

Obtenção de extratos de própolis e determinação da atividade antifúngica

Obtention of propolis extracts and determination of antifungal activity

RESUMO

Tabata Hana Shigihara

Autor

tabatashigihara@alunos.utfpr.com.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Brasil

Tatiana Shioji Tiunan

tatianatiunan@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



O objetivo deste trabalho foi obter diferentes extratos de própolis verde e comparar as atividades antifúngicas e fungicidas contra três diferentes leveduras do gênero de *Candida*. Foram elaborados extratos utilizando diferentes tipos de solventes em forma pura e em misturas de dois ou três solventes orgânicos de iguais proporções e as atividades antifúngicas e fungicidas foram determinadas pela técnica de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para três diferentes espécies de leveduras do gênero *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. As menores concentrações de CIM e CFM obtidas foram da mistura de solventes acetona + etanol variando de 0,94 a 2,50 mg/mL. Os resultados de CIM e CFM foram mais sensíveis aos extratos obtidos com acetona pura (0,94 a 3,75 mg/mL) do que com etanol puro (2,50 a 3,75 mg/mL). Dessa forma, observou-se a melhor atividade antifúngica e fungicida da própolis verde quando utilizou-se a mistura de acetona + etanol para o preparo do extrato. Estudos adicionais devem ser realizados para a busca de melhoria no processo de extração de substâncias antifúngicas em própolis verde.

PALAVRAS-CHAVE: Produtos naturais. Fungicida. Leveduras.

ABSTRACT

The objective of this work was to obtain different extracts of green propolis and to compare antifungal and fungicidal activities against three different yeasts of the *Candida* genus. Extracts were prepared using different types of solvents in pure form and in mixtures of two or three organic solvents of equal proportions and the antifungal and fungicidal activities were determined by the technique of determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (CFM) for three different yeast species of the genus *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*. The lowest concentrations of MIC and CFM obtained were from the solvent mixture acetone + ethanol ranging from 0.94 to 2.50 mg/mL. The results of MIC and CFM were more sensitive to extracts obtained with pure acetone (0.94 to 3.75 mg/mL) than with pure ethanol (2.50 to 3.75 mg/mL). Therefore, the best antifungal and fungicidal activity of green propolis was observed when the mixture of acetone + ethanol was used to prepare the extract. Additional studies should be carried out to seek improvements in the process of extracting antifungal substances from green propolis.

KEYWORDS: Natural products. Fungicide. Yeasts.



INTRODUÇÃO

A própolis é o produto proveniente de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, coletadas por abelhas melíferas, de brotos, flores e exsudados de plantas, com a adição de secreções salivares, cera e pólen (BRASIL, 2001).

Em estimativas gerais, a composição desse produto natural contém entre 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen, juntamente com elementos como alumínio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e poucas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (MORAES 2009). Devido à sua composição química variável, são diversas as atividades biológicas relatadas na literatura, tais como antimicrobiana, anticariogênica, citotóxica, anti-inflamatória, imunomodulatória, antioxidante e antitumoral. Dentre os componentes da própolis, os ácidos fenólicos e os flavonoides chamam bastante atenção, pois são responsáveis pela ação antimicrobiana e antioxidante (CABRAL, 2009).

No entanto, a composição da própolis é influenciada pela vegetação da região em que cada colmeia é localizada. Nesse contexto, admite-se que esse material apresenta alta variabilidade da proporção de componentes elementos e propriedades físicas, químicas e biológicas específicas, podendo ser classificado conforme as suas características em verde, amarela, marrom ou vermelha (MARIANO, 2018). O tipo verde é produzido a partir da *Baccharis dracunculifolia*, planta popularmente conhecida como alecrim do campo (FISCHER, 2008).

O mercado brasileiro de própolis está em pleno desenvolvimento, cerca de 92% de toda a própolis consumida no Japão é de origem brasileira e, em termos de produção, o país ocupa o terceiro lugar no ranking mundial com produção de 50 a 150 toneladas por ano (COSTA, 2014). A maior parte de própolis comercializada pelo o país é proveniente de Minas Gerais, aproximadamente 70%, o que representa uma produção de 29 toneladas de própolis, sendo 20 toneladas somente de própolis verde (SEBRAE, 2014).

Os fármacos antifúngicos geram recorrência ou causam resistência, além de apresentarem toxicidade. Por isso, há uma procura contínua por novos antifúngicos mais eficientes, principalmente, mais seguros que os já existentes. Neste sentido, a própolis é considerada um produto natural opoterápico, por ser um medicamento obtido a partir de glândulas, órgãos, tecidos e secreções de animais, neste caso, secreções salivares das abelhas (PORTILHO 2013).

As leveduras do gênero *Candida* são de extrema importância devido a frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Esses microrganismos são comensais que habitam o trato gastrointestinal, fazendo parte também da microbiota oral, urogenital e da pele (CARVALHO, 2017).

A *C. albicans* é a levedura que mais comumente causa infecções fúngicas. Essa espécie pode viver em equilíbrio no ambiente vaginal, como um habitante comensal, sem comprometimento à saúde. No entanto, se ocorrer alguma alteração local, pode ser desenvolvido um processo infeccioso (BITTENCOURT, 2008). Já a *C. tropicalis* tende a causar fungemia em pacientes que apresentam complicações no sistema imunológico ocasionados por patologias como câncer, neutropenia ou malignidade (LIBERATO, 2008).

A *C. glabrata* foi considerada, por muitos anos, uma espécie relativamente não patogênica presente na flora natural de indivíduos saudáveis. Todavia, em razão do uso de fármacos imunossupressores e do aparecimento da AIDS, a frequência de infecções em seres humanos por *C. glabrata* vem aumentando significativamente em diversos países, passando a ser considerada um patógeno oportunista emergente, especialmente em ambientes hospitalares (ALMEIDA, 2014).

Para que a extração dos compostos de propriedade antifúngica ocorra da melhor forma e preserve a atividade dos princípios ativos, é necessário buscar a otimização do processo. Assim, são empregadas variações da metodologia de extração de amostras de própolis, na qual são alterados os parâmetros que permeiam o processo de extração, como: tipo de solvente, concentração do solvente, temperatura e tempo de contato (ANDOLFATO, 2014).

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo obter diferentes extratos de própolis verde e comparar as atividades antifúngicas e fungicidas frente a três diferentes leveduras do gênero de *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra de própolis verde foi cedida pela empresa Apis Global, sendo pertencente ao lote 001/19 e coletada no município de Caxambú, localizado no sul do estado de Minas Gerais. Sua caracterização foi realizada pela PROBee Consultoria e Controle de Qualidade de Produtos Apícolas e naturais através das seguintes análises: determinação do teor de cinzas, umidade, cera, impurezas mecânicas, fenólicos, flavonoides e solubilidade em álcool. O laudo foi fornecido pela empresa Apis Global.

Os extratos foram obtidos utilizando-se solventes puros (isopropanol; etanol; acetato de etila e acetona) e diferentes misturas de solventes extratores em proporções de 1:1 ou 1:1:1 (acetona + acetato de etila; acetona + isopropanol; acetona + etanol; isopropanol + acetato de etila + etanol; isopropanol + acetato de etila; etanol + isopropanol).

Com o preparo em triplicata, foi pesado 1 grama de própolis verde, já cortada em pequenos pedaços para a aumentar a superfície de contato. Em um erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 25 mL do solvente extrator ou da mistura de solventes. Em seguida, o erlenmeyer foi completamente coberto de papel alumínio e vedado com parafilme a fim de evitar a oxidação do conteúdo.

Após esse procedimento, o frasco foi incubado em agitador refrigerado (Thoth) a 200 rpm e 40 °C, por 24 horas. Após o período de incubação, o extrato foi filtrado utilizando-se funil de Buchner e bomba de vácuo (PRISMATEC modelo 151). Posteriormente, a mistura filtrada foi concentrada utilizando-se evaporador rotativo (MA 120). E o extrato concentrado foi transferido para um balão de 10 mL que foi completado com o volume da mistura de solventes extratores ou solvente puro. Ao final, transferiram-se os extratos para frascos âmbar de 10 mL e estes foram armazenados em freezer a -18 °C até o momento das análises.

Para o preparo das soluções de extratos de própolis para avaliação da atividade antifúngica, inicialmente foram evaporados os solventes e pesou-se 10 mg do extrato de própolis em microtubos de centrifugação e adicionou-se 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). O sistema foi agitado em vortex até a completa dissolução do extrato. Em seguida, foram adicionados 900 µL de caldo Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, novamente, a mistura foi homogeneizada em vortex.

O inóculo fúngico foi obtido por meio das culturas das leveduras *C. albicans* ATCC 26790, *C. glabrata* ATCC 2001 e *C. tropicalis* ATCC 28707 que foram mantidas a 10°C em ágar Sabouraud. Essas amostras foram ativadas em caldo Sabouraud e incubadas a 35°C por 24 horas sem agitação. Em seguida, foram preparadas diluições das culturas em salina 0,9% de acordo com a escala 0,5 de McFarland para a obtenção de aproximadamente $2,0 \times 10^6$ UFC/mL. Posteriormente, a suspensão de leveduras foi diluída em caldo RPMI (1:20).

A concentração inibitória mínima (CIM) para as leveduras foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com a norma M27-A2 do NCCLS (2002). Utilizou-se meio de cultura Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, tamponado com 0,165 M de solução tampão ácido-3-(N-morfolino)propanossulfônico (MOPS).

O experimento foi reproduzido em placas estéreis de 96 poços. Inicialmente, adicionou-se 100 µL de meio RPMI 1640 em cada poço, seguido de 100 µL de uma solução de meio RPMI com os extratos de própolis a 10 mg/mL na primeira linha, sucedido de diluição seriada (1:2), homogeneizado e transferido 100 µL para os poços da linha seguinte e, assim, sucessivamente até a linha G onde 100 µL foram retirados destes poços e descartados. A linha H foi utilizada para controle do crescimento microbiano, dessa forma, não foi acrescido extrato nestes poços.

Já as suspensões fúngicas padronizadas em solução salina 0,9% e diluídas 1:20 em RPMI ($1,0 \times 10^5$ UFC/mL) teve 10 µL acrescidos em cada poço da placa. As placas foram incubadas a 35 °C por 24h. A concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento fúngico (ausência de turvação).

Para determinar a concentração fungicida mínima, foi realizado o subcultivo em Ágar Sabouraud da cultura de cada poço que demonstrou inibição de crescimento, em conjunto com o controle positivo a fim de avaliar o crescimento de colônias.

Após este procedimento, para confirmar a leitura da concentração inibitória mínima foram acrescidos 10 µL de solução de 2,3,5-Trifeniltetrazólio cloreto a 0,5% (diluído em água) em cada poço das placas e estas foram novamente incubadas por 3 horas a 35°C. O 2,3,5 Trifeniltetrazólio é uma substância incolor na sua forma oxidada e quando reduzido por microrganismos sintetiza formazano, composto que confere coloração rosa. Dessa forma, os poços que apresentaram coloração rosa apontam crescimento de microrganismos.

Os experimentos foram repetidos em momentos distintos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra cedida pela Apis Global foi submetida a análises de controle de qualidade, solicitadas pela própria empresa, para verificar se amostra segue os parâmetros de qualidade. O laudo foi fornecido e analisado. A umidade e o teor de cinzas afetam a qualidade do produto, por meio destas avaliações podem ser indicadas as condições de armazenamento do produto ou até mesmo identificar possíveis fraudes (BRASIL, 1988). Além disso, o teor de compostos fenólicos e flavonoides influenciam diretamente na atividade antimicrobiana da própolis (ANDOLFATO, 2014).

A amostra de própolis acata todos os limites estabelecidos em legislação quanto ao percentual de cinzas, umidade, ceras, impurezas mecânicas, fenólicos, flavonoides e solubilidade em álcool. Ademais, não apresentou coliformes totais, bolores, leveduras ou *Samonella sp.* A própolis mineira analisada registrou 95,2% de elementos histológicos típicos de *Baccharis dacunculifolia* (alecrim do campo), o que permite classificá-la como própolis verde.

Ao todo foram testadas sete concentrações dos extratos obtidos, sendo a primeira 5,00 mg/mL e as restantes obtidas por diluição seriada (1:2): 2,50; 1,25; 0,63; 0,32; 0,16 e 0,08 mg/mL. Todos os dez extratos testados apresentaram ação antifúngica frente as três espécies de *Candida* utilizadas.

O etanol é um solvente já bastante aplicado na extração de própolis. Entretanto, no geral, as menores concentrações de CIM (Tabela 1) e CBM obtidas foram da mistura de solventes acetona + etanol variando de 0,94 a 2,50 mg/mL. Os resultados de CIM e CBM foram mais sensíveis aos extratos obtidos com acetona pura (0,94 a 3,75 mg/mL) do que com etanol puro (2,50 a 3,75 mg/mL). Dessa forma, é possível afirmar que a acetona tem maior potencial de extração de fenóis e flavonoides que o etanol.

Notou-se que nos dois experimentos reproduzidos diversos resultados se repetiram para a triplicata das amostras de extratos testados. Assim, fica assegurado que o método realizado foi capaz de extrair os compostos que apresentam a atividade antimicrobiana em todos os exemplares, apresentando apenas pequenas variações.

Dos demais solventes empregados apenas as misturas de isopropanol+ acetato de etila e isopropanol + acetato de etila + etanol apresentaram atividade antifúngica próxima dos resultados da acetona + etanol, uma faixa de 1,25 a 2,50 mg/mL, reafirmando bom potencial de extração com solventes combinados.

Nos ensaios realizados, a espécie *C. tropicalis* demonstrou ser mais susceptível às menores concentrações de extratos que as demais espécies testadas. Resultado que está em contrapartida dos estudos desenvolvidos por Sforcin et al. (2001). Sforcin chegou à conclusão de que a *C. albicans* é mais suscetível as concentrações baixas de própolis verde que a *C. tropicalis*. No entanto, a própolis verde estudada é oriunda do estado de São Paulo, apresentando algumas diferenças em sua composição, o que pode acarretar nas diferenças de propriedades biológicas.

Já Hoseto et al. (2016) assegura também que a *C. albicans* tem maior resistência as concentrações dos extratos de própolis em relação a *C. tropicalis*. Haja vista que a CIM e CFM ficaram em 95,75 µg/mL e 46,88 µg/mL, respectivamente.

Tabela 1 – Resultados de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) em mg/mL dos extratos de própolis. Valores expressos em relação às médias

Extrato	<i>C albicans</i>		<i>C glabrata</i>		<i>C tropicalis</i>	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
I.1	2,50±0,00	2,50±0,00	5,00±0,00	5,00±0,00	2,50±0,00	5,00±0,00
I.2	2,50±0,00	2,50±0,00	2,50±0,00	5,00±0,00	1,87±0,50	1,87±0,50
I.3	2,50±0,00	2,50±0,00	2,50±0,00	3,75±1,11	1,87±0,50	1,87±0,50
E.1	2,50±0,00	2,50±0,00	2,50±0,00	2,50±0,00	2,50±0,00	2,50±0,00
E.2	2,50±0,00	3,75±1,11	2,50±0,00	2,50±0,00	2,50±0,00	2,50±0,00
E.3	2,50±0,00	3,75±1,11	2,50±0,00	3,75±1,11	2,50±0,00	2,50±0,00
A.1	2,50±0,00	3,75±1,11	3,75±1,11	3,75±1,11	1,87±0,50	2,50±0,00
A.2	2,50±0,00	5,00±0,00	2,50±0,00	3,75±1,11	2,50±0,00	2,50±0,00
A.3	3,75±1,11	3,75±1,11	2,50±0,00	5,00±0,00	1,87±0,50	1,87±0,50
AC.1	3,75±1,11	3,75±1,11	1,87±0,50	1,87±0,50	0,94±0,56	1,87±0,50
AC.2	3,75±1,11	3,75±1,11	1,87±0,50	1,87±0,50	0,94±0,56	1,25±0,00
AC.3	3,75±1,11	3,75±1,11	1,87±0,50	1,87±0,50	2,50±0,00	1,25±0,00
AA.1	2,50±0,00	3,75±1,11	1,56±0,97	1,56±0,97	2,50±0,00	2,50±0,00
AA.2	2,50±0,00	3,75±1,11	1,56±0,97	1,56±0,97	2,50±0,00	2,50±0,00
AA.3	1,87±0,50	1,87±0,50	1,56±0,97	1,56±0,97	2,50±0,00	2,50±0,00
AI.1	2,50±0,00	3,75±1,11	1,25±0,00	1,87±0,50	1,25±0,00	3,75±1,11
AI.2	2,50±0,00	3,12±1,37	1,25±0,00	1,87±0,50	1,25±0,00	3,75±1,11
AI.3	2,50±0,00	3,75±1,11	1,87±0,50	1,87±0,50	1,25±0,00	3,75±1,11
AE.1	2,50±0,00	2,50±0,00	0,94±0,56	0,94±0,56	1,25±0,00	1,25±0,00
AE.2	2,50±0,00	2,50±0,00	0,94±0,56	0,94±0,56	1,25±0,00	1,25±0,00
AE.3	2,50±0,00	2,50±0,00	1,56±0,97	1,56±0,97	1,25±0,00	1,87±0,50
IAE.1	2,50±0,00	1,87±0,50	1,87±0,50	1,87±0,50	1,87±0,50	1,87±0,50
IAE.2	2,50±0,00	2,50±0,00	1,25±0,00	1,87±0,50	1,25±0,00	1,87±0,50
IAE.3	2,50±0,00	2,50±0,00	1,25±0,00	1,87±0,50	1,25±0,00	1,25±0,00
IA.1	2,50±0,00	2,50±0,00	1,87±0,50	1,87±0,50	1,25±0,00	1,87±0,50
IA.2	2,50±0,00	2,50±0,00	1,25±0,00	1,25±0,00	1,25±0,00	1,25±0,00
IA.2	2,50±0,00	2,50±0,00	1,25±0,00	1,25±0,00	1,25±0,00	1,25±0,00
EI.1	3,75±1,11	3,75±1,11	1,87±0,50	2,50±0,00	1,87±0,50	1,87±0,50
EI.2	5,00±0,00	5,00±0,00	0,94±0,56	1,87±0,50	1,87±0,50	2,50±0,00
EI.3	5,00±0,00	5,00±0,00	0,94±0,56	1,25±0,00	1,25±0,00	2,50±0,00

(I = isopropanol; E = etanol; A = acetato de etila; AC = acetona; AA = acetona + acetato de etila; AI = acetona + isopropanol; AE = cetona + etanol; IAE = isopropanol + acetato de etila + etanol; IA = isopropanol + acetato de etila e EI = etanol + isopropanol)

Fonte: Próprio autor (2020).

A *C. glabrata* exibiu os menores valores de CIM (0,94mg/mL) para o extrato acetona + etanol. Siqueira (2015) obteve CIM e CFM para a mesma *Candida* de 64 µg/mL, valor significativamente menor, apontando maior potencial fungicida à própolis brasileira. Enquanto a própolis iraniana teve a CBM para *C. glabrata* determinada em aproximadamente 5 mg/mL (SHOKRI et al., 2011).

Os testes com antifúngicos comerciais para o controle do ensaio não puderam ser realizados em decorrência das complicações geradas pelo COVID-19 e a situação pandêmica mundial. No município de Toledo os casos estão em números alarmantes e o uso dos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná para atividades de pesquisa foi restrito.

CONCLUSÕES

As propriedades da própolis já são bastante conhecidas na área de produtos naturais. Diante disso, nos últimos anos, as pesquisas científicas relacionadas a investigação e comprovação de tais propriedade estão se intensificando. Nesse trabalho foi comprovada a atividade antifúngica e fungicida da própolis verde para as três espécies: *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

Em se tratando dos solventes utilizados para o preparo dos extratos de própolis a acetona e a mistura de acetona com etanol, de modo geral, exibiram as melhores atividades apresentando menores concentrações de CIM e CFM, proporcionando um extrato de maior atividade antimicrobiana.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Toledo e seu corpo docente pela oportunidade de imersão na ciência.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, N. A. Atividade antifúngica de extratos da própolis contra o fungo *botrytis* sp. isolados de morango. 2014. 61 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014. Disponível em: <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/3454>. Acesso em 16 jul. 2020.

ANDOLFATO, S. C.; ANDOLFATO, S. **Otimização do processo de extração de compostos bioativos da própolis produzida por abelhas geneticamente modificadas**. 2014. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014. Disponível em: <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/2199?mode=full>. Acesso em 16 jul. 2020.

BITTENCOURT, F. O. **Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha**. 2008. 74 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes. Aracaju, 2008. Disponível em:

<https://mestrados.unit.br/wp-content/uploads/sites/6/2011/05/disserta%C3%A7%C3%A3o-Felipe-Oliveira-Bittencourt.pdf> . Acesso e 06 jul. 2020.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001. Disponível em: http://www.dourados.ms.gov.br/wp-content/uploads/2016/05/RTIQ-Mel-completo-IN-11_2000.pdf . Acesso em 18 jul. 2020.

CABRAL et al. **Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira**. Quim. Nova, Vol. 32, No. 6, 1523-1527, 2009. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422009000600031&script=sci_arttext. Acesso em 19 jul. 2020.

CARVALHO, M. H. G. F. **Características fenotípicas associadas à virulência e ao perfil de suscetibilidade aos antifúngicos em isolados clínicos do complexo candida glabrata**. 2017. 166 f. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/27065>. Acesso em 20 jul. 2020

COSTA, A. S. et al. Levantamento dos estudos com a própolis produzida no estado da Bahia. **Sit. Cien. Biol.**, 2014. Disponível em: <http://periodicos.uefs.br/index.php/sitientibusBiologia/article/download/324/332>. Acesso em 20 jul. 2020.

FISCHER et al. Imunomodulação pela própolis. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.2, p.247-253, abr./jun., 2008. Disponível em: <http://www.apiariorosilvestre.com.br/images/documentos/3.Imunomodulacaopela%20propolis.pdf>. Acesso em 20 jul. 2020.

HOSETO et al. Atividade antifúngica do extrato do subproduto da própolis frente a espécies de Candida sp. In: II Congresso Paranaense de Microbiologia, Simpósio Sul-Americano de Microbiologia Ambiental. **Anais eletrônicos...** Campinas, Galoá, 2016. Disponível em: <https://proceedings.science/cpm/papers/atividade-antifungica-do-extrato-do-subproduto-da-propolis-frente-a-especies-de-candida-sp-?lang=pt-br>. Acesso em 06 ago. 2020.

LIBERATO, K. B. C. **Atividade antifúngica de extratos de plantas do semiárido paraibano frente a leveduras do gênero candida**. 2018. 41f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2018. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/3791>. Acesso em 16 jul. 2020.

MARIANO, M. M.; HORI, J. I. **O potencial terapêutico da própolis verde Brasileira**. E- Revista. Ribeirão Preto: SP, 2018. Disponível em <http://periodicos.estacio.br/index.php/e-revistafacitec/article/view/6219>. Acesso em 19 jul. 2020.

MORAES, C. S. **Isolamento e identificação de formononetina da própolis vermelha de João Pessoa – PB, estudo de sua sazonalidade e avaliação de suas atividades biológicas**. 2009. 188 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP: 2009. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/255823/1/Moraes_CleberSilveira_D.pdf. Acesso em 18 jul. 2020.

PORTILHO, D. R.; et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. **Rev. Cien. ITPAC**, Araguaína, v.6, n. 2, Pub.1, abr. 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Hebert_Lima_Batista/publication/262725380_AVALIACAO_DA_ATIVIDADE_ANTIBACTERIANA_E_ANTIFUNGICA_DA_PROPOLIS_PRODUZIDA_NO_ESTADO_DO_TOCANTINS/links/02e7e53890d2b4a153000000/AVALIACAO-DA-ATIVIDADE-ANTIBACTERIANA-E-ANTIFUNGICA-DA-PROPOLIS-PRODUZIDA-NO-ESTADO-DO-TOCANTINS.pdf Acesso em 18 jul. 2020.

SEBRAE. **Agronegócio boletim: o mercado da própolis**. 2014 Disponível em: [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/\\$File/4612.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/$File/4612.pdf) Acesso em 20 jul. 2020.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **J. Venom. Anim. Toxins**, Botucatu, v.7, n.1, p. 139-144, 2001 Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79302001000100009&lng=en&nrm=iso. Acesso em 06 Jul. 2020.

SHOKRI et al. Antifungal efficacy of propolis against fluconazole-resistant *Candida glabrata* isolates obtained from women with recurrent vulvovaginal candidiasis. **Int. J. Gyn. Obst.**, 2011. Disponível em: http://scholar.google.com.br/scholar_url?url=http://www.academia.edu/download/33894817/Antifungal_efficacy_of_propolis_against_fluconazole-resistant_Candida_glabrata_isolates-elsevier.pdf&hl=pt-BR&sa=X&scisig=AAGBfm3F91PL7oI499uEkGhxV09IT1xRwA&nossl=1&oi=scholar_r. Acesso em 06 jul. 2020.

SIQUEIRA et al. Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis. **Braz. Oral. Res.** v.29, n.1, p. 1-6, 2015. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242015000100278. Acesso em 06 jul. 2020.