



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**GEONE PIMENTEL DOS SANTOS BULHÕES DE ALMEIDA**

**Atividade Antifúngica *in vitro* de Extrato da Própolis Vermelha de Alagoas  
em *Candida* spp. Isoladas de Pacientes com Candidíase Vulvovaginal**

**MACEIÓ**

**2017**

**GEONE PIMENTEL DOS SANTOS BULHÕES DE ALMEIDA**

**Atividade Antifúngica *in vitro* de Extrato da Própolis Vermelha de Alagoas  
em *Candida* spp. Isoladas de Pacientes com Candidíase Vulvovaginal**

Dissertação do Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Rui Machado Reys

Coorientação: Profa. Dra. Fernanda Cristina  
de Albuquerque Maranhão

**MACEIÓ**

**2017**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

A447a Almeida, Geone Pimentel dos Santos Bulhões de.  
Atividade antifúngica *in vitro* de extrato da própolis vermelha de Alagoas em *Candida* SSP. Isoladas de pacientes com candidíase vulvovaginal / Geone Pimentel dos Santos Bulhões de Almeida. – 2020.  
89 f. : il. color.

Orientador: José Rui Machado Reys.  
Co-orientadora: Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão.  
Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 70-84.

Anexos: f. 85-87.

Apêndice: f. 88-89.

1. Candidíase vulvovaginal. 2. Própole - Alagoas. 3. Antifúngicos. I. Título.

CDU: 615.282:618.16



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Ata de Exame de Dissertação

Aos **sete dias** do mês de **dezembro** de **2017**, as quatorze horas, na Sala 214 da ESENFAR/UFAL, a banca examinadora composta pelos docentes doutores e pelas docentes doutoras, José Rui Machado Reys; Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão; Maria Aline Barros Fidelis de Moura, Ticiano Gomes do Nascimento e Eurípides Alves da Silva Filho, para Exame de Defesa da Dissertação intitulada: "**Atividade antifúngica in vitro de Extrato da Própolis Vermelha de Alagoas em Candida spp. isoladas de Pacientes com Candidíase Vulvovaginal**", elaborada pela Mestranda **Geone Pimentel dos Santos Bulhões de Almeida**, regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Nível Mestrado, sob a orientação do **Prof. Dr. José Rui Machado Reys**, que presidiu os trabalhos, além da co-orientação da **Profa. Dra. Fernanda Cristina Albuquerque Maranhão**. Após apresentação por 35 minutos, a mestranda foi arguida pela banca. Em seguida, reunidos em sessão secreta às 16:00 horas, os examinadores emitiram o seguinte parecer: aprovada mediante correções sugeridas pela banca.

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 16:25 horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, Secretário do PPGCF, Mestrado, lavrei a presente ata que será assinada pela Banca Examinadora e pela Mestranda. **Maceió, 07 de dezembro de 2017.**

**Presidente (Orientador):** José Rui Machado Reys

José Rui Machado Reys.

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão

Ticiano Gomes do Nascimento. / Tamaraculifej

**Examinador Interno:** Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento

Ticiano Gomes do Nascimento.

**Examinadora Interna:** Maria Aline Barros Fidelis de Moura

Maria Aline Barros Fidelis de Moura.

**Examinador Externo:** Prof. Dr. Eurípides Alves da Silva Filho

Eurípides Alves da Silva Filho.

**Mestranda:** Geone Pimentel dos Santos Bulhões de Almeida

Geone Pimentel dos Santos Bulhões de Almeida.

## **OFEREÇO**

*A minha família e especialmente, meus filhos Bruna Adriana, Mariana Liz e Tiago Henrique, tão pequenos, mas seus carinhos e perspectivas de bons tempos foram o incentivo para a conclusão deste trabalho.*

## **DEDICO**

*Meus Pais, George e Fátima, pelo apoio e alicerce em minha vida e por sempre acreditaram em mim  
Ao meu Amado Esposo, Tiago Adriano, que sempre apoiou meus sonhos e nunca me deixou desistir.*

*E aos meus irmãos Jamilly, Elton (cunhado/irmão) e George Antônio pelo suporte e orações.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre está presente na vida permitindo que TUDO seja segundo sua Vontade e providência!! Obrigada Senhor por seu amor tão presente e constante.

À Universidade Federal de Alagoas, pela oportunidade de ingressar no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Enfermagem e Farmácia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela apoio financeiro durante a realização da pesquisa.

Ao meu Orientador, Professor Dr. José Rui Machado Reys, pelo oportunidade para cursar o programa, pela preocupação e carinho dispensados constantemente.

A minha Coorientadora, Professora Dra. Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão, pelo acolhimento ao seu laboratório (LMC – Laboratório de Microbiologia Clínica), confiança, atenção, orientação, ensinamentos e disponibilidade prestados a todo momento de forma incondicional e sua paciência. Muito obrigada!!

A Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, nas pessoas da Professora Dra. Aline Fidelis pela dedicação e preocupação com aprimoramento do Programa.

Ao Corpo Docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos e palavras de incentivos.

Ao Professor Dr. Zenaldo Porfírio, meu Mestre e Amigo, obrigada pela atenção, preocupação e ensinamentos deste da graduação e palavras de incentivos e orientações durante toda essa jornada.

A Professora Dra. Maria Anilda dos Santos Araújo, pelos seus ensinamentos nos meus primeiros passos no mundo da Micologia durante a graduação e hoje pela ajuda e orientação durante o mestrado e atenção incondicional.

Ao Professor Dr. Ticiano Gomes do Nascimento, pela colaboração e apoio fornecidos através do seu laboratório e sua disponibilidade para ajudar em toda minha vida acadêmica e suas palavras de incentivo. Muito Obrigada!!

A Professora Dra. Denise Maria Wanderlei Silva, pelo apoio e disponibilidade para execução da análise estatística da pesquisa, bem como a disponibilidade de materiais e equipamentos do LabMICOL durante a execução dos experimentos. Muito Obrigada!!

Ao Professor Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho, pelo apoio para realização da pesquisa.

Ao Secretário do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Sr. Daniel de Brito, pela sua atenção e gentileza constante e palavras de incentivo.

Aos colegas de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos momentos de aprendizagem, descontração e risadas.

Aos amigos, conquistados no Laboratório de Microbiologia Clínica (LMC), Isabelle, Camila e Luiza, pelo carinho, atenção e ajuda constante.

Aos colegas do LabMicol (Laboratório de Micologia), Aline, Marcílio, Douglas e Luélida pela amizade e colaboração

A Técnica do Laboratório, Emilly Margete, pela amizade e palavras de sabedoria e carinho.

Aos Meus Pais George e Fátima pelo amor, apoio e ensinamentos concedidos durante minha vida, vocês são meu sustento e porto seguro! AMO vocês e OBRIGADA por CADA palavra e CADA gesto de afeto!!

Ao meu amado Tiago, obrigada por TUDO! Sem você nada disso seria possível! Te AMO e OBRIGADA!

A meus Filhos, Bruna, Mariana e Tiago, vocês são A ESSÊNCIA DA MINHA VIDA e fonte de esperança! AMO cada um de vocês, meu tesouro!

A meus irmãos, Jamilly e George, e ao meu cunhado Elton pelo disponibilidade em ficar com meus filhos quando precisei e pela preocupação! AMO vocês!

A minha família pela torcida, especialmente, aos meus tios Djalma e Selma, pelas orações e torcida! Amo vocês e obrigada pela presença constante em minha vida.

A minha sogra D. Ivonete que estava sempre disponível para cuidar dos meus filhos e me permitir executar as atividades das pesquisas e por suas palavras de esperança e confiança!

As minhas amigas de profissão e da vida, Flávia Soares, Elísia Maria, Karine Ataíde, Kátia Simone. Que mesmo não estando presente constantemente, sempre se preocuparam comigo e me colocaram em seus pensamentos e orações e estavam sempre disponível para ouvir minhas angústias e problemas que surgiram ao longo desta caminhada. Que bom saber que todas vocês existem na minha vida.

A Cada um, meu muito obrigada!!



*“Não há glória sem sacrifícios!”*

*“Não há nada impossível,  
porque os sonhos de ontem são as  
esperanças de hoje e podem  
converter-se em realidade  
amanhã”.*

***(Autor Desconhecido)***

## RESUMO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é considerada uma doença sexualmente transmissível segundo a OMS, causada por levedura do gênero *Candida*. No Brasil, é a segunda causa de infecções entre mulheres em idade fértil e sexualmente ativas. O tratamento terapêutico disponível para o tratamento com CVV é restrito a fármacos poliênicos e azólicos, e a resistência à agentes antifúngicos recomendados (cetoconazol/CET, fluconazol/FLU, itraconazol/ITR e nistatina/NIS) tem sido relatada com mais frequência em *Candida albicans*, a principal espécie associada, mas também em espécies de *Candida* não-*albicans* (p. ex, *C. glabrata*, *C. krusei* e do complexo de *C. parapsilosis*). A própolis é um composto resinoso produzido por abelhas *Apis mellifera* L. e é conhecido por possuir uma variedade de atividades biológicas, e a própolis vermelha de Alagoas (PVA) tem componentes como flavonóides que causam danos estruturais e funcionais contra microorganismos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de PVA (extrato de etanol e frações) contra diferentes espécies de *Candida*, focalizando isolados clínicos de CVV. Foram cultivadas cinco cepas de referência ATCC (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*) e 15 isolados clínicos (3 de cada espécie citada) de pacientes com CVV de Maceió/Alagoas em ágar Sabouraud Dextrose e CHROMagar®*Candida* separadamente, até 48h a 37°C. As suspensões de cada cultura de *Candida* foram ajustadas para 0,5 na escala McFarland em solução NaCl 0,9% para os testes de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA) pelos métodos de difusão de disco e microdiluição, conforme CLSI para CET, ITR, FLU, NIS, bem como EE e suas frações. Os programas JASP (versão 0.8.3.1) e IBM®SPSS (versão 23.0) foram adotados nas análises estatísticas. Observou-se que no TSA por disco-difusão e microdiluição tanto com antifúngicos comerciais como com EE e frações mostraram perfis de susceptibilidade variados para as espécies analisadas, principalmente entre os isolados clínicos quando comparados às cepas de referência. Pelo método disco-difusão todas as cepas ATCC foram susceptíveis a CET e NIS, mas houve resistência ao ITR e FLU principalmente em *C. glabrata* e *C. krusei*, inclusive padrão de co-resistência ITR/FLU confirmado em 9 isolados. Entre todos os isolados clínicos houve resistência a pelo menos 2 antifúngicos testados, sendo 8 resistentes a CET/ITR/FLU, drogas indicadas pelo RENAME (SUS) para tratamento de CVV. Os testes de microdiluição confirmaram que CET e NIS se mostraram mais efetivos, enquanto FLU e ITR tiveram menor atividade nas cepas de referência e alguns isolados clínicos. O método de microdiluição com a PVA mostraram CIM para as frações variando de 125 a 250 µg/mL, sendo constatado CIM de 500 µg/mL apenas para *C. parapsilosis* e *C. krusei* em relação às frações hexanólica e etanólica, respectivamente. A fração etanólica de PVA foi eficaz contra uma maior quantidade de cepas testadas, mas a fração acetanólica agiu com CIM mais baixo, provavelmente por que mais flavonoides, enquanto que a fração clorofórmica teve CIM homogêneo entre as cepas de referência (250 µg/mL). TSA por ambos os métodos indicou 9 isolados clínicos com co-resistência à ITR/FLU, e PVA foi efetiva com baixo CIM para 6 isolados com padrão R-ITR/FLU. Os testes de disco-difusão e microdiluição foram concordantes na maior parte das cepas e isolados testados. Esses resultados trazem novos dados sobre a própolis vermelha brasileira de Alagoas em relação à qualidade de flavonoides e confirmou atividade anti-*Candida* de diferentes frações para várias espécies frequentemente envolvidas em candidíase vulvovaginal, criando possibilidades para o uso de PVA como bioativo com importante potencial farmacológico em formulações de uso vaginal.

**Palavras-chaves:** Candidíase vulvovaginal, própolis vermelha, antifúngicos.

## ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a fungal infection classified as a sexually transmitted disease according to WHO, caused by yeast of the genus *Candida*. In Brazil, it is the second cause of infections among women of childbearing age and sexually active. The therapeutic treatment available for VVC treatment is restricted to polyene and azole drugs and resistance to the recommended antifungal agents (ketoconazole / CET, fluconazole / FLU, itraconazole / ITR and nystatin / NIS) has been reported more frequently in *Candida albicans*, the main associated species, but also in *Candida non-albicans* species (eg *C.glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* complex). Propolis is a resinous compound produced by bees *Apis mellifera L.* and is known to possess a variety of biological activities, and Brazilian red propolis (BRP) has components such as flavonoids that cause structural and functional damage against microorganisms. The objective of this study was to evaluate the in vitro antifungal activity of PVA (ethanol extract and fractions) against different *Candida* species, focusing on clinical isolates of VVC. Five strains of ATCC reference (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*) and 15 clinical isolates (3 of each species) were cultured from patients with VVC from Maceió / Alagoas on Sabouraud agar Dextrose and CHROMagar® *Candida* separately until 48 hours at 37° C. Suspensions of individual *Candida* cultures were adjusted to 0.5 McFarland standard in 0.9% NaCl solution for antimicrobial susceptibility testing (TSA) by disc diffusion and microdilution methods, as CLSI for CET, ITR, FLU, NIS, as well as EE and its fractions. The JASP (version 0.8.3.1) and IBM®SPSS (version 23.0) programs were adopted in the statistical analyzes. It was observed that in the TSA by disk diffusion and microdilution with both commercial antifungal and EE and fractions showed varied susceptibility profiles for the analyzed species, mainly among the clinical isolates when compared to the reference strains. By the disc-diffusion method all ATCC strains were susceptible to CET and NIS, but there was resistance to ITR and FLU mainly in *C. glabrata* and *C. krusei*, including ITR / FLU co-resistance pattern confirmed in 9 isolates. Among all the clinical isolates, resistance to at least 2 antifungal agents was tested, being 8 resistant to CET / ITR / FLU, drugs indicated by RENAME (SUS) for VVC treatment. The microdilution tests confirmed that CET and NIS were more effective, whereas FLU and ITR had less activity in the reference strains and some clinical isolates. The microdilution method with PVA showed MICs for the fractions ranging from 125 to 250 µg / mL, being found MIC of 500 µg / mL only for *C. parapsilosis* and *C. krusei* in relation to the hexanolic and ethanolic fractions, respectively. The ethanolic fraction of PVA was effective against a larger number of strains tested, but the acetanolic fraction acted with lower MIC, probably because of more flavonoids, whereas the chloroform fraction had homogenous MIC among the reference strains (250 µg / mL). TSA by both methods indicated 9 clinical isolates with ITR / FLU co-resistance, and PVA was effective with low MIC for 6 isolates with R-ITR / FLU standard. Disk-diffusion and microdilution tests were concordant in most of the strains and isolates tested. These results provide new data on the Brazilian red propolis of Alagoas in relation to the quality of flavonoids and confirmed the anti-*Candida* activity of different fractions for several species frequently involved in vulvovaginal candidiasis, creating possibilities for the use of PVA as a bioactive with important pharmacological potential in formulations of vaginal use.

**Keywords:** Vulvovaginal candidiasis, red propolis, antifungals.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Macromorfologia e Micromorfologia de <i>Candida albicans</i> Fonte: <a href="http://www.microbiologyinpictures.com">www.microbiologyinpictures.com</a> .	20
<b>Figura 2</b> – Microscopia eletrônica de <i>Candida glabrata</i> . Fonte: Sasani <i>et al.</i> , 2016.	20
<b>Figura 3</b> – Lesão de candidíase vulvovaginal. Fonte: Spence; Melville, 2007.	21
<b>Figura 4</b> – CHROMagar® <i>Candida</i> . Fonte: Vijaya <i>et al.</i> (2014)	24
<b>Figura 5</b> – O surgimento das drogas antifúngicas. Fonte: Lewis, 2011.	26
<b>Figura 6</b> – Estrutura molecular da nistatina. Fonte: ROMERO <i>et al.</i> , 2011.	27
<b>Figura 7</b> . Farmacodinâmica dos antifúngicas. Fonte: LEWIS, 2011.	27
<b>Figura 8</b> – Estrutura química de antifúngicos azólicos. Fonte: SNELL <i>et al.</i> , 2012; LAMB <i>et al.</i> , 2015.	28
<b>Figura 9</b> – Comparação de mecanismos de resistência ao fluconazol em espécies de <i>Candida</i> . Fonte: Whaley <i>et al.</i> , 2017.	30
<b>Figura 10</b> – Resina para produção da própolis vermelha. Fonte: Dauschet <i>et al.</i> , 2007.	32
<b>Figura 11</b> – Carta de outorga da IG-PVA, emitida em 2012 pela INPI. Fonte: INPI.	32
<b>Figura 12</b> – Grupos de flavonóides encontrados na composição da própolis. Fonte: KUMAR; PANDEY, 2013.	34
<b>Figura 13</b> – Fluxograma com as etapas para isolamento e purificação das cepas e isolados clínicos de espécies do gênero <i>Candida</i> .	37
<b>Figura 14</b> – Evaporação para obtenção do extrato de própolis vermelha em rotaevaporador no LAFA/ESENFAR	38
<b>Figura 15</b> – Fluxograma para obtenção do extrato e frações da própolis vermelha conforme polaridade crescente dos solventes.	39
<b>Figura 16</b> – Etapas do preparo da solução própolis vermelha com DPPH para avaliação da atividade antioxidante da própolis vermelha de Alagoas.	41
<b>Figura 17</b> – Fluxograma da avaliação do uso do álcool e DMSO como solvente para solubilização da própolis.	42
<b>Figura 18</b> – Esquema do método de disco-difusão para avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos. Fonte: Adaptado de basicmedcalkey.com.	43
<b>Figura 19</b> – Execução da microdiluição conforme preconizado pelo CLSI para determinar a susceptibilidade das espécies de <i>Candida</i> frente a própolis e suas frações .	45

<b>Figura 20</b> – Diferentes isolados de <i>Candida</i> sp. após cultivo em meio Sabouraud Dextrose Agar e subcultivo em meio cromogênico Hicrome <sup>®</sup> <i>Candida</i> , indicando o padrão esperado para de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. krusei</i>	49
<b>Figura 21</b> – Avaliação da atividade antioxidante da própolis vermelha e suas frações pelo método de captura do radical livre DPPH	50
<b>Figura 22</b> – Método de Kirby-Bauer.	52
<b>Figura 23</b> – Gráficos disponibilizados pelo programa JASP.	52
<b>Figura 24</b> – Perfil de susceptibilidade aos antifúngicos padronizados.	55
<b>Figura 25</b> – Placa de microtitulação com RPMI-1640 (M27-A, CLSI).	57
<b>Figura 26</b> – Dados em <i>BoxPlot</i> tipo-violino, indicando dispersão de cepas e isolados clínicos de acordo com as CIM aproximada.	59
<b>Figura 27</b> –Teste de <i>Cup plate</i> .	62
<b>Figura 28</b> – Placa de microtitulação com RPMI-1640 após teste de microdiluição (M27-A, CLSI).	63
<b>Figura 29.</b> Perfil de susceptibilidade de cepas de referência de <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. tropicalis</i> (n=5) e seus respectivos isolados clínicos.	65
<b>Figura 30</b> – Gráficos <i>BoxPlot</i> tipo-violino das concentrações inibitórias mínimas dos extratos etanólico e frações.	66
<b>Figura 31</b> – Comparação entre os testes de microdiluição dos antifúngicos comerciais e de extrato etanólico e frações da propólis vermelha de Alagoas.	67

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1.** Correlação de susceptibilidade de antifúngicos por disco-difusão como os halos encontrados pela disco-difusão para as espécies de *Candida* com a susceptibilidade determinada pelo CLSI. 53

**TABELA 2.** Susceptibilidade de antifúngicos por concentração inibitória mínima (CIM) para as espécies de *Candida* com a susceptibilidade determinada pelo CLSI. 58

**TABELA 3 -** Correlação da susceptibilidade da própolis vermelha alagoana por concentração inibitória mínima (CIM) para as espécies de *Candida* com a susceptibilidade determinada pelo CLSI. 64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
AMD	Ágar Mueller-Hinton
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain and Heart Infusion
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CSB	Cabine de segurança biológica
CVV	Candidíase vulvovaginal
CVVR	Candidíase vulvovaginal recorrente
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DIU	Dispositivo Intra-Uterino
DST	Doença Sexualmente Transmissível
ESENFAR	Escola de Enfermagem e Farmácia
EtOH	Etanol
°GL	Gay Lussac
ICBS	Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
IG	Indicação Geográfica
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Intelectual
ITS	Internal Transcribed Spacer)
Lafa	Laboratório de Análises Farmacêuticas e Alimentos
LabMICOL	Laboratório de Micologia
LMC	Laboratório de Microbiologia Clínica
MS	Ministério da Saúde
MM	Milímetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
PVA	Própolis Vermelha de Alagoas
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio
UFAL	Universidade Federal de Alagoas

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>19</b>
2.1 O Gênero <i>Candida</i>	19
2.2 Candidíase vulvovaginal (CVV)	20
2.3 Principais espécies de <i>Candida</i> envolvidas na Candidíase Vulvovaginal	23
2.4 Diagnóstico laboratorial de candidíase vulvovaginal	24
2.5 Antifúngicos no tratamento da candidíase Vulvovaginal	25
2.6 Mecanismo de resistência antifúngica entre espécies <i>Candida</i> spp.	29
2.7 A própolis vermelha de Alagoas	30
<b>3.OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
3.1 Geral	35
3.2 Específicos	35
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>36</b>
4.1 Local do estudo	36
4.2 Isolamento e identificação das espécies de <i>Candida</i> spp.	36
4.3 Atividade antioxidante da própolis vermelha de Alagoas	39
4.4 Avaliação do uso do álcool e DMSO (Dimetilsufóxido) como solvente	41
4.5 Teste de susceptibilidade a antifúngicos (TSA)	43
4.5.1 Método do disco-difusão (Kirby-Bauer)	43
4.5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) a partir do método de microdiluição	44
- Preparo do meio RPMI 1640	44
- Preparo solução padrão para antifúngicos comerciais	44
- Preparo da solução padrão do extrato da própolis vermelha	46
- Microdiluição utilizando a própolis vermelha de Alagoas	46
4.6 Método <i>cup-plate</i>	47
4.7 Análise Estatística	47
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>49</b>
5.1 Isolados clínicos de diferentes espécies de <i>Candida</i> de micoteca clínica	49



5.2 Atividade antioxidante da própolis vermelha de Alagoas pelo método DPPH	50
5.3 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA) de diferentes espécies de <i>Candida</i>	51
5.3.1 Método disco-difusão (Método Kirby-Bauer) com antifúngicos comerciais	51
5.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima através de microdiluição com antifúngicos comerciais	56
5.3.3 Método Cup-plate com própolis vermelha de Alagoas	61
5.3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima da Própolis Vermelha de Alagoas através de microdiluição	62
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>69</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>70</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>85</b>
<b>9 APÊNDICE</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* são os principais responsáveis pelas infecções fúngicas no ser humano (SOBEL, 2007), colonizando a pele, mucosa oral, trato gastrointestinal, trato geniturinário e trato respiratório, podendo provocar infecções mucocutâneas, vulvovaginites, cistitis e septicemia, sendo considerada a infecção fúngica oportunista mais frequente entre os pacientes imunocomprometidos (PEIXOTO *et al*, 2014), estando presente no trato digestivo de 80% dos indivíduos saudáveis e em torno 20-30% do trato genital feminino (BARBEDO; SGARBI, 2010).

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma manifestação frequente entre as mulheres em idade fértil e sexualmente ativas, considerada uma doença sexualmente transmissível (DST) pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (SOBEL, 2007) e um importante problema de saúde no mundo, afetando milhares de mulheres anualmente (GUNTHER *et al*, 2014). Nos Estados Unidos é a segunda causa de infecção em mulheres, sendo gasto em torno de 1 bilhão de dólares por ano, com diagnóstico e tratamento (PONTES *et al*, 2014).

Caracterizada por corrimento esbranquiçado, prurido intenso, edema, eritema disúria, leucorréia e ardor durante as relações sexuais, podendo a candidíase vulvovaginal ser assintomática (LOPEZ, 2015) e apresentar pontos esbranquiçados e amarelados na parede vaginal e colo uterino (PEIXOTO *et al*, 2014). Comum entre mulheres grávidas, diabéticas (GUNTHER *et al*, 2014; LOPEZ, 2015), mulheres em uso de contraceptivos orais (JANKOVIC *et al*, 2010) e dispositivos intra-uterinos (DIU) (AULER, 2010).

A espécie *Candida albicans* é a mais isolada nas culturas de secreção vaginal, (FORNARI *et al*, 2016) seguida de *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* (SOBEL, 2007), são denominadas *Candida* não-*albicans* estão presentes entre 20%-80% dos adultos saudáveis e em 30% das mulheres grávidas (GUNTHER *et al*, 2014) e 25% - 50% dos casos são assintomáticos (PEIXOTO *et al*, 2014).

Diversos fatores favorecem a invasão dessas leveduras no hospedeiro, tais como: ação de proteinases e lipases, alteração de pH e elevação glicogênio da mucosa vaginal favorece a proliferação das espécies de *Candida* (GONDO *et al*, 2010) e produção de biofilme em DIU estão relacionados aos episódios de candidíase vulvovaginal recorrente ou não (FORNARI *et*

al, 2016), permitindo que as leveduras não sejam reconhecidas pelas células do sistema imunológico (CAPOCI *et al*, 2015).

No Brasil, a CVV também é a segunda causa de infecção ginecológica em 4,9% das mulheres (MARCONI *et al*, 2015), na região nordeste é considerada endêmica juntamente com a vaginose bacteriana e outras infecções do trato reprodutivo, sendo mais comum em mulheres entre 30-49 anos (OLIVEIRA *et al*, 2007). A prevalência de VVC em Alagoas é de 5,8% das mulheres da zona rural entre 15 – 49 anos (SOARES *et al*, 2003), mas no período de 2009–2016 constatou-se 1.593 amostra positivas de *Candida* spp do trato genital em Alagoas (dados ainda não publicados, comunicação verbal: Profa. Dra. Fernanda C. de A. Maranhão).

Os produtos de origem natural estão sendo amplamente estudados como opção para o tratamento de diferentes patologias, devido À variedade de compostos ativos e propriedades farmacológicas, a própolis é um desses produtos, que apresenta atividade anti-inflamatória, antisséptica, adstringente, antioxidante, antiviral e antimicrobiana inclusive para *Candida* spp. (FERNANDES JUNIOR *et al*, 2005; KHALIL,2006; DOTA *et al*, 2010, JUNIOR *et al*, 2012; CAPOCI *et al*, 2015).

Por se tratar de um produto natural, a própolis apresenta uma rica composição química de benzofenona, hidrocarbonetos, aminoácidos, esteróides, fenóis, flavonóides, terpenos e isoflavonóides (MARCUCCI, 1996; PARKER *et al*, 2002) entre outros compostos que variam conforme o país, a flora de cada região e o período de coleta da resina (VOLPI; BERGONZINI, 2006; ALENCAR *et al*, 2007).

A própolis brasileira é classificada em 13 grupos, conforme suas características físico-química e origem botânica (ALENCAR *et al.*, 2005) sendo 05 grupos no Sul, 07 grupos no Nordeste e 01 grupo no Sudeste Mas popularmente a própolis é conhecida conforme sua coloração, como própolis marrom, preta, amarela, verde e vermelha (PARK *et al*, 2002). Dentre os compostos encontrados na resina brasileira, os flavonóides e ácidos fenólicos, chamam a atenção por suas propriedades antimicrobiana, antiviral e antioxidante (VOLPI; BERGONZINI, 2006; LUSTOSA,2008).

Em Alagoas é encontrada a própolis do grupo 13 (própolis vermelha), com origem botânica da *Dalbergiae castophyllum* típica dos manguezais do Estado de Alagoas conhecida

como rabo-de-bugio, onde é coletado pelas abelhas um exsudato vermelho (DAUGCSH *et al.*, 2007), rico em isoflavonóides, benzofenonas, compostos fenólicos e outros (SALOMÃO *et al.*, 2007; LUSTOSA *et al.*, 2008). Por suas propriedades farmacêuticas e nutracêuticas, a resina alagoana apresenta uma composição única no mundo e por isso teve a sua Indicação Geográfica (IG) reconhecida em 29 de maio de 2012 pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), agregando valor e competitividade ao produto (INPI, 2016).

A própolis vermelha de Alagoas (PVA), apresenta atividade antibacteriana e antifúngica, devido seus isoflavonóides e ácidos fenólicos, sendo observado uma melhor atividade contra *Candida albicans*, relacionado mais ao extrato etanólico e na fração acetanólica em relação a fração hexânica e clorofórmica, devido a concentração de compostos fenólicos e da isoflavona formononetina. (TRUSHEVA *et al.*, 2006; CABRAL *et al.*, 2009; RIGHI *et al.*, 2010; JUNIOR *et al.*, 2012).

Atualmente, há escassez de estudos referente à aplicação vaginal da própolis brasileira no tratamento da candidíase vulvovaginal, e os poucos existentes têm a própolis verde como base do medicamento. Dessa forma, é relevante pesquisas para a preparação e caracterização da própolis vermelha como medicamento vaginal para tratamento da CVV. Para isso, é importante avaliarmos a atividade antifúngica *in vitro* do extrato da PVA e diferentes frações em cepas ATTC e isolados clínicos de espécies de *Candida*, determinando sua concentração inibitória mínima (CIM) e comparando aos antifúngicos: cetoconazol, nistatina, fluconazol e nistatina, todos preconizados para o tratamento da CVV e CVV-R.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O Gênero *Candida*

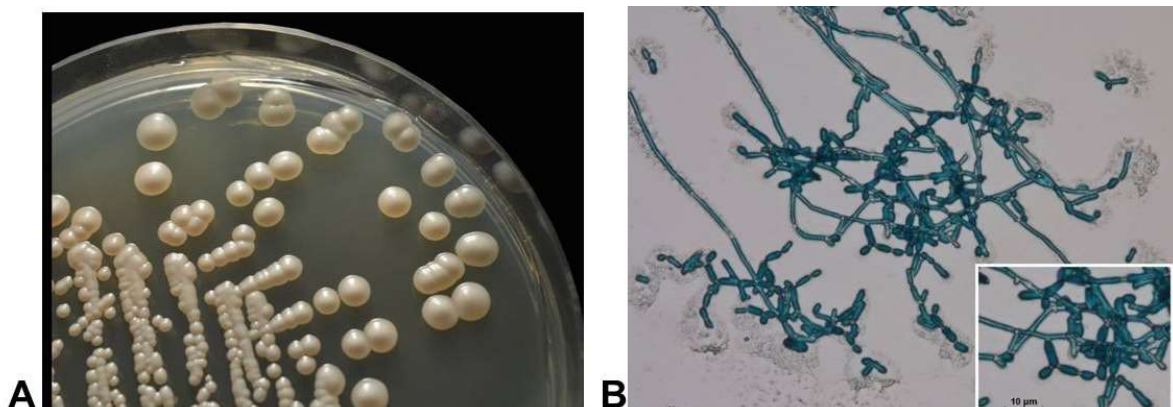
As infecções fúngicas têm sido mais estudadas nas últimas décadas com o surgimento da AIDS (BARBEDO; SGARBI, 2010), mas seus primeiros relatos como um agente patogênico são descritos por Hipócrates (460 a 337 a.C), onde descreve as típicas placas esbranquiçadas das lesões na cavidade oral, estas em neonatos e pacientes debilitados, sendo o mesmo observado por Galeno (200 a 130 a.C), o que demonstra que fungos do gênero *Candida* já era um agente endógeno humano (HAZEN,1995; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Fungos leveduriformes do gênero *Candida* pertence ao Reino Fungi, divisão *Ascomycota*, subdivisão *Saccharomycotina*, classe *Saccharomycetes* e Família *Saccharomycetaceae* (GUARRO *et al.*,1999; BUTLER, 2010; BRANDT; LOCKHART, 2015). Trata-se de microrganismos eucariontes, unicelulares, que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou bipartição, geralmente medindo 2-6  $\mu\text{m}$  (Fig.1) e nutrindo se por absorção de carbono e nitrogênio proveniente das fontes de proteínas e carboidratos, encontrados amplamente em solo, água, vegetais (BARBEDO; SGARBI, 2010).

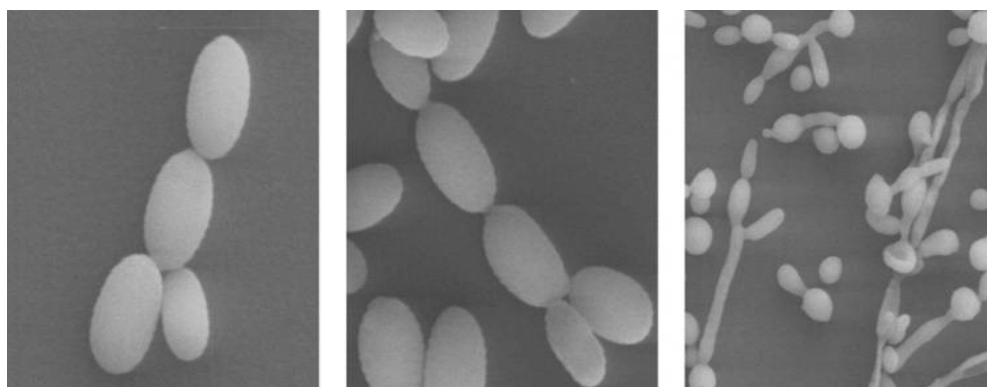
Distribuídas amplamente no ambiente e na microbiota dos mamíferos, espécies de *Candida* são considerados patógenos oportunistas frequentes entre homens e mulheres. Sabemos que aproximadamente 200 espécies do gênero *Candida* são consideradas patogênicas ao homem (ÁLVARES *et al.*, 2007; BARBEDO; SGARBI, 2010), dentre estas a mais prevalentes são *C. albicans* (Fig. 1) e não-*albicans* como *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* (Fig. 2) e *C. parapsilosis (sensu lato)* (TAVANTI *et al.*, 2005; NÉMETH *et al.*, 2013), podendo encontrar ainda espécies como *C. lusitanae*, *C. rugosa* e *C.utilis* afetando o homem (BRANDT; LOCKHART, 2015) acredita-se que uma das vias de colonização no homem seja a passagem do feto via vaginal (ZISOVA *et al.*, 2016).

Podemos detectar a presença dessas leveduras colonizando vários sítios anatômicos em homens e mulheres, como na pele, trato digestivo e genital de indivíduos sadios, ocorrendo candidíase quando há o desequilíbrio da microbiota e baixa do sistema imunológico, podendo ainda a levedura vir de origem endógena ou exógena (BARBEDO; SGARBI, 2010; PEIXOTO *et al.*, 2014). Espécies de *Candida* podem causar desde infecções superficiais em uma variedade de sítios anatômicos como pele, unhas e mucosas, até invasivas (candidemia), sendo a

candidíase vulvovaginal, considerada a segunda causa mais frequente entre as infecções genitais (ACHKAR; FRIES, 2010; BARBOSA *et al*, 2012; PEIXOTO *et al*, 2014).



**Figura 1 – (A) Macromorfologia de *Candida albicans* em meio ágar Sabouraud e sua (B) Micromorfologia focando a produção de pseudo-hifas. Fonte: [www.microbiologyinpictures.com](http://www.microbiologyinpictures.com).**



**Figura 2 – Microscopia eletrônica de *Candida glabrata*. Fonte: Sasani *et al.*, 2016.**

## 2.2 Candidíase vulvovaginal (CVV)

Esta patologia foi descrita pela primeira vez em 1949 por Wilkinson, descrevendo uma relação existente entre a levedura vaginal e a vaginite (BARBEDO; SGARBI, 2010). A CVV é caracterizada por prurido vulvar intenso, odor presente ou ausente, leucorréia, dispareunia, disúria, edema e eritema vulvovaginal (Fig.3), que pode se estender a região inguinal (ROSA; RUMEL, 2004; ALVARES *et al.*, 2007; PEIXOTO *et al.*, 2014)

Na CVV observamos que a *C. albicans* é prevalente 70-90% dos casos diagnosticados (PEIXOTO *et al.*, 2014) e outros 10-20% podem ser causados pelas demais espécies (*C.*

*glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*), tal distribuição tem correlação com a distribuição geográfica da levedura, fatores hormonais, hábitos de higiene, atividade sexual e doenças como diabetes (ALVARES *et al.*, 2007; BARBEDO; SGARBI,2010; LOPEZ, 2015), podendo colonizar o trato genital de 20-80% das mulheres saudáveis, 10% das mulheres na fase da pré-menopausa, 5-10% das menopausadas e até 30% das gestantes.(CORREIA *et al.*, 2009; GONDO *et al.*, 2010), sendo que 25-40% das mulheres são assintomáticas, colonizadas pela levedura e quando exposta a quadro de desordem vaginal manifesta CVV (ACHKAR; FRIES, 2010; GONDO *et al.*, 2010; LINHARES *et al.*, 2010).



**Figura 3 – Aspecto de lesão no colo de útero de paciente afetada por candidíase vulvovaginal, mostrando placas brancas típicas da doença causada por *Candida* spp.** Fonte: Spence; Melville, 2007

O Centro de Controle de Doenças (CDC) classifica a CVV em duas categorias: CVV simples e a recorrente (CVVR), sendo a primeira caracterizada por episódios esporádicos e de gravidade leve a moderada, sem registro de reincidência em indivíduos saudios, enquanto que entende-se por CVV-R quando há ocorrência entre três a quatro episódios de CVV em 1 ano, possivelmente por reinfecção a partir de reservatórios extragenitais ou via sexual (HOLANDA *et al.*, 2007; ACHKAR; FRIES, 2010; LOPEZ, 2015).

Sabemos que a CVV atinge aproximadamente 75% das mulheres adultas, com pelo menos um episódio ao ano, equivalente a 30 milhões de episódios por ano (NAGLIK, 2014), sendo que 40-50% destas mulheres terão CVV-R e dentre estas 5-8% apresentarão CVV-R resistente (SOBEL, 2007; HOLANDA *et al.*, 2007; LOPEZ, 2015). E o uso de dispositivo intra-uterino (DIU) é fator de risco para CVV-R devido a formação de biofilme intra-uterino

(AULER *et al.*, 2010). Nas Filipinas a CVV-R é um problema de saúde pública, sendo a doença fúngica que acomete 80% das mulheres atendidas pelos serviços de ginecologia e obstetria (BATAÇ; DENNING, 2017).

A incidência da CVV está relacionada a fatores extrínsecos como uso prolongado de corticoides e antibióticos de amplo espectro, por exemplo, alterando a microbiota dos trato digestivos e genito-urinário de mulheres adultas, bem como o uso de roupas apertadas, peças íntimas de tecidos sintéticos, DIU e uso de anticoncepcionais orais e os fatores intrínsecos são déficit da imunidade celular, diabetes mellitus, ciclo menstrual regulares e gravidez produzem aumento de glicogênio e acidificação do pH vaginal, ambiente propicio a vaginite fúngica (HOLANDA, 2007; BARBEDO; SGARBI, 2010; PEIXOTO *et al.*, 2014). Medeiros (2013) observou que a vida sexual ativa foi o principal fator para CVV em todas pacientes estudadas, podendo está relacionado ainda a gravidez, uso de roupas íntimas de nylon e de calças apertadas por longa duração, alergia, uso de anticoncepcional, absorvente interno, diabetes, uso de antimicrobianos e DIU.

A vaginite causada por *Candida* também é observada em gestantes, podendo a levedura vaginal ser transmitida ao neonato durante o parto normal, levando a candidíase oral e também a transmissão horizontal na unidade hospitalar materna e unidade de terapia intensiva neonatal, especialmente por *C. parapsilosis*. (DIAS, 2007; 2013; PAMMI *et al.*, 2013). Segundo Manzoni *et al.*(2012) a colonização por espécies de *Candida* em neonatos prematuros pode ocorre por via horizontal ou vertical, podendo causar abscessos superficiais como microabscessos em órgãos e doença disseminada nos neonatos. Já em seu estudo Zisova *et al.* (2016) observou que a colonização em neonatos por *C. albicans* em seus primeiros dias de vida ocorre por transmissão vertical e tal fato foi comprovado após compatibilidade entre as cepas isoladas do trato genital da progenitora e do neonato.

O comportamento saprofítico e patogênico que envolve as espécies *Candida* spp está relacionado aos mecanismos de defesa como: prematuridade, envelhecimento, neoplasias, imunossupressão e danos de barreiras anatômicas como: queimaduras e uso de dispositivos invasivos (BARBEDO; SGARBI, 2010). A patogênese da candidíase ocorre em três aspectos que corroboram para CVV são eles: adesão com a liberação de adesinas, glicoproteínas, usada para aderir à membrana das células do epitélio vaginal, para facilitar a invasão tecidual; liberação de proteinases extracelulares que apresentam diferenças em sua atividade proteolítica conforme espécie e morfologia do gênero *Candida* também corroboram como fator de



virulência, onde os blastoconídios são típicos do estado saprofítico e durante o quadro de CVV é comum à formação pseudo-hifas e tubo germinativo (hifas verdadeiras) facilitando a adesão, disseminação e transmissão da levedura (ALVARES *et al*, 2007; CORREA *et al*, 2009; BARBEDO; SGARBI, 2010; MEDEIROS, 2013).

### 2.3 Principais espécies *Candida* envolvidas na candidíase vulvovaginal

Das 200 espécies de *Candida* que podem acometer os seres vivos, *C. albicans* é a mais prevalente (BARBEDO; SGARBI, 2010), seja nas micoses superficiais ou invasivas, como na CVV, por ser a espécie mais relevante no trato genito-urinário feminino (ACHKAR; FRIES, 2010), as demais por serem menos frequentes compõem as espécies denominada *Candida* não-albicans, representada pelas espécies *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* (ANDRIOLI *et al*, 2009; DOTA *et al.*, 2011; LIMA, 2012).

Muitos pesquisadores apontam *C. glabrata* como a segunda espécie mais comum em CVV (5-15%) e com prevalência próxima de *C. tropicalis*, sendo a primeira espécie também presente nos tratos gastrointestinal e genito-urinário de indivíduos sadios (AREAL, 2015). Nos últimos anos os casos de infecções associados a esta espécie vem aumentando e apresenta elevada taxa de mortalidade e letalidade em relação *C. albicans*, podendo causar infecção concomitante com a *C. albicans* (BARBEDO; SGARBI, 2010; SARDI *et al*, 2013). Outra espécie emergente é *C. krusei*, típica em imunocomprometidos e com resistência intrínseca ao fluconazol e baixa sensibilidade a anfotericina B (JIANG *et al*, 2013; AREAL, 2015).

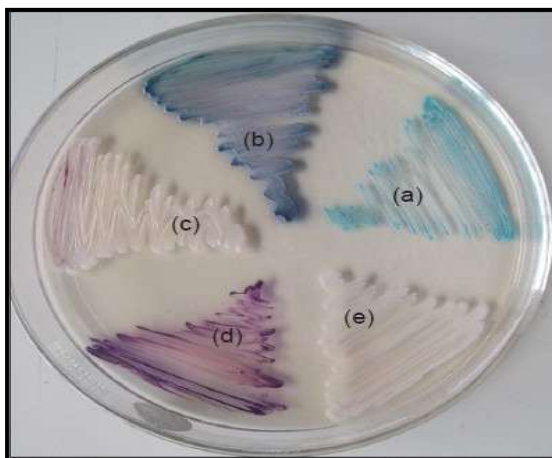
No ambiente hospitalar também podemos encontrar *C. parapsilosis* causando infecções a partir de cateteres, endocardites, artrite (TROFA *et al*, 2008; BARBEDO; SGARBI, 2010; SARDI *et al*, 2013) e também formando biofilmes aumentando seu poder de virulência (BARBEDO; SGARBI, 2010; NASCIMENTO *et al*, 2014). Recentemente, três espécies foram compiladas no complexo *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis* {*Sensu stricto*} *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) (TAVANTI *et al*, 2005), com diferenças detectadas apenas na sequência de DNA, *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* são mais virulentas no modelo experimental de candidíase vaginal em comparação a *C. metapsilosis* (NEMETH *et al*, 2013).

## 2.4 Diagnóstico de candidíase vulvovaginal

O diagnóstico clínico é feito baseado nos sinais e sintomas da CVV, mas que podem ser confundidos com outras vaginites, sendo necessário para diagnóstico correto e tratamento adequado o diagnóstico laboratorial desta infecção, que pode ser executados por métodos microbiológicos e moleculares.

O Ministério da Saúde (2015) preconiza como testes para diagnóstico de corrimento vaginal: medição do pH vaginal (normalmente é menor que 4,5); Teste de Whiff (teste das aminas ou “do cheiro”); Exame a fresco da amostra vaginal para observar a presença de leucócitos, leveduras e/ou pseudo-hifas; Bacterioscopia da secreção vaginal para observar as alterações morfológicas típicas de CVV (ausência/presença de raros *Lactobacillus* spp, células epiteliais, células leveduriformes em brotamento com ausência/presença de pseudo-hifas).

Os métodos microbiológicos para identificação fenotípica (Clássica) baseiam-se nas características morfológicas macro e microscópicas demonstradas pelas leveduras isoladas na amostra após semeio em meio de cultura seletivo para fungos: ágar Sabouraud ou meio cromogênico, que pode ser o HiCrome<sup>®</sup> *Candida* (Hicrome) ou CHROMagar<sup>®</sup> *Candida* (Difco) (Fig.4). Nesses tipos de meios é possível a diferenciação de 03 (três) espécie de *Candida* através da reação da  $\beta$ -glicosamida presente no meio cromogênico com enzimas secretadas pelas diversas espécies da levedura, resultando em colônias com diferentes pigmentações conforme a espécie isolada (HOSPENTHAL *et al.*, 2006). Tal procedimento permite a liberação de resultados presuntivos na rotina ambulatorial, viabilizando o início da terapia antifúngica.



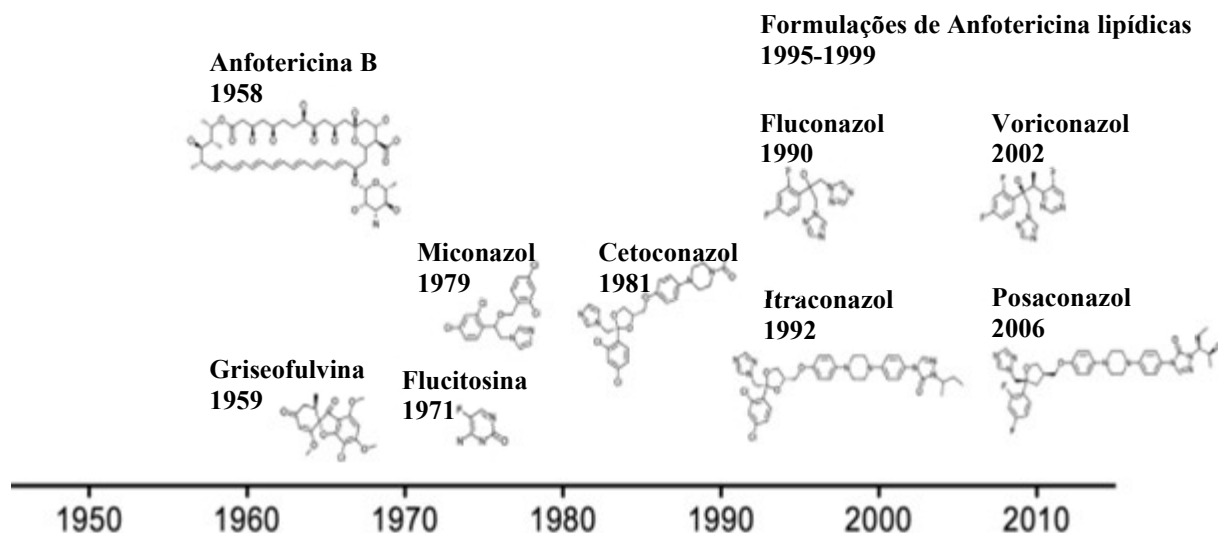
**Figura 4 – Crescimento em CHROMagar<sup>®</sup> *Candida* (a) *C. albicans* (b) *C. tropicalis* (c) *C. krusei* (d) *C. glabrata* (e) *C. parapsilosis*. Fonte: Vijaya *et al.* (2014)**

O emprego de técnicas moleculares vem sendo adotadas para o diagnóstico das espécies de *Candida*, devido sua sensibilidade. Pois os métodos convencionais são baseados nas características fenotípicas e bioquímicas das espécies *Candida*, sendo observadas algumas deficiências como pouca variação morfológica entre espécies, especialmente quando há infecções por espécies pouco frequentes (OLIVEIRA *et al*, 2008). Baseado nas características genotípicas e variabilidade genética presente entre espécies e numa mesma espécie *Candida* (MAROL; YUCESYOY, 2007; OLIVEIRA *et al*, 2008). Isso é possível graças o emprego de iniciadores usado para amplificar fragmentos da região entre os genes 18S e 28S do rDNA das espécies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* (VALLE *et al*, 2010; LIMA, 2012), conhecida como Espaço Interno Transcrito (ITS) são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie (ARRAES, 2012)

Daef *et al.* (2014) observou que há diferenças entre a identificação por meio cromogênico e por PCR, onde no meio CHROMagar® *Candida* identificou *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* com altas sensibilidades e especificidades (97,5%), mas não identificou *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. E com 100% de sensibilidade e especificidade foi possível identificar *C. dubliniensis* no meio CHROMagar® *Candida*, com o meio cromogênico Biggy ágar observou menor sensibilidade e especificidades.

## **2.5 Antifúngicos no tratamento da candidíase vulvovaginal**

Desde o surgimento dos primeiros antibióticos, poucas classes de fármacos estão disponíveis para tratamento de infecções fúngicas, sejam superficiais ou sistêmicas, e causadas por fungos leveduriformes, filamentosos ou dimórficos. Na década de 70 surgiram os derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol e miconazol) (Fig.5), uma nova opção com apresentação farmacológica por via oral, com menor toxicidade, amplo espectro e uma opção em relação a anfotericina B (SOBEL *et al*, 1998; SIDRIM *et al*, 2004; PAPPAS *et al*, 2009; LOPEZ; 2015).

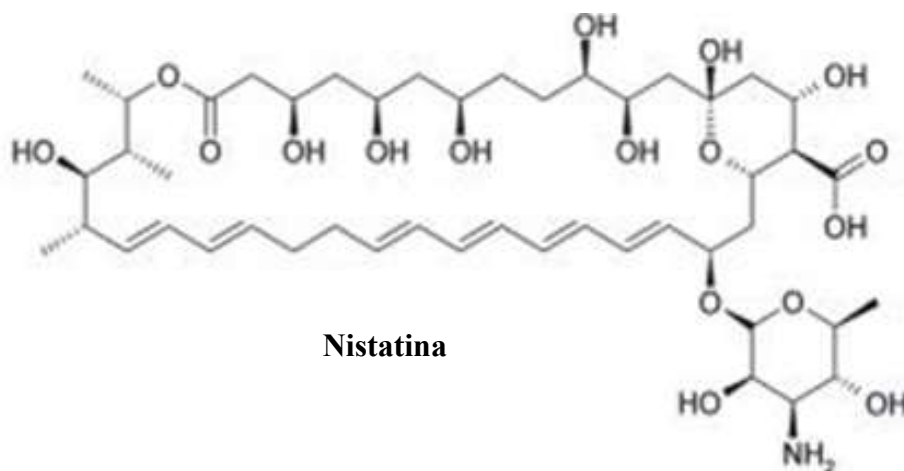


**Figura 5** –O surgimento das drogas antifúngicas. Fonte: Lewis, 2011.

Os antifúngicos são classificados em polienos (Anfotericina B e nistatina), derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, clotrimazol e econazol), alilaminas (terbinafina, naftifina e fluocitosina), griseofulvina e equinocandina (caspofungina), são usados para diferentes tipos de infecções fúngicas segundo sítio da infecção, tipo do fungo e via de administração (SIDRIM; ROCHA, 2004; LEWIS, 2011; CASTRO *et al.*, 2016).

Para CVV pode ser tratada com derivados azólicos (cetoconazol, miconazol, fluconazol, itraconazol) e polienos (nistatina). O primeiro é efetivo por um período de 1-3 dias com taxa de cura em torno 85-90% já a nistatina apresenta uma taxa de 75-80%. Por isso é preferível o tratamento oral com os azólicos, que também geralmente erradicam os reservatórios genitais e extragenitais e a praticidade da administração desta via, devendo nestes casos tratar ambos os parceiros (SOBEL *et al.*, 1998; HALBE, 2000; MS, 2015; CASTRO *et al.*, 2016).

A nistatina é o polieno de escolha com administração por via vaginal (Fig. 6), uma vez que não é absorvida por via oral, sendo administrada na forma de óvulo, creme vaginal, loções e pomadas por 14 dias aplicados à noite ao deitar (SIDRIM; ROCHA, 2004; MS, 2015). Este antifúngico é eficaz contra leveduras, especialmente contra espécies de *Candida*, sendo sintetizado a partir de *Streptomyces* spp. e que atua na permeabilidade da membrana célula dos fungos, ligando-se com o ergosterol da membrana celular e promovendo a formação de poros (LEWIS, 2011). Dessa forma, o fármaco interfere permeabilidade e funções de transporte de eletrólitos (sódio e potássio) e metabólitos das células fúngicas, levando a morte celular (Fig. 7) (ODDS *et al.*, 2003; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).



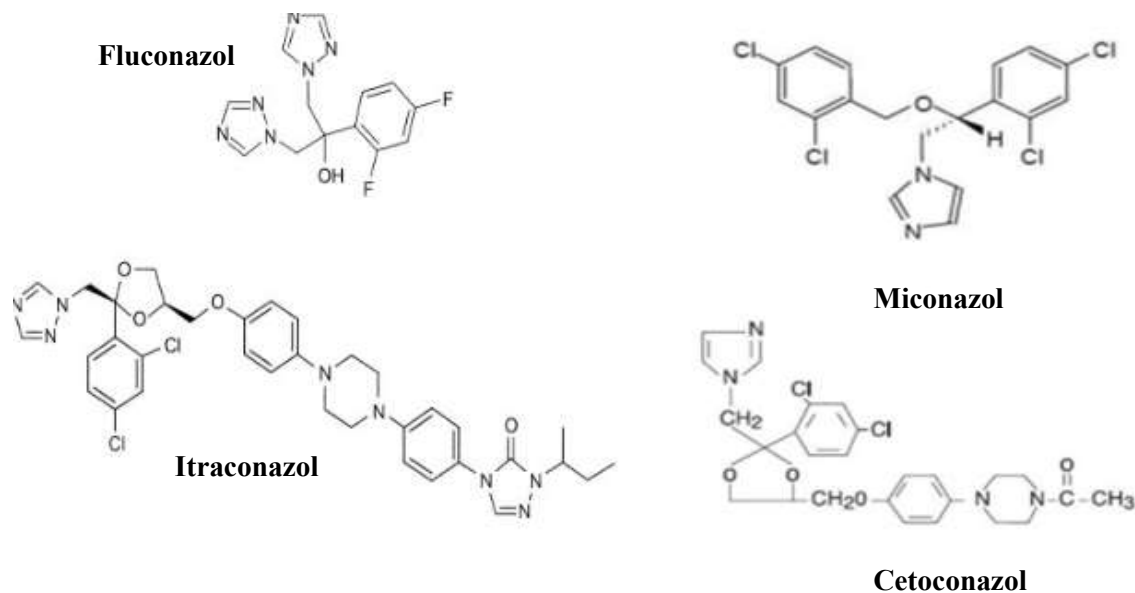
**Figura 6 – Estrutura molecular de antifúngico polieno nistatina.** Fonte: ROMERO *et al*, 2011.

Mecanismo	Classe da	Drogas
<p><b>Menbrana Celular</b></p> <p><b>Inibidores do Ergosterol</b></p>	<p><b>Azoles</b> (inibidor da 14-<math>\alpha</math>-demetilase)</p>	<p><b>Imidazólicos</b> Cetoconazol, miconazol <b>Triazólicos</b> Fluconazol, itraconazol, Voriconazol, posaconazol</p>
	<p><b>Polienos (ligação do ergosterol)</b></p>	<p><b>Anfotericina B</b></p>
	<p><b>Alilaminas (esqualeno monoxigenase)</b></p>	<p><b>Terbinafina</b></p>

**Figura 7. Farmacodinâmica de antifúngicas imidazólicos e triazólicos.** Fonte: LEWIS, 2011.

Os derivados azólicos (Fig. 8) são divididos em dois subgrupos: os triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol) e imidazólicos (cetoconazol, miconazol e clotrimazol) adotados na terapia de CVV (LEWIS, 2011; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). Estes atuam na inibição da biossíntese do ergosterol (esteróide de membrana fúngica) pela inativação enzimática do C-14- $\alpha$ -demetilase presente no citocromo P-450, que metila o lanosterol em ergosterol sem a devida formação de ergosterol ocorre o acúmulo de lanosterol e assim aumenta

a permeabilidade celular levando a formação de poros e lise (Fig.8) (SIDRIM; ROCHA, 2004; CASTRO *et al*, 2016).



**Figura 8 – Estrutura química de antifúngicos azólicos (fluconazol, itraconazol, miconazol e cetoconazol).**

Fonte: SNELL *et al*, 2012; LAMB *et al*, 2015.

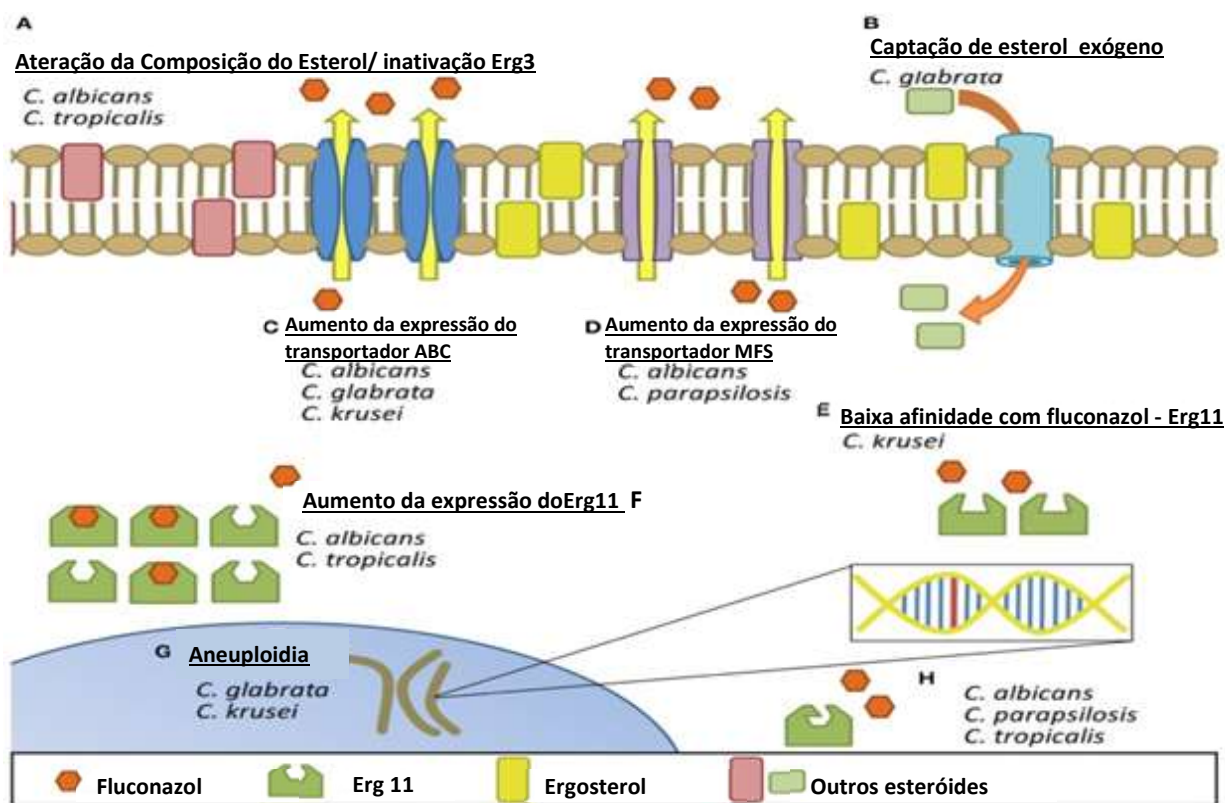
O cetoconazol foi o primeiro azólico (imidazol), administrado por via oral para tratamento sistêmico com maior toxicidade hepática e gastrointestinal em relação ao triazólicos, mas com boa biodisponibilidade. O cetoconazol consta na RENAME na forma de shampoo, tendo no miconazol (creme 2%) seu substituto em virtude da elevada toxicidade, devendo ser usado por 7 dias à noite ao deitar (SIDRIM; ROCHA, 2004; MS, 2015; CASTRO *et al*, 2016).

Os triazólicos (fluconazol, itraconazol e voriconazol) tem elevada biodisponibilidade oral e apresenta raros efeitos adversos, mas não é indicado para infecções por *C. krusei* e *C. glabrata* devido a resistência intrínseca e é insolúvel em água e lipofílico, para que haja absorção oral é necessário a presença do meio ácido, por isso é recomendado a administração associado com sucos de frutas e comidas. Sendo preconizado dose única do fluconazol ou 2 (dois) comprimidos 2x/dia por 1(um) dia (HALBE, 2000; SILVA, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004; SILVA, 2002; DIAS, 2007; MS, 2015).

## 2.6 Mecanismos de resistência antifúngica em espécies de *Candida*

O crescente aumento da resistência aos antifúngicos vem nos alertar sobre estratégias para conter a disseminação de isolados de fungos resistentes. Nas últimas décadas a resistência aos antifúngicos azólicos vem sendo bastante estudada, em virtude a elevada resistência ao fluconazol e descoberta da resistência intrínseca da *C. glabra* e *C. krusei* a este fármaco (RODRIGUEZ-TUDELA, 2002; RIBEIRO, 2005; ESPINELL-INGTEROFF, 2008; ROSA, 2013). Sabemos que os mecanismos de resistência ligados aos azólicos ocorrem de diferentes formas, conforme indicado na Figura 9, e geralmente está relacionado à via biosintética do ergosterol, que possui vários genes codificadores de enzimas intermediárias que atuam na produção deste homólogo do colesterol: (a) Redução da concentração intracelular do fármaco com uso de bombas de efluxo (genes CDR1 e CDR2) e outra bomba secundária que é específica para fluconazol (gene MDR1); (b) Diminuição da afinidade do alvo com o fármaco, onde o alvo é a enzima 14- $\alpha$ -desmetilase lanosterol, com alta na expressão do gene ERG11 (*up-regulation*) e aumento na concentração intracelular da proteína alvo; e/ou inativação de gene como observado no gene ERG3, que diminui a C5-esterol desaturase (MENEZES *et al*, 2009; SOUZA, 2011; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; BERKOW; LOCKHART, 2017).

A resistência aos polienos pode acontecer também e está relacionada à codificação de enzimas ligadas a biossíntese do ergosterol, e várias situações pode ocasionar na ativação da expressão de genes relacionados à resposta contra polienos, por exemplo, quando o fungo regula a expressão gênica para diminuir a concentração de alguma enzima, até anular a presença de ergosterol na membrana fúngica, constatado relação direta à mutações no gene ERG3 e ERG6 (SOUZA, 2011; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). É importante salientar que muitos mecanismos podem ocorrer em conjunto, e alguns genes podem existir em mais de uma cópia, garantindo a ação efetiva quando são expressos de acordo com a necessidade.



**Figura 9 – Comparação de mecanismos de resistência ao fluconazol em espécies de *Candida*.** (A) A inativação de ERG3 resulta na utilização de esteróis alternativos na membrana de levedura. (B) A absorção de esteróis exógenos ajuda na inibição da produção de esteróis endógenos (C) e (D) Transportadores reduzindo a acumulação intracelular de azóis. (E) A baixa afinidade inerente da ligação do fluconazol ao ERG11 específico da espécie de *Candida* pode diminuir o potencial do fluconazol para inibir proteica. (F) A expressão aumentada da proteína ERG11 pode ajudar a superar a atividade dos azóis (G) A aneuploidia pode promover a adaptação genética à exposição azóis. (H) Mutações em ERG11 também podem resultar em proteínas com afinidade reduzida para a ligação ao fluconazol. Fonte: Whaley *et al*, 2017.

## 2.7 A própolis vermelha de Alagoas (PVA)

Desde antiguidade, há acerca de 300 anos a.C, os egípcios utilizavam a própolis como anti-putrefativo e no embalsamento dos seus cadáveres, mas o seu reconhecimento medicinal veio através da medicina greco-romana, como antisséptico e cicatrizante para tratamento de feridas e desinfetante bucal, por Aristóteles, Plínio e Galeno (RIGHI *et al*, 2008). Manuscritos de culturas milenares como a chinesa, tibetana e inca indicam receitas com o mel, própolis e



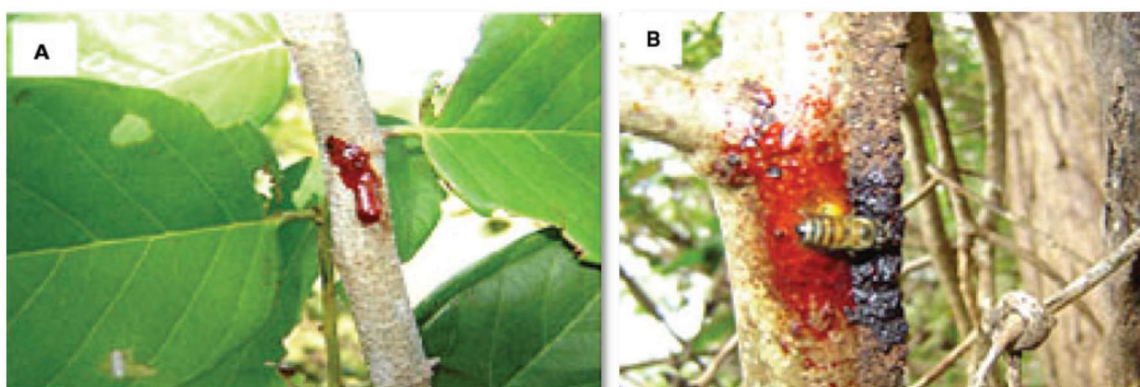
larvas de abelhas, e até mesmo o uso das abelhas para cura e prevenção de doenças e uso da própolis como agente antitérmico (CASTALDO; CAPASSO, 2002). No Brasil o interesse pelas propriedades terapêuticas da própolis começou na década de 80, após a publicação do trabalho de Ernesto Ulrich Breyer sobre Abelhas e saúde (SALATINO *et al.* 2005), que defendia o potencial medicamentoso do mel e seus derivados.

A própolis é uma resina produzida pelas abelhas *Apis mellifera*, para proteger a colmeia contra insetos invasores como aranhas e escorpiões e agentes contaminantes como fungos e bactérias (BASTOS, 2008; SILVA *et al.*, 2006;). A produção ocorre a partir de resinas coletadas pelas abelhas na flora regional, permitindo assim uma variação de cor, sabor e aroma conforme sua origem botânica. Uma vez que a própolis produzida no Nordeste brasileiro tem diversas características baseadas na flora da região, vários pesquisadores já realizaram pesquisas comparativas com própolis de outras regiões brasileiras, quando por exemplo, constataram que a própolis nordestina de Pernambuco (Brasil) apresenta atividade antimicrobiana superior a própolis de Minas Gerais (SILVA *et al.*, 2006).

Avaliando a composição da própolis de forma geral, encontra-se cerca de 30-40% de cera, 5-10% de pólen, 50-60% de resina e oligoelementos como o ferro, cobre e alumínio e além de vitaminas B1, B2, B6, C e (LUSTOSA *et al.*, 2008). Foram identificados mais de 300 compostos existentes na própolis e a maior parte desses são flavonoides, responsáveis pelas propriedades biológicas e antimicrobiana. Também fazem parte da complexa composição deste derivado apícola os terpenóides, aldeídos, chalconas, pterocarpano, flavona, antocianidina, cetonas, fenilpropanóides como ácido caféico e clorogênico, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos e outros compostos em pequenas quantidades (PAULINO, 2005; CABRAL, *et al.*, 2009).

Observando a classificação da própolis brasileira quanto às suas características fitogeográficas e de cor, sua distribuição geográfica é dividida da seguinte forma: Na região Sul do país foram encontrados vários tipos e classificados em grupo 1, a própolis amarela; grupo 2 como própolis castanho claro; grupo 3 como própolis castanho escuro; grupo 4 chamada própolis castanho claro; grupo 5 como própolis marrom esverdeado; na região Nordeste encontraremos o grupo 6 conhecida como própolis marrom avermelhado; grupo 7 como marrom esverdeado; grupo 8 própolis castanho escuro; grupo 9 como própolis amarela; grupo 10 como amarela escuro; grupo 11 como própolis amarela e na região Sudeste o grupo 12 conhecida como própolis verde (PARK *et al.*, 2000; ALENCAR *et al.*, 2007).

Uma nova variedade de própolis foi descrita por Trusheva *et al.* em 2006 com diferente constituição biológica, sendo, portanto, criado o 13º grupo onde se enquadra a própolis vermelha brasileira, mas sem ainda ter a definição da sua origem botânica, que só foi indicada em 2008 por Dausch e colaboradores. Então, a própolis vermelha do grupo 13 tem sua origem da *Dalbergia castophyllum*, planta típica do litoral alagoano conhecida popularmente como rabo-de-bugio (Fig. 10), onde abelhas coletam seu exsudato vermelho responsável pela cor da própolis (DAUGCSH *et al.*, 2008; LUSTOSA *et al.*, 2008; RIGHI *et al.*, 2011;). Tal origem atribui uma composição única no mundo à própolis de Alagoas, e por isso teve a sua Indicação Geográfica (IG) como indicada na Figura 11, reconhecida pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI, 2016).



**Figura 10 – (A) Resina produzida pela *Dalbergia ecastophyllum* encontrada nos Manguezais de Alagoas. (B) *Apis mellifera* coletando a resina para produção da própolis vermelha.** Fonte: Dausch *et al.*, 2007.



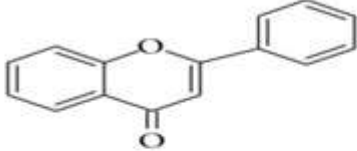
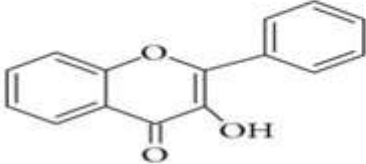
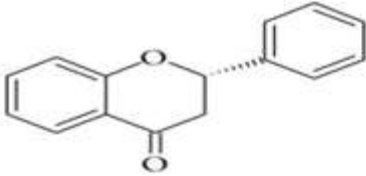
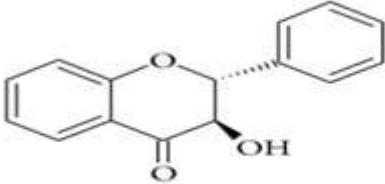
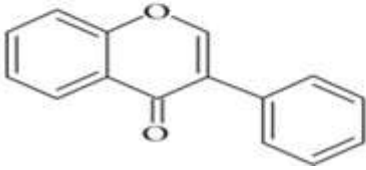
**Figura 11 – Carta de outorga da IG-PVA, emitida em 2012 pela INPI.** Fonte: INPI

A própolis alagoana vermelha (PAV) oriunda de Marechal Deodoro (município de AL) é rica em compostos fenólicos como flavonóides (flavonas, flavonolonas), taninos, xantonas e triterpenoides, que funcionam causando danos na parede e membrana de microrganismos (MENDONÇA *et al.*, 2015). Os flavonóides são os compostos mais pesquisados devido às suas propriedades farmacológicas, antimicrobiana, antiviral e antioxidante (PARK *et al.*, 2000), são compostos fenólicos que apresentam na sua estrutura uma cadeia de propano ligado a dois anéis de benzeno ligados a um anel pirano, conforme apresentado na Figura 12, que são metabolizados pelos animais, tornando-os viáveis para aplicação na área médica em humanos e animais (ALENCAR *et al.*, 2007; LUSTOSA *et al.*, 2008).

Sabemos que na PVA podemos encontrar mais de 38 tipos de flavonóides, como quercetina, pinocembrina, crisina, artepilina-C e outros, e a presença desses flavonóides atua como marcador biológico desse bioativo, logo, a quantificação do mesmo certifica a sua qualidade, podendo tal processo ser realizado pela atividade antioxidante da própolis (RIGHI *et al.*, 2008; MENDONÇA, 2011). Foram identificados na PVA quatro isoflavonas, desconhecidas nos outros 12 tipos de própolis brasileiras (homoptero carpina, dihidroisoflavona, medicarpina e 4,7-dimethexo-2-isoflavona), dotadas de propriedades antifúngica, antibacteriana, anticâncer e antioxidante (RUFER; KULLING, 2006; ALENCAR *et al.*, 2007).

A atividade de própolis de origem brasileira já foi avaliada em cepas de referência em algumas bactérias, sendo constatada atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* (RIGHI *et al.*, 2011). Extrato bruto e frações da própolis vermelha do Estado de Pernambuco apresentou atividade também contra cepas de referência de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *Cryptococcus neoformans* (NEVES *et al.*, 2016), enquanto Freire e colaboradores (2016) testaram própolis de diferentes fontes do Brasil contra várias cepas de *Candida* de referência oriundas de banco holandês CBS (Central Bureau voor Schimmelcultures; *Central Bureau of Fungal Cultures*) tanto nas formas plactônicas como biofilme, constatando baixos índices de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para do extrato bruto de PVA, que ainda teve frações etanólicas testadas com boa inibição das cepas-padrão. Conforme constata-se, existem dados sobre atividade antibacteriana e antifúngica de diferentes própolis brasileiras, com algumas pesquisas focando a atividade antimicrobiana da PVA, entretanto, observamos testes realizados apenas com cepas de referência cadastradas em importantes bancos internacionais,

mas não com cepas de origem clínica, que podem apresentar resultados diferenciados frente ao extrato bruto de PVA e suas frações.

Grupo de Flavonóides	Estrutura Química
Flavonas	
Flavonóis	
Flavononas	
Flavanonol	
Isoflavonas	

**Figura 12– Grupos de flavonóides encontrados na composição da própolis.** Fonte: KUMAR; PANDEY, 2013

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral:

Determinar atividade antifúngica do extrato bruto da própolis vermelha de Alagoas e suas diferentes frações contra as principais espécies de *Candida* clinicamente importantes, oriundas pacientes com candidíase vulvovaginal.

#### 3.2 Específicos:

- Selecionar e reativar diferentes espécies de *Candida* isoladas em pacientes com candidíase vulvovaginal e armazenadas em micoteca clínica.
- Avaliar a atividade antioxidante da própolis vermelha de Alagoas pelo método DPPH.
- Determinar o perfil de susceptibilidade para *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (cepas de referência e isolados clínicos de origem vaginal) frente ao cetoconazol, itraconazol, nistatina e fluconazol, através dos métodos de disco-difusão e microdiluição.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico da própolis vermelha de Alagoas, bem como suas frações acetanólica, clorofórmica e hexânica para *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (cepas de referência e isolados clínicos de origem vaginal) através dos métodos de cup-plate e microdiluição.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Local do estudo

A presente pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Clínica do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (LMC/ICBS) e no Laboratório de Análises Farmacêuticas e Alimentos da Escola de Enfermagem e Farmácia (LAFA/ESENFAR), ambos localizados na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), sob a coordenação da Profa. Dra. Fernanda C. de A. Maranhão e Prof. Dr. Ticiano G. do Nascimento, respectivamente. O preparo do extrato etanólico e frações e demais análises da própolis vermelha de Alagoas (PVA) foram efetivadas no LAFA, enquanto que testes antifúngicos foram realizados no LMC.

### 4.2 Isolamento e identificação das espécies de *Candida*

Inicialmente, foram selecionadas 5 diferentes cepas de referência do *American Type Culture Collection* (ATCC) de espécies de *Candida* (*Candida albicans*/64548, *C. glabrata*/90030, *C. tropicalis*/750, *C. parapsilosis*/28019 e *C. krusei*/6258), além de efetivada uma busca na micoteca clínica do LMC de três isolados clínicos referentes à cada espécie *Candida* spp. citadas acima, que foram obtidos de pacientes com candidíase vulvovaginal voluntários em pesquisa anterior aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFAL (ANEXO I) através da Plataforma Brasil ([www.plataformabrasil.saude.gov.br](http://www.plataformabrasil.saude.gov.br)) com processo sob número 23065.017665/2011-64) Cada isolado clínico do gênero *Candida* selecionado para esta pesquisa teve sua espécie anteriormente identificada através de PCR da região ITS do rDNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) antes de serem armazenadas na micoteca do LMC sob refrigeração a - 20°C em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) acrescido de glicerol a 20%, minimizando os danos que a refrigeração pode causar nas células leveduriformes, permitindo a viabilidade celular do microorganismo.

Os isolados *Candida* spp. foram descongelados gradativamente e reativados após inoculação em tubo de ensaio com caldo BHI em cabine de segurança biológica (CBS) Classe II-A (Veco), seguindo para incubação em estufa bacteriológica a 37°C em até 48 h. Em seguida, uma alíquota de cada isolado foi semeada em ágar Sabouraud Dextrose (ASD) para avaliar macromorfologia e características do gênero *Candida* após incubação a 37°C em até 48 h em estufa.

Constatado o crescimento leveduriforme característico, realizou-se o subcultivo em meio cromogênico HiCrome® *Candida* (incubação em estufa a 37°C por 24-48 h), para avaliar a distinção de cores que auxilia na identificação presuntiva de três espécies de *Candida* spp. O meio é fundamentado na mudança de pH e fermentação de substratos cromogênico, no qual a presença da hexosamidase cromogênica na sua formulação auxilia na identificação de espécies de importância clínica, de acordo com o manual do fabricante (Himedia). Para melhor compreensão de como foram obtidas as cepas e isolados clínicos de *Candida* spp estudadas, segue-se um fluxograma das etapas envolvidas neste procedimento (Fig. 13).

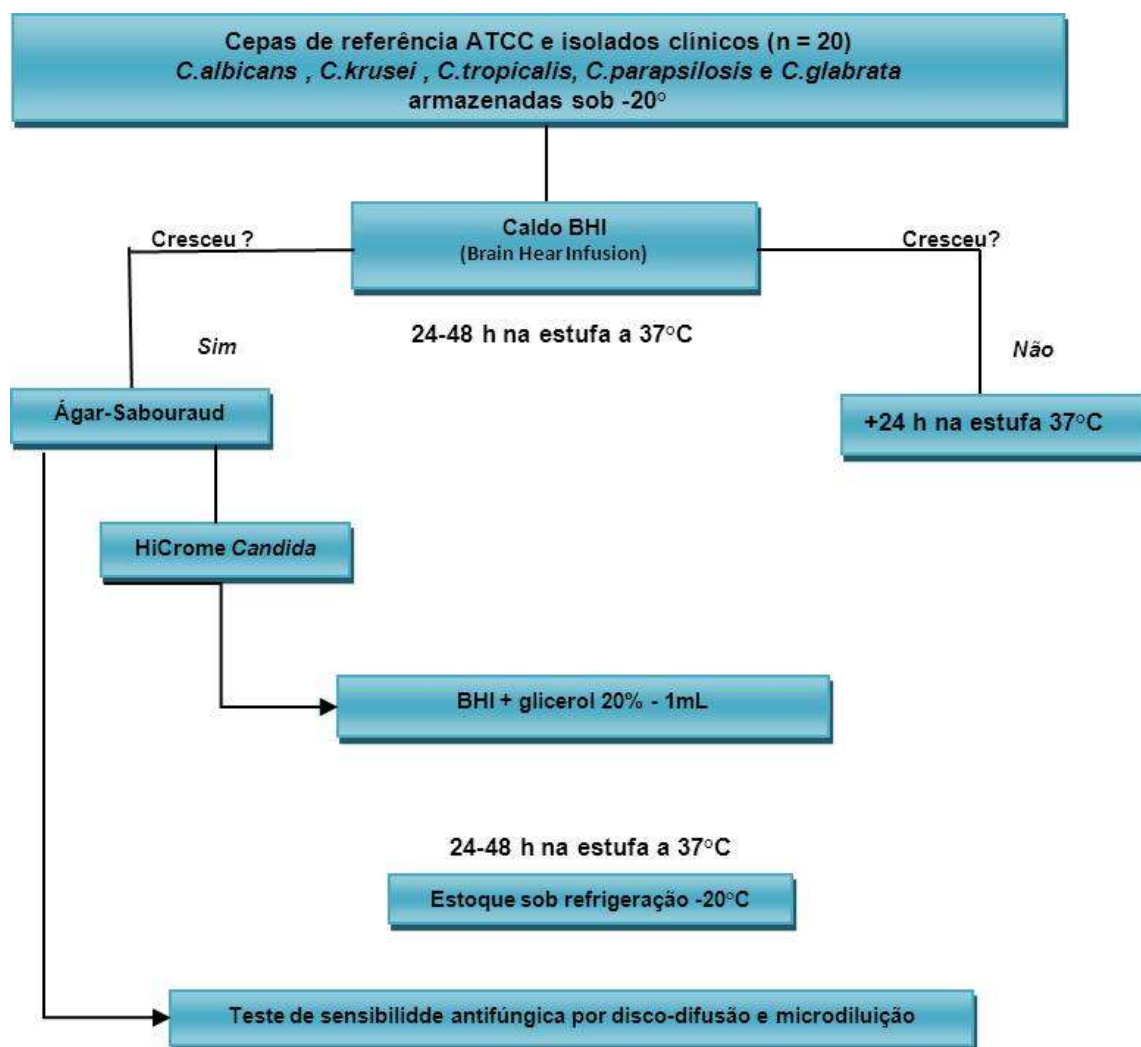


Figura 13 – Fluxograma com as etapas para isolamento e purificação das cepas e isolados clínicos de espécies do gênero *Candida*. Fonte: Autor

Seguindo o indicado por Alencar e colaboradores (2007), a própolis bruta foi triturada e cerca de 100g foi submetida à extração com 400mL de etanol (96°GL) e incubação em temperatura ambiente por 48 horas. Em seguida o material passou por três lavagens com etanol (96°GL) com o objetivo de esgotar a extração da própolis. A suspensão formada foi filtrada em papel de filtro, com o uso de bomba à vácuo para obtenção do extrato etanólico da própolis diluída. Em seguida, o mesmo foi evaporado em rotoevaporador (Fig. 14), resultando no extrato etanólico concentrado de própolis.



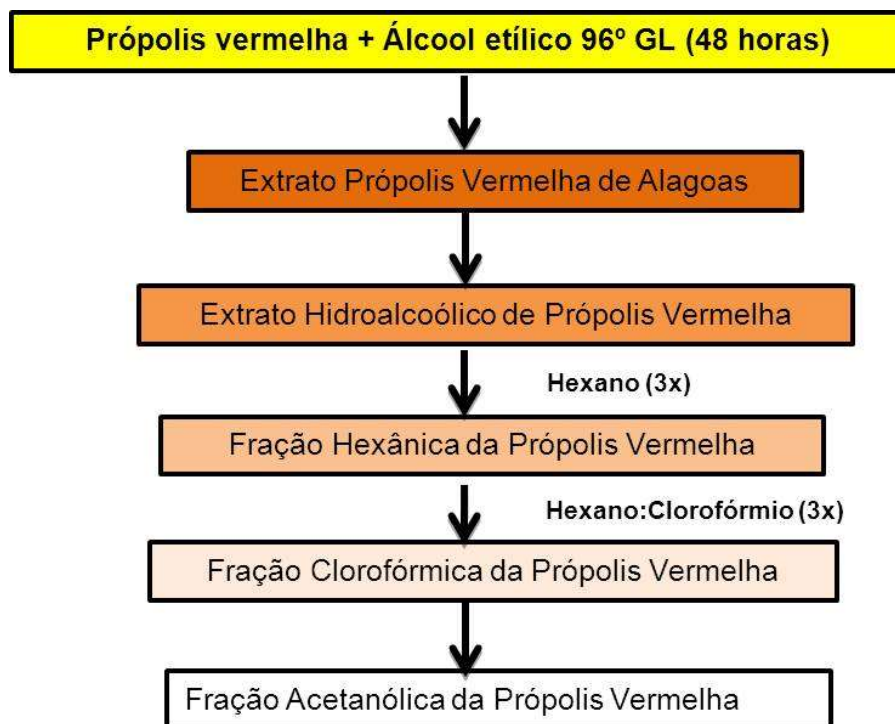
**Figura. 14 – Evaporação para obtenção do extrato de própolis vermelha em rotoevaporador no LAFA/ESENFAR/UFAL.**

Para obtenção das frações de própolis a partir do extrato etanólico concentrado (EEC), este foi lavado com solventes com polaridade crescente (particionamento líquido-líquido): hexano, clorofórmio e acetato de etila. O EEC foi misturado por agitação com hexano (PA) e deixado em repouso em funil de decantação até a completa separação das fases, quando a fase mais densa foi coletada, chamada de resíduo do extrato de própolis, enquanto a fase menos densa foi reservada para o preparo da fração clorofórmica, conforme indicado na Figura 15.

No preparo da próxima fração, uma mistura de hexano:clorofórmio (7:3) foi preparada e misturada por agitação com resíduo do extrato de própolis em funil de decantação, e novamente aguardou-se a completa separação de fases, usando a fase mais densa coletada para ser misturada com clorofórmio (PA) e deixada em repouso até a completa separação de fases.



A fase mais densa correspondeu à fração clorofórmica da própolis vermelha, sendo a fase menos densa separada para o preparo da fração acetônica. Para obtenção da última fração, uma mistura de clorofórmio:acetato de etila (7:3) foi preparada com resíduo do extrato de própolis em funil de decantação. Com a completa separação de fases, aquela mais densa foi coletada (fração acetônica) e em todas as etapas o procedimento foi repetido três vezes.



**Figura 15 – Fluxograma para obtenção do extrato e frações da própolis vermelha conforme polaridade crescente dos solventes.** Fonte: Autor

#### 4.3 Atividade antioxidante da própolis vermelha de Alagoas

A determinação da atividade antioxidante da PVA foi feita pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila), empregado para substâncias puras, misturas e/ou matrizes complexas. Como os flavonóides são os constituintes prevalentes na composição da própolis, a avaliação da atividade antioxidante é usada para validar a qualidade da própolis, a partir dos níveis de concentração dos flavonóides presentes na amostra analisada nas suas frações. Esse método foi realizado de acordo com Mendonça *et al.* (2015), e é considerado, fácil, barato, altamente

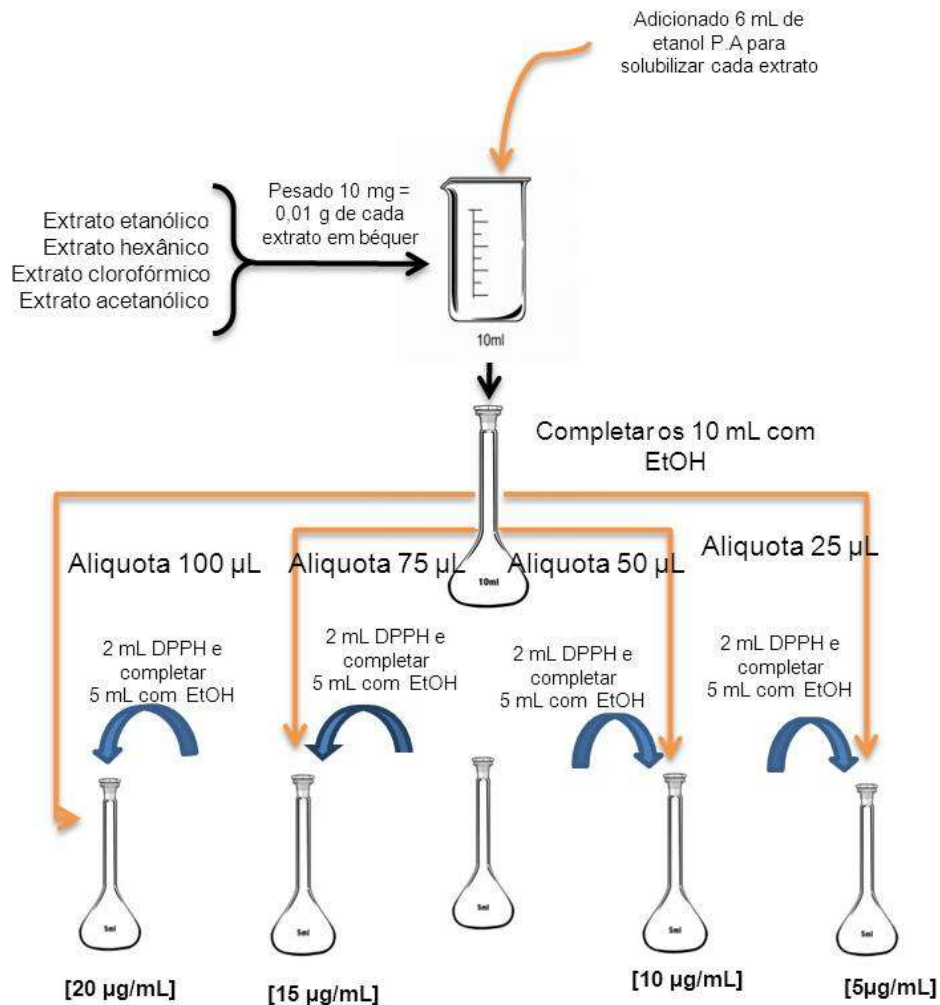
sensível e econômico, pois o DPPH não é gerado e o sistema precisa apenas do radical e do antioxidante, devendo ser empregado como solvente metanol ou etanol, no meio alcóolico há uma maior facilidade da doação de um átomo de hidrogênio do álcool e aumentando a solubilidade.

O método se baseia na transferência de elétrons de um substrato antioxidante para um radical livre, o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), que ao se reduzir a coloração altera de púrpura para amarelo, e a mudança da cor resulta na diminuição da absorvância do radical DPPH•, que foi monitorada por espectrofotômetro UV/visível (Modelo UV-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan) para a determinação da capacidade antioxidante. Essa avaliação foi realizada no escuro, pois a luz interfere na reação do radical DPPH• com a substância antioxidante em análise, acelerando a diminuição da absorvância e conseqüente alterando os resultados finais, conforme indicado por Oliveira e colaboradores (2015).

O consumo de DPPH foi monitorado através da medida do decréscimo da absorvância das soluções das amostras, em um espectrofotômetro a 518 nm. A atividade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólico, hexânico, clorofórmico e acetanólico de própolis foram avaliados a partir de 10 mg de cada composto sendo adicionado 6 mL etanol (PA) para solubilizar os extratos (Fig.16), seguindo-se a transferência de cada extrato para um balão de 10 ml, completado o volume com álcool etílico (EtOH). De cada balão foi aliqüotado 100 µl, 75µl, 50µl e 25µl para baldões de 5 ml, a estes foi adicionado 2 ml de DPPH e completado os 5 ml com EtOH, obtendo uma concentração final de 20 µl/ml, 15 µl/ml, 10 µl/ml, 5µl/ml para cada extrato analisado. Após 30 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente, a redução de O DPPH de radicais livres foi medida através da leitura de absorvância em espectrofotômetro a 518 nm.

O mesmo procedimento foi realizado com o etanol substituindo a amostra, considerada como controle negativo (branco) e com trolox como controle positivo. A capacidade de sequestro de radicais livres foi expressa como a porcentagem de inibição de oxidação, e para avaliar o percentual da atividade anti-oxidante foi calculado a absorvância das amostras (branco e controle) conforme fórmula seguinte:

$$\% \text{ Anti-oxidante} = 100 - ((\text{ABS amostra} - \text{ABS Branco}) \times 100) / \text{ABS Controle}$$



**Figura 16 – Etapas do preparo da solução própolis vermelha com DPPH para avaliação da atividade antioxidante da própolis vermelha de Alagoas.** Fonte; Autor

#### 4.4 Avaliação do uso do álcool e DMSO (Dimetilsufóxido) como solvente

Para complementar a avaliação da atividade do extrato e frações da PVA foi necessário investigar a atividade fungicida do EtOH na faixa de concentração 70%-10% e a ação do DMSO (Dimetilsufóxido) como meio de cultura (10%-0,5%), com o objetivo de escolher o solvente a ser empregado nos teste de sensibilidade para solubilizar a própolis, sem interferir no crescimento das células leveduriformes.

O álcool é considerado um solvente universal bastante empregado para obtenção do extrato da própolis e para solubilização do mesmo após evaporação do solvente. O mesmo pode

ser encontrado em diferentes graus de pureza (96 - 99,8%) e na concentração de 70% é considerado com boa atividade bactericida e fungicida. Logo, precisamos avaliar a interferência do álcool numa faixa de concentração 70%-10%, para descartar a ação fungistática ou fungicida deste solvente.

Já o DMSO é usado para diversos fins na indústria farmacêutica, inclusive como solvente por ser um líquido higroscópico, dissolvendo-se em água e no álcool, sendo ainda solúvel em éter, clorofórmio e benzeno, apresentando temperatura de congelamento de 18,5° C, baixa viscosidade e densidade idêntica à da água.

Para avaliar o uso do álcool foi adotado no controle positivo tubo com 5mL de água destilada estéril associado com 0,5 mL (10 gotas) de BHI e para avaliar o uso do DMSO também adotamos como controle positivo que foi adotado para o álcool. Conforme mostra a Figura 17, após o preparo da solução de álcool e DMSO, cada solução foi incubada em estufa a 37°C por 24 h e 48 h para posterior leitura da turbidez, seguido pelo semeio em placa de Petri com meio ASD com clorafenicol para nova incubação na estufa bacteriológica a 37°C por 24 h.

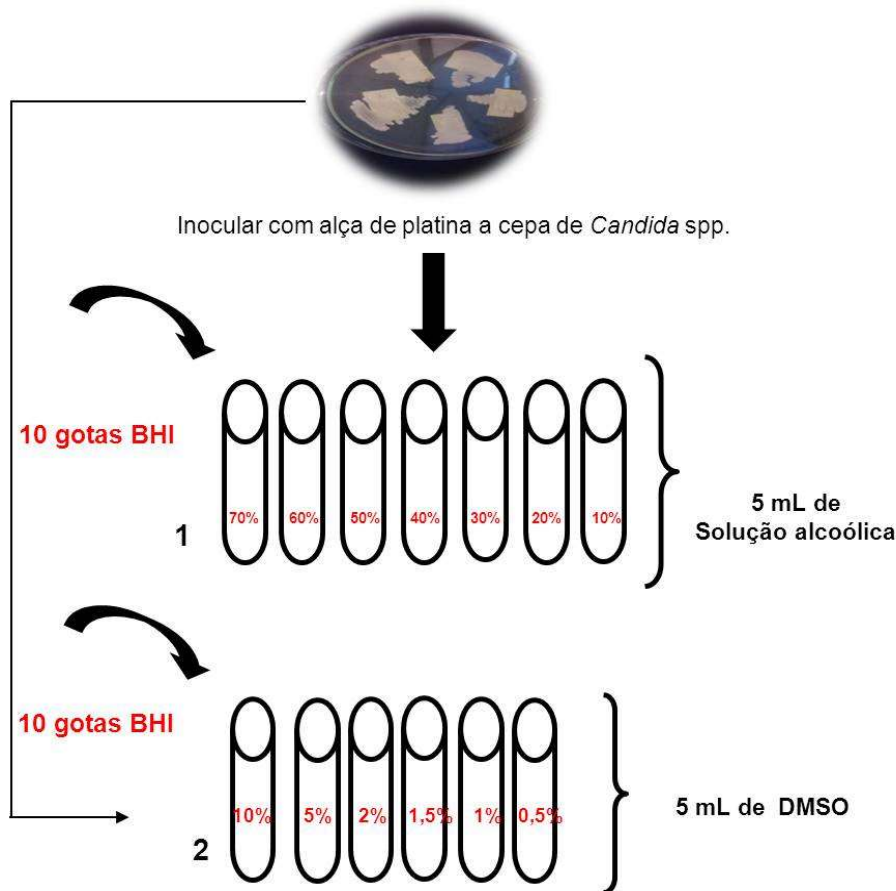


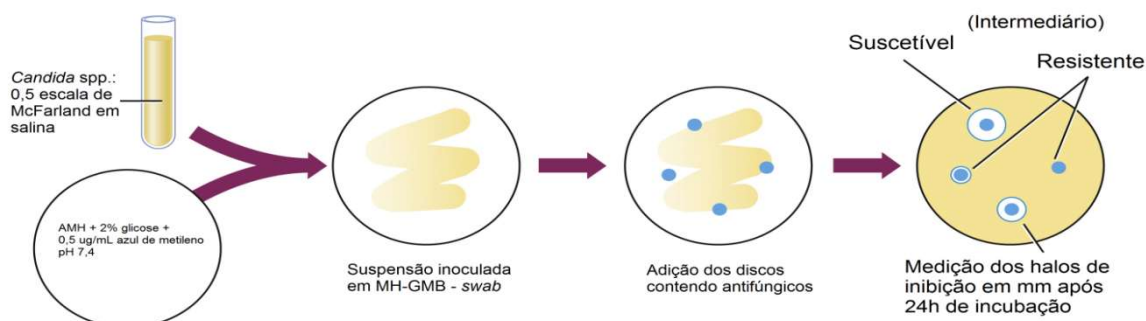
Figura 17 – Fluxograma da avaliação do uso do álcool e DMSO como solvente para solubilização da própolis. Fonte: Autor

## 4.5 Teste de susceptibilidade a antifúngicos (TSA)

### 4.5.1 Método do disco-difusão (Kirby-Bauer)

O perfil de sensibilidade das espécies de *Candida* foi primeiramente feito através do método Kirby-Bauer (1996) ou disco-difusão, utilizando discos dos antifúngicos comercialmente utilizados para avaliação como controle comparativo quanto ao efeito da própolis, listados a seguir: fluconazol (FLU; 25µg/ml), itraconazol (ITR; 10µg/ml), cetoconazol (CET; 15µg/ml) e nistatina (NIS; 50µg/ml) (CECON). A metodologia foi efetivada de acordo com o protocolo M44-A2 disponibilizado pelo *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI, 2005). Todas as etapas de efetivação dos testes de susceptibilidade a antifúngicos foram efetivadas de forma asséptica em CBS Classe II-A (Veco).

Após a reativação das cepas e isolados clínicos (Para cada espécie foi selecionado 1 ATCC e 3 isolados clínicos) a partir de cultivo em ASD de cada representante de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (35°C por 24 h), como indica a Figura 18. coletou-se com alça de platina flambada 1 a 3 colônias de cada isolado para suspensão individualmente em salina esterilizada (NaCl 0,9%) por autoclavagem, a fim de preparar solução com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland e que foi calibrada no LAFA por espectrofotometria em comprimento de onda 530 nm (absorbância 0,08-0,10), gerando solução com aproximadamente  $1-5 \times 10^6$ , que foi usada na inoculação em placa de Petri contendo meio Ágar Miller-Hinton (AMH) com uso de swab estéril para garantir uma distribuição homogênea da levedura. Após a secagem do material na placa, foram distribuídos os discos de antifúngicos FLU, ITR, CET e NIS com distância de 24-25 mm entre eles e da borda da placa, para incubação posterior a 35°C por 24 h em estufa.



**Figura 18 – Esquema do método de disco-difusão para avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos.** Fonte: Adaptado de basicmedcalkey.com.

Todo o experimento foi feito em triplicata e a leitura de cada experimento foi feita a partir da observação de ausência ou presença de halo de inibição ao redor dos discos de antifúngicos, e quando presente, este halo foi medido em mm (milímetros) com auxílio de halômetro, sendo indicados os padrões “Sensível/S”, “Intermediário/I” (que pode ser dose-dependente/DD) ou “Resistente/R”, conforme indicado pelo CLSI para espécies de *Candida*.

#### 4.5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) a partir do método de microdiluição

##### - Preparo do meio RPMI 1640

O ensaio para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado com objetivo de avaliar a menor faixa de concentração de antifúngico capaz de inibir o crescimento fúngico. O protocolo do M27–A2 (CLSI, 2008), foi adotado para o método de microdiluição com o meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640*) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e com indicador de pH vermelho de fenol (pH 7,0-7,1). O meio RPMI foi filtrado em membrana estéril de 0,22 mm, distribuído em 2 frascos estéreis e colocado em estufa a 37° C por 24 h para controle de esterilidade, para ser armazenado a 4° C até o momento do uso.

##### - Preparo solução padrão para antifúngicos comerciais

As soluções dos antifúngicos insolúveis cetoconazol, itraconazol e nistatina foram obtidos após pesagem de cada fármaco e solubilizados em DMSO estéril obtendo uma concentração final de 1600 µg/mL<sup>-1</sup>. Diferentemente, o antifúngico fluconazol foi pesado e solubilizado em água estéril para concentração final de 6400 µg/mL<sup>-1</sup> e cada solução padrão foi armazenada em frasco de vidro estéril e sob refrigeração (8°C). Nos testes para determinação da CIM dos antifúngicos foram adotadas as concentrações preconizadas pelo CLSI M27-A2, onde cetoconazol, itraconazol e nistatina devem ter um intervalo de concentração de 1600 - 0,0313 µg/mL<sup>-1</sup> e o fluconazol 6400-0,125 µg/mL<sup>-1</sup>.

A partir de colônias em Ágar-Sabouraud, uma alíquota de cada isolado foi suspensa em 5 mL de salina estéril (0,9%) ajustado no padrão 0,5 da escala de MacFarland, que

corresponde a  $1-5 \times 10^6$  de unidades formadoras de colônias (UFC). Os testes de microdiluição foram executados em duplicata com algumas modificações em placas de microtitulação com 96 poços, onde foram dispensados 2X a concentração de cada fármaco na coluna 1 num volume de 100  $\mu\text{L}$  com auxílio de uma pipeta multicanal. A coluna 1 continha a maior concentração do fármaco (64 ou 16  $\mu\text{g/mL}$ ) e a fileira 10 a menor concentração do fármaco (0,12 ou 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ) (Fig.19).



**Figura. 19 – Execução da microdiluição em cabine de segurança biológica classe II-A., conforme preconizado pelo CLSI para determinar a susceptibilidade das espécies de *Candida* frente a própolis e suas frações.** Fonte: Autor

A orientação do CLSI indica que a leitura dos resultados pode ser feita visualmente, comparando os poços controle (coluna 11 e 12) com auxílio de um espelho de leitura, usando a seguinte escala numérica: 0 = opticamente claro; 1 = crescimento indefinido; 2 = redução proeminente de crescimento; 3 = ligeira redução do crescimento; e 4 = nenhuma redução do crescimento. Entretanto, para garantir a qualidade do trabalho e reduzir viés com a leitura visual, escolhermos adotar o trifeniltetrazólio (TTC) como agente revelador, que é um indicador de oxirredução enzimática e diferencia tecidos vivos daqueles não vivos, empregado em estudos de viabilidade celular. O composto incolor 2,3,5- trifeniltetrazólio sofre redução enzimática

para 1,3,5-trifenilformazan de cor vermelha, indicando a atividade celular presente (ROZATTO, 2012).

Para titulação com revelador TTC foi usado em concentração de 0,5%, sendo adicionados 20 $\mu$ L a cada poço da microplaca para avaliação após 2 horas. Como o TTC se liga à células viáveis, poços com nenhum crescimento fúngico permaneciam incolores, enquanto que nos poços com crescimento leveduriformes indicando diferentes níveis de atividade dos antifúngicos houve marcação em de vermelho em variadas tonalidades de acordo com o nível de interferência no crescimento (VEIGA, 2016).

#### *- Preparo da solução padrão do extrato da própolis vermelha de Alagoas*

A própolis é uma resina complexa composta por terpenos, flavonóides, e isoflavonas, podendo ser solubilizada em meio alcoólico como metanol e etanol ou com dimetilsufóxido (DMSO), possibilitando solubilizar o extrato etílico, hexânico, clorofórmico e acetanólico, para em seguida ser empregado nos testes de Cup-plate.

Para execução desta etapa foram pesado 50 mg de cada extrato da própolis e solubilizado em 5 mL de DMSO estéril, obtendo uma concentração de 10.000  $\mu$ g/mL. A partir desta solução padrões/estoque de extrato etanólico, clorofórmico, hexânico e acetanólico, foram alíquotas 0,24 mL, 0,16 mL, 0,08 mL e 0,04mL de cada extrato e transferido cada volume alíquotado para um balão de 10 mL e completado o volume de cada balão com água ultra-pura: DMSO, obtendo uma concentração de 240  $\mu$ g/mL, 160  $\mu$ g/mL, 80  $\mu$ g/mL e 40  $\mu$ g/mL, respectivamente.

#### *- Microdiluição com própolis vermelha de Alagoas*

O TSA através do método de microdiluição com a própolis vermelha alagoana foi executado em duplicata de acordo com M27-A2 do CLSI, com concentração inicial de 500  $\mu$ g/mL em 0,1 mL da solução do extrato etanólico, hexânico, clorofórmico e acetanólico, dispostos na coluna 1 da placa que continha a maior concentração do fármaco (500 $\mu$ g/mL), enquanto na coluna 10 foi adicionada a menor concentração do fármaco (0,98 $\mu$ g/mL).

Com auxílio de pipeta multicanal foi transferido 100  $\mu$ L do meio RPMI-1640 da coluna 1-11 e a coluna 12 preenchida apenas com 100  $\mu$ L do meio por se tratar do controle de esterilidade (negativo). Cem microlitros (100  $\mu$ L) da solução do extrato de própolis foram



adicionados (1-11), sendo retirados 100 $\mu$ L e adicionados aos poços subsequentes para diluição do extrato em um intervalo de 500 $\mu$ g-0,98 $\mu$ g, para em seguida ser adicionado 20 $\mu$ L do inóculo a cada poço da placa de microdiluição. As placas foram incubadas a 35° C, tendo sido feita a leitura após 24 h utilizando o TTC como revelador.

#### **4.6 Método *Cup-plate***

Foram realizados bioensaios em triplicata com extrato etanólico de PVA e as frações determinadas com o objetivo de escolher o melhor método baseado em disco-difusão a fim de comparar com as análises obtidas no teste de disco-difusão realizado com antifúngicos disponibilizados comercialmente. Teste feitos com a impregnação do extrato de PVA em discos de 6 mm feitos com papel filtro foram realizados, mas não houve garantia que as proporções finais de PVA nos discos estaria mantida. Sendo assim, optou-se também por testar o método *Cup-Plate*, que visa o crescimento microbiano na superfície e em profundidade, onde cada inóculo fúngico ajustado na escala MacFarland (0,5) foi misturado ao meio Ágar Muller-Hinton já fundido para disposição em placas de Petri esterilizadas. Após secagem, foram feitos 05 (cinco) poços/placas com capacidade para 100 microlitros/poço perfurados com a base de ponteiros esterilizadas, sendo 04 (quatro) poços para incubação separadamente da solução do extrato etanólico e suas frações da PVA, nas concentrações de 240 $\mu$ L, 160 $\mu$ L, 80 $\mu$ L e 40 $\mu$ L; e 01 poço para controle positivo com 100 $\mu$ L de DMSO estéril. As placas semeadas foram incubadas em estufa a 35° C (24 e 48 h).

#### **4.7 Análises estatísticas**

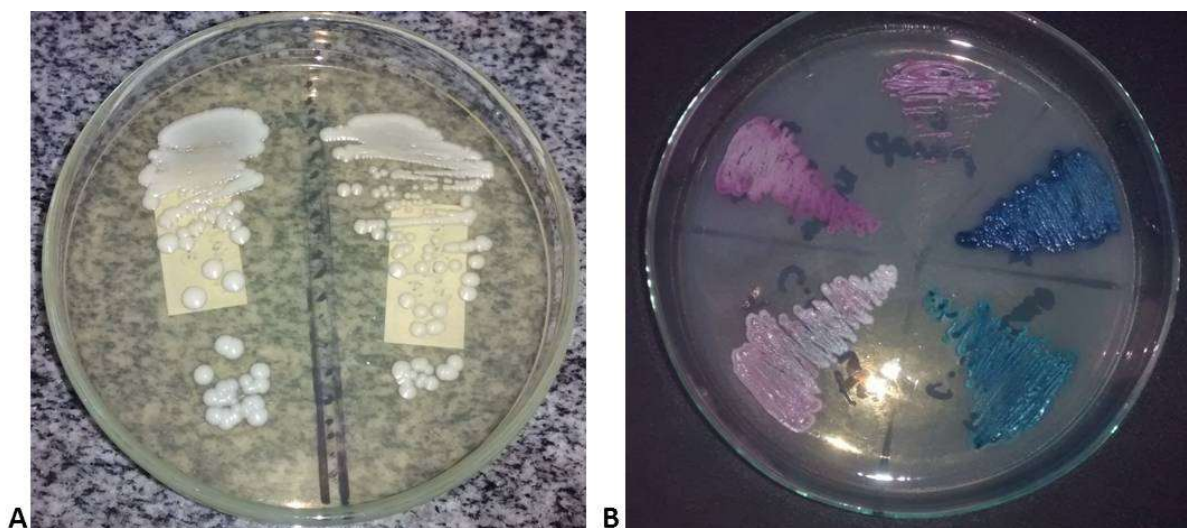
Os dados da atividade de antifúngicos comerciais e do PVA e suas frações frente a diferentes espécies de *Candida* foi avaliado estatisticamente utilizando a plataforma do programa IBM®SPSS (*Statistical Package for The Social Sciences*) versão 23.0 para Windows, quando aplicou-se a análise de variância univariada (UNIANOVA) utilizando a soma dos quadrados Tipo-III, com indicações de cepas e antifúngicos como variáveis independentes, sendo dados de halo (mm) como variável dependente. Análise de *posthoc* foi efetuada por Bonferroni, sendo indicando variância, média e desvio padrão com nível de significância estatística por  $p$ -value ( $p$ )  $\leq 0.05$ . O programa JASP (Versão 0.8.3.1, Amsterdã) também foi usado para teste de Tukey com  $p \leq 0.05$  também foi efetivada, com plotagem, (BoxPlot)

selecionada tipo-violino com elemento *Jitter* para cada cepa em relação ao antifúngico comercial ou o extrato etanólico de PVA e suas frações.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Isolados clínicos de diferentes espécies de *Candida* de micoteca clínica

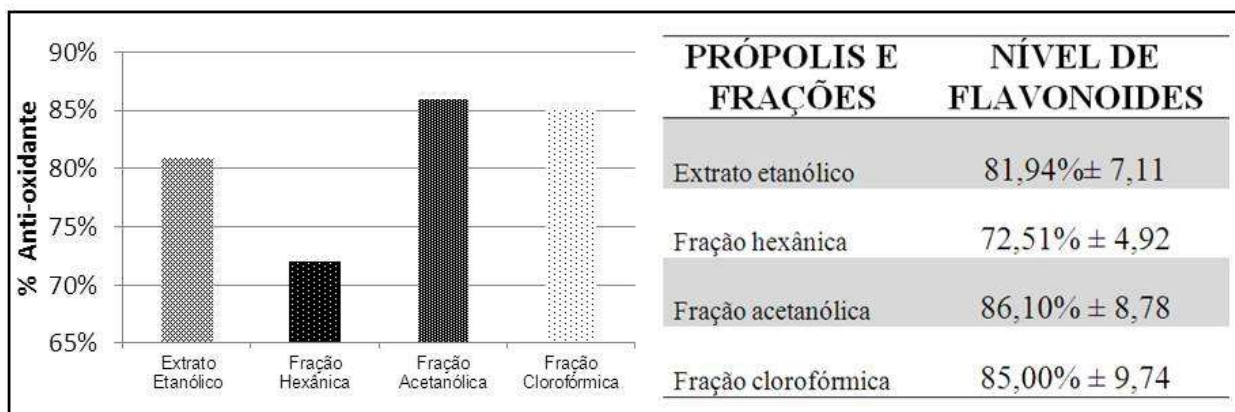
Foi realizada uma busca entre os isolados de origem vaginal estocados na micoteca clínica do LMC/UFAL sob congelamento, e após a seleção de 3 isolados representantes de cada cepa de referência disponível (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*), totalizamos 15 isolados que constavam como identificados por PCR da região ITS, confirmando cada espécie. Apesar disto, foi necessário fazer reativação metabólica dos isolados em meio ASD (Fig. 20.A) e também subcultivo em meio cromogênico (Fig. 20.B) para confirmar se todos os isolados selecionados se encontravam puros e sem contaminação, o que poderia ter ocorrido durante o armazenamento ou em manipulação anterior. Os estoques foram refeitos a partir de cultivos novos, para que fossem utilizados em todas as etapas posteriores e assim dar inícios aos testes de susceptibilidade a antimicrobianos comerciais, bem como ao extrato bruto da PVA e suas frações.



**Figura 20 – Diferentes isolados de *Candida* sp. após cultivo em meio Sabouraud Dextrose Agar. (A) O crescimento demonstra s aparência mucoide típica de leveduras e (B) subcultivo em meio cromogênico Hicrome®*Candida*, indicando o padrão esperado para de *C. albicans* (verde), *C. tropicalis* (azul) e *C. krusei* (rosa). Fonte: Autor**

## 5.2 Atividade antioxidante da própolis vermelha de Alagoas pelo método DPPH

A determinação da atividade antioxidante é fundamental para avaliar a qualidade da PVA e suas frações, determinando o nível de flavonóides na amostra estudada poderemos garantir que há compostos com atividade fungicida. Após a análise pelo método DPPH, constatamos a presença de flavonóides na amostra de extrato etanólico de PVA e em todas suas frações (hexânica, clorofórmica e acetanólica) em quantidades variáveis. De acordo com o exposto na Figura 21, podemos observar que os níveis de flavonóides na PVA estavam elevados próximo ao trolox (97,27%) usado com controle positivo, confirmando a presença de compostos fenólicos na amostra de própolis estudada, que apresentou na fração acetanólica (86,1%) os maiores níveis de flavonóides e a fração hexânica (72,51%) mostrou os menos níveis deste composto fenólico.



**Figura 21 - Avaliação da atividade antioxidante da própolis vermelha e suas frações pelo método de captura do radical livre DPPH.** Fonte: Autor

A presença de maior concentração de flavonóides da na sua composição não é garantia de maior atividade fungicida da fração acetanólica, porque em virtude da afinidade por polaridade haverá variação nos tipos e concentrações de compostos fenólicos presentes nas frações de PVA. E tal fato foi confirmado por Trusheva *et al.* (2006), quando este observou que substâncias com menor polaridade em relação aos flavonóides, podem exercer maior atividade antioxidante, logo, frações menos polares da própolis podem apresentar maior capacidade de radical livre DPPH e também por Cabral *et al.* (2009) que relata diferenças nos resultados da atividade antioxidante, devido a influência da concentração da amostra.

A sazonalidade, local e o período de coleta podem influenciar na concentração de flavonoides que agem diretamente na geração do dano em microrganismos. Tal fato foi observado por Castro *et al.* (2007), que detectou diferenças na atividade antibacteriana em própolis da região Sudeste e Nordeste, provavelmente em decorrência da quantidade de flavonoides alterada pela sazonalidade de cada própolis colhida na região envolvida. Mendonça *et al.* (2015) observou em seu estudo com própolis vermelha alagoana que a fração hexânica apresentou maior atividade antioxidante, mas em nosso estudo foi a fração acetanólica, e tal fato pode ser justificado pela sazonalidade do período de coleta de cada lote de PVA coletado por *et al.* (2015) em relação ao avaliado neste trabalho atual. Trusheva *et al.* (2006) detectou ainda que amostras de própolis apresentam substâncias com menor polaridade em relação aos flavonóides, que podem exercer maior atividade antioxidante.

Em relação a pesquisas que utilizaram própolis vermelha de Alagoas, Mendonça *et al.* (2015) em sua pesquisa ainda observou que a fração hexânica e acetanólica de PVA apresentaram maior percentual de captura do radical livre DPPH em relação aos nossos resultados, mesmo se tratando de PVA oriunda da mesma região de Alagoas. Já Cabral *et al.* (2009) observou que apenas a fração hexânica de PVA apresentava maior atividade antioxidante, mas não a acetanólica, sendo o mesmo observado em tese de doutorado realizada por Silva (2015), quando este usou micropartículas para encapsular PVA, visando produção de cosmético. Tais indicações reforçam que coletas de PVA realizadas em momentos climáticos diferentes apresentam variação de flavonoides que poderiam interferir na atividade geral da PVA, portanto, estudos mais profundos podem indicar o melhor momento para realizar coleta de PVA com condições climáticas que favoreçam a produção em maiores quantidades de flavonoides.

### **5.3 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA) de diferentes espécies de *Candida***

#### **5.3.1 Método disco-difusão (Método Kirby-Bauer) com antifúngicos comerciais**

A avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos pelo método de disco-difusão foi realizada em cepas de referência (ATCC) de diferentes espécies de *Candida*, e mostrou diferentes padrões de susceptibilidade (Fig.22) mais frequente entre os isolados clínicos do que nas cepas de referência testadas.

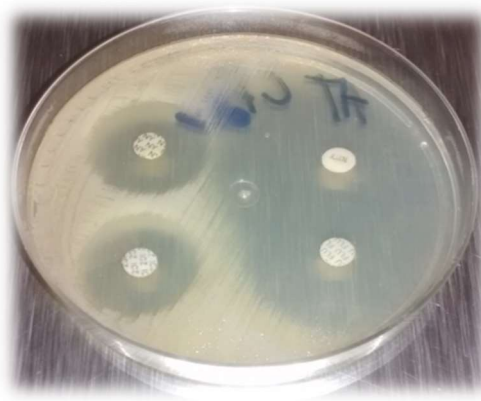


Figura 22 – Placa de Petri com ágar Muller-Hinton com resultado de disco-difusão (Método de Kirby-Bauer): Padrão de susceptibilidade de cepa de referência (ATCC) de *Candida tropicalis* aos antifúngicos (ceftioconazol, nistatina, fluconazol e nistatina). Fonte: Autor

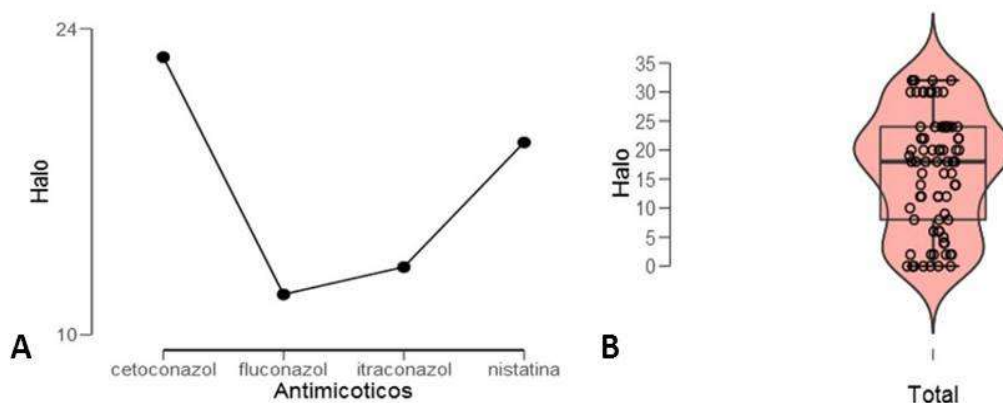


Figura 23 – Em (A) observa-se uma visão geral, demonstrando maior susceptibilidade ao ceftioconazol e nistatina, bem como a presença de cepas com resistência a fluconazol e o itraconazol (B) resultado geral exposto em *BoxPlot* tipo-violino, indicando dispersão de cepas e isolados clínicos de acordo com a posição em milímetros aproximada dos halos observados para cada análise individual. Consta-se a variedade de perfil entre as cepas. Gráficos disponibilizados pelo programa JASP. Fonte: Autor

Na Figura 23, constatamos que os antifúngicos ceftioconazol e nistatina foram os fármacos com maior susceptibilidade perante as cepas ATCC e os isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* em relação aos antimicóticos itraconazol e fluconazol. Nota-se variação na susceptibilidade aos antimicóticos entre as espécies de *Candida* estudadas na Figura 23B, confirmando a importância de realizar o teste de

susceptibilidade na rotina diagnóstica, uma vez que existe essa variabilidade na resposta frente às poucas opções farmacoterapêuticas disponíveis para o tratamento da CVV e CVV-R.

Na Tabela 1 encontram-se os resultados obtidos a partir do teste (em mm) com cetoconazol (CET), fluconazol (FLU), itraconazol (ITR) e nistatina (NIS) para todas as cepas de referência e isolados clínicos, sendo ainda indicado como se enquadra cada avaliação de acordo com o CLSI (R, Resistente; I, Intermediário; DD, Dose Dependente; S, Sensível). Observamos nesses resultados que as cepas ATCC de *C. albicans* foram susceptíveis aos quatro antifúngicos testados, apresentando halos de 32 mm para CET, 30 mm para FLU, 30 mm para ITR e 20 mm para NIS, enquanto que a ATCC de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* mostraram padrão similar, exceto para ITRA, pois se apresentaram como padrão Intermediário-Dose dependente.

**TABELA 1. Correlação da susceptibilidade de antifúngicos por disco-difusão como os halos encontrados pela disco-difusão para as espécies de *Candida* com a susceptibilidade determinada pelo CLSI.**

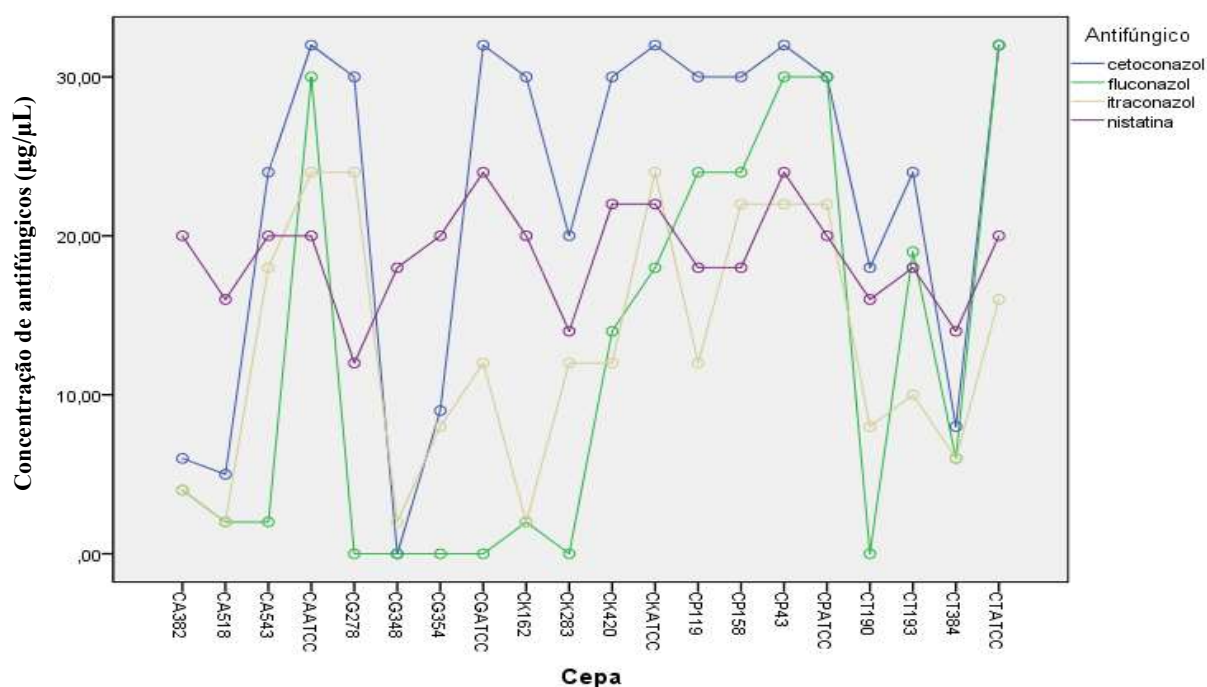
<b>CEPAS-ATCC</b>	<b>Cetoconazol mm/CLSI</b>	<b>Fluconazol mm/CLSI</b>	<b>Itraconazol mm/CLSI</b>	<b>Nistatina mm/CLSI</b>
<i>Candida albicans</i>	32/S	30/S	24/S	20/S
<i>Candida tropicalis</i>	32/S	32/S	16/DD	20/S
<i>Candida parapsilosis</i>	30/S	30/S	22/DD	20/S
<i>Candida glabrata</i>	32/S	-/R	12/R	24/S
<i>Candida krusei</i>	32/S	18/DD	24/S	22/S
<b>ISOLADOS CLÍNICOS</b>	<b>Cetoconazol mm/CLSI</b>	<b>Fluconazol mm/CLSI</b>	<b>Itraconazol mm/CLSI</b>	<b>Nistatina mm/CLSI</b>
<i>C. albicans</i> 382	6/R	4/R	4/R	20/S
<i>C. albicans</i> 518	5/R	2/R	2/R	16/S
<i>C. albicans</i> 543	24/I	2/R	18/DD	20/S
<i>C. tropicalis</i> 193	24/I	19/S	10/R	18/S
<i>C. tropicalis</i> 190	18/R	0/R	8/R	16/S
<i>C. tropicalis</i> 384	8/R	6/R	6/R	14/S
<i>C. parapsilosis</i> 43	32/S	30/S	22/DD	24/S
<i>C. parapsilosis</i> 119	30/S	24/S	12/R	18/S
<i>C. parapsilosis</i> 158	30/S	24/S	22/DD	18/S
<i>C. glabrata</i> 278	30/S	-/R	24/S	12/S
<i>C. glabrata</i> 348	-/R	-/R	2/R	18/S
<i>C. glabrata</i> 354	9/R	-/R	8/R	20/S
<i>C. krusei</i> 162	30/S	2/R	2/R	20/S
<i>C. krusei</i> 283	20/R	-/R	12/R	14/S
<i>C. krusei</i> 420	30/S	14/R	12/R	22/S

\*: os resultados estão expressos em mm (milímetros); 0 Indica ausência total de halo. Perfil de resposta ao fármaco: R: Resistente; I: Intermediário; DD: Intermediário dose-dependente; S: Sensível.

Todas as cepas ATCC foram totalmente susceptíveis apenas a cetoconazol e nistatina: *C. glabrata* (32 mm para CET (24 mm para NIS), *C. krusei* (32 mm/22 mm) e *C. tropicalis* (32 mm/20 mm). Em relação ao fluconazol constatamos ausência de halo nas cepas de *C. glabrata* e *C. krusei*, atestando resistência a este fármaco enquanto que *C. krusei* tem padrão Dose dependente, sendo a cepa *C. tropicalis* sensível ao FLU (32 mm). Susceptibilidade ao itraconazol foi observada entre as cepas de referência apenas para *C. albicans* e *C. krusei* (Tabela 1). A maioria dos isolados clínicos que apresentam resistência ao FLU também são resistentes ao ITRA (10, além de 1 R/DD), assim como a única ATCC que apresenta essa co-resistência (*C. glabrata*). Entre as espécies de *Candida*, todas as cepas ATCC ou isolados clínicos, apresentaram susceptibilidade a nistatina (polieno), mas isolados de *C. glabrata* (CG 348, CG354) que responderam bem à NIS se comportaram como resistentes aos demais antifúngicos testados.

No gráfico gerado pelo programa SPSS (Fig. 24) observa-se com mais clareza o perfil das cepas e isolados clínicos testados, como 11 cepas apresentaram resistência ao FLU, sendo 10 isolados clínicos (*C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*) e 1 cepa de referência (*C. glabrata*). Indicado pela cor roxa nota-se em relação à nistatina todas (*Candida* spp.) são susceptíveis à nistatina. Quando comparamos esta Figura 24, fica claro o padrão diferenciado entre as cepas de referência e os isolados. Em relação CET observou-se que todas as cepas ATCC são sensíveis, mas há um padrão variável entre os isolados clínicos, com padrões de intermediário a resistente com frequência (9/15). Sobre ITR observamos que somente a *C. glabrata* (CG278), foi susceptível, logo, detectamos que entre todas as espécies isoladas de CVV analisadas apresentavam resistência a pelo menos 02 (dois) antifúngicos testados e que 8 desses isolados clínicos apresentavam-se resistentes à CET, ITR e FLU, drogas indicadas pelo RENAME para tratamento de CVV.





**Figura 24** -:Perfil de susceptibilidade aos antifúngicos cetoconazol, fluconazol, itraconazol e nistatina de 5 cepas de referência (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) e 15 isolados clínicos obtidos de pacientes com candidíase vulvovaginal. Cepas e isolados indicados por siglas referentes às espécies, sendo os isolados clínicos seguidos por números de registro na micoteca clínica: *C. albicans*: CAATCC, CA382, CA518 e CA543; *C. tropicalis*: CTATCC, CT190, CT193 e CT384; *C. parapsilosis*: CPATCC, CP119, CP158, CP43; *C. krusei*: CKATCC, CK162, CK283, CK420; *C. glabrata*: CGATCC, CG278, CG348 e CG354. Gráfico gerado pelo SPSS.

Dota *et al.* (2010) observou em isolados de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. lusitaniae* coletadas de pacientes com CVV e CVV-R, uma maior resistência ao cetoconazol (32,9%) e itraconazol (17%), e que a prevalência de resistência foi semelhante tanto *C. albicans* e como nas cepas não-*albicans*. Pedrosa *et al.*(2014) em seu estudo com espécies de *Candida* isoladas de secreção vaginal observou que a *C. krusei* apresentou o maior perfil de resistência em relação as demais cepas estudadas (*C. albicans*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*; *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*), com 1 isolado resistente ao fluconazol e outro ao itraconazol. Estes padrões são similares aos encontrados entre os isolados de Alagoas, constatando maior susceptibilidade a azólicos apenas entre aqueles da espécie *C. parapsilosis*.

Por se tratar do polieno de escolha para o tratamento de CVV, resultados referentes à nistatina devem ser avaliados detalhadamente, ao invés da anfotericina B que é reserva para quadros de infecções sistêmicas. De acordo com o relato de pacientes, Fornari *et al.* (2016) selecionou isolados de *C. albicans* associados à CVV e CVV-R, e observou que todos os isolados de pacientes com CVV-R eram resistentes à nistatina e sensíveis ao fluconazol (n=10), diferentemente, em nosso estudo a nistatina é o antifúngico com maior susceptibilidade as espécies de *Candida*.

Durante o estudo sobre a eficácia da nistatina e fluconazol no tratamento da CVV em *C. albicans* por Martins et al. (2012), foi constatado que a nistatina era mais eficaz nos isolados clínicos de *C. albicans*, enquanto o fluconazol era mais efetivo contra *Candida* não-*albicans*. Tal observação reforça a necessidade da solicitação e realização de teste de susceptibilidade ao antimicóticos pelo método de disco-difusão na rotina do diagnóstico laboratorial, para auxiliar na garantia de uma terapia antifúngica segura e eficiente. Depois da nistatina, o antifúngico com melhores resultados nos isolados clínicos foi o cetoconazol, também bastante encontrado na formulação de cremes vaginais.

### 5.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima através de microdiluição com antifúngicos comerciais

A aplicação do método de microdiluição realizado com as cepas de referência e isolados de *Candida* coletados de pacientes alagoanas nos deu maior precisão em relação à dosagem inibitória mínima de cada antifúngico testado. Na Figura 25 pode-se observar um resultado em placa de microtitulação de *C. krusei* (ATCC), sendo indicado o padrão de organização dos antifúngicos CET, NIS, ITR e FLU na placa, bem como as posições dos controles positivo (crescimento da levedura em meio RPMI-1640 sem inibidor) e negativo (controle de esterilidade do meio de cultura).

Este método de microdiluição em caldo é o mais preciso para conhecer a concentração inibitória mínima (CIM) correta para cada *Candida* sp. testada, pois permite que o avaliador selecione as concentrações testadas, diferente do teste epsilométrico, (E-test), para avaliar com melhor qualidade a susceptibilidade do microrganismo aos agentes antimicóticos, neste caso, preconizados na terapêutica contra CVV.

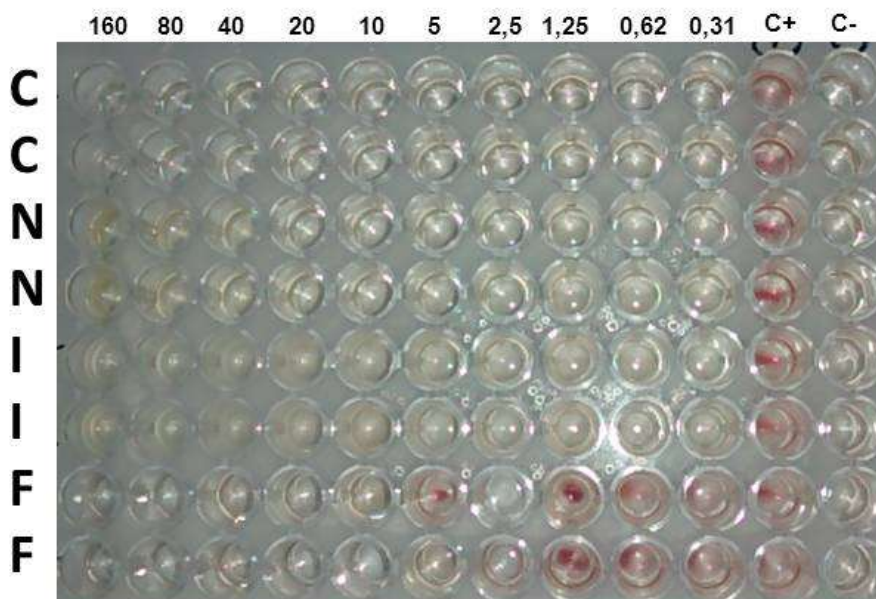


Figura 25 - Placa de microtitulação com RPMI-1640 após teste de microdiluição (M27-A, CLSI). Determinação da concentração inibitória mínima dos antifúngicos cetoconazol (C), nistatina (N), itraconazol (I) e fluconazol (F) em cepa ATCC de *Candida krusei*. Acima há indicação das concentrações avaliadas ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), sendo C+ controle positivo e C- o controle negativo. A cor vermelha indica o crescimento fúngico marcado com TTC (trifeniltetrazólio), mais presente nos poços com diferentes concentrações de fluconazol e na coluna C+. Fonte: Autor.

Analisando a Tabela 2 abaixo observamos que os antimicóticos fluconazol e itraconazol foram os fármacos com menor atividade perante as cepas ATCC das espécies de *Candida*, e também para os isolados clínicos oriundos de CVV, mantendo o mesmo perfil observado pelo disco-difusão. Então, as espécies dos isolados clínicos são mais susceptíveis a nistatina e cetoconazol, este último apresenta uma menor susceptibilidade em relação a nistatina, inclusive observando que vamos encontrar

*C. parapsilosis* foi a espécie mais susceptível aos fármacos testados, com CIM de  $0,31 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  para a ATCC referente a todas os antifúngicos, e CIM aproximado foi observado para os isolados clínicos desta espécie, exceto no caso de *C. parapsilosis* 119 que foi resistente a FLU e ITR. Similarmente, *C. tropicalis* ATCC mostrou-se mais susceptível a CET, FLU, ITR e NIS, enquanto que todos os isolados de *C. tropicalis* foram sensíveis a NIS, mas com co-resistência FLU/ITR.

**TABELA 2. Correlação da susceptibilidade de antifúngicos por concentração inibitória mínima (CIM) para as espécies de *Candida* com a susceptibilidade determinada pelo CLSI**

CEPAS ATCC	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)			
	Cetoconazol µg/mL <sup>-1</sup> /CLSI	Fluconazol µg/mL <sup>-1</sup> /CLSI	Itraconazol µg/mL <sup>1</sup> /CLSI	Nistatina µg/mL <sup>-1</sup> /CLSI
<i>C. albicans</i>	0,31/S	40/DD/	0,31/S	0,31/S
<i>C. tropicalis</i>	0,31/S	1,25/S	0,31/S	0,31/S
<i>C. parapsilosis</i>	0,31/S	0,31/S	0,31/S	0,31/S
<i>C. glabrata</i>	2,5/SDD	160/R	5/R	0,31/S
<i>C. krusei</i>	0,31/S	10/R	0,31/S	0,31/S
ISOLADOS CLÍNICOS	Cetoconazol µg/mL <sup>-1</sup> /CLSI	Fluconazol µg/mL <sup>-1</sup> /CLSI	Itraconazol µg/mL <sup>1</sup> /CLSI	Nistatina µg/mL <sup>-1</sup> /CLSI
<i>C. albicans</i> 543	2,5/S	80/R	20/R	0,31/S
<i>C. albicans</i> 518	40/R	0/R	40/R	0,31/S
<i>C. albicans</i> 382	40/R	0/R	40/R	0,31/S
<i>C. tropicalis</i> 190	0,3/S	160/R	10/R	0,31/S
<i>C. tropicalis</i> 193	0,3/S	0/R	20/R	0,31/S
<i>C. tropicalis</i> 384	20/R	0/R	40/R	0,31/S
<i>C. parapsilosis</i> 119	0,31/S	5/R	10/R	0,31/S
<i>C. parapsilosis</i> 158	0,31/S	0,31/S	0,31/S	0,31/S
<i>C. parapsilosis</i> 43	0,31/S	0,31/S	0,31/S	0,31/S
<i>C. glabrata</i> 348	0,31/S	40/DD	20/R	0,31/S
<i>C. glabrata</i> 354	40/R	0/R	40/R	0,31/S
<i>C. glabrata</i> 278	0,31/S	0,31/S	0,31/S	0,31/S
<i>C. krusei</i> 162	2,5/DD	80/R	20/R	0,31/S
<i>C. krusei</i> 283	2,5/DD	10/DD	0,31/S	10/DD
<i>C. krusei</i> 420	20/R	40/DD	0,31/S	40/DD

Perfil de resposta ao fármaco: R: Resistente; I: Intermediário; DD: Intermediário dose-dependente; S: Sensível.

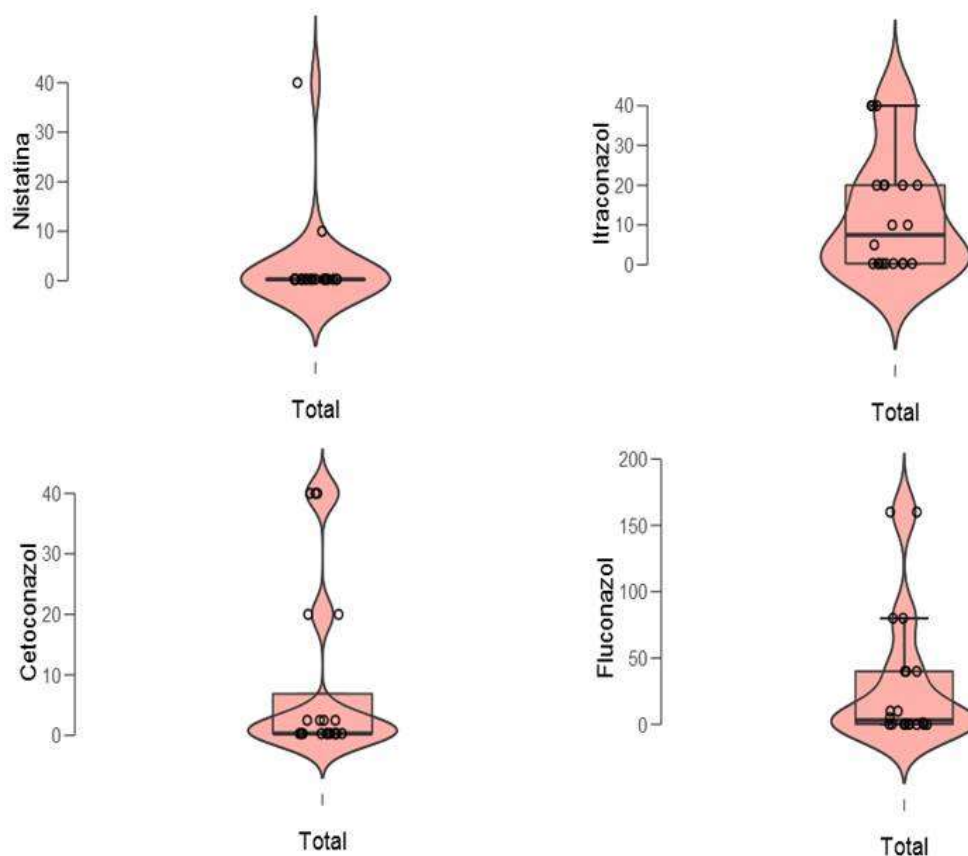
Perfil de susceptibilidade para nistatina de acordo com DALBEN-DOTA *et al.*, 2010.

Desde 2002 o CLSI não atualiza mais sua tabela indicativa de faixa para CIM constando dados para a nistatina. Mesmo sem a informação técnica direta do CLSI para este tema, muitas pesquisas em vários países ainda focam a determinação de CIM da nistatina visando várias espécies de *Candida*, principalmente devido ao uso ainda frequente de nistatina para terapêutica de CVV. O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) do Ministério da Saúde no Brasil (2015) com foco na atenção às pessoas com infecções sexualmente transmissíveis preconiza a nistatina (100.000 UI) na forma de aplicação vaginal como a primeira opção para CVV junto com miconazol creme (imidazólicos).

Sendo assim, é importante manter os testes de antifungograma com nistatina. Para definir o padrão resistente ou sensível de cepas e isolados de *Candida* sp. testados frente à nistatina

através de microdiluição, a faixa considerada por pesquisadores de vários países foi adotada (DALBEN-DOTA *et al.*, 2010; FORNARI *et al.*, 2016), que indica S (Sensível) para CIM  $\leq 4$   $\mu\text{g/mL}$ , DD (Intermediário dose- dependente) com CIM 8-32  $\mu\text{g/mL}$  e resistente com CIM  $\leq 64$   $\mu\text{g/mL}$ . Avaliando todos os testes efetivados na nossa pesquisa, as 5 cepas de referência e 13 isolados clínicos avaliados em duplicata se mostraram susceptíveis a nistatina (CIM  $\leq 0,31$   $\mu\text{g/mL}$ ), exceto 2 isolados clínicos de *C. krusei* dos registros 283 e 420, classificados com padrão intermediário dose-dependente com CIM 10  $\mu\text{g/mL}$  e 40  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Os gráficos dispostos na Figura 26 mostram os dados gerais compilados dos resultados de CIM referentes aos antifúngicos comerciais testados, onde os pontos com maiores concentrações (em números) de cepas e isolados clínicos estão alargados no *BoxPlot* tipo-violino (Programa JASP), e no eixo vertical temos a concentração aproximada de cada extrato/fração, corresponde ao CIM.



**Figura 26 - Disposição espacial das concentrações inibitórias mínimas dos antimicóticos (CIM) determinado para as espécies de *Candida* avaliadas. Dados expostos em *BoxPlot* tipo-violino, indicando dispersão de cepas e isolados clínicos de acordo com as CIM aproximada. Gráficos gerados pelo programa JASP. Fonte: Autor.**

Dessa forma observamos que a maioria dos isolados das diversas espécies apresentam CIM baixo, conforme indicado na Tabela 2, para nistatina a CIM é baixa, assim como um padrão similar foi constatado para cetoconazol. Enquanto que para fluconazol e itraconazol fica clara a dispersão em maior número de cepas/isolados em uma faixa maior de CIM, havendo isolados concentrados em pontos de CIM alto.

Oito isolados clínicos dos 15 testados nesta pesquisa apresentaram-se como sensíveis ao cetoconazol, assim como observaram Goulart *et al.* (2016) e Lima (2012) em trabalhos com *C. albicans*. Entretanto 2 isolados clínicos de *C. albicans* de Maceió-AL mostraram-se resistentes ao cetoconazol. Resistência ao cetoconazol geralmente é mais observada em isolados de quadros sistêmicos (candidemia), conforme indicam Stuçu *et al.* (2017) e Chun-fang Ma *et al.* (2013), atestando 12,5% e 61,9% de resistentes ao cetoconazol, respectivamente. Mas resistentes a CET tem sido encontradas em isolados de secreção vaginal também de mulheres com CVV, como confirma Dota *et al.* (2010) que observou maior resistência ao cetoconazol (32,9%) entre 88 isolados de várias espécies.

Em nosso estudo evidenciou-se elevada resistência aos fármacos triazólicos, especialmente FLU detectada em *C. albicans*, *C. glabra*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, o que demonstra uma necessidade de conhecermos melhor os perfis genotípicos de cepas para descobrir quais mecanismos genéticos poderiam estar mais envolvidos nessa resistência. A resistência ao fluconazol está relacionada a vários mecanismos moleculares, como Berkow e Lockhart (2017) mostram em sua revisão quanto à importância dos genes ERG, indicando por exemplo que o gene ERG 11 em *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* pode ser superexpresso quando as espécies tem contato com a droga e ocorre uma alteração do alvo da droga, ou outros genes relacionados à produção de bombas de efluxo de drogas.

Quando analisamos de forma comparativa a susceptibilidade entre disco-difusão e microdiluição para cepas de referência observamos que na maior parte dos dados houve concordância, por exemplo, em relação à susceptibilidade à NIS nos dois métodos avaliados nas espécies testadas. Porém, em relação à cepa ATCC de *C. albicans* susceptível ao FLU no disco-difusão, foi dose-dependente na microdiluição (CIM= 40  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ), enquanto que a cepa ATT de *C. krusei* foi dose-dependente ao fluconazol no disco-difusão mas na microdiluição o resultado constatou resistência (CIM= 10  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ). Cepas de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram consideradas dose-dependentes para ITR no disco-difusão, mas confirmou-se CIM de 0,31 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  que indica susceptibilidade para ambas. No entanto, ficou mais clara uma

discordância entre os métodos de disco-difusão e microdiluição nos isolados clínicos: *C. albicans* (1/3) (CA543) para o CET e ITR; *C. tropicalis* (2/3) para CET; *C. parapsilosis* (2/3) para ITR; *C. glabrata* (2/3), sendo 1 para CET e FLU e outra para FLU; *C. krusei* (que foi a espécie com maior discordância) para CET e FLU em todos os isolados e 2 para nistatina (2/3). Observa-se que a maior parte da discordância ocorreu em isolados que tinham perfil de DD, como em *C. krusei* com a nistatina, que se mostrou susceptível no disco-difusão, mas na microdiluição foram 2 isolados dose-dependentes. É importante lembrar que o TSA por microdiluição garante maior sensibilidade no resultado do que testes por disco-difusão.

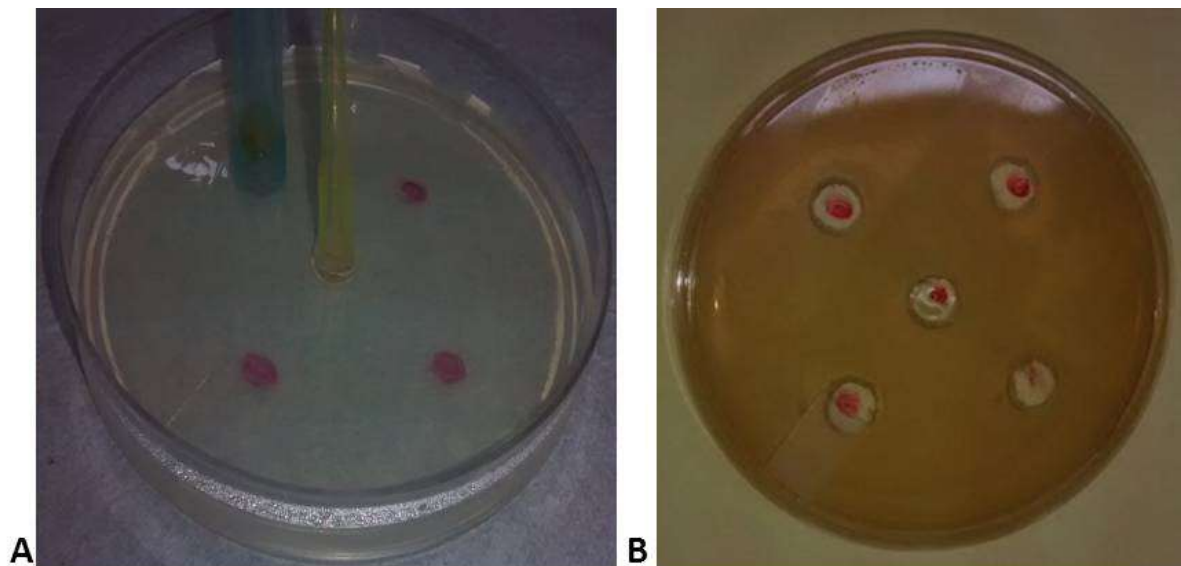
Podemos perceber que para as espécies de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabra* houve uma melhor concordância entre o método de disco-difusão e a microdiluição, mas que o mesmo não foi observado para *C. krusei*. Em estudo comparativo para avaliar a susceptibilidade entre os métodos de disco-difusão e microdiluição realizado por Pedroso *et al.* (2014) com isolados clínicos de espécies de *Candida* foi observado que *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram as espécies que apresentam melhor concordância entre os métodos avaliados, mas que houveram discordância entre *C. kefyr* e *C. krusei*. A análise geral dos dados aqui expostos e de outros autores revela a necessidade de um diagnóstico laboratorial adequado com uso mais frequente do antifungigrama para reduzir a terapia empírica que é tão comum e inadequada, uma vez que mesmo conhecendo o padrão de susceptibilidade mais comum para algumas espécies de *Candida* ainda é possível errar na prescrição sem auxílio de TSA, submetendo pacientes ao uso inadequado de antifúngicos.

### 5.3.3 Método Cup-plate com própolis vermelha de Alagoas

Uma vez efetivado a técnica de *cup-plate* em triplicata, com a colocação do extrato etanólico diluído e as demais frações individualmente dentro dos poços abertos conforme está descrito na metodologia, não foi possível analisar a atividade da própolis disposta nos poços por que após 24 h de incubação em estufa foi evidenciado o ressecamento da PVA nos poços.

Isso inviabilizou avaliações desta etapa da pesquisa, e após a investigação de possíveis fatores responsáveis por tal resultado não conseguimos determinar a causa do ressecamento da solução preparada a ser analisada. Foi decidido pela continuidade da pesquisa do PVA adotando

apenas a metodologia de microdiluição, que apresenta maior sensibilidade e especificidade segundo CLSI.



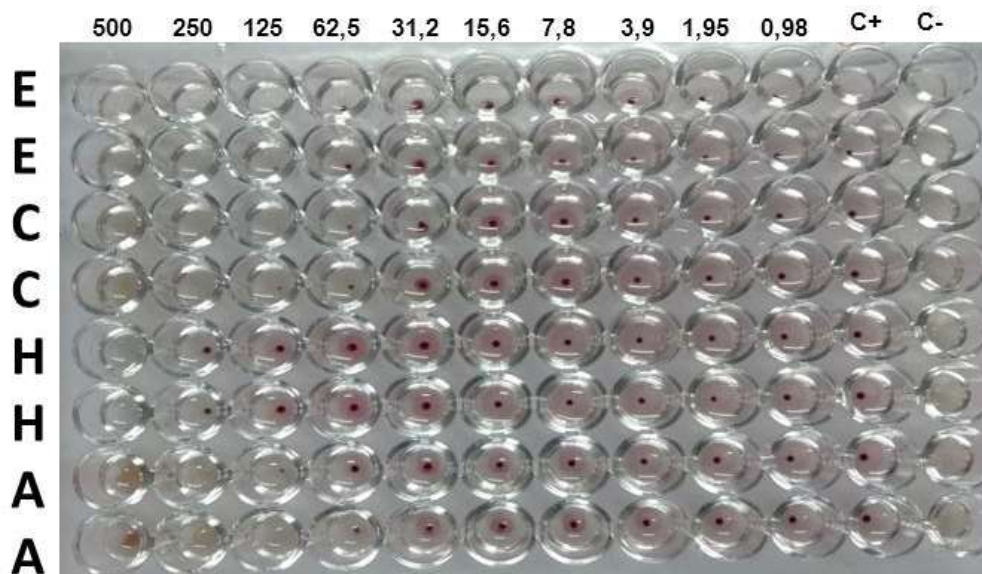
**Figura 27**–Teste de *Cup plate*. (A e B) Abertura e avaliação de volume de poços para aplicação do extrato da PVA em placa de Petri com meio de Mueller-Hinton. Fonte: Autor.

#### 5.3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima da Própolis Vermelha de Alagoas através de microdiluição

Reproduzindo o método de microdiluição de acordo com o CLSI usando PVA contra cepas de referência e isolados de *Candida* coletados de pacientes com CVV, foi possível observar uma grande variação de CIM para as diferentes espécies testadas.

A Figura 28 acima nos mostra um exemplo do teste de microdiluição após 24h, e conforme constatado pela impregnação de TTC exemplificado na figura com isolado clínico de *C. albicans*, houve crescimento em diferentes níveis de CIM no extrato etanólico e nas frações clorofórmica, hexânica e acetanólica. Na Tabela 3 estão dispostos todos os dados de CIM certificados pela avaliação desta pesquisa, e podemos observar a variação de CIM entre as diferentes frações e quanto ao extrato etanólico de PVA.





**Figura 28 –** Placa de microtitulação com RPMI-1640 após teste de microdiluição (M27-A, CLSI). Determinação da concentração inibitória mínima da própolis vermelha de Alagoas (E= Extrato etanólico; C= Fração clorofórmica; H= Fração Hexânica; e A= Fração acetanólica) para isolado clínico de *Candida albicans* (382). Acima há indicação das concentrações avaliadas de própolis ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), sendo C+ controle positivo e C- o controle negativo. A cor vermelha indica o crescimento fúngico marcado com TTC (trifeniltetrazólio). Fonte: Autor.

Apesar de não haver uma padronização para bioativos naturais como a própolis que tenha determinando a faixa de CIM ou um perfil fixo de resistente, intermediário e sensível como encontramos nos manuais internacionais para antifúngicos comerciais, podemos nos basear em algumas faixas indicadas em trabalhos já realizados com própolis vermelha e verde para estabelecer um perfil ao que avaliamos.

Na Tabela 3 podemos avaliar detalhadamente o CIM obtido para as espécies testadas. Todas as cepas ATCC avaliadas mostraram CIM que pode ser considerado alto, com a maioria do CIM para todas as frações variando de 125 a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . CIM de 500  $\mu\text{g}/\text{m}$  foi constatado apenas para *C. parapsilosis* e *C. krusei* em relação à fração hexânica e ao extrato etanólico. A fração clorofórmica ressaltou um CIM mais homogêneo entre todas as cepas de referência testadas, de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . Interessante observar que na microdiluição com PVA as cepas de referência responderam com CIM que pode ser considerado alto, quando estas mesmas cepas não apresentaram amplo padrão de resistência aos antifúngicos comerciais.

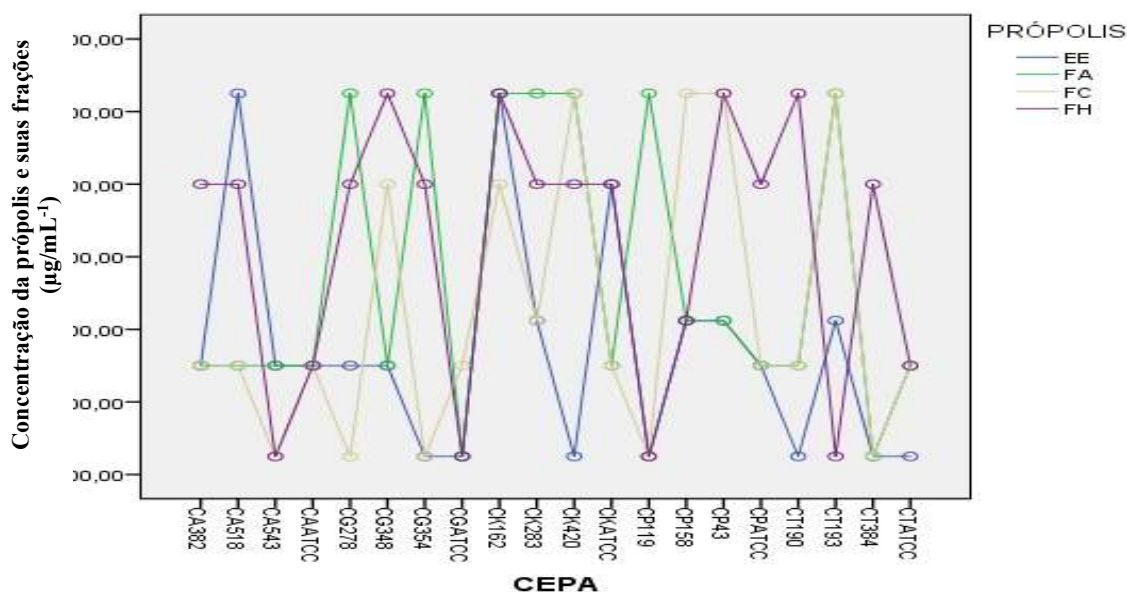
**TABELA 3 - Correlação da susceptibilidade da própolis vermelha alagoana por concentração inibitória mínima (CIM) para as espécies de *Candida* com a susceptibilidade determinada pelo CLSI**

<b>CEPAS ATCC</b>	<b>Extrato Etanólico µg/mL<sup>-1</sup></b>	<b>Fr. Hexânica µg/mL<sup>-1</sup></b>	<b>Fr. Acetanólica µg/mL<sup>-1</sup></b>	<b>Fr. Clorofórmica µg/mL<sup>-1</sup></b>
<i>C. albicans</i>	250	250	250	250
<i>C. tropicalis</i>	125	250	250	250
<i>C. parapsilosis</i>	250	500	250	250
<i>C. glabrata</i>	125	125	125	250
<i>C. krusei</i>	500	500	250	250
<b>ISOLADOS CLÍNICOS</b>	<b>Extrato Etanólico µg/mL<sup>-1</sup></b>	<b>Fr. Hexânica µg/mL<sup>-1</sup></b>	<b>Fr. Acetanólica µg/mL<sup>-1</sup></b>	<b>Fr. Clorofórmica µg/mL<sup>-1</sup></b>
<i>C. albicans</i> 543	250	125	250	125
<i>C. albicans</i> 382	250	500	250	250
<i>C. albicans</i> 518	62,5	500	250	250
<i>C. tropicalis</i> 193	31,2	125	62,5	62,5
<i>C. tropicalis</i> 190	125	62,5	250	250
<i>C. tropicalis</i> 384	125	500	125	125
<i>C. parapsilosis</i> 43	31,2	62,5	31,2	62,5
<i>C. parapsilosis</i> 119	125	125	62,5	125
<i>C. parapsilosis</i> 158	31,2	31,2	31,2	62,5
<i>C. glabrata</i> 354	125	500	62,5	125
<i>C. glabrata</i> 278	250	500	62,5	125
<i>C. glabrata</i> 348	250	62,5	250	500
<i>C. krusei</i> 162	62,5	62,5	62,5	250
<i>C. krusei</i> 283	31,2	500	62,5	31,2
<i>C. krusei</i> 420	125	500	62,5	62,5

Fr: Fração

Nos resultados com os isolados clínicos pode-se observar que a fração etanólica de PVA mostrou-se mais eficaz contra a maioria das espécies de *Candida* oriundas de pacientes, com CIM até 125 µg/mL<sup>-1</sup> (11/15), e em seguida o melhor resultado foi em relação à fração acetanólica, enquanto o pior efeito foi da fração hexânica. Entretanto, mesmo a fração acetanólica tendo sido mais efetiva contra um menor número de isolados quando comparado com a fração etanólica, a fração acetanólica foi eficaz mais vezes com CIM inferior a 125 µg/mL<sup>-1</sup>.

As espécies que ainda cresceram com maior flexibilidade frente às diferentes frações de PVA foram de *C. albicans* (543 e 382) e *C. glabrata* (278 e 348), com CIM altos entre 250  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . Todos os isolados de *C. parapsilosis* se mostraram bastantes susceptíveis às 4 frações avaliadas, sendo resultado aproximado encontrado também para *C. tropicalis*. Esse padrão de susceptibilidade das espécies ao PVA pode ser constatado ainda na Figura 29.

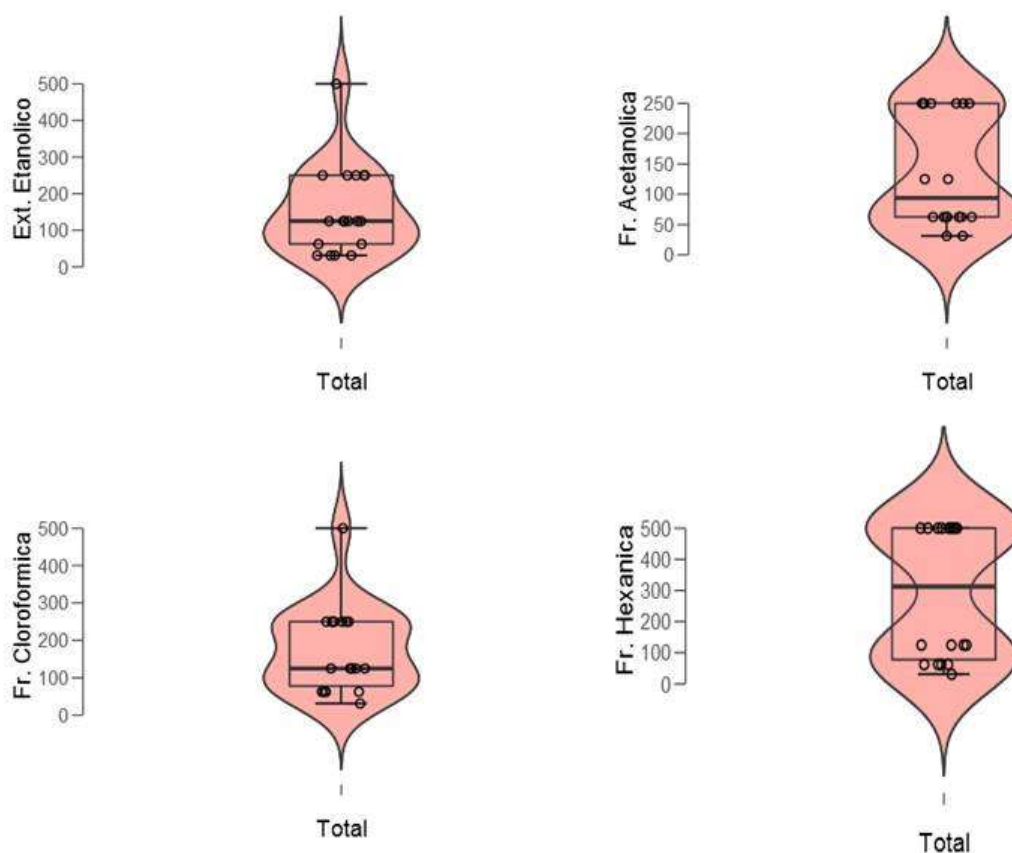


**Figura 29.** Perfil de susceptibilidade de cepas de referência de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (n=5) e seus respectivos isolados clínicos (n=15) em obtidos de pacientes com candidíase vulvovaginal frente à própolis vermelha de Alagoas (extrato e frações). Cepas e isolados indicados por siglas referentes às espécies, sendo os isolados clínicos seguidos por números de registro na micoteca clínica: *C. albicans*: CAATCC, CA382, CA518 e CA543; *C. tropicalis*: CTATCC, CT190, CT193 e CT384; *C. parapsilosis*: CPATCC, CP119, CP158, CP43; *C. krusei*: CKATCC, CK162, CK283, CK420; *C. glabrata*: CGATCC, CG278, CG348 e CG354. Gráfico gerado pelo programa SPSS. Fonte: Autor

Na Figura 30, nota-se que o padrão dispersivo gerado no gráfico *BoxPlot* pelo programa JASP quanto a reação das cepas de referência e dos isolados clínicos é de fato mais proeminente frente à fração etanólica de PVA, seguida da fração acetanólica, confirmando estatisticamente o que observamos nas placas de microtitulação. Os retângulos ou quadrados observados dentro

dos gráficos indicam os pontos onde houve maior concentração em números de cepas e isolados em relação aos números do eixo vertical.

Relacionando as concentrações inibitórias mínimas (250-31,2  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) com a atividade antioxidante da PVA indicada anteriormente, observamos que apesar da fração etanólica ter apresentado a menor concentração de compostos fenólicos (81,94%) em relação a fração acetanólica (86,1%) e clorofórmica (85,0%), o extrato etanólico apresentou melhor resultado de CIM.

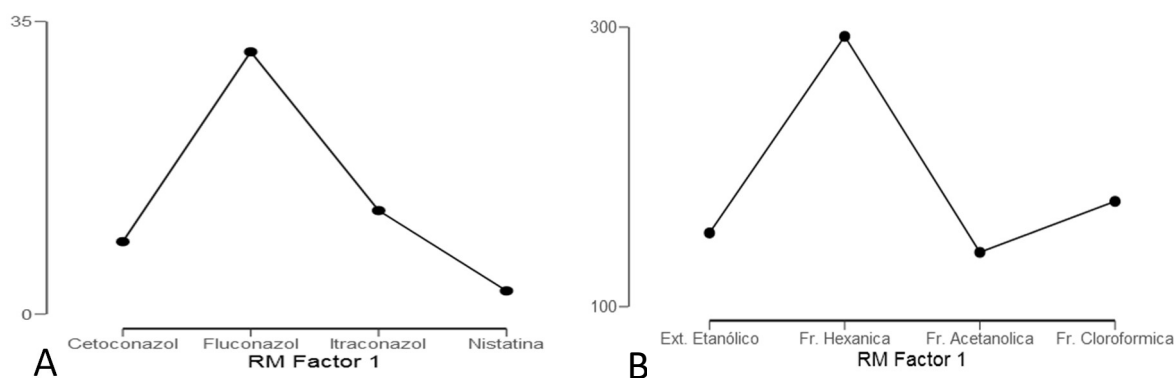


**Figura 30– Gráficos das concentrações inibitórias mínimas dos extratos etanólico e frações acetanólica, clorofórmica e hexânica testados em diferentes espécies de *Candida*, expostos em *BoxPlot* tipo-violino, indicando dispersão de cepas e isolados clínicos de acordo com as faixas de CIM indicadas no eixo vertical. Fonte: Autor**

Sartoratto *et al.* (2004) em seu estudo para avaliar atividade antimicrobiana de 8 tipos de óleos essenciais brasileiros de várias plantas contra a *C. albicans* observou que apenas 2 tipos tiveram atividade antifúngica significativa, pois para o pesquisador e colaboradores substâncias bioativas com CIM entre 50-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apresenta alta atividade antimicrobiana,

com CIM entre 600-1500 apresentou atividade moderada (significativa) e com CIM acima 1600  $\mu\text{g/mL}$  tem fraca atividade antimicrobiana. Baseado no entendimento de Sartoratto e colaboradores, CIM abaixo de 500 como os obtidos nesta pesquisa podem caracterizar que a própolis vermelha alagoana apresenta alta atividade antimicrobiana. Guedes *et al.* (2012) utilizou extrato bruto e frações produzidos com microalgas coletadas no litoral de Alagoas e determinou CIM para espécies de *Candida*, que variou de 8-16  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ . Estes dados demonstram a importância do uso de bioativos diversos contra leveduras e que o CIM pode ser bastante variável.

Finalizando as avaliações dos resultados desta pesquisa com a Figura 31, observamos um comparativo dos resultados gerais da determinação do CIM obtidos com os antifúngicos comerciais e também com extrato etanólico da PVA e as diferentes frações. Os picos no alto de ambos os gráficos indicam claramente que o cetoconazol e a nistatina (gráfico A) foram mais eficazes contra espécies de *Candida*, assim como o extrato etanólico (mais ativo em um maior número de cepas e isolado) e a fração acetanólica da PVA foram mais eficientes contra as leveduras testadas.



**Figura 31 – Comparação descritiva dos perfis gerais dos testes de microdiluição dos antifúngicos comerciais (A) e de extrato etanólico e frações da própolis vermelha de Alagoas (B). Gráficos disponibilizados pelo programa JASP. Fonte: Autor.**

Oliveira *et al.* (2006) também observou que o extrato etanólico de própolis verde oriunda do Estado do Paraná (Brasil) apresentou atividade antifúngica em isolados de *Candida* spp. coletadas de quadros de onicomicoses (micoses em unhas), encontrando CIM de várias espécies entre 500  $\mu\text{g/mL}$  e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ . Dalben-Dota *et al.* (2010) realizou testes adicionais com a

mesma própolis verde paranaense e afirmou a boa atividade do extrato etanólico desta própolis contra isolados de *Candida* spp. coletada de CVV trato genital feminino, num intervalo de CIM entre 6,12-393.19 µg/mL. Ao comparar com a faixa de CIM 31,2-500 µg/mL obtida no estudo com os dados citados no estudo acima, verificamos que a PVA apresentar melhor atividade antimicótica.

Mendonça *et al.* (2015) utilizou diferentes extratos de própolis hidroalcoolicos produzidos com própolis de Sergipe (Nordeste do Brasil) coletadas em diferentes meses em um mesmo ano para avaliar a resposta de cepas-ATCC de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Nesta pesquisa foi constatado que todas as amostras do extrato testado própolis inibiram o desenvolvimento nas cepas avaliadas, sendo mais efetivo em *C. glabrata*. A atividade da própolis vermelha alagoana como agente antifúngico ainda é pouco estudada, mas Bispo-Júnior *et al.* (2004) observou atividade da PVA contra *Staphylococcus aureus* e *C. albicans*, sendo testadas cepas ATCC e clínica de ambos os microorganismos citados. Neste estudo também foi obtido melhor resultado com fração acetanólica da PVA.

Freires *et al.*(2016) comparou frações da própolis tipo 3 (região Sul) e a tipo 13 (de Alagoas) em espécies de *Candida* spp, e então constatou que as frações diclorometano e hexânica da própolis-3 apresentavam atividade antifúngica superior a PVA-13, com intervalo de MIC entre 20-500 µg/mL. Salomão *et al.*(2007) fez testes utilizando própolis de diferentes regiões do Brasil contra vários fungos além de *C. albicans*, incluindo agentes de micoses subcutâneas e sistêmicas no homem (*Sporotrix schenckii* e *Paracoccidioides brasiliensis*), inclusive com PVA. Neste experimento, Salomão *et al.* (2008) testou PVA apenas com *C. albicans* em um método de disco difusão adaptado e confirmou formação de halos entre 20 e 30 mm em concentrações de 2-16 mg/mL, e ainda constatou atividade antifúngica de outras própolis contra os fungos dimórficos *S. schenckii* e *P. brasiliensis*.

Este trabalho trouxe novos dados em relação à qualidade da própolis vermelha alagoana quanto aos flavonoides e à atividade anti-*Candida* de diferentes frações para várias espécies frequentemente envolvidas em candidíase vulvovaginal, criando possibilidades para o uso de PVA em formulações para aplicação vaginal.

## 6. CONCLUSÕES

- O número de isolados clínicos de *Candida* spp. selecionados de pacientes com CVV neste trabalho foi suficiente para comprovar a ação da PVA contra espécies de *Candida* em adição às cepas de referência testadas, uma vez que a maior parte das pesquisas divulgadas usa apenas cepas de referência.
- Os testes de susceptibilidade a antimicrobianos confirmaram que a própolis vermelha de Alagoas é um bioativo com importante potencial farmacológico contra espécies de *Candida*, inclusive com frente a cepas resistentes.
- A fração acetanólica apresentou maior percentual de flavonoides do que a fração clorofórmica e etanólica. Logo, a fração acetanólica agiu com CIM mais baixo.
- Baixo CIM de PVA foi eficiente contra muitos isolados clínicos, inclusive contra 6 espécies que apresentaram padrão de co-resistência à ITR/FLU.
- O variado perfil de susceptibilidade observado em várias espécies de *Candida* spp. revelou a necessidade de um diagnóstico laboratorial mais preciso associado ao antifungigrama, pois além de apontar a espécie pode indicar o melhor antifúngico para tratamento.
- Os resultados obtidos entre os testes de disco-difusão e microdiluição foram concordantes na maior parte das cepas e isolados testados, incluindo as repetições, o que indica que o disco-difusão por ser de baixo custo deve continuar a ser usado na rotina laboratorial mesmo tendo menos sensibilidade que o teste de microdiluição.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHKAR, J.M.; FRIES, B.C. *Candida* infections of the genitourinary tract. Clin. Microbiol. Reviews, Vol.23, n.2, p.253-273, 2010.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, Vol. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; GUZMÁN, J. P.; PARK, Y. K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*. *Ciência Rural* Vol.35, p. 909-915, 2005.

ALMEIDA, E.T.C.; SILVA, M.C.D.; SANTOS, J.M.; KAMIYA, R.U.; ARRUDA, R.E.S.; VIEIRA, D.A.; SILVA, V.C.; ESCODRO, P.B.; JÚNIOR-BASÍLIO, I.D., NASCIMENTO, T.G. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Vol. 7, n.5, .280-287, 2017.

ALVARES, C.A.; SWIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *J Bras Patol Med Lab*, Vol.43, n.5, p.319-327, 2007.

ARAÚJO, M. A.S. Caracterização molecular de espécies de *Candida* isoladas de portadores de AIDS e de portadores de câncer atendidos em hospitais-escola de Maceió-Alagoas, Brasil.2006. 116 f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2006.

AREAL, N.A.S. Atualização do manejo da candidíase vulvovaginal (CVV) e da candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) visando à melhora da assistência a mulheres e gestantes. Monografia (Especialização em Microbiologia Aplicada) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2015.



ARRAES, A.C.P. Detecção da diversidade molecular de *Candida* spp. Isoladas de UTI neonatal. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2012.

ATAC, M.C.R.; DENNING, D. Serious fungal infections in the Philippines. *Eur.J.Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Vol.36, p.937-947, 2017.

AULER, M.E.; MORREIRA, D.; RODRIGUES, F.F.O.; ABRAO, M.S.; MARGARIDO, P.F.R.; MATSUMOTO, F.E.; SILVA, E.G.; SILVA, B.C.M.; SCHEINEIDER, R.P.; PAULA, C.R.B. Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Medical Mycology*, Vol.48, p. 211-216, 2010.

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

BARBOSA, C.; FERNANDES, G.; QUINTAS, C.; TEIXEIRA, M.E.; NEVES, J.P. Anti-fungal treatment with azole compounds for uncomplicated vulvovaginal candidiasis. *Acta Obstet. Ginecol. Port.*, Vol.6, n.3, p.118-123, 2012.

BASTOS, E. M. A. F.; SIMONE, M.; JORGE, D. M.; SOARES, A. E. E.; SPIVAK, M. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *J Invertebrate Pathology*, Vol. 97, n. 3, p. 273-281, 2008.

BATAC, M.C.R.; DENNING, D. Serious fungal infections in the Philippines. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect. Dis.* Vol.36, p.937-947,2017.

BERKOW.E.L.; LOCKHART, S.R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infect. Drug Resist.* Vol.31, n.10, p.237-245, 2017.

BRANDOLT, T.M.; KLAFKE, G.B.; GONCALVES, C.V.; BITENCOURT, L.R.; MARTINEZ, A.M.B.; MENDES, J.F.; MEIRELES, M.C.A.; XAVIER, M.O. Prevalence of *Candida* spp.in cervical-vaginal samples and the in vitro susceptibility of isolates. *Braz. Jour. Microbiol.* Vol.48, p.145-150, 2017.

BUTLER, G. Fungal Sex and Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol.23, n.1, p. 140-159, 2010.

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

CAPOCI, I.R.G.; BONFIM-MENDONÇA, P.S.; ARITA, G.S.; PEREIRA, R.R.A.; CONSOLARO, M.E.L.; BRUSCHI, M.L.; NEGRI, M.; ESTIVALETSVIDZINSKI.I.T. propolis is an efficient fungicide and inhibitor of biofilm production by vaginal *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015

CARVALHO, V.O. Identificação e análise de mutações no gene ERG11 de isolados de *Candida* susceptíveis e resistentes ao fluconazol. 2011. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.

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

CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; Própolis do sudeste e nordeste do Brasil:Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Quím. Nova*, Vol.30, n.7, p.1512-1516, 2007.

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

CAZORLA, I.M.; FONTANA, R. Frequência de leveduras em fluido vaginal de mulheres com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal.*Rev.Bras.Ginecol.Obstet.*Vol.31, n.6, p 300-4,2009.

CHU-FUNG, M.; FUNG-QUI L.; LI-NING, S.; YU-NA,H.; WANG,Y.; QUIN-QUIN,K. Surveillance study of species distribution, antifungal and susceptibility and mortality of

nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in China. *BMC Infect. Dis.* Vol.13, p.337, 2013.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition M27-A3 document. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

CORRÊA, P.R.; DAVID, P.R.S.; PERES, N.P.; CUNHA, K.C.; ALMEIDA, M.T.G. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*; Vol.31, p.177–181,2009.

DAEF, E.; MOHARRAM, A.; ELDIN, S.S.; ELSHERBINY, N.; MOHAMMED, M. Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species. *Braz. J. Microbiol.* Vol.45, n.1, p.255-262, 2014.

DALBEN-DOTA, K.F.; FARIA, M.G.; BRUSCHI, M.L. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. *J Altern Complement Med.* Vol. 16, n.3, p.285-90, 2010.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Oxford, Vol. 5, n. 4, p. 435-441, 2007.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PACHECO, E.; LIMA, I.B.; ABREU, J.A. Própolis vermelha e sua origem botânica. *Mensagem Doce* [Internet]. 2006. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/artigo.htm> Acessado em : 20 de janeiro de 2017.

DÁURIA, F. D.; TECCA, M.; SCAZZOCCHIO, F.; RENZINI, V.; STRIPPOLI, V. Effect of propolis on virulence factors of *Candida albicans*. *J Chemotherapy*, Vol.15, n.5, p.454-460, 2003.

DIAS, L.B. Candidíase vulvovaginal em pacientes gestantes e não gestantes atendidas no Hospital Geral Universitário de Cuiabá/MT – prevalência, identificação das leveduras e susceptibilidade aos antifúngicos através de duas metodologias distintas. 2007. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, 2007.

DOTA, K. F. D.; FREITAS, A. R.; CONSOLARO, M. E. L.; SVIDZINSKI, T. I. E. A Challenge for clinical Laboratories: Detection of Antifungal Resistance in *Candida* species Causing Vulvovaginal Candidiasis. *Science*, Vol.42, n.2, p 87-93, 2011.

FERNANDES, JUNIOR, A.; BALESTRIN, E. C.; BETONI, J. E. C.; ORSI, R. O.; CUNHA, M. L. R. S.; MONTELLI, A. C. Propólis: anti-Staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 100, p. 563-566, 2005.

FORNARI, G.; VICENTE, V.A.; GOMES, R.R.; MURO, M.D.; PINHEIRO, FERRARI, C.; HERKET, P.F.; TAKIMURA, M.; CARVALHO, N.S.; QUEIROZ-TELLES, F. Susceptibility and molecular characterization of *Candida* species from patients with vulvovaginitis. *Braz J Microbiology*, Vol.47, p. 373-380, 2016.

FREIRES, I.A.; QUEIROZ, V.C.P.P.; FURLETTI, V.F.; IKEGAKI, M.; ALENCAR S.M.; DUARTE, M.C.T.; ROSALEN, P.L. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. *J Mycologie Médicale*, 2016.

GONDO, D.C.A.F.; DUARTE, M.T.C.; SILVA, M.G.; PARADA, C.M.G.L. Alteração de flora vaginal em gestantes de baixo risco, atendidas em serviço público de saúde: prevalência e associação à sintomatologia e achados do exame ginecológico. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, Vol. 18, n.5, 2010.

GOULART, L.S.; SANTIAGO, F.S.; RAMON, J.L.; MOURA, S.V.; SILVA, A.R.; SILVA Jr., I.F.; CHÁVEZ-PAVONI, J.H.; ARAUJO, C. J. *Bras Patol. Med.* Vol,52, n.4, p.233-237, 2016.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev ; Vol.12, n.3,p. 454-500, 1999.

GUNTHER, L.S.A.; MARTINS, H.P.R.; GIMENES, F.; ABREU, A.L.P.; CONSOLARO, M.E.L.; SVIDZINSKI, T.I.E. Prevalence of *Candida albicans* and no-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. São Paulo Med. J. Vol.132, n.2, p. 116-120, 2014.

HALBE, H.W. Tratado de ginecologia. 3ªed.São Paulo. Ed.Roca, 2000.

HAZEN, K. C. New and Emerging Yeast Pathogens. Clinical Microbiology Reviews, Vol. 8, n.4, p.462-478, 1995.

HOLANDA, A. A. R. Candidíase vulvovaginal: uma revisão de literatura. LILACS v. 33, n. 5, p. 347-351, 2005.

HOLANDA, A. A. R.; FERNANDES, A. C. S.; BEZERRA, C. M.; FERREIRA, M. A. F.; HOLANDA, M. R. R., HOLANDA, J.C.P., MILAN, E. P. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. Rev.Bras.Ginecol.Obstet., Vol.29, n.1, p.3-9,2007.

HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K.; RINALDI, M. G. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. Diagn Microbiol Infect Dis. ; Vol.48, n.3, p.153–160, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL – INPI (Brasil). Guia Básico-Indicação Geográfica. Disponível em:< [http://www.inpi.gov.br/portal/artigo/guia\\_basico\\_indicacao\\_geografica](http://www.inpi.gov.br/portal/artigo/guia_basico_indicacao_geografica). Acesso em: 20 junho 2016.

JAING, C.; DONG, D.; YU, B.; CAI, G.; WANG, X.; JI, Y.; PENG, Y. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. J Antimicrob Chemother. Vol.68, p.778-785, 2013.

JANKOVIĆ, S.; BOJOVIĆ, D.; VUKADINOVIĆ, D.; DAGLAR, E.; JANKOVIĆ, M.; LAUDANOVIĆ, D. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis. *Vojnosanit Preg*, Vol.67, n.10, 2010

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

KHALIL, M.L. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Nagoya, Vol. 7, n.1, p. 22-31, 2006.

KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An Overview. *Scientific World Journal*, 2013.

LAMB, D.C.; ANDREW, G.S.; WARRILOW, N.J.R.; PARKER, J.E.; NES, W.D.; SMITH, S.N.; KELLY, D.E.; KELLY, S.L. Azole antifungal agents to treat the human pathogens *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga* through inhibition of sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51). *Antimicrob Agents Chemoth*. Vol.59, n.8, p.4707-4713, 2015.

LEWIS, R.E. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc*. Vol.86, n.8, p.805-817, 2011.

LIMA, G.B.C. Variabilidade genética e perfil de susceptibilidade aos antifúngicos em espécies de *Candida* isoladas de secreção vaginal. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2012.

LINHARES, I.M.; GIRALDO, P.C.; BARACAT. Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana – Artigo de Revisão. *Rev. Assoc. Med. Bras*, Vol.56, n.3, p.370-374, 2010.

LOPEZ, J.E.M. Candidiasis (vulvovaginal). *BMJ Clin. Evidence*, Vol. 03, p.815, 2015.

LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; NETO, P.J.R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacologia*, Vol.18, n.3, p.447-454, 2008.

MARCONI, C.; DUARTE, M.T.C.; SILVA, D.C.; SILVA, M.G. Prevalence of and risk factors for bacterial vaginosis among women of reproductive age attending cervical screening in Southeastern Brazil. *Int J Gynecology Obstetrics*, Vol.131, p. 137-141, 2015.

MANZONI, P.; MOSTERT, M.; AIGRAIN-JACQZ, E.; STRONATI, M.; FARINA, D. *Candida* colonization in the nursery. *J Pediatrics*, Vol.88, n.3.p.187-190, 2012.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Quim Nova*, Vol.19, p.529-536, 1996.

MAROL, S.; YUCESO, Y. M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. *Mycoses*, Vol. 51, p. 40-49, 2007.

MEDEIROS, M.A.P. Aspectos de patogenicidade e relacionamento genético de isolados clínicos vaginais e anais de *Candida albicans* oriundos de pacientes com candidíase vulvovaginal. 2013. 206 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2013.

MENDONÇA, L.S. Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, 2011.

MENEZES, E.A.; MENDES, L.G.; CUNHA, F.A. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isolados no Estado do Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Vol.42, n.3, p.354-355, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas (PCDT). 2015 Disponível em:< - [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo\\_clinico\\_diretrizes\\_terapeutica\\_atencao\\_i](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_diretrizes_terapeutica_atencao_i)

[ntegral\\_pessoas\\_infeccoes\\_sexualmente\\_transmissiveis.pdf](#). Acessado em 15 de novembro 2017.

MOURÃO, L.R.M.B. Estudo *in vitro* da atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira. 2013. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2013.

SUTÇU, M.; ACAR, M.; GENÇ, G.E.; KOKÇU, I.; AKTURK, H.; ATAY, G.; HANCERLI, S.; SALMAN, N.; SOMER, A. Evaluation of *Candida* species and antifungal susceptibilities among children with invasive candidiasis. *Turk Pediatr Ars*, Vol.53, n.3, p. 145-153, 2017

NAGLIK, J.R. Candida Immunity – Review Article. *New Journal of Science*, Vol. 2014, 27 páginas, 2014.

NEMETH, T.; TOTH, A.; SZENZENSTEIN, J.; HORVATH, P.; NOSANCHUK, J .D.; GROZER, S.; TOTH, R.; PAPP, C.; HAMARI, S.; VAGVOLGYI, C.; GACSER, A. Characterization of Virulence Properties in *the C.parapsilosis* Sensu Lato species. *OPLOS ONE*, Vol.8, Issue 7, 2013.

NEVES, M. V. M.; SILVA, T. M. S.; LIMA, E. O.; CUNHA, E.V.L.; OLIVEIRA, E, J. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. *B r a z i l i a n Jour. of Microbiol.* Vol.47, p. 159–166, 2016.

ODDS, F.C. *Candida and candidosis: a review and bibliography*. 2<sup>nd</sup>. Ed.London: Bailliere Tindall, p.67, 1998.

ODDS, F.C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.*; Vol.32, p.1923–1929, 1994.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J.; GOW, N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* Vol.11, n.6, p. 272-279, 2003.



OLIVEIRA, F.A.; PFLEGER, V.; LANG, K.; HEUKELBACH, J.; MIRALLES, I.; FRAGA, F.; SOUSA, A.Q.; MEIKICKE, M.S.; IGNATIUS, R.; KERR, L.F.S.; FELDMIEIER, H. Sexually transmitted infections, bacterial vaginosis, and candidiasis in women of reproductive age in rural Northeast Brazil: a population-based study. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol.102(6), p.731-736, 2007.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. Ver Bras Pl. Med., Campinas, v.17, n.1, p.36-44, 2015.

PAMMI, M.; HOLLAND, L.; BUTLER, G.; GACSER A; B. J.M. Candida parapsilosis is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. Pediatr. Infect. Dis. J., Vol. 32, n. 5, p. 206-216, 2013.

PAPPAS,P.G.; KAUFFMANN,C.A.; ANDES,D.; BENJAMIN,D.K.; CALANDRA,T.F.; EDWARDS,J.E.;FILLER,S.G.;FISHER,J.F.; KULLBERG,B.J.;OSTROSKY-ZEICHNER,L.; REBOLIA,A.C.;REX,J.H.;WALSH,T.J.;SOBEL,D.J. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 Update by the infectious diseases society of America. Clinical Infectious Diseases, Vol.48, p.503-535, 2009.

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

PARK, Y.K, ALENCAR, S.M, AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. J. Agric. Food Chem., Vol.50, p.2502–2506, 2002;

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINE, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. Ciência Rural, Vol. 2, p. 997-1003, 2002.

PAULINO, N. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato padronizado de própolis p1 e de seu principal constituinte ativo, artemisinina. 2005. 137 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2005.

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

PEIXOTO, J. V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T.G. B. Candidíase – Uma revisão de literatura. Braz J Surgery Clin Res. Vol.8, n.2, p.75-82, 2014.

PIPI, B.; LANA, A. J. D.; MORAES, R. C.; GUEZ, R. C.; MACHADO, M.; OLIVEIRA, L.F.S.; POSER, G.L.V.; FUENTEFRIA, A.M. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. Jour. Appl. Microbiol., Vol.118, p.839-850, 2015.

PONTES, A.C.; ROSE, L.G.; AMARAL, P. C.; GIRALDO, J. A systematic review of the effect of daily panty liner use on the vulvovaginal environment. International Journal of Gynecology and Obstetrics, Vol. 127, p. 1–5, 2014.

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

ROMERO, D.; TRAXLER, M. F.; LOPEZ, D.; KOLTER, R. Antibiotics as signal molecules. Chem. Rev. Vol.111, n.9, p.5492-5505, 2011.

ROSA, M. I.; RUMEL, D. Fatores Associados à candidíase vulvovaginal: Estudo exploratório. RBGO, Vol.36, n.1, p.65-70,2004.

ROZATTO, M.R. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda*. 2012. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, SP, 2012.

RUFER, C. E.; KULLING, S. E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays. *J Agricultural Food Chemistry*, Vol.54, p.2926–2931, 2006.

SALATINO, A.; T EIXEIRA, E.W.; N EGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence based Complementary and Alternative Medicine*, Vol.2, n.1, p. 33-38, 2005.

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P. R. S.; CAMPOS, L. C.; BORBA, C. M.; CABELLO, P. H.; MARCUCCI, M.C.; CASTRO, S. L. **Brazilian Propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity.** *Evid. Based Complement Alternat. Med*, Vol.5, n.3, p.317-324, 2008.

SARDI, J.C.O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; GIANNINI, M. J. S. M. ***Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options.** *Int J Med. Microbiol*, Vol.62, p10-24, 2013.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. ***Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents.** *Biomed. Res. Int.* Vol.2013, 2013.

SASANI, E.; KHODAVAISSY, S.; AGHA, S. K. A. A.; DARABIAN, S.; AALA, F.; REZALE, S. **Pseudohyphae formation in *Candida glabrata* due to CO<sub>2</sub> exposure.** *Curr. Med.Mycol.*, Vol.2, n.4. p.49-52, 2016.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos.** 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

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

SILVA, R. A.; RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, M. C. M.; CUSTODIO A. R.; ANDRADE, N. E. D.; PEREIRA, W. E. **Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1842-1848, 2006.

SILVA, V.A. **Micropartículas de própolis-polímero para aplicação como produto cosmético multifuncional.** 2015. 160 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2015.

SNELL, S. B.; FOSTER, T. H.; HAIDARIS, C. G. **Miconazole induces fungistasis and increases killing of *Candida albicans* subjected to photodynamic therapy.** Photochem Photobiol. Vol.88, n.3, p.596-603, 2012.

SPENCE, D.; MELVILLE, C. **Vaginal discharge** – Clinical Review. BMJ, Vol.335, p.1147-1151, 2007

SOARES, V.L.; MESQUITA, A.M.T.S.; CAVALCANTE, F.G.T.; SILVA, Z.P.; HORA, V.; DIEDRICH, T.; SILVA, P.C.; MELO, P.G.; DACAL, A.R.C.; CARVALHO, E.M.F.; FELDMEIER, H. **Sexually transmitted infections in a female population in rural North-East Brazil: prevalence, morbidity and risk factors.** Tropical Medicine and International Health, Vol.8, n.7, p. 595-603, 2003.

SOBEL, J.D. **Vulvovaginal candidosis.** Lancet. Vol. 369, p.1961-71,2007.

SOUZA, N.S. **Determinação do perfil de compostos fenólicos na própolis vermelha de Alagoas usando técnicas de fingerprinting (impressão digital) com LC-Orbitrap-FTMS e o software MZmine.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 114 f. 2014.

SOUZA, S.O.; CAMPOS, T.R. ***Candida albicans*: Fatores de virulência e de resistência e o uso de derivados vegetais como alternativa de tratamento da candidíase oral.** Dissertação de Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, GO, 2011.

TROFA, D.; GACSER, A.; NOSANCHUK, J.D. ***Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen.** *Clin. Microbiol. Reviews.* Vol. 21, n.4, p. 606-625, 2008.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. R. e TSVETKOVA, I.; **Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* V. 3, n.2, p. 249-254, 2006.

VALLE, G. C.; RENDE J. C.; OKURA, M. H. **Estudo da Incidência do Gênero *Candida* em Hospital Público Universitário.** *NewsLab,* Vol. 101 p. 202-222, 2010.

VEIGA, A. **Padronização e validação do método de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima de compostos antimicrobianos.** 2016. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2016.

VIJAYA, D.; DHANALAKSHIMI, T. A.; KULLKARNI, S. **Changing trends of vulvovaginal candidiasis.** *Journal of Laboratory Physicians.* Vol.6, n.1, p.28-30, 2014

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. **Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry.** *J Pharm Biomed Anal.* Vol.42, p. 354-361, 2006.

WHO- World Health Organization. **Women and sexually transmitted infections.** Fact Sheet No. 249, Geneva, 2000.

YUN, Y.H.; SUH, D.Y.; YOO, H.D.; OH, M.H.; KIM, S.H. **Yeast Associated with the Ambrosia Beetle *Platypus koryoensis*, the Pest of Oak Trees in Korea.** *Mycobiology,* Vol.43, n.4, p.458-466, 2015.

ZIARRUSTA, G. B. **Vulvovaginitis candidásica**. Rev. Iberoam. Micol, Vol.19, p.22-4.2002.

ZIDA, A.; YACOUBA, A., BAMBA, S.; SANGARE, I.; SAWADOGO, M.; GUIGUEMDE, T.; KONE,S., TRAORE, L.K.; OUEDRAOGO-TRAORE, R.; GUIGUEMDE, R.T. **In vitro susceptibility of Candida albicans clinical isolates to eight antifungal agents in Ouagadougou (Burkina Faso)**. J. Mycol Med. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.07.001>

ZISOVA, G.L.; CHOKOEVA, A.A.; AMALIEV, I.G.; PETLESHKOVA.V.P.; MITEVA-KATRANZHEVA, M.T.; KRASTEVA, M.B.; UCHIKOVA, E.H.; KOUZMANOV, H.A.; IVANOVA, Z.V. **Vulvovaginal Candidiasis in pregnant women and its importance for Candida colonization of Newborns**. Folia Medica, Vol.58, n.2, 2016.

## ANEXO I



### UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Maceió – AL, 11/11/2011

Senhor (a) Pesquisador (a), Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão  
Nayara Maciel Mendonça  
Gleiciane Soares da Silva  
Maria Anilda dos Santos Araújo  
Denise Maria Wanderlei Silva

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 11/11/2011 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 017665/2011-64 sob o título, **Monitoramento e identificação molecular de agentes causadores de micoses superficiais**, vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

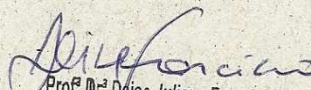
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

(\*) Áreas temáticas especiais  
Válido até: Janeiro de 2013

  
Profª Drª Daise Juliana Francisco  
Coordenadora do Comitê de  
Ética em Pesquisa -UFAL

**ANEXO II**  
**Meios de Cultura**

**Ágar Batata Dextrose – BDA**

Infusão de Batatas	200ml
Dextrose	20g
Ágar	15g
Água destilada	1000ml

O pH final foi ajustado para 5,6 e o volume completado para 1000 mL com água destilada, seguindo para autoclavagem a 121°C, por 15 minutos.

**Ágar Hicrome Candida (Himedia ®)**

Digestão péptica do tecido animal	15g
Fosfato dipotássico de hidrogênio	1g
Mistura cromogênica	11,22g
Clorafenicol	0,5g
Agar	15g
Água destilada	1000ml

O pH final foi ajustado para 7,2 e o volume completado para 1000 mL com água destilada esterilizada anteriormente po autoclavagem a 121°C, por 15 minutos.

**Extrato de Levedura, Peptona e Dextrose (YPD) – 1000mL**

Extrato de levedura.....	10 g
Peptona .....	20 g
Glicose .....	20 g

Para a preparação do meio sólido, adicionar 20 g de Agar, 50 mg/L de ácido nalidíxico e 100 µL de verde de bromecresol a 220 mg por 100 mL.

**Ágar Sabouraud Dextrose (ASD)- 1000 mL**

Dextrose.....	40 g
Peptona.....	10 g
Ágar.....	15 g



**RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*1640) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e com indicador de pH vermelho de fenol**

Meio RPMI-1640 em pó.....	10,4 g
MOPS .....	34,53 g
Água destilada.....	1.000 mL

O meio foi tamponado com ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico (MOPS), em concentração final de 0,165 mol/mL, sendo o pH ajustado para 7,0, a 25°C, usando hidróxido de sódio 1 mol/L. A esterilização do meio foi realizada por filtração em membrana com poros de 0,22 µm

## APÊNDICE I

### • MÉTODO DISCO-DIFUSÃO COM ANTIFÚNGICOS COMERCIAIS

#### Estatística descritiva

	Cetoconazol	Fluconazol	Itraconazol	Nistatina
Validade	20	20	20	20
Ausência	0	0	0	0
Significância	8.67	31.37	12.39	2.78
Erro padrão	3.29	11.39	3.23	2.02
Desvio padrão	14.73	50.96	14.43	9.02
Variância	216.97	2596.83	208.20	81.44
Faixa	39.69	160.00	39.69	39.69
Mínimo	0.31	0.00	0.31	0.31
Máximo	40.00	160.00	40.00	40.00

#### ANOVA - Halo

Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
3950.74	19.00	207.93	2.91	8.57e-4
4286.25	60.00	71.44		

Note. Type III Sum of Squares

### • MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO COM ANTIFÚNGICOS COMERCIAIS

#### Repeated Measures ANOVA

##### Within Subjects Effects

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p	VS-MPR*	$\eta^2$	$\eta^2_p$
RM Factor 1	9172.53 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3057.51 <sup>a</sup>	3.84 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>	6.09	0.17	0.17
Residual	45378.78	57	796.12					

Note. Type III Sum of Squares

##### Between Subjects Effects

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p	VS-MPR*	$\eta^2$	$\eta^2_p$
Residual	45378.78	57	796.12					

Note. Type III Sum of Squares

## APÊNDICE II

### • MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO COM EXTRATOS DE PROPOLIS E FRACÇÕES

### Estatística descritiva

	Ext. Etanólico	Fr. Hexanica	Fr. Acetanolica	Fr. Cloroformica
<b>Validade</b>	18	18	18	18
<b>Ausência</b>	0	0	0	0
<b>Significância</b>	152.77	293.40	138.88	175.34
<b>Erro padrão</b>	28.46	50.47	22.20	27.34
<b>Desvio padrão</b>	120.75	214.15	94.20	116.01
<b>Variância</b>	14581.09	45858.49	8873.31	13458.90
<b>Faixa</b>	468.80	468.80	218.80	468.80
<b>Mínimo</b>	31.20	31.20	31.20	31.20
<b>Máximo</b>	500.00	500.00	250.00	500.00

### Repeated Measures ANOVA

#### Post Hoc Tests

#### Post Hoc Comparisons - RM Factor 1

		Mean Difference	SE	t	p tukey	p bonf
Ext. Etanólico	Fr. Hexanica	-140.63	48.81	-2.88	NaN	0.06
	Fr. Acetanolica	13.88	22.77	0.61	NaN	1.00
	Fr. Cloroformica	-22.58	28.89	-0.78	NaN	1.00
Fr. Hexanica	Fr. Acetanolica	154.52	51.80	2.98	NaN	0.05
	Fr. Cloroformica	118.06	60.35	1.96	NaN	0.40
Fr. Acetanolica	Fr. Cloroformica	-36.46	19.77	-1.84	NaN	0.50

*Note.* Tukey corrected p-values are not appropriate for repeated measures post-hoc tests (Maxwell, 1980; Field, 2012).

#### Between Subjects Effects

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p	VS-MPR*	$\eta^2$	$\eta^2_p$
Residual	799605.74	51	15678.54					

*Note.* Type III Sum of Squares