a  $p < 0,05$  de acordo com o teste de Tukey.

Bezerra *et al.* (2020) analisaram a atividade de EP verde obtido em Minas Gerais contra três espécies de *Candida*, e obtiveram bons resultados para *C. albicans* com halo de inibição de 15,1 a 20,1 mm. Os resultados de Sierra *et al.* (2019), demonstraram diferenças de zonas de inibição contra um isolado clínico de *C. albicans*, sendo que o extrato de própolis da abelha sem ferrão *Melipona beechi* mostrou halo de inibição de 20 mm.

Todavia, estudos que avaliaram a atividade antifúngica de extratos de própolis verdes e de abelhas sem ferrão pelo método de disco de fusão contra *C. krusei* são escassos, o que limita a comparação com os resultados deste trabalho, nesse sentido, é possível comparar com outros tipos de EP brasileiros. Silva *et al.* (2019) utilizaram extrato de própolis vermelho adquirido em Alagoas, e obtiveram halo de inibição contra *C. krusei* de 12,4 mm.

Gniewosz *et al.* (2022) indicaram que filmes de pululano com extratos de própolis da Polônia podem ser considerados como embalagem ativa natural para proteger os alimentos contra fungos, e em seus resultados esses EP produziram zonas de inibição contra *C. albicans* e *C. krusei* de 10,2 e 9,4 mm, respectivamente.

Um teste de disco-difusão em ágar realizado por Pedroso *et al.* (2014) demonstrou que quatro isolados de *C. krusei* foram resistentes aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol, enquanto um dos halos de 19 mm produzido pelo voriconazol foi similar ao EP verde TB do presente estudo.

Conforme Papp *et al.* (2021), as diferenças nas atividades antifúngicas em diversas amostras de própolis são atribuídas a origem geográfica, método de extração, época de colheita e composição química variada. Levando em conta o que foi observado, as diferenças nos diâmetros das zonas de inibição da própolis podem ser explicadas pelas diferentes composições desses produtos e pelas diferentes formas de induzir o efeito antimicrobiano. E apesar dos extratos de própolis serem líquidos, a própolis possui alta viscosidade o que limita sua difusão, tornando o método de disco-difusão limitado para avaliar a atividade antimicrobiana dos EP (AWAWDEH *et al.*, 2018; VICĂ *et al.*, 2022).

## 6.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis para as leveduras *C. albicans* e *C. krusei*

Os resultados deste estudo mostraram que os extratos de própolis apresentaram CBM de 0,20 a <0,06 mg/mL para *C. albicans* e CBM de 0,20 a 0,07 mg/mL para *C. krusei* (Tabela 2). As CBMs dos extratos de própolis verdes comerciais do Distrito Federal (PW, TB e A) apresentaram maior destaque em relação aos demais EPs para ambas as leveduras testadas. Os EPs de abelhas sem ferrão Jataí (J e JPC) não demonstraram atividade fungicida (CBM) contra *C. krusei*.

**TABELA 2:** Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) e da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de própolis para leveduras *C. albicans* e *C. krusei*.

Procedência/Tipo de Própolis	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>	
	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)
<b>Extratos de própolis de abelhas sem ferrão</b>				
1 SC/M	0,15 a	< 0,01 a	0,20 a	< 0,01
2 PR/J	0,20 b	0,02 b	N	0,15 a
3 DF/ JPC	0,20 b	< 0,01 a	N	0,02 b
4 DF/ MPC	0,20 b	< 0,01 a	0,15 b	< 0,01
5 DF/ MM	0,20 b	< 0,01 a	0,15 b	< 0,01
<b>Extratos comerciais de própolis verdes</b>				
6 DF/ PW	<0,06 c	< 0,01 a	0,10 c	< 0,01
7 DF/ PC	0,20 b	< 0,01 a	0,20 a	< 0,01
8 DF/ A	0,20 b	< 0,01 a	0,07 c	< 0,01
9 DF/ TB	<0,06 c	< 0,01 a	0,15 b	< 0,01

Fonte: Autoria Própria. Notas: M = Mandaçaia in natura Santa Catarina. J = Jataí in natura Paraná. JPC = Jataí comercial Distrito Federal. MPC = Mandaçaia comercial Distrito Federal. MM = Mandaçaia comercial Rio Grande do Sul. PW = Verde comercial Distrito Federal. PC = Verde comercial Distrito Federal. A = Verde comercial Distrito Federal. TB = Verde comercial Distrito Federal. Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata  $\pm$  desvio padrão. As médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes a  $p < 0,05$  de acordo com o teste de Tukey.

Corrêa *et al.* (2020) obtiveram CBM de 3,35 a 6,70 mg/mL usando amostras de extratos de própolis verdes originárias do Paraná contra diferentes isolados de *C. albicans* de pacientes com candidíase vaginal. Da mesma forma os EP verdes PW e TB desse estudo foram eficazes contra *C. albicans* em concentrações fungicidas ainda menores, o que evidencia o potencial efeito antifúngico desses extratos de própolis verdes do Distrito Federal.

Ademais, nenhum dos EP verdes alcançaram a concentração inibitória mínima, pois todas as diluições testadas foram capazes de ter efeito bacteriostático nos dois fungos testados (Tabela 2). Capoci *et al.* (2015) reportaram que os extratos de própolis verdes brasileiros apresentaram CIM entre 0,07 e 0,55 mg/mL contra *C. albicans*. Corrêa *et al.* (2020) obtiveram CIM de 0,84 a 1,68 mg/mL usando amostras de extratos de própolis verdes originárias do Paraná contra diferentes isolados de *C. albicans* de pacientes com candidíase vaginal.

O EP de Jataí *in natura* do Paraná (J) apresentou CIM de 0,02 mg/mL para *C. albicans* e 0,15 mg/mL para *C. krusei* e o EP de Jataí comercial do Distrito Federal (JPC) apresentou CIM <0,01 mg/mL para *C. albicans* e 0,02 mg/mL para *C. krusei* (Tabela 2). Peter (2015) analisou extratos de própolis de Jataí originárias do RS e obteve CIM e CBM de 54,9 mg/mL para o gênero *Candida* spp. Isso demonstra que extratos de própolis de abelhas Jataí podem produzir efeito fungicida contra espécies de *Candida* a depender da concentração do EP, sugerindo que em certas concentrações os ativos da própolis podem não estar em quantidades suficientes.

A atividade antifúngica de EP de Mandaçaia foi testada por Santos *et al.* (2017) que encontraram CIM de 20,5 mg/mL e CBM de 28,3 mg/mL. De acordo Salatino *et al.* (2019), não se estudou muito sobre as própolis de abelhas sem ferrão, apesar disso há dados disponíveis que indicam que este tipo de própolis possui certa semelhança com as própolis das abelhas *Apis mellifera* com ferrão. Sugere-se que as atividades biológicas das própolis brasileiras sejam devidas ao alto teor de compostos fenólicos (ROCHA *et al.*, 2013).

Ao comparar os resultados deste estudo com resultados de EP de outros países, Sierra *et al.* (2019) usaram extratos de própolis de abelhas sem ferrão *Melipona beechi* originárias do México, e obtiveram CIM de 0,02 mg/mL para *C. albicans*, semelhante ao EP Jataí (J). Tamfu *et al.* (2020) analisaram compostos

isolados de amostras de EP obtidas em Camarões, e obtiveram CIM de 0,16 mg/mL para *C. krusei*.

Diversos efeitos da própolis na saúde bucal têm se mostrado eficaz, o que levaram seu uso em doenças periodontais (HUSAIN *et al.*, 2017). Extratos de própolis vermelha brasileiras analisadas por Siqueira *et al.* (2015), tiveram CIM de 0,03–0,06 mg/mL para espécies de *Candida* isoladas de pacientes com periodontite crônica.

Verifica-se ainda que as propriedades antifúngicas da própolis estão relacionadas com seus diversos constituintes, como a crisina e derivados do ácido cinâmico, e essas informações podem contribuir para selecionar moléculas e amostras da própolis para melhorar a eficácia em tratamentos antifúngicos (PEIXOTO *et al.*, 2022). Portanto, as própolis têm demonstrado bons resultados para serem utilizados como uma nova alternativa, visando solucionar o problema de resistência encontrado nos antifúngicos convencionais.

## 7 CONCLUSÃO

Os extratos de própolis brasileiros analisados neste estudo, especialmente os verdes, demonstraram ter atividade antifúngica contra *C. albicans* e *C. krusei*. Inúmeros estudos demonstram que as diferentes espécies de *Candida* são um grande problema de infecções oportunistas e a própolis é um produto natural, eficaz, de baixo custo e que está disponível para a população brasileira, podendo oferecer grande ajuda na prevenção e tratamento de candidíases.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. K. F. Imunopatogenese da *Candida albicans*: uma revisão bibliográfica. **Mostra Científica em Biomedicina**, v. 1, n. 1, 2016.

ALMUHAYAWI, M. S. Propolis as a novel antibacterial agente. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.27, ed.11, p.3079-3086, 2020.

ANDRE. *et al.* Antimicrobial activity of propolis extract and their application as a natural preservative in livestock products: a meta-analysis. **Food Science of Animal Resources**, p. 280-294, 2022.

ARAUJO, I. M. *et al.* Caracterização sistemática da resposta imune à infecção por *Candida*. **Brazilian Journal of Health Review**, 2020.

AUHUSTSINOVICH. Shutterstock. **Bee propolis and honey delicious, useful and medicinal products**. Disponível em: < <https://www.shutterstock.com/pt/image-photo/bee-propolis-honey-delicious-useful-medicinal-333377492> >. Acesso em: 13 de fev. de 2023.

AVILA, S. *et al.* **Mel de mandacaria - *Melipona quadrifasciata* (Lepeletier): parâmetros físico-químicos e espectro polínico**. Comunicado Técnico da EMBRAPA, 2016.

AWAWDEH, L. *et al.* The antifungal effect of propolis endodontic irrigant with three other irrigation solutions in presence and absence of smear layer: an in vitro study. **Iranian Endodontic Journal**, p. 234-239, 2018.

BARREIRAS, D. G. *et al.* Eficácia da ação antimicrobiana do extrato de própolis de abelha jataí (*Tetragonisca Angustula*) em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Caderno de Ciências Agrárias**, 2020.

BEZERRA, C. R. F. *et al.* Highly efficient antibiofilm and antifungal activity of green propolis against *Candida* species in dentistry materials. **PLOS ONE**, 2020.

BOUCHELACHEM, S. Propolis characterization and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.29, p. 1936-1946, 2022.

BRASIL. 2001. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 3 de 19 de janeiro de 2001. **Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis**. Brasília, Diário Oficial, 2001.

BRASIL. 2016. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 97, de 1º de agosto de 2016. **Altera a Resolução - RDC nº 24, de 14 de junho de 2011**. Sistemas de Legislação da Saúde. 2016.

BRASIL. 2018. Ministério da Saúde. Portaria nº 702 de 21 de março de 2018. **Altera a Portaria de Consolidação nº 2/GM/MS, de 28 de setembro de 2017, para incluir novas práticas na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares – PNPIC**. Brasília, Diário Oficial, 2018.

BRASIL. 2021. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento / Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria/SDA Nº 486, de 22 de dezembro de 2021. **Submete à Consulta Pública, as normas higiênico sanitárias e tecnológicas para produtos de abelhas, mel, cera de abelha e derivados**. Brasília, Diário Oficial, 2021.

BRASIL. 2022. Ministério da Saúde. **Pacientes imunocomprometidos ou com infecções fúngicas terão novas opções de tratamento pelo SUS**: Medicamentos foram incorporados após recomendação da Conitec. Sapude e Vigilância Sanitária, 9 de ago. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/agosto/pacientes-imunocomprometidos-ou-com-infeccoes-fungicas-terao-novas-opcoes-de-tratamento-pelo-sus>>. Acesso em: 29 de dez. de 2022.

CAMPOS, J. F. *et al.* Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-11, 2015.

CAPOCI, I. R. G. *et al.* Propolis is an efficient fungicide and inhibitor of biofilm production by vaginal *Candida albicans*. **Evidence-Based Complement and Alternative Medicine**, p. 287–693 ,2015.

CARDOZO, D. Variabilidade química de geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí. **Revista Virtual de Química**. p. 2457-2474, 2015.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**, Tenth Edition. CLSI document M07A10, Wayne, Pennsylvania, USA, 2015.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard**, Eleventh Edition. CLSI document M02-A1, Wayne, Pennsylvania, USA, 2012.

CORRÊA, J. L. *et al.* Propolis extract has bioactivity on the wall and cell membrane of *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, 2020.

CRUZ, F. B. *et al.* Avaliação da atividade anti-inflamatória de própolis de abelha *Apis mellifera*: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, 2021.

CRUZ, F. B. *et al.* Fatores de heterogeneidade do potencial antioxidante da própolis da abelha *Apis mellifera*: uma revisão. **Infarma Ciências Farmacêuticas**, p. 58-85, 2022.

FREIRES, I. A. *et al.* Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. **Journal de Mycologie Médicale**, p 122-132, 2016.

GNIEWOSZ, M. *et al.* Characterization and antifungal activity of pullulan edible films enriched with propolis extract for active packaging. **Foods**. 2022

GRAVIRIA, M. G.; MONTES, H. M. M. Current aspects in the biology, pathogeny, and treatment of *Candida krusei*, a neglected fungal pathogen. **Infection and Drug Resistance**. 2020.

GUCWA, K. *et al.* Antifungal activity and synergism with azoles of Polish Propolis. **Pathogens**, v. 7, n. 2, p. 56, 2018.

HUSAIN, S. *et al.* Chitosan Biomaterials for Current and Potential Dental Applications. **Materials**, 2017.

LARA, A. E.; GIL, L. D. Caso clínico: Meningoencefalitis por *Candida krusei*. **La Ciencia al Servicio de la Salud y la Nutrición**, v. 8, n.2, 2017.

LÓPEZ B. G. C. *et al.* Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chem.** 2014. p.174–180.

MALASPINA, O.; PALMA, M. S. **Própolis brasileira: controle de qualidade e legislação**. Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP, 2015.

MARGRAF, C. Shutterstock. **Bee native to Brazil, known as mandaçaia scientific name is *Melipona quadrifasciata***. Disponível em: <<https://www.shutterstock.com/pt/image-photo/bee-native-brazil-known-scientific-name-1785612692>>. Acesso em: 10 de fev. de 2023.

NAVARRO-ARIAS, M. J. *et al.* Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. **Infection and Drug Resistance**. p. 783–794, 2019.

PAPP, Z. *et al.* The Scent of Antifungal Propolis. **Sensors**, 2021.

PASUPULETI, V. R. *et al.* Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017

PAZIN, W. M. *et al.* Antioxidant activities of three stingless bee propolis and green propolis types. **J. Apic. Res.**, v. 56, p. 40–49, 2017.

PEDROSO, R. S. *et al.* Sensibilidade de isolados de *Candida* spp. a antifúngicos por disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo. **Bioscience Journal**. p. 304-311, 2014.

PEIXOTO, M. *et al.* Mixing Propolis from Different Apiaries and Harvesting Years: Towards Propolis Standardization? **Antibiotics**, 2022.

PEREIRA, L. V. A. C. *et al.* In vitro analysis of the antifungal activity of plant extracts against yeasts belonging to the *Candida albicans* species. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, 2021.

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

PORTILHO, D. R. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. **Revista Científica do ITPAC**, v. 6, n. 2, 2013.

PRUDEK, D. Istockphoto. **Detalhe de abelha ou abelhas, *Apis mellifera* - Imagem em Alta Resolução**. Disponível em < <https://www.istockphoto.com/br/foto/detalhe-de-abelha-ou-abelhas-apis-mellifera-gm647325060-117437281> >. Acesso em: 14 de fev. de 2023.

RISTIVOJEVIĆ, P. *et al.* Profiling of Turkish propolis subtypes: Comparative evaluation of their phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities. **LWT - Food Science and Technology**, v. 95, p. 367–379, 2018.

ROCHA, B. A. *et al.* Evaluation of a propolis water extract using a reliable RP-HPLC methodology and in vitro and in vivo efficacy and safety characterization. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 11 p., 2013.

ROCHA, W. R. V. *et al.* Gênero *Candida* - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**. 2021

RODRIGUES, C. F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. **Eur. J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 6, 2014.

SACHIVKINA, N.; PODOPRIGORA, I.; BOKOV, D. Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. **Veterinary World**. 2021.

SALATINO, A. *et al.* The emerging market of propolis of stingless bees in tropical countries. **MOJ Food Processing e Technology**, 2019.

SANTOS, C. M. *et al.* Chemical composition and pharmacological effects of geopropolis produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017.

SANTOS, G. C. O. *et al.* Candida infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. **Front. Microbiol.**, 2018.

SIERRA, J. R. *et al.* Partial characterization of ethanolic extract of *Melipona beecheii* propolis and in vitro evaluation of its antifungal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2019.

SILVA, F. R. G. *et al.* Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities of the red propolis Alagoas. **Brazilian Journal of Biology**, 2019.

SILVA, K. G. V. *et al.* Morfologia, epidemiologia e virulência de espécies do gênero *Candida*. **Tópicos nas ciências da saúde**, p. 42-58. 2021.

SIQUEIRA, A. B. S. *et al.* Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis. **Brazilian Oral Research**, 2015.

SOARES, A. L. F. *et al.* Identidade e qualidade de diferentes extratos de própolis. **Revista Gestão em Foco**, 2017.

SOARES, D. M. *et al.* Candidíase vulvovaginal: uma revisão de literatura com abordagem para *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, 2019.

SOBREIRA, A. L. C. *et al.* Atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis vermelha contra isolados patogênicos de *Candida* spp. **Revista Verde**, p. 429-433, 2020.

SOUZA, J. S. *et al.* A incidência de doenças causada por leveduras *Cândida albicans*, *glabrata* e *tropicalis*. **Brazilian Journal of Development**, p.76325-76338, 2022.

SRIVASTAVA, V.; SINGLA, R.K., DUBEY, A.K. Emerging virulence, drug resistance and future anti-fungal drugs for *Candida* pathogens. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 18, p. 759–778, 2018.

SUREK, M. *et al.* Chemical composition, cytotoxicity, and antibacterial activity of propolis from Africanized honeybees and three different Meliponini species. **Journal of Ethnopharmacology**, 2021.

TAMFU, A. N. *et al.* A new isoflavonol and other constituents from Cameroonian propolis and evaluation of their anti-inflammatory, antifungal and antioxidant potential. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p. 1659–1666, 2020.

TURRINI, P. Istockphoto. **Abelha Jataí voando foto macroabelha *Tetragonisca angustula* - Imagem em Alta Resolução.** Disponível em: < <https://www.shutterstock.com/pt/image-photo/bee-tetragonisca-angustula-flying-macro-photo-794158639> >. Acesso em: 11 de fev. de 2023.

TURNER, S. A.; BUTLER, G. The *Candida* pathogenic species complex. Cold Spring Harb. **Perspect. Med.**, v. 4, 2014.

VICĂ, M. L. *et al.* Qualitative Characterization and Antifungal Activity of Romanian Honey and Propolis. **Antibiotics**, 2022.

VIEIRA F.; NASCIMENTO T. Resistência a Fármacos Antifúngicos por *Candida* e Abordagem Terapêutica: *Candida* Antifungal Resistance and Therapeutic Approach. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**. 2017. p.161-168.

## APÊNDICES

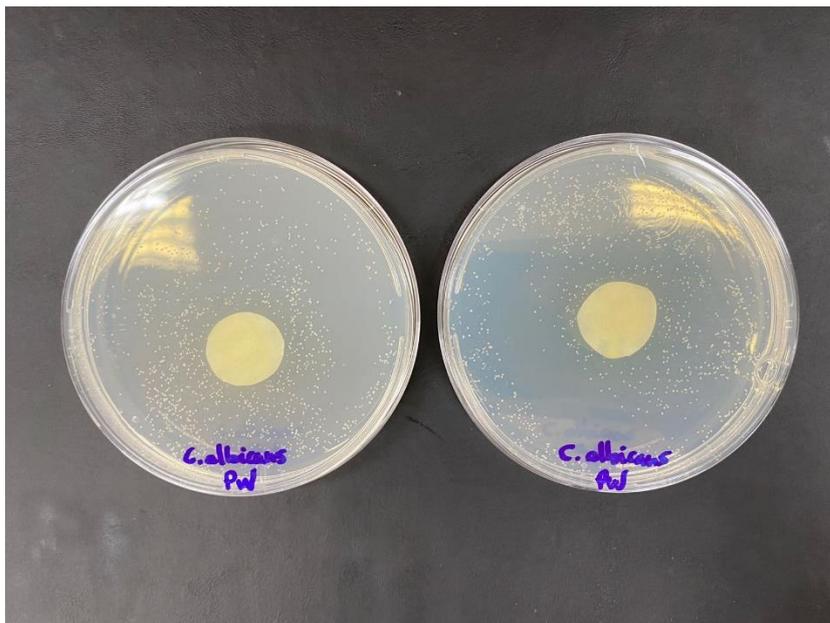
### APÊNDICE 1 - Atividade antifúngica por ensaio de disco-difusão em *C. albicans*



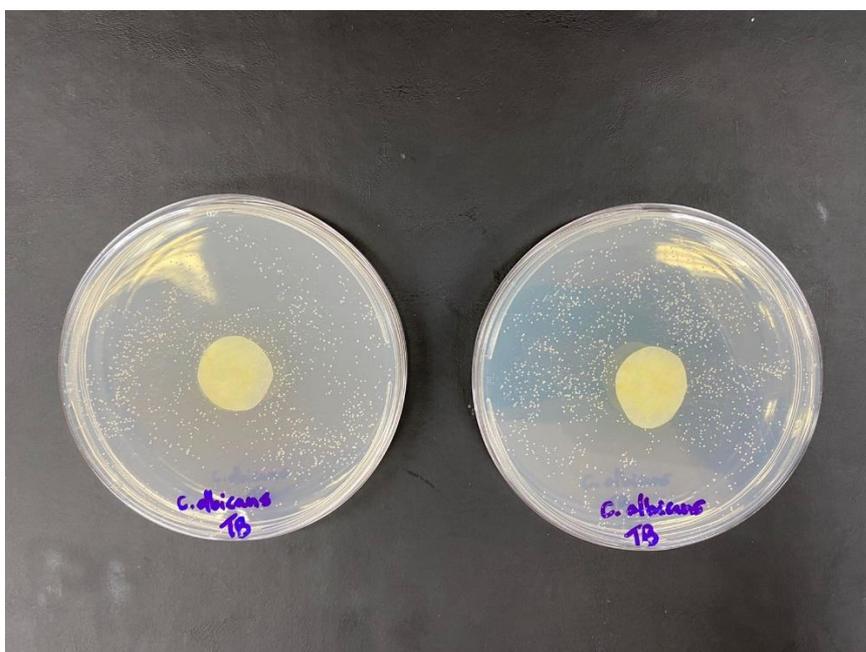
APÊNDICE 1.1 - Imagens das placas com *C. albicans* nos ensaios de atividade antifúngica por disco-difusão dos extratos de própolis verde comercial A, Distrito Federal.



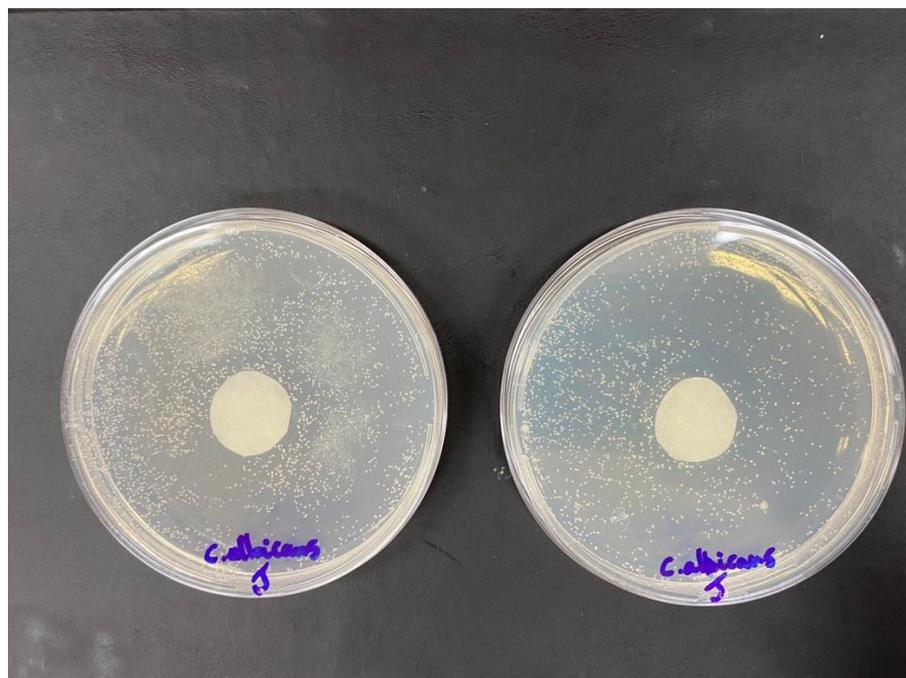
APÊNDICE 1.2 - Imagens das placas com *C. albicans* nos ensaios de atividade antifúngica por disco-difusão dos extratos de própolis verde comercial PC, Distrito Federal.



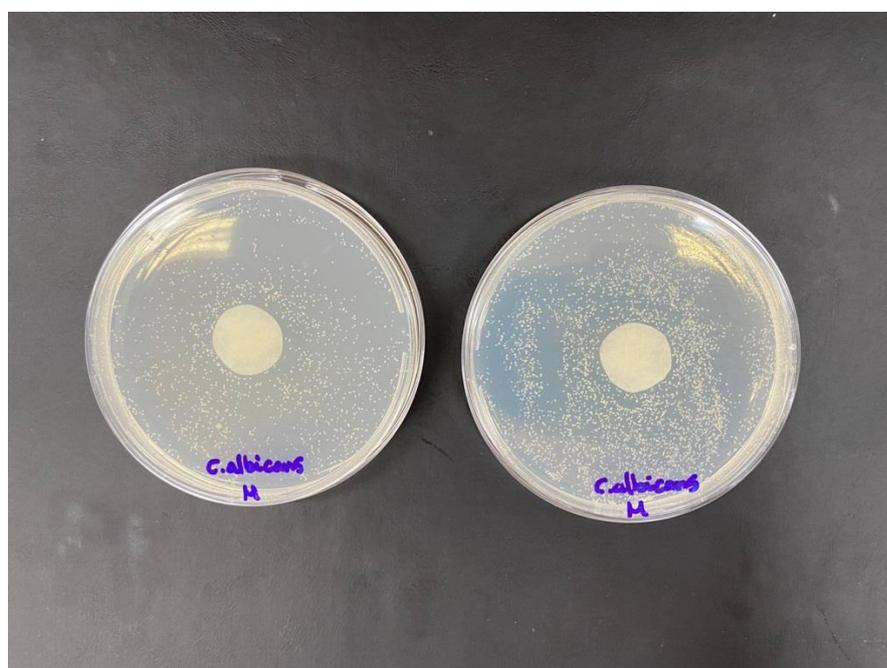
**APÊNDICE 1.3 -** Imagens das placas com *C. albicans* nos ensaios de atividade antifúngica por disco-difusão dos extratos de própolis verde comercial PW, Distrito Federal.



**APÊNDICE 1.4 -** Imagens das placas com *C. albicans* nos ensaios de atividade antifúngica por disco-difusão dos extratos de própolis verde comercial TB, Distrito Federal.



APÊNDICE 1.5 - Imagens das placas com *C. albicans* nos ensaios de atividade antifúngica por disco-difusão dos extratos de própolis de Jataí *in natura*, Paraná.



APÊNDICE 1.6 - Imagens das placas com *C. albicans* nos ensaios de atividade antifúngica por disco-difusão dos extratos de própolis de Mandaçaia *in natura*, Santa Catarina.



**APÊNDICE 1.7 -** Imagens das placas com *C. albicans* nos ensaios de atividade antifúngica por disco-difusão dos extratos de própolis de Jataí, JPC, Distrito Federal.

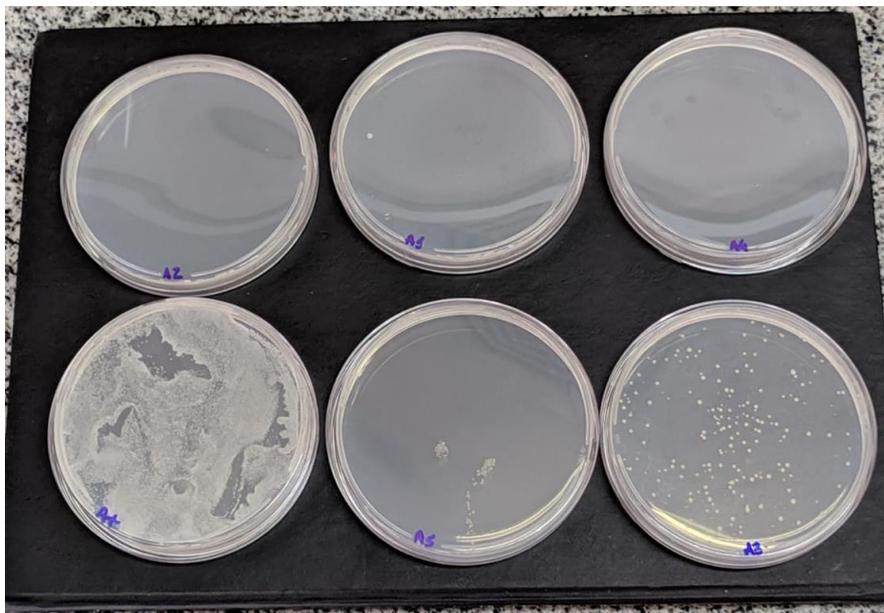


**APÊNDICE 1.8 -** Imagens das placas com *C. albicans* nos ensaios de atividade antifúngica por disco-difusão dos extratos de própolis de Mandaçaia, MPC, Distrito Federal.

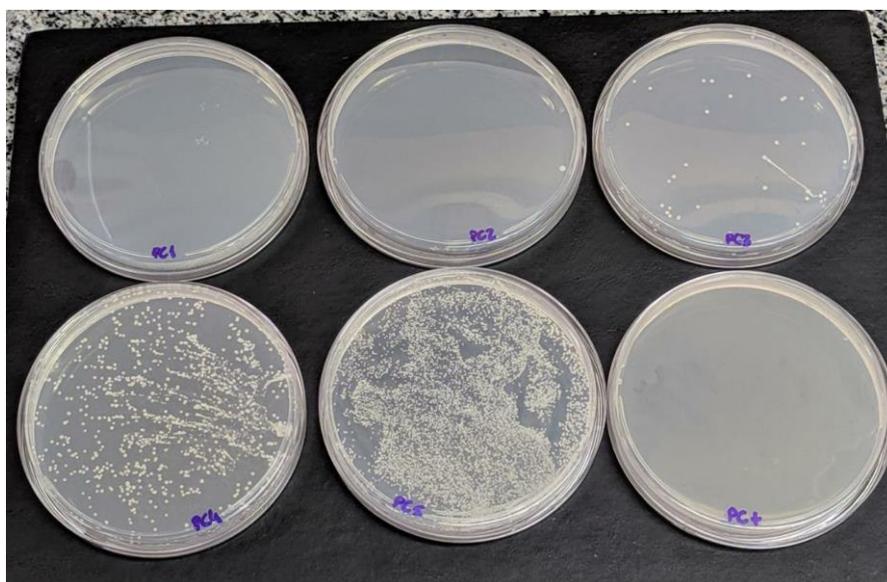


**APÊNDICE 1.9 -** Imagens das placas com *C. albicans* nos ensaios de atividade antifúngica por disco-difusão dos extratos de própolis de Mandaçaia MM, Rio Grande do Sul.

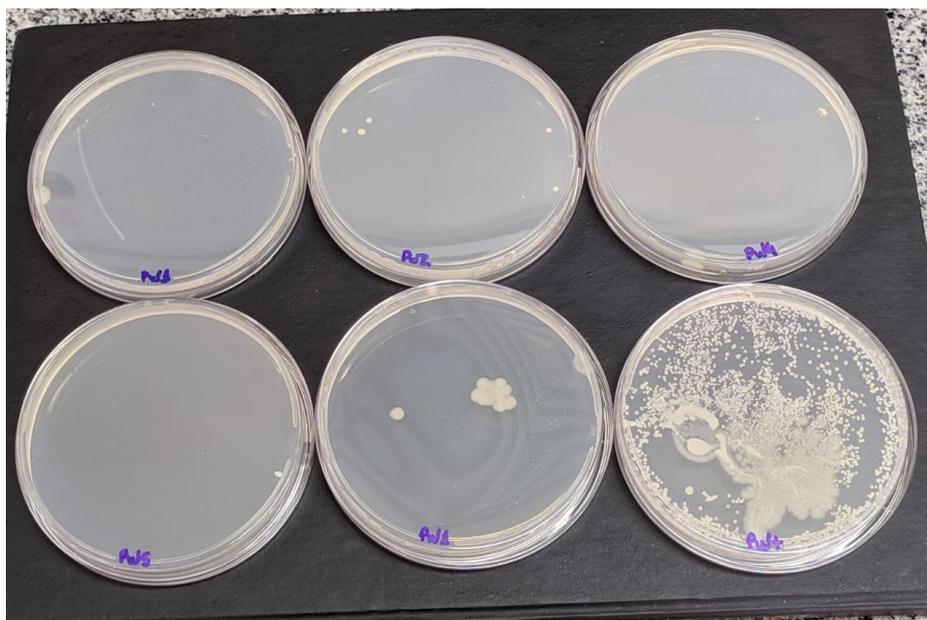
## APÊNDICE 2 - CBM para *C. albicans*



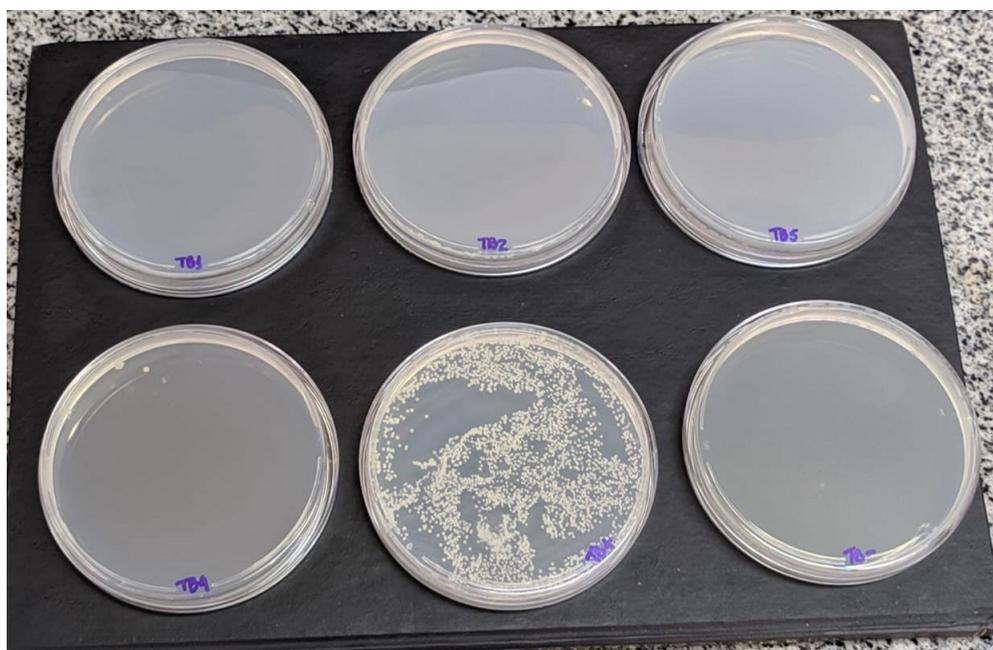
APÊNDICE 2.1 – Imagens das placas com *C. albicans* após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde A – DF (A): A1 – 0,2 mg/mL; A2 – 0,15 mg/mL; A3 – 0,10 mg/mL; A4 – 0,07 mg/mL; A5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



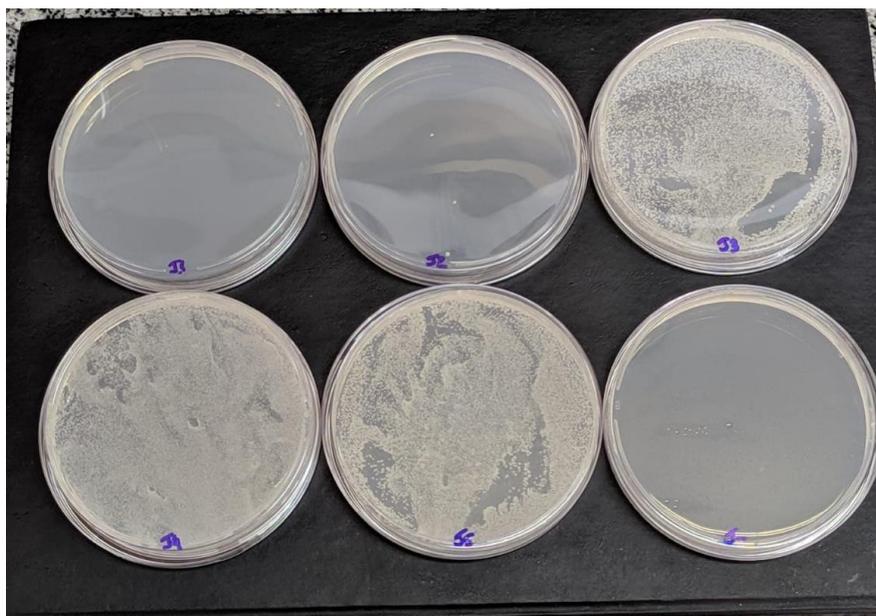
APÊNDICE 2.2 – Imagens das placas com *C. albicans* após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde PC – DF: PC1 – 0,2 mg/mL; PC2 – 0,15 mg/mL; PC3 – 0,10 mg/mL; PC4 – 0,07 mg/mL; PC5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



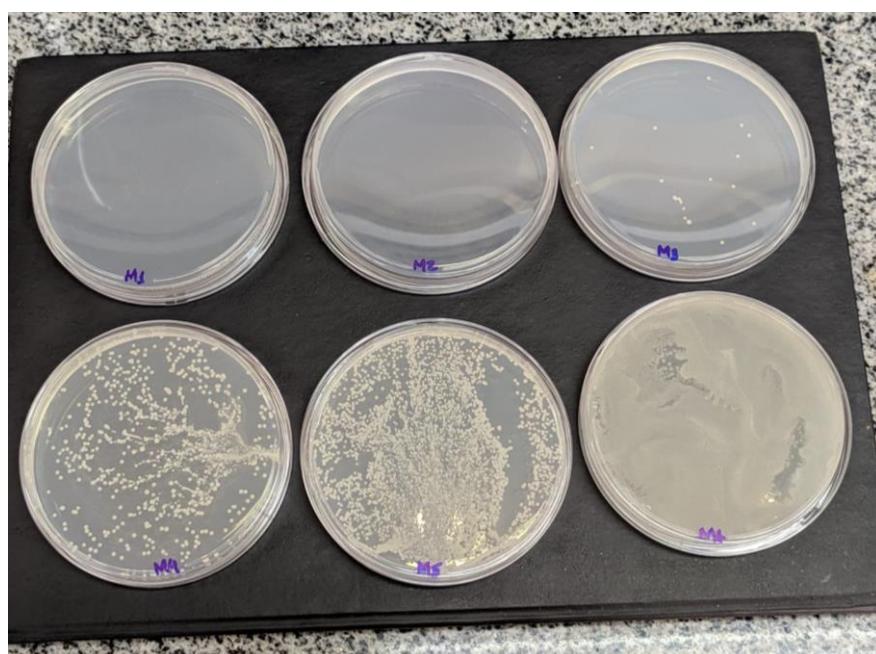
**APÊNDICE 2.3 –** Imagens das placas com *C. albicans* após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde PW – DF: PW1 – 0,2 mg/mL; PW2 – 0,15 mg/mL; PW3 – 0,10 mg/mL; PW4 – 0,07 mg/mL; PW5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



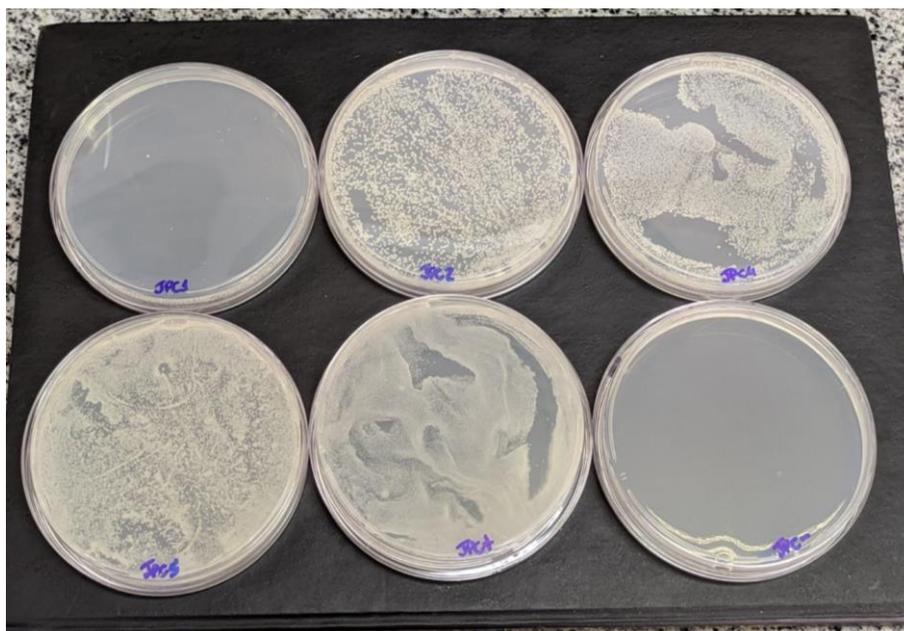
**APÊNDICE 2.4 –** Imagens das placas com *C. albicans* após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde TB – DF: TB1 – 0,2 mg/mL; TB2 – 0,15 mg/mL; TB3 – 0,10 mg/mL; TB4 – 0,07 mg/mL; TB5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



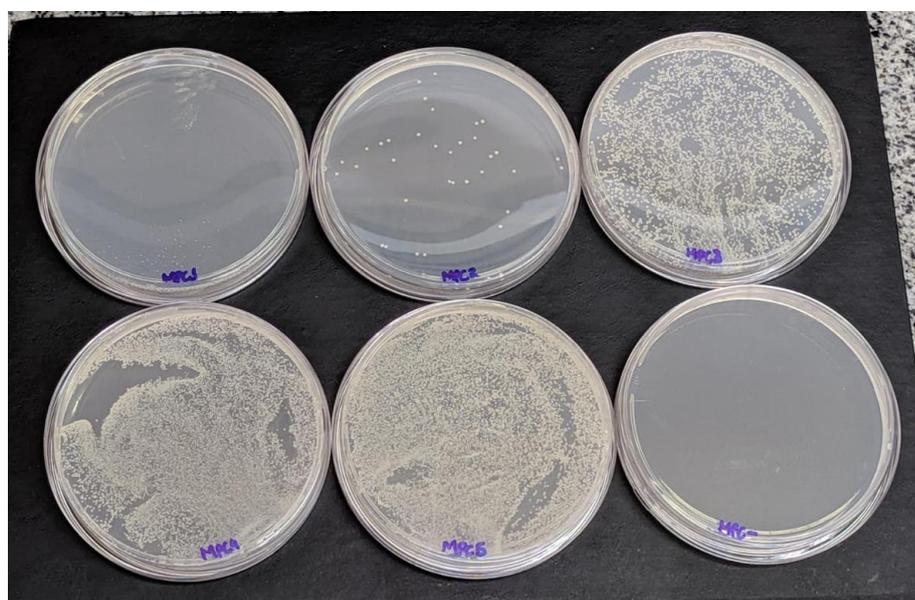
**APÊNDICE 2.5** – Imagens das placas com *C. albicans* após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis de Jataí *in natura*, Paraná (J): J1 – 0,2 mg/mL; J2 – 0,15 mg/mL; J3 – 0,10 mg/mL; J4 – 0,07 mg/mL; J5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



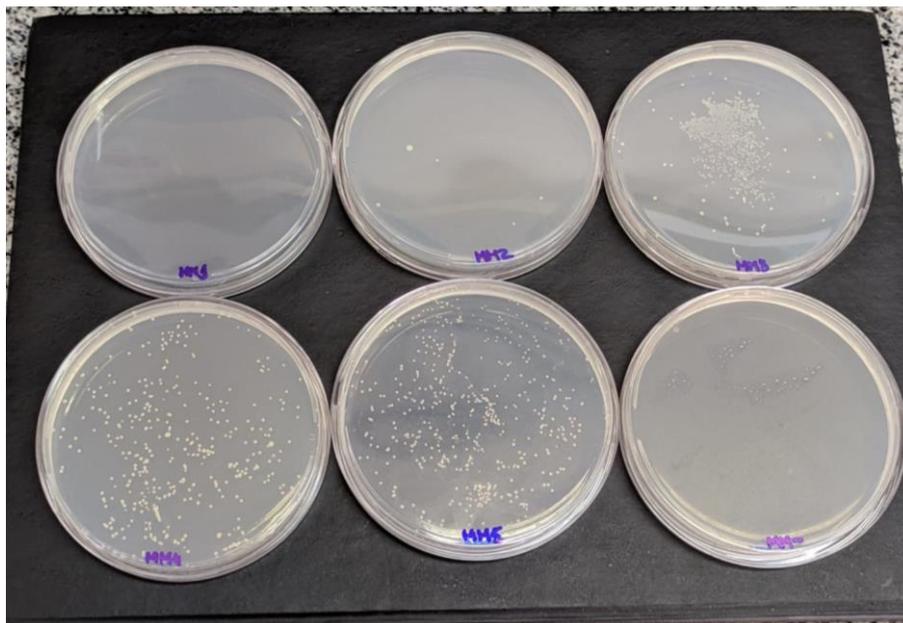
**APÊNDICE 2.6** – Imagens das placas com *C. albicans* ATCC após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis de Mandaçaia *in natura*, Santa Catarina (M): M1 – 0,2 mg/mL; M2 – 0,15 mg/mL; M3 – 0,10 mg/mL; M4 – 0,07 mg/mL; M5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



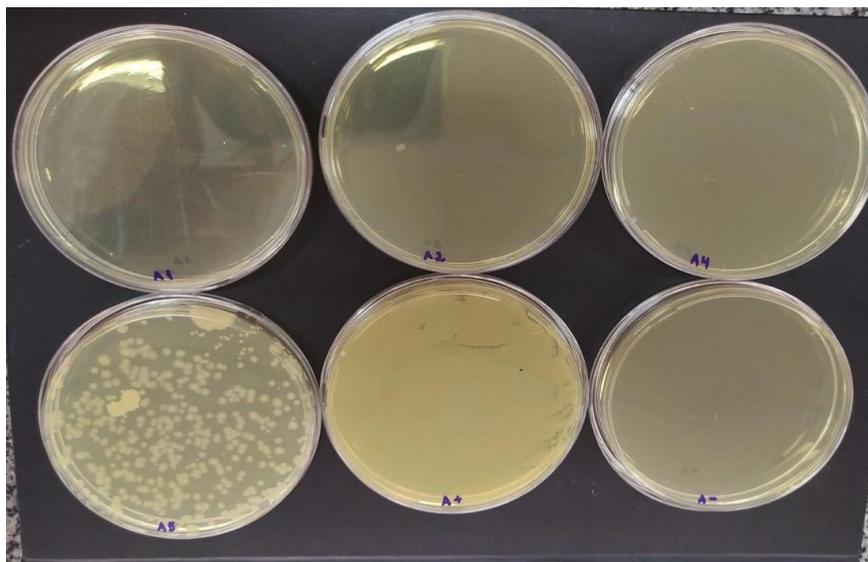
**APÊNDICE 2.7 –** Imagens das placas com *C. albicans* após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis de Jataí – DF (JPC): JPC1 – 0,2 mg/mL; JPC2 – 0,15 mg/mL; JPC3 – 0,10 mg/mL; JPC4 – 0,07 mg/mL; JPC5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



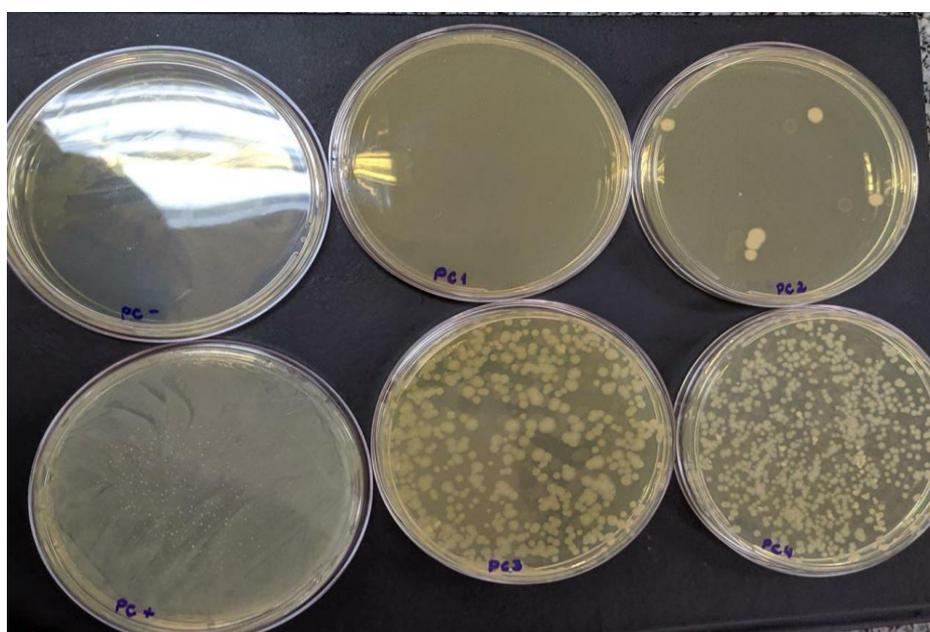
**APÊNDICE 2.8 –** Imagens das placas com *C. albicans* após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis de Mandaçaia – DF (MPC): MPC1 – 0,2 mg/mL; MPC2 – 0,15 mg/mL; MPC3 – 0,10 mg/mL; MPC4 – 0,07 mg/mL; MPC5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



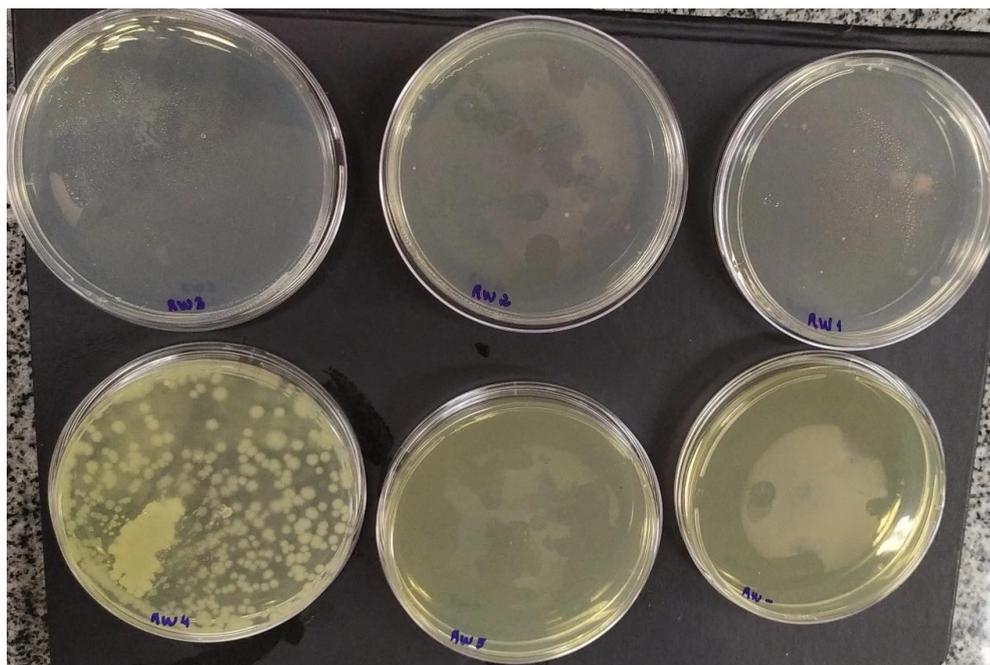
**APÊNDICE 2.9 –** Imagens das placas com *C. albicans* após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis de Mandaçaia RS (MM): MM1 – 0,2 mg/mL; MM2 – 0,15 mg/mL; MM3 – 0,10 mg/mL; MM4 – 0,07 mg/mL; MM5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

**APÊNDICE 3 - CBM para leveduras *C. krusei***

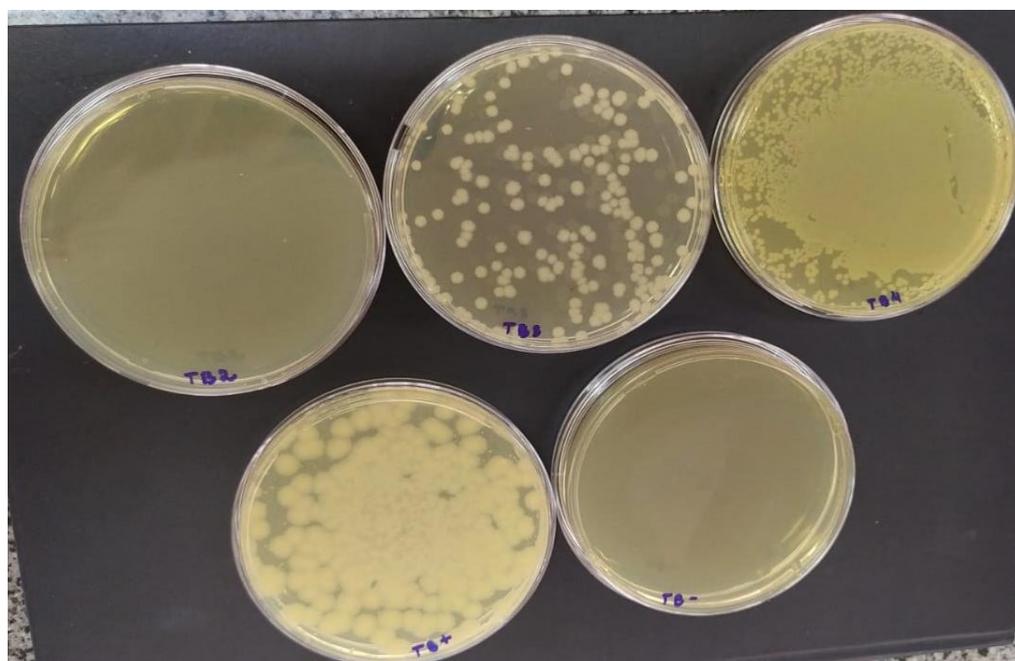
**APÊNDICE 3.1 –** Imagens das placas com *C. krusei* após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde DF (A): A1 – 0,2 mg/mL; A2 – 0,15 mg/mL; A3 – 0,10 mg/mL; A4 – 0,07 mg/mL; A5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



**APÊNDICE 3.2 –** Imagens das placas com *C. krusei* após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde DF (PC): PC1 – 0,2 mg/mL; PC2 – 0,15 mg/mL; PC3 – 0,10 mg/mL; PC4 – 0,07 mg/mL; PC5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



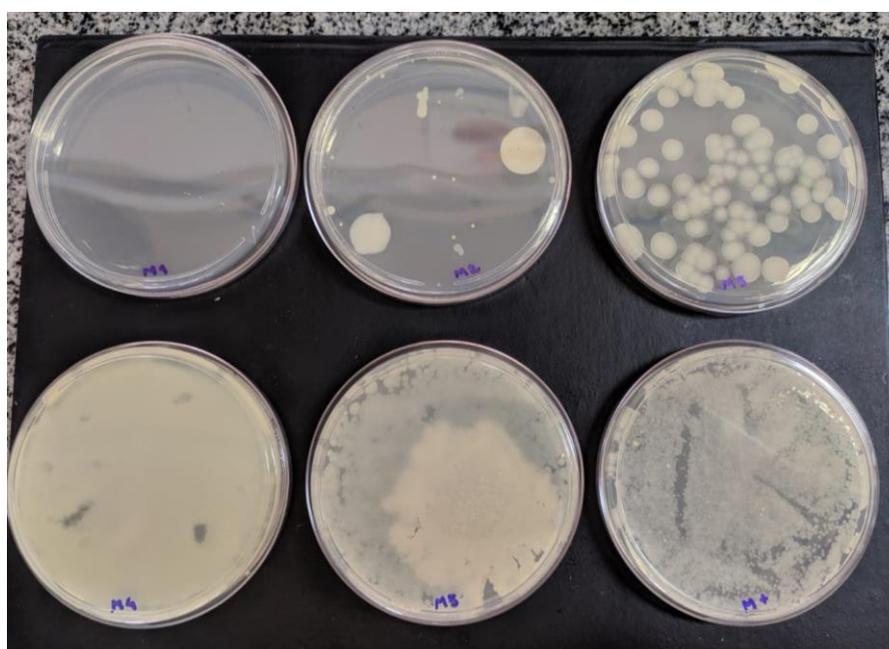
**APÊNDICE 3.3 –** Imagens das placas com *C. krusei* após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde DF (PW): PW1 – 0,2 mg/mL; PW2 – 0,15 mg/mL; PW3 – 0,10 mg/mL; PW4 – 0,07 mg/mL; PW5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



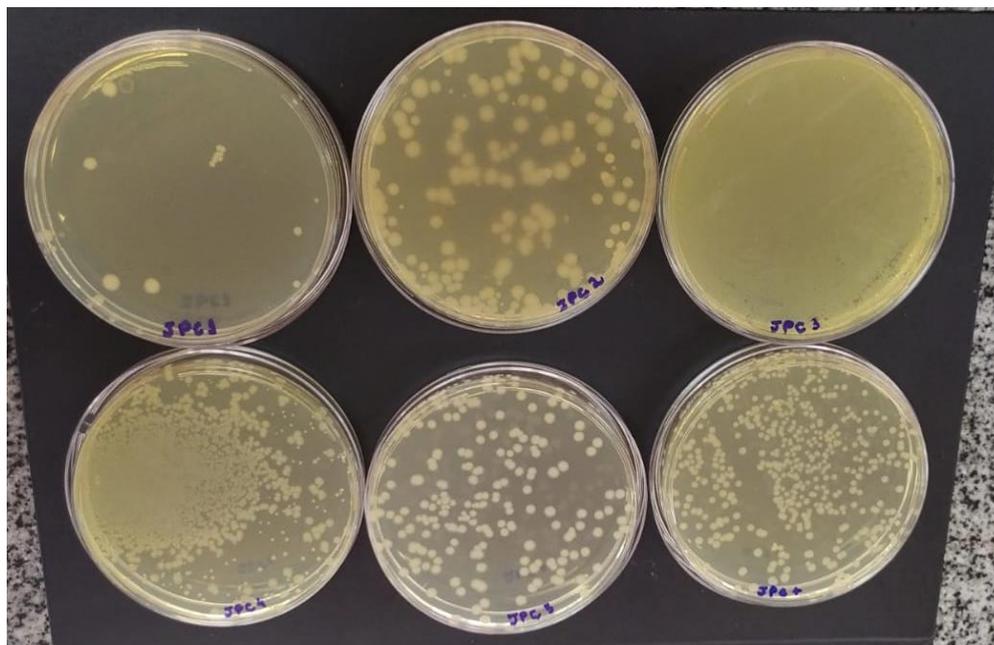
**APÊNDICE 3.4 –** Imagens das placas com *C. krusei* após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde DF (TB): TB1 – 0,2 mg/mL; TB2 – 0,15 mg/mL; TB3 – 0,10 mg/mL; TB4 – 0,07 mg/mL; TB5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



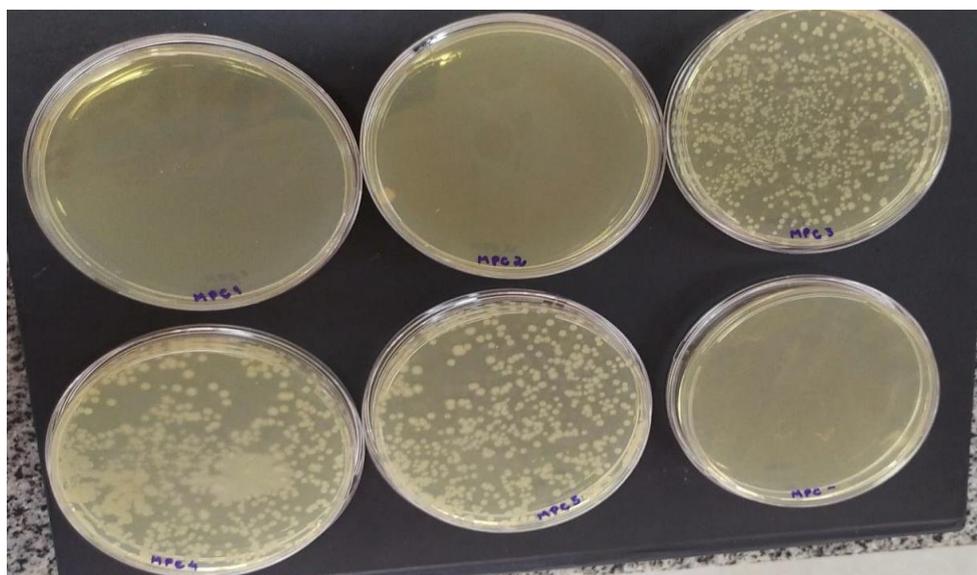
**APÊNDICE 3.5 –** Imagens das placas com *C. krusei* após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis de Jatáí *in natura*, Paraná (J): J1 – 1 mg/mL; J2 – 0,5 mg/mL; J3 – 0,3 mg/mL; J4 – 0,25 mg/mL; J5 – 0,2 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



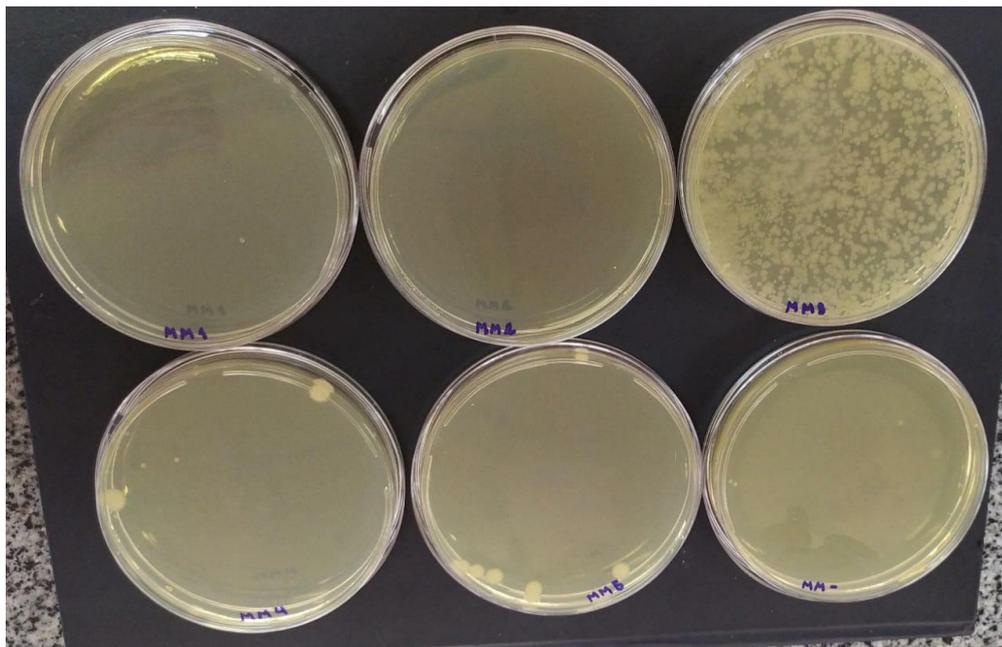
**APÊNDICE 3.6 –** Imagens das placas com *C. krusei* após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis de Mandaçaia *in natura*, Santa Catarina (M): M1 – 0,2 mg/mL; M2 – 0,15 mg/mL; M3 – 0,10 mg/mL; M4 – 0,07 mg/mL; M5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



**APÊNDICE 3.7 –** Imagens das placas com *C. krusei* após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis de Jataí, DF (JPC): JPC1 – 0,2 mg/mL; JPC2 – 0,15 mg/mL; JPC3 – 0,10 mg/mL; JPC4 – 0,07 mg/mL; JPC5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

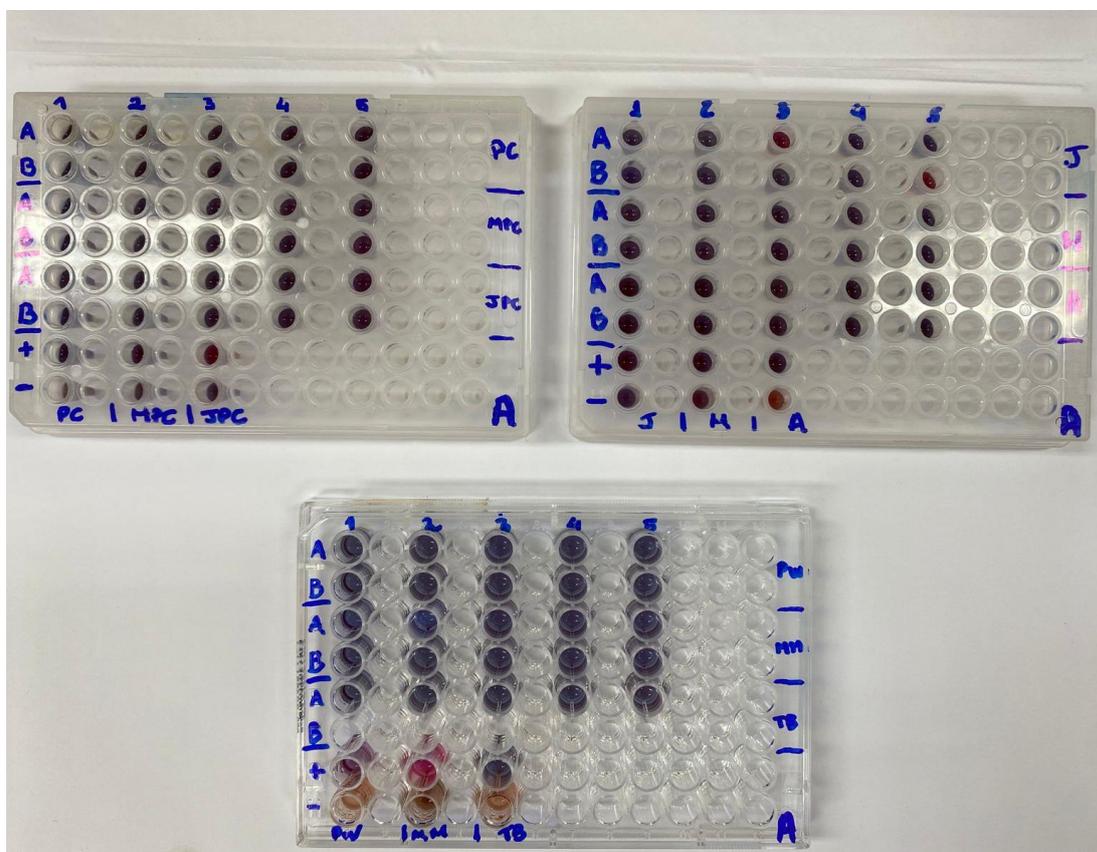


**APÊNDICE 3.8 –** Imagens das placas com *C. krusei* ATCC após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis de Mandaçaia, DF (MPC): MPC1 – 0,2 mg/mL; MPC2 – 0,15 mg/mL; MPC3 – 0,10 mg/mL; MPC4 – 0,07 mg/mL; MPC5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



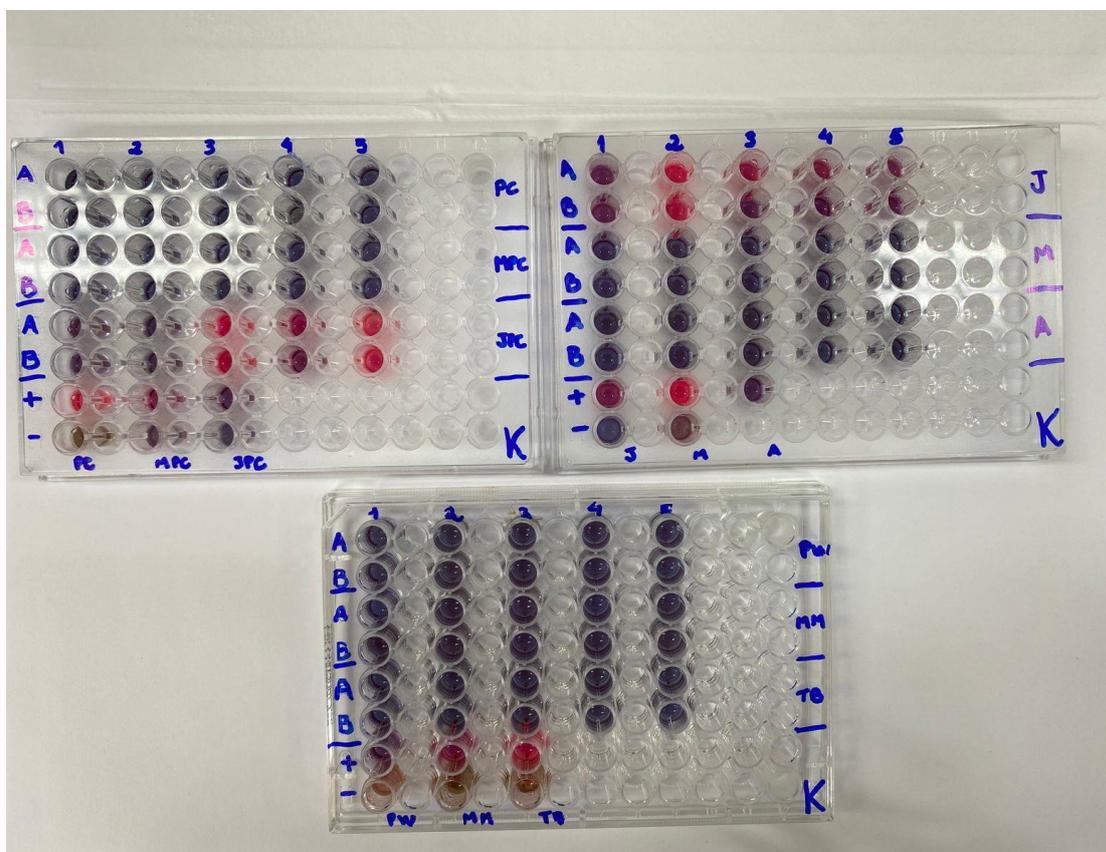
**APÊNDICE 3.9 –** Imagens das placas com *C. krusei* ATCC após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis de Mandaçaia RS (MM): MM1 – 0,2 mg/mL; MM2 – 0,15 mg/mL; MM3 – 0,10 mg/mL; MM4 – 0,07 mg/mL; MM5 – 0,06 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

**APÊNDICE 4 – Determinação da CIM utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular para *C. albicans***



**APÊNDICE 4.1.** Imagem da determinação da CIM em microplaca utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular, (*C. albicans*) e os extratos de própolis: 1 (VERDE PC), 2 (MANDAÇAIA MPC), 3 (JATAÍ JPC), 4 (JATAÍ J), 5 (MANDAÇAIA M), 6 (VERDE A), 7 (VERDE PW), 8 (MANDAÇAIA MM) e 9 (VERDE TB). Cor azul = morte celular e cor e rosa fluorescente = resazurina reduzida a resorufina pelas enzimas óxido-redutases presentes nas células vivas.

**APÊNDICE 5 - Determinação da CIM utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular para *C. krusei***



**APÊNDICE 5.1.** Imagem da determinação da CIM em microplaca utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular, (*C. krusei*) e os extratos de própolis: 1 (VERDE PC), 2 (MANDAÇAIA MPC), 3 (JATAÍ JPC), 4 (JATAÍ J), 5 (MANDAÇAIA M), 6 (VERDE A), 7 (VERDE PW), 8 (MANDAÇAIA MM) e 9 (VERDE TB). Cor azul = morte celular e cor e rosa fluorescente = resazurina reduzida a resorufina pelas enzimas óxido-redutases presentes nas células vivas.