

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

GABRIELLE PIRES DE MORAIS MONARI

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DO EXTRATO DE PRÓPOLIS
VERDE SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE ISOLADOS
CLÍNICOS DA LEVEDURA *Trichosporon asahii***

Botucatu

2025

GABRIELLE PIRES DE MORAIS MONARI

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DO EXTRATO DE PRÓPOLIS
VERDE SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE ISOLADOS
CLÍNICOS DA LEVEDURA *Trichosporon asahii***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada.

Área de concentração: Biologia de Micro-organismos e Imunidade

Orientadora: Prof. Dra. Luciana da Silva Ruiz Menezes

Botucatu

2025

M735a

Monari, Gabrielle Pires de Moraes

Avaliação in vitro da atividade do extrato de própolis verde sobre células
planctônicas e sésseis de isolados clínicos da levedura *Trichosporon asahii* /

Gabrielle Pires de Moraes Monari. -- Botucatu, 2025

70 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto
de Biociências, Botucatu

Orientadora: Luciana da Silva Ruiz Menezes

1. microbiologia médica. 2. fungos patogênicos. 3. antifúngicos. 4. produtos
naturais. 5. biofilmes. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DA PESQUISA

Este estudo *in vitro* investiga o efeito antimicrobiano de um produto natural amplamente aceito pela população, com baixo custo e fácil acesso. A metodologia empregada é reprodutível e compatível com os principais comitês de teste de suscetibilidade antimicrobiana, o que garante a confiabilidade dos resultados. Os dados inéditos obtidos sobre a combinação do produto natural com antifúngicos clínicos atualmente em uso e seu efeito sobre o biofilme oferecem novas perspectivas para estudos de tratamentos mais eficazes. Considerando que os antifúngicos clínicos apresentam longos períodos de desenvolvimento, a combinação proposta pode representar uma alternativa promissora, potencialmente acelerando a disponibilidade de novos tratamentos. Além disso, a acessibilidade do produto natural pode reduzir os custos com tratamentos e ampliar o acesso à saúde, beneficiando comunidades de menor poder aquisitivo e oferecendo uma solução viável em contextos de baixa infraestrutura médica.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This *in vitro* study investigates the antimicrobial effect of a natural product widely accepted by the population, characterized by its low cost and easy accessibility. The methodology employed is reproducible and aligned with the standards of major antimicrobial susceptibility testing committees, ensuring the reliability of the results. The novel data obtained on the combination of the natural product with currently used clinical antifungals and its effect on biofilm offer new perspectives for studies on more effective treatments. Considering that clinical antifungal agents require lengthy development periods, the proposed combination could represent a promising alternative, potentially accelerating the availability of new treatments. Moreover, the accessibility of natural products may reduce treatment costs and expand access to healthcare, benefiting low-income communities and offering a viable solution in contexts with limited medical infrastructure.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação *in vitro* da atividade do extrato de própolis verde sobre células planctônicas e sésseis de isolados clínicos da levedura *Trichosporon asahii*

AUTORA: GABRIELLE PIRES DE MORAIS MONARI

ORIENTADORA: LUCIANA DA SILVA RUIZ MENEZES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biologia Geral e Aplicada, área: Biologia de Micro-organismos e Imunidade pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LUCIANA DA SILVA RUIZ MENEZES (Participação Virtual)
Núcleo de Ciências Biomédicas / Instituto Adolfo Lutz Bauru

Profa. Dra. AMANDA LATÉRCIA TRANCHES DIAS (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

Profa. Dra. JÉSSICA LUANA CHECHI (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade de São Paulo - USP

Botucatu, 27 de fevereiro de 2025

Documento assinado digitalmente
 **MARIA VICTORIA RAMALHO DA CUNHA**
Data: 28/02/2025 09:50:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Maria Victória Ramalho da Cunha
Assistente Administrativo II da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu

Dedico esse trabalho ao meu pai, que sempre foi o meu maior incentivador. Sinto sua falta.

AGRADECIMENTOS

À minha família, minha mãe Regina e irmãos Isabelle, Gabriel e Lucy pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado durante essa jornada e ouviram pacientemente todos meus desabaços, em especial as minhas companheiras Alice, Bruna, Cassiana, Débora, Laís e Vanessa.

À Apis Flora em especial Andresa Berretta pela parceria e auxílio essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários e diretores do Instituto Adolfo Lutz de Bauru que me acolheram e me ensinaram todos os dias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada e a Seção Técnica de Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu (IB) pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais de Bauru pelo apoio e a estrutura para o desenvolvimento desse trabalho.

A Sayuri Mikawa e a Maria Renata do Instituto Lauro de Souza Lima de Bauru pelo auxílio e estrutura para o desenvolvimento de uma parte desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº 10.940-2/2023.

À Luciana, minha orientadora, por me acolher e me incentivar, por se preocupar não só com o meu desempenho, mas a minha saúde e o meu aprendizado, obrigada pela confiança e pela oportunidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de Financiamento 001.

“Não há nada a temer na vida, apenas tratar de compreender.”
— Marie Curie

RESUMO

A levedura *Trichosporon asahii* faz parte da microbiota humana, causando principalmente infecções superficiais. No entanto, na última década tem causado infecções disseminadas em pacientes imunocomprometidos, além de apresentar sensibilidade diminuída a maioria dos antifúngicos utilizados na rotina terapêutica. Considerando os desafios da prática clínica para o enfrentamento de infecções fúngicas e o aumento de resistência aos antifúngicos clínicos, buscam-se alternativas terapêuticas nos produtos naturais. Assim, o presente trabalho teve como objetivos determinar a atividade antifúngica (concentração inibitória mínima - CIM e concentração fungicida mínima - CFM) *in vitro* do extrato etanólico de própolis verde e de quatro antifúngicos comerciais sobre células planctônicas de isolados clínicos de *T. asahii*; avaliar a interação entre os extratos com os melhores resultados de atividade antifúngica *in vitro* com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol; avaliar a capacidade antibiofilme (inibição e remoção) do extrato de própolis verde frente aos isolados de *T. asahii*; avaliar a ultraestrutura de biofilmes de tratados com própolis; avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações do extrato de própolis verde sobre células animais. Foram estudadas dez cepas clínicas de *T. asahii* mantidas em micoteca, extrato de própolis verde alcóolico a 11,05% (m/v) e os antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol. Os ensaios antimicrobianos *in vitro* foram realizados com base no EUCAST para determinação da CIM e CFM. Para anfotericina, caspofungina e voriconazol, foram testadas concentrações de 0,03-16mg/L, para fluconazol de 0,25-128mg/L e para a própolis de 2,15-1105mg/L. Os valores de CIM variaram entre 0,5mg/L e 4mg/L para anfotericina B, 4mg/L e >16mg/L para caspofungina, 0,5 e 4mg/L para fluconazol e 0,06 e 0,5mg/L para o voriconazol. A CFM para anfotericina B variou entre 2 e 4 mg/L, >16mg/L para caspofungina, 2 e 8 mg/L para fluconazol e entre 0,5 e 2 mg/L para voriconazol. Para a própolis, os valores de CIM e CFM variaram entre 276,25 e 552,2mg/L. Ao combinar anfotericina B e fluconazol com o extrato de própolis, houve ação antagonista para ambas os compostos. Ensaios de formação de biofilmes mostraram que todas as cepas testadas foram capazes de produzir biofilmes. O tratamento com o extrato de própolis foi realizado nas concentrações 100%CIM, 75%CIM, 50%CIM, 25%CIM e 20%CIM e foi aplicada para análise de erradicação e inibição da formação de biofilmes. Nos ensaios de erradicação, a redução de biomassa foi observada em todas as concentrações testadas (1,6-99%), mas houve pouca alteração na atividade metabólica (0,46-50,77%). Em contraste, nos ensaios de inibição, houve redução de biomassa (5,3-100%) e atividade metabólica (11,9-81,1%) para a maioria das concentrações testadas. A erradicação de biofilmes analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura mostrou a redução da complexidade dos biofilmes formados após o tratamento. O ensaio de citotoxicidade em fibroblastos animais mostrou que as concentrações de 69,06 mg/L, 138,125 mg/L e 276,25 mg/L são tóxicas, mas a viabilidade celular aumenta nas concentrações mais altas testadas. Os resultados mostraram o efeito inibitório do extrato de própolis verde sobre as cepas clínicas de *T. asahii*, considerados importantes para apoiar estudos de seu uso como potencial alvo terapêutico ou adjuvante para o tratamento das infecções fúngicas.

Palavras-chave: Antifúngicos, Produtos naturais, virulência

ABSTRACT

The yeast *Trichosporon asahii* is part of the human microbiota, mainly causing superficial infections. However, in the last decade, it has been responsible for disseminated infections in immunocompromised patients, in addition to exhibiting reduced susceptibility to most antifungals used in routine therapy. Considering the challenges of clinical practice in managing fungal infections and the increasing resistance to clinical antifungals, natural products have been explored as alternative therapies. Thus, the present study aimed to determine the *in vitro* antifungal activity (minimum inhibitory concentration - MIC and minimum fungicidal concentration - MFC) of the ethanolic extract of green propolis and four commercial antifungal agents on planktonic cells of clinical isolates of *T. asahii*; to evaluate the interaction between the extracts with the best antifungal activity *in vitro* and the antifungals amphotericin B and fluconazole; to evaluate the anti-biofilm capacity (inhibition and removal) of the green propolis extract against *T. asahii* isolates; to assess the ultrastructure of biofilms treated with propolis; and to evaluate the cytotoxicity of different concentrations of the green propolis extract on animal cells. Ten clinical strains of *T. asahii* maintained in a microbiological collection were studied, along with alcoholic green propolis extract at 11.05% (m/v) and the antifungals amphotericin B, caspofungin, fluconazole, and voriconazole. *In vitro* antimicrobial assays were performed based on EUCAST guidelines to determine the MIC and MFC. For amphotericin B, caspofungin, and voriconazole, concentrations of 0.03-16 mg/L were tested, for fluconazole 0.25-128 mg/L, and for propolis 2.15-1105 mg/L. MIC values ranged from 0.5 mg/L to 4 mg/L for amphotericin B, 4 mg/L to >16 mg/L for caspofungin, 0.5 mg/L to 4 mg/L for fluconazole, and 0.06 mg/L to 0.5 mg/L for voriconazole. The MFC for amphotericin B ranged from 2 to 4 mg/L, >16 mg/L for caspofungin, 2 to 8 mg/L for fluconazole, and 0.5 to 2 mg/L for voriconazole. For propolis, MIC and MFC values ranged from 276.25 to 552.2 mg/L. When combining amphotericin B and fluconazole with propolis extract, an antagonistic effect was observed for both drugs. Biofilm formation assays showed that all tested strains were capable of producing biofilms. Treatment with the propolis extract was performed at concentrations of 100% MIC, 75% MIC, 50% MIC, 25% MIC, and 20% MIC and was applied to analyze biofilm eradication and inhibition. In eradication assays, biomass reduction was observed at all tested concentrations (1.6-99%), but there was little change in metabolic activity (0.46-50.77%). In contrast, in inhibition assays, biomass reduction (5.3-100%) and metabolic activity reduction (11.9-81.1%) were observed for most tested concentrations. Biofilm eradication analyzed by Scanning Electron Microscopy revealed a reduction in the complexity of biofilms formed after treatment. Cytotoxicity assays in animal fibroblasts showed that concentrations of 69.06 mg/L, 138.125 mg/L, and 276.25 mg/L were toxic, but cell viability increased at higher concentrations tested. The results showed the inhibitory effect of the green propolis extract on clinical strains of *T. asahii*, considered important to support studies of its use as a potential therapeutic target or adjuvant for the treatment of fungal infections.

Key words: antifungal, natural products, virulence

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Produção de biomassa e atividade metabólica totais dos 10 isolados em relação ao controle sem tratamento para os ensaios de erradicação de biofilmes.	37
Figura 2 - Produção de biomassa e atividade metabólica totais, em relação ao controle sem tratamento, nos ensaios de inibição da produção de biofilmes dos 10 isolados de <i>T. asahii</i> estudados.....	39
Figura 3 - Fotomicrografias do isolado 3, biofilmes sem tratamento (A e B), biofilmes tratados com CIM-2 (C e D) e com CIM-1 (E e F). Aumento de 372x a 8000x.....	41
Figura 4 - Fotomicrografias do isolado 3, biofilmes tratados com CIM (A e B), CIM+1 (C e D) e CIM+2 (E e F). Aumento de 400x a 12000x.....	42
Figura 5 - Fotomicrografias do isolado 5, biofilmes sem tratamento (A e B), biofilmes tratados com CIM-2 (C e D) e com CIM-1 (E e F). Aumento de 300 a 7004x.	43
Figura 6 – Fotomicrografias do isolado 5, biofilmes tratados com CIM (A e B), CIM+1 (C e D) e CIM+2 (E e F). Aumento de 400x a 8000x.....	42
Figura 7 - Viabilidade celular (%) de diferentes concentrações do extrato de própolis sobre fibroblastos 3T3.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores de CIM (mg/L) e CFM (mg/L) dos 10 isolados de <i>T. asahii</i> estudados, frente aos antifúngicos comerciais anfotericina B, caspofungina, fluconazol, voriconazol e ao extrato alcoólico da própolis.....	34
Tabela 2- Concentrações do extrato de própolis, anfotericina B e fluconazol utilizados nos ensaios de combinação de produtos.....	35
Tabela 3 - Suscetibilidade de células planctônicas de cinco isolados contra os antifúngicos anfotericina B e fluconazol sozinhos e em combinação com o extrato de própolis.....	35
Tabela 4 - Classificação dos isolados de <i>T. asahii</i> quanto a quantificação da produção de biomassa (Cristal Violeta) e atividade metabólica (XTT).....	36
Tabela 5 - Efeito da própolis na erradicação da biomassa de biofilmes dos 10 isolados de <i>T. asahii</i> estudados.....	38
Tabela 6 - Efeito da própolis na atividade metabólica de biofilmes dos 10 isolados de <i>T. asahii</i> estudados. Ensaio de erradicação.....	38
Tabela 7 - Efeito da própolis na inibição da biomassa de biofilmes dos 10 isolados de <i>T. asahii</i> estudados.....	40
Tabela 8 - Efeito da própolis na atividade metabólica de biofilmes dos 10 isolados de <i>T. asahii</i> estudados. Ensaio de inibição.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ASD	Ágar Sabourad Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
CASPO	Caspofungina
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF	Combinação Inibitória Fracionária
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsufóxido
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FLUCO	Fluconazol
FPPL	Fungal Priority Pathogen List
HPLC/DAD	High Performance Liquid Chromatography– Diode Array Detector (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, detector DAD)
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Mínima Fracionária
IFI	Infecção Fúngica Invasiva
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOPS	Ácido 3-morfolinopropano 1-sulfônico
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate Buffer Sollution
RPMI	Roswell Park Memorial Insistute (meio de cultura)
SFB	Soro Fetal Bovino
SOLUÇÃO P/S	Solução de estreptomomicina e penicilina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VORICO	Voriconazol
XTT	2,3-(2- methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl) -5- [(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1.	Infecções fúngicas e o cenário global.....	11
1.2.	<i>Trichosporon</i> spp. e <i>Trichosporonose</i>	12
1.3.	Fatores de virulência – biofilme	14
1.4.	Terapia antifúngica	16
1.5.	Produtos naturais	18
1.5.1.	Própolis.....	20
2	OBJETIVOS	23
2.1.	Objetivo Geral	23
2.2.	Objetivos específicos	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1.	Instituição sede	24
3.2.	Isolados de <i>Trichosporon asahii</i>	24
3.3.	Extrato de própolis verde brasileira.....	24
3.3.1.	Preparo de solução hidroalcoólica para diluição do extrato de própolis	25
3.4.	Teste de sensibilidade aos antifúngicos – células planctônicas.....	25
3.4.1.	Preparo de soluções de antifúngicos comerciais	25
3.4.2.	Preparo das diluições do extrato de própolis	26
3.4.3.	Preparo do inóculo.....	26
3.4.4.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – antifúngicos comerciais.....	26
3.4.5.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – extrato de própolis verde	27
3.4.6.	Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) – antifúngicos comerciais e extrato de própolis	27
3.5.	Avaliação da atividade combinada entre extrato de própolis e os antifúngicos anfotericina B e fluconazol.....	28
3.6.	Ensaio de formação de biofilme	29
3.6.1.	Erradicação de biofilme por extrato de própolis verde.....	29
3.6.1.1.	Quantificação da biomassa	30
3.6.1.2.	Atividade metabólica	30
3.6.2.	Inibição da formação de biofilme por extrato de própolis verde.....	31
3.7.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de biofilmes tratados e não tratados com própolis	31
3.8.	Citotoxicidade.....	32
3.9.	Análise Estatística	33
4	RESULTADOS	34
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÕES.....	57
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
	ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1. Infecções fúngicas e o cenário global

Os fungos são organismos ubíquos com um amplo espectro de ações ecológicas, podendo ser decompositores, simbiontes, parasitas e patógenos (Shapiro; Robbins; Cowen, 2011). A diversidade de fungos atualmente está estimada em 2,2 a 3,8 milhões de espécies, estando 120 mil delas já descritas e apenas em torno de 100 espécies são capazes de causar doenças em humanos, caracterizando-se como patógenos (Antonelli *et al.*, 2023). As infecções superficiais, de pele e unhas, são as mais comuns e podem afetar anualmente quase 2 bilhões de indivíduos pelo mundo, no entanto, as formas invasivas são mais graves (Munzen; Goncalves Garcia; Martinez, 2023).

Nos últimos anos, as infecções fúngicas invasivas têm emergido como uma preocupação significativa para a saúde pública global. Estima-se que aproximadamente 6,5 milhões de pessoas sejam afetadas anualmente por essas condições, incluindo aspergilose pulmonar crônica, candidíase invasiva e outras infecções fúngicas severas. A gravidade dessa situação é evidenciada pela alta taxa de mortalidade associada a essas infecções, que varia entre 3 e 8 milhões de óbitos anuais. Observa-se que cerca de 68% dessa mortalidade pode ser atribuída a casos não diagnosticados e, portanto, não tratados, destacando a necessidade urgente de melhorias na detecção e no manejo dessas doenças (Denning, 2024).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a crescente preocupação com as infecções fúngicas e, em 2022, publicou a Fungal Priority Pathogen List (FPPL) ou Lista de Patógenos Fúngicos Prioritários, em tradução livre, a primeira lista global sobre patógenos fúngicos que surgiu após uma versão para bactérias, divulgada alguns anos antes. Essa lista categoriza 19 grupos de fungos em três níveis de prioridade — crítica, alta e média — com o objetivo de orientar os esforços de pesquisa e desenvolvimento. A metodologia da OMS baseou-se em uma análise de decisão multicritério, levando em consideração fatores como mortalidade, incidência anual, e principalmente a resistência antifúngica (WHO, 2022). Contudo, alguns especialistas apontam que a lista da OMS pode não abordar todas as entidades fúngicas de forma adequada e sugerem ajustes com base em critérios adicionais, como a tendência nos últimos 10 anos, o acesso a diagnósticos e tratamentos e a necessidade de uma abordagem regionalizada considerando a distribuição global, uma vez que a carga de doença fúngica varia significativamente entre diferentes regiões (Casalini; Giacomelli; Antinori, 2024).

Além disso, uma pesquisa recente aponta que as mudanças climáticas podem estar desempenhando um papel crucial na adaptação e expansão dos fungos patogênicos, indicando

que o aumento das temperaturas globais possa estar tornando os fungos mais termotolerantes, o que não só amplia sua virulência, mas também facilita sua proliferação em ambientes anteriormente inóspitos, como áreas urbanas e habitats poluídos. Esse fenômeno contribui para a emergência de novos patógenos fúngicos e para o aumento da frequência e severidade de surtos associados às mudanças climáticas. A população socialmente vulnerável é particularmente suscetível aos efeitos dessas mudanças e à propagação de doenças fúngicas, o que ressalta a necessidade de maior conscientização, investimento em pesquisa e políticas públicas eficazes para mitigar os impactos das mudanças climáticas. A compreensão dessas dinâmicas é fundamental para desenvolver estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes, tendo em vista a crescente importância das infecções fúngicas no cenário global de saúde pública (Seidel *et al.*, 2024).

Dentre os grupos que aparecem mais frequentemente envolvidos em infecções oportunistas na forma invasiva estão os gêneros *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus* spp. (Bitterman; Marinelli; Husain, 2021). Além destes, o gênero *Trichosporon* spp. tem se destacado como um fungo emergente em infecções sistêmicas, sendo identificado como a segunda maior causa de infecções invasivas originadas por leveduras em pacientes com doenças hematológicas malignas (de Almeida Júnior; Hennequin, 2016), com mortalidade chegando a 86% em pacientes com COVID-19 (Benelli *et al.*, 2022).

1.2. *Trichosporon* spp. e tricosporonose

As leveduras do gênero *Trichosporon* spp. pertencem ao Filo Basidiomycota, Subfilo Agaricomycotina, Classe Tremellomycetes, Ordem Tremellales e Família Trichosporonaceae. São leveduras amplamente distribuídas na natureza e têm sido isoladas de diversos ambientes, como solo, sedimentos, águas residuais, lodo, madeira e espécimes clínicos, predominantemente em ambientes úmidos e quentes, como as regiões tropicais e temperadas (Colombo; Padovan; Chaves, 2011). Além disso, também fazem parte da microbiota humana e animal, colonizando o trato gastrointestinal, pele e membranas mucosas (Iyer; Ojcius, 2024; Mehta *et al.*, 2021).

O estudo realizado por Colombo *et al.* (2011) descreveu o gênero *Trichosporon* spp. em 50 espécies, divididas entre quatro clados. Entretanto, uma reclassificação filogenética recente da Classe Tremellomycetes, promoveu modificações taxonômicas significativas na família Trichosporonaceae (Liu *et al.*, 2015). As espécies foram reorganizadas em cinco gêneros distintos: *Apiotrichum* (21 espécies), *Cutaneotrichosporon* (10 espécies), *Effuseotrichosporon* (1 espécie), *Hagleromyza* (1 espécie) e *Trichosporon* (12 espécies). A maioria das espécies

anteriormente classificadas no gênero *Trichosporon* foram reclassificadas nos gêneros *Apiotrichum*, *Cutaneotrichosporon* e *Trichosporon*. Esta reavaliação permitiu uma modernização taxonômica da classe Tremellomycetes, promovendo uma melhor compreensão da evolução dos gêneros e integrando a filogenia com aspectos bioquímicos, fisiológicos e características reprodutivas de basidiomicetos unicelulares.

Em 2019, Takashima e colaboradores construíram, por meio de dados genômicos, relações filogenéticas para avaliar o delineamento e caracterização dos gêneros pertencentes a Trichosporonales. Os autores propuseram que seja realizada uma reanálise das denominações taxonômicas, sugerindo a reavaliação do gênero *Cutaneotrichosporon* e a adição de dois novos gêneros que foram denominados como *Pascua* e *Prillingera*.

O gênero *Trichosporon* spp. é composto por leveduras não encapsuladas formadoras de hifas verdadeiras e septadas, com a presença abundante de artroconídios. As colônias são de cor creme, úmidas ou secas, com ou sem cobertura farinácea. São urease positiva e sua parede exibe uma configuração multilamelar composta de 9% de quitina e β -1,3-glucano. A estrutura da parede celular com glucoronoxylomanona (GMX) pode contribuir para as propriedades sorológicas das espécies do gênero (Kurtzman; Fell; Boekhout, 2011).

Embora a maioria das espécies de *Trichosporon* seja saprófita, algumas têm potencial patogênico e podem causar micoses superficiais, além de condições sistêmicas graves como a tricosporonose, especialmente em pacientes com imunodeficiências (Lima; Dias, 2024). A tricosporonose profunda tem uma alta taxa de mortalidade e um prognóstico desfavorável. Os pacientes que enfrentam desfechos fatais associados a *Trichosporon* spp. geralmente são aqueles com leucemia, linfoma ou neutropenia profunda no momento da infecção fúngica (Hennequin; de Almeida Junior, 2016).

No passado, as infecções fúngicas invasivas (IFIs) por *Trichosporon* spp. eram menos comuns devido ao uso de antifúngicos derivados de triazol, como o fluconazol (Gomes *et al.*, 2014). Atualmente, observa-se uma reemergência deste patógeno, possivelmente em razão da introdução das equinocandinas, que são frequentemente usadas para tratar infecções fúngicas invasivas em situações de alto risco (Sah *et al.*, 2019). Como *Trichosporon* spp. apresenta resistência intrínseca a esses medicamentos e somados a recente pandemia de COVID-19, ambos contribuíram para o aumento de casos de tricosporonose. Estudos recentes indicam que pacientes hospitalizados com COVID-19 apresentam um alto risco de desenvolver IFIs por *Trichosporon* (Ali *et al.*, 2021; Benelli *et al.*, 2022; Cronyn *et al.*, 2021; Sprute *et al.*, 2022).

A tricosporonose pode se apresentar de duas formas, sendo elas, localizada ou disseminada. No primeiro caso a infecção é delimitada a um órgão ou a um sistema específico, enquanto no

segundo caso a infecção acomete mais órgãos ou sistemas, podendo inclusive se disseminar para a corrente sanguínea (Jesus, 2018). A apresentação clínica mais comum é a fungemia (>70%), pneumonia e lesões na pele, sendo que a taxa de mortalidade relacionada a estas infecções varia entre 50% e 70%. Apesar da importância, fungemias por *Trichosporon* spp. são frequentemente negligenciadas e incorretamente diagnosticadas como infecções sanguíneas ocasionadas por outras leveduras, especialmente *Candida* spp. (Singh *et al.*, 2019).

A maioria das infecções invasivas por *Trichosporon* spp. provavelmente se inicia com a colonização das superfícies mucosa e cutânea, seguida do rompimento da integridade da superfície e subsequente disseminação por via hematogênica. Este rompimento pode ser secundário a danos epiteliais induzidos por cateteres intravasculares ou quimioterapia. O uso de antibióticos também pode aumentar a incidência e a extensão da colonização por meio da destruição da microbiota residente, elevando assim o risco da infecção invasiva (Castano; Yarrarapu; Mada, 2022).

Entre as espécies de *Trichosporon* com potencial patogênico, *T. asahii*, *T. asteroides* e *T. mucoides* são responsáveis pela maioria dos casos de *Trichosporonose*, representando importantes patógenos oportunistas (Almeida Jr *et al.*, 2016). Recentemente, achados clínicos e microbiológicos tem relatado outras espécies de *Trichosporon* como patógenos humanos capazes de causar infecções invasivas (Francisco *et al.*, 2019, 2024; Lara *et al.*, 2021; Nath *et al.*, 2018).

Entre as espécies patogênicas, *T. asahii* se destaca como um importante agente de infecções invasivas em pacientes imunocomprometidos. Mais de 90% dos casos de *trichosporonose* tem *T. asahii* como o agente etiológico. A maioria dos isolados é resistente à anfotericina B, mas sensível aos azóis, embora o número de cepas resistentes a azóis esteja aumentando (Kurakado *et al.*, 2021).

Apesar da crescente importância do gênero *Trichosporon* na medicina contemporânea, o tratamento de pacientes com *trichosporonose* permanece desafiador, uma vez que há poucos dados disponíveis em relação as atividades *in vitro* e *in vivo* de substâncias antifúngicas contra espécies clinicamente relevantes do gênero (Francisco *et al.*, 2019).

1.3. Fatores de virulência – biofilme

Apesar de *Trichosporon* spp. representar a segunda ou terceira levedura não-*Candida* mais comum causando infecções invasivas, e com alta taxa de mortalidade em pacientes imunossuprimidos, poucos estudos na literatura têm relatado os fatores de virulência envolvidos na caracterização dos isolados (Almeida *et al.*, 2016; Chagas-Neto *et al.*, 2009; Demir;

Kuştimur, 2014; Di Bonaventura *et al.*, 2006; do Espírito Santo *et al.*, 2020; Hazirolan; Koçak; Karagöz, 2018; Iturrieta-González *et al.*, 2014; Lara *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2012).

Os fatores de virulência das espécies de *Trichosporon* são complexos e variados, refletindo a sua habilidade para causar infecções. Os principais fatores de virulência do gênero englobam a composição da parede celular, a evasão do sistema imune, a plasticidade metabólica, a presença de enzimas líticas, o *switching* fenotípico e a formação de biofilmes (Duarte-Oliveira *et al.*, 2017).

A formação de biofilmes, uma característica marcante de *Trichosporon* spp., é especialmente notável, pois aumenta a resistência aos antifúngicos e à resposta imune do hospedeiro. Biofilmes são comunidades altamente estruturadas de microrganismos que se aderem a superfícies ou entre si, envoltos em uma matriz extracelular protetiva. Esses biofilmes são formados por células sésseis, que são aderidas a uma superfície e distintas das células planctônicas, que permanecem livres e homogêneas no ambiente. Estima-se que cerca de 80% dos microrganismos no ambiente estejam associados a biofilmes, refletindo sua importância ecológica e clínica (Ramage *et al.*, 2012).

A formação de biofilmes oferece diversas vantagens adaptativas para os microrganismos (Flemming *et al.*, 2016). Eles proporcionam proteção contra estresses físicos e químicos, possibilitam a cooperação metabólica entre as células e permitem uma regulação gênica baseada na comunidade. Durante as fases iniciais do desenvolvimento de biofilmes, bombas de efluxo são ativadas para remover agentes antimicrobianos e outros fatores prejudiciais. À medida que o biofilme amadurece, a densidade da estrutura pode atuar como uma barreira física adicional, tornando os microrganismos menos suscetíveis a fatores de crescimento e pressionando a resistência. Esses biofilmes podem, portanto, exibir uma resistência fúngica induzível, regida por uma série de vias moleculares que regulam tanto o desenvolvimento do biofilme quanto a homeostase celular (Di Bonaventura *et al.*, 2006). Em estudos comparativos, *Trichosporon* spp. mostrou uma capacidade de formação de biofilmes semelhante ou até superior à de *Candida* spp., com células formadoras de biofilmes sendo significativamente mais resistentes a antifúngicos como o voriconazol (Iturrieta-González *et al.*, 2014).

Di Bonaventura *et al.*, (2006) foram os primeiros a descreverem, por meio da microscopia eletrônica, a cinética da formação de biofilmes e o desenvolvimento sobre superfícies de poliestireno por cepas de *T. asahii*, relatando a rapidez com que esta espécie realizou adesão neste material. Ressalta-se que infecções invasivas por *Trichosporon* spp. são usualmente associadas ao uso de cateteres (Urs *et al.*, 2018). Estudos vem sendo realizados para avaliar o papel do biofilme durante o curso de uma infecção por espécies *Trichosporon*, principalmente

T. asahii (Almeida *et al.*, 2016; Cordeiro *et al.*, 2017; Di Bonaventura *et al.*, 2006; do Espírito Santo *et al.*, 2020; Hazirolan; Koçak; Karagöz, 2018; Iturrieta-González *et al.*, 2014; Kurakado *et al.*, 2023; Lara *et al.*, 2019; Montoya *et al.*, 2018; Paldrychová *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2012).

Estudos recentes também revelaram que a formação de biofilmes é uma característica significativa em cepas de *T. asahii*. Em estudo de Lara *et al.* (2023), todos os isolados de *T. asahii* testados demonstraram a capacidade de formar biofilmes, com a maioria sendo classificados como fortes produtores. Ao avaliar a produção junto com outras espécies do gênero, *T. asahii* apresentou o maior número de isolados classificados como fortemente produtores de biofilmes entre os fungos testados. Comparações entre a concentração inibitória mínima (CIM) de células em biofilmes e células planctônicas mostraram que a CIM aumentou de 2 a 66 vezes em biofilme.

A formação de biofilmes por *T. asahii* contribui para a persistência no tecido infectado e a resistência a infecções, o que pode levar a complicações significativas para os pacientes e implicar custos elevados para os sistemas de saúde. Assim, novas estratégias de tratamento para infecções associadas a biofilmes são essenciais para enfrentar esses desafios clínicos e melhorar os resultados para os pacientes (Duarte-Oliveira *et al.*, 2017).

Com a capacidade de adaptação rápida e a presença de múltiplos fatores de virulência, *Trichosporon* spp. representa um desafio significativo para o tratamento de infecções fúngicas, especialmente em ambientes hospitalares onde biofilmes e dispositivos médicos como catéteres são comuns (Lara *et al.*, 2023; Montoya; González, 2014).

1.4. Terapia antifúngica

O tratamento de infecções fúngicas invasivas sistêmicas é um campo complexo e desafiador da medicina. As infecções fúngicas, que podem ser graves e difíceis de tratar, são combatidas com uma variedade de antifúngicos classificados em quatro principais categorias: polienos, azóis, equinocandinas e pirimidinas. Cada uma dessas classes possui características distintas, mecanismos de ação e limitações. Recentemente, uma nova classe de antifúngicos, os triterpenoides como o ibrexafungerp, tem mostrado promissora eficácia e está avançando para o uso clínico, o que representa um avanço significativo no arsenal contra infecções fúngicas (Puumala *et al.*, 2024).

Os polienos, como a nistatina e a anfotericina B, foram pioneiros no tratamento de infecções fúngicas, em uso desde a década de 1950. Atualmente a anfotericina B é uma das principais escolhas contra doenças fúngicas sistêmicas invasivas. O mecanismo de ação dos polienos é baseado em moléculas anfipáticas que se ligam ao ergosterol na membrana

plasmática dos fungos formando grandes agregados extra membranosos droga-lipídio. Estes agregados se intercalam com a membrana fúngica formando canais que viabilizam a saída de íons. Esse processo remove o ergosterol da membrana, resultando em alterações estruturais e funcionais que comprometem a integridade da célula fúngica. Apesar de sua potência e amplo espectro de atividade, os polienos têm limitações significativas, como baixa biodisponibilidade oral e toxicidade para os hospedeiros (Shapiro; Robbins; Cowen, 2011).

Dentre as espécies do gênero *Trichosporon*, *T. asahii* é a que mais apresenta valores elevados de CIMs frente a anfotericina B (Tsai *et al.*, 2012). De Almeida Júnior; Hennequin (2016) avaliaram diferentes estudos que realizaram teste de suscetibilidade para anfotericina B em isolados clínicos de *T. asahii*, obtendo valores de CIM entre 1 e 64 mg/L. Arabatzis *et al.* (2014) obtiveram valores de CIM > 2 mg/L em 58% dos isolados testados. A taxa de resistência de *T. asahii* para anfotericina B é a maior entre os antifúngicos usados na prática clínica (Abbes *et al.*, 2021).

Introduzidos na clínica na década de 1980, os azóis se tornaram a classe padrão de antifúngicos para o tratamento de micoses invasivas. Esses compostos sintéticos, que incluem triazóis e imidazóis, atuam bloqueando a biossíntese de ergosterol, um componente essencial da membrana celular dos fungos. Eles inibem a enzima lanosterol 14- α -demetilase, codificada pelo gene *ERG11*, levando ao acúmulo de um esterol tóxico, o 14- α -meil-3,6-diol, causando estresse na membrana celular fúngica (Puumala *et al.*, 2024).

Os azóis tem apresentado melhor atividade antifúngica *in vivo* e *in vitro* sobre *Trichosporon* spp. quando comparado aos demais antifúngicos (Francisco *et al.*, 2019), sendo que pesquisas descrevem o voriconazol como uma opção terapêutica para infecções por *Trichosporon* spp. (Colombo; Padovan; Chaves, 2011; Lee; Koh, 2020a). Ao analisar os mecanismos de resistência aos antifúngicos em isolados de *T. asahii*, encontraram uma frequência de resistência em 87% dos isolados frente a anfotericina B, 16,1% frente ao fluconazol e 3,2% frente ao voriconazol.

As equinocandinas desenvolvidas no início dos anos 2000, compreendem uma classe importante de antifúngicos. Esses compostos semissintéticos lipopeptídicos inibem a enzima 1,3- β -D-glucano sintase, essencial para a síntese de um componente crucial da parede celular fúngica. Quando essa parede perde a integridade, caracteriza-se um processo de estresse. As equinocandinas como caspofungina, micafungina e anidulafungina são ineficazes contra *Trichosporon*, que apresentam resistência intrínseca amplamente conhecida, exibindo elevados valores de CIM (Almeida *et al.*, 2016; Colombo; Padovan; Chaves, 2011; de Almeida Júnior; Hennequin, 2016; Francisco *et al.*, 2019; Shapiro; Robbins; Cowen, 2011).

O desenvolvimento contínuo de novos antifúngicos é crucial para enfrentar as infecções fúngicas resistentes. As estratégias atuais incluem a criação de novos agentes direcionados a alvos específicos e a triagem de moléculas naturais e sintéticas com atividade antifúngica (Fuentefria *et al.*, 2018). A aprovação do ibrexafungerp em 2021, a primeira nova classe de antifúngicos em duas décadas, representa um avanço significativo (Puumala *et al.*, 2024). No entanto, a resistência antifúngica continua a ser um desafio considerável, com a emergência de resistência, frequentemente, ocorrendo mais rapidamente do que o desenvolvimento de novos compostos. Isso destaca a importância de entender os mecanismos evolutivos que contribuem para essa resistência (Roy *et al.*, 2023).

A inovação no design de fármacos, incluindo o uso de tecnologias genômicas e o design guiado de estruturas, oferece potencial para o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas. Contudo, a evolução constante da resistência e a complexidade dos patógenos fúngicos exigem soluções novas e adaptativas para melhorar o tratamento e prevenir a progressão das infecções fúngicas resistentes (Polvi *et al.*, 2015). Para combater a resistência antifúngica, é necessário um esforço colaborativo entre a academia, clínicos, profissionais de saúde pública e a indústria. A pesquisa não se concentra apenas na descoberta de novos compostos, mas também no desenvolvimento de terapias combinadas que podem incluir antifúngicos e compostos naturais (Fuentefria *et al.*, 2018).

Além disso, a resistência intrínseca a vários fármacos e a falta de identificação inicial da infecção podem resultar em tratamentos inadequados ou tardios. Portanto, é essencial considerar *Trichosporon* spp. em infecções difíceis de tratar, especialmente em pacientes com histórico de transplante e em contextos em que há falha no tratamento com equinocandinas ou anfotericina. A pesquisa contínua é necessária para compreender melhor a epidemiologia, a resistência antifúngica e para aprimorar as estratégias de tratamento, com o objetivo não apenas de reduzir a morbidade e mortalidade associadas a essas infecções (Liao *et al.*, 2015; Mariné *et al.*, 2015; Mehta *et al.*, 2021), mas também de buscar por tratamentos mais eficazes e fármacos cada vez mais seguros (Bentubo; Gompertz, 2014).

1.5. Produtos naturais

O aumento da variedade de patógenos associados com infecções fúngicas não tem encontrado correspondência com o número de agentes antifúngicos disponíveis para tratamento. O desenvolvimento de terapias antifúngicas diminuiu, infelizmente, pois a indústria farmacêutica tem dado menor atenção à essas patologias.

Limitações na eficácia e na tolerância destes agentes em uso, falha na resposta clínica e grande toxicidade tem sido relatadas. Além disso, destaca-se o aumento da resistência destes microrganismos aos fármacos usuais, a qual pode estar associada tanto a processos de evolução natural do microrganismo ou a estados fisiológicos da célula como planctônicos ou sésseis e quanto ao uso indiscriminado destes compostos (Lara *et al.*, 2023).

Este cenário de crescente tolerância aos antifúngicos e desenvolvimento de resistência secundária (adquirida) de amostras clínicas de *Trichosporon spp.*, associado às poucas opções terapêuticas atuais do mercado, tem estimulado a pesquisa de novas substâncias com potencial antifúngico, tais como os produtos de origem natural (Fuentefria *et al.*, 2018; Padovan *et al.*, 2019).

Neste contexto, as plantas são um grande reservatório, ainda com grande potencial de descoberta de compostos naturais bioativos que podem ser de grande interesse na indústria farmacêutica, alimentícia, de cosméticos e da saúde, e por isso, é crescente o interesse dos pesquisadores nos mais diversos aspectos relacionados a esses compostos (Veiga Junior; Pinto; Maciel, 2005). As principais propriedades buscadas pela ciência são: anticâncer, imunoestimuladora, anti-inflamatória, antioxidante, neuroprotetivas e hepatoprotetivas.

A utilização de plantas para a prática medicinal é uma das formas mais antigas de medicina tradicional da humanidade e costuma ter grande aceitação por parte da população. Apesar da grande evolução da medicina atualmente, populações socialmente vulneráveis como indígenas, quilombolas, ribeirinhos, ou indivíduos de baixa renda podem ter dificuldade de acesso ao sistema de saúde para atendimento, fazendo, assim, uso de fitoterápicos devido a tradição e facilidade de obtenção, principalmente em países em desenvolvimento (Veiga Junior; Pinto; Maciel, 2005). O comércio de fitoterápicos e produtos naturais está muito relacionado a mercados e feiras populares, onde há a disponibilidade de produtos sem fiscalização e controle de qualidade, que muitas vezes podem interagir entre si ou com medicamentos da medicina convencional de forma prejudicial. Assim, é essencial que esses produtos e suas combinações sejam avaliados e os efeitos colaterais ou tóxicos disponibilizados para conscientização da população (Shibata *et al.*, 2012).

Considerando a importância das infecções fúngicas e as barreiras envolvidas no desenvolvimento de novos antifúngicos, Bozó *et al.*, (2016) testaram *in vitro* e *in vivo* a combinação de farnesol, um composto natural encontrado em óleos essenciais de diversas plantas, com antifúngicos de forma a avaliar a ação como adjuvante contra células planctônicas e biofilmes. Apesar de resultados anteriores indicarem efeito *in vitro* positivo, a combinação entre o composto e o fluconazol não apresentou efeito adjuvante nem efeito antagonista em

infecções por *Candida* spp. O estudo publicado por Paldrychová *et al.*, (2019) buscou avaliar o efeito do resveratrol em biofilmes de *Trichosporon cutaneum*. Os autores relataram que o composto teve ação antibiofilme tanto para inibição como para erradicação, com efeito similar a anfotericina B, podendo ser utilizado como agente antibiofilme. Yang *et al.*, (2023) analisaram a propriedade antifúngica da alicina, o principal composto ativo com atividade antimicrobiana de amplo espectro encontrado no alho, contra cepas de *T. asahii*, concluindo que o crescimento de células planctônicas e biofilmes é inibido significativamente *in vitro*. Além disso, *in vivo*, a alicina melhorou o tempo de sobrevivência de ratos com tricosporonose e reduziu a carga fúngica nos tecidos.

Considerando a variedade de propriedades farmacêuticas associada a grande aceitação popular, os produtos apícolas são uma alternativa valiosa a ser considerada no estudo de alternativas antifúngicas. Koç *et al.*, (2011) avaliaram cinco produtos apícolas quanto a habilidade de inibir o crescimento de leveduras, indicando a importante ação no controle de cepas resistentes a alguns antifúngicos comerciais comuns na prática clínica. Nesse estudo os produtos apícolas com melhor atividade contra *Candida* spp e *Trichosporon* spp., foram: o mel, como produto com menor habilidade, seguido de geleia real, pólen e a própolis como produto apícola de maior potencial na inibição do crescimento desses fungos.

1.5.1. Própolis

A própolis é um material produzido por abelhas a partir do exsudato de plantas (árvores, flores, folhas e pólen) que se misturam a cera e enzimas glandulares produzidas pelas próprias abelhas, resultando num composto de consistência de resina. A coloração da própolis depende da composição vegetativa do entorno da colmeia, podendo variar do marrom escuro, passando por tons esverdeados ao marrom avermelhado. A matéria bruta da própolis é então composta de resina e bálsamos (50%), cera de abelhas (30%), óleos voláteis (10%), pólen (5%) e impurezas (Sforcin, 2014). Esse composto apresenta propriedades biológicas e farmacológicas conhecidas como imunomoduladora, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiviral, antiparasitária e antifúngica (Almeida; Menezes, 2002; Augusto-Obara *et al.*, 2019; Auricchio *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2006; Jenny; Kus; Szveda, 2024; Kurek-Górecka *et al.*, 2022; Leitão *et al.*, 2004; Salomão *et al.*, 2008).

Em relação a infecções fúngicas, a própolis têm ação efetiva no tratamento de infecções de pele, atuando como agente antimicrobiano natural, mas as propriedades terapêuticas dependem da forma e local de extração e concentração do produto (Cerqueira; Cunha; Almeida-Aguiar, 2022; Passão; Almeida-Aguiar; Cunha, 2023).

Pazin *et al.*, (2019) analisaram o efeito da própolis verde sobre a espécie *Pythium ophanidermatum*, concluindo que a própolis é adequada para o controle desse fitopatógeno, devido ao seu efeito inibitório sobre a espécie. Os autores também investigaram qual o composto responsável pela ação fungicida, encontrando que o Artepilin C (3,5-diprenyl-p-coumaric acid), é o principal composto bioativo presente na própolis verde brasileira com ação sobre os fungos. A ação desse composto também foi observada por outros autores (de Sá Assis *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020). Pazin *et al.* (2019), concluíram que além da composição química, os métodos de extração da própolis também podem interferir nos ensaios antimicrobianos.

Ao analisar a composição química e antimicrobiana de própolis produzidas em várias regiões da Europa, Hegazi *et al.* (2000) descobriram que a própolis austríaca se destacou como a mais eficaz contra *Candida albicans*, apresentando uma composição química dominada por ácido trans-p-cumárico e pinocembrina. Nos extratos de própolis brasileiros, os compostos mais comuns são fenólicos, especialmente ácidos hidroxicinâmicos como o p-cumárico e os cafeoilquínicos. O conhecimento desses princípios ativos é fundamental para a padronização dos produtos. Salomão *et al.*, (2008) investigaram a composição química e a atividade antimicrobiana de diferentes tipos de própolis brasileiras, constatando que a atividade antifúngica é semelhante em todas as variedades analisadas. Auricchio *et al.* (2006) estudaram própolis disponíveis para comercialização e, após seguir as diluições indicadas nos rótulos, não observaram atividade antimicrobiana, sublinhando a importância da padronização na obtenção de extratos para garantir suas propriedades eficazes.

A toxicidade da própolis foi estudada por diversos autores (Burdock, 1998; da Silva *et al.*, 2015; De Luca *et al.*, 2017; Farida *et al.*, 2022; Islam *et al.*, 2024; Queiroga *et al.*, 2023a; Silva *et al.*, 2022; Tanugur Samanci *et al.*, 2022), e tem sido amplamente estudada em modelos animais e culturas celulares, revelando uma gama de resultados que evidenciam tanto a segurança quanto as precauções necessárias para seu uso. Em geral, a toxicidade aguda da própolis parece ser baixa, como demonstrado por estudos recentes (De Luca *et al.*, 2017; Farida *et al.*, 2022; Islam *et al.*, 2024; Kischkel *et al.*, 2020). Farida *et al.*, 2022, obtiveram uma DL50 $\geq 5\text{g/kg}$, sem observar sintomas de toxicidade ou anormalidades em ratos. Estes resultados são corroborados por estudos que investigaram a toxicidade da própolis vermelha brasileira em modelo animal invertebrado (*Caenorhabditis elegans*), indicando que a substância é atóxica em concentrações abaixo de 750 $\mu\text{g/mL}$.

Entretanto, alguns estudos alertam para os efeitos adversos do uso excessivo de própolis. Segundo Castaldo e Capasso (2002), doses superiores a 15 g/dia podem causar reações alérgicas

e irritação de pele ou mucosas. Isso sugere que, apesar da baixa toxicidade em concentrações normais, a segurança da própolis pode ser comprometida em doses elevadas. da Silva *et al.*, (2015), encontraram efeitos tóxicos em machos de modelos animais quando administrados com doses de 200 mg/kg do extrato hidroetanólico de própolis vermelha, sugerindo possíveis atividades estrogênicas associadas às isoflavonas presentes no extrato. Portanto, cautela é recomendada, especialmente em pacientes com condições de pele como eczema e urticária. (Castaldo; Capasso, 2002). Esses dados sugerem que, enquanto a própolis geralmente apresenta baixa toxicidade, a avaliação cuidadosa é necessária para garantir a segurança em diferentes contextos de uso e tipos celulares.

Com esse potencial observado na literatura, estudos *in vitro* realizados com extratos quimicamente caracterizados se tornam essenciais na obtenção de dados relevantes sobre a ação desse produto em relação a alguns patógenos, principalmente fúngicos.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação da própolis sobre células planctônicas e sésseis (biofilme).

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima dos antifúngicos comerciais fluconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B frente a células planctônicas de isolados clínicos de *T. asahii*.
- Determinar a concentração inibitória mínima do extrato de própolis verde frente a células planctônicas de isolados clínicos de *T. asahii*.
- Determinar a concentração fungicida do extrato de própolis verde frente a células planctônicas de isolados clínicos de *T. asahii*.
- Avaliar a interação entre os extratos com os melhores resultados de atividade antifúngica *in vitro* com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol.
- Avaliar a capacidade antibiofilme (inibição e remoção) do extrato de própolis verde frente aos isolados de *T. asahii*;
- Avaliar por meio de microscopia eletrônica, a ultraestrutura de biofilmes tratados com própolis;
- Avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações do extrato de própolis verde sobre células animais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Instituição sede

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Micologia e Parasitologia do Núcleo de Ciências Biomédicas do Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais de Bauru – CLR II- Bauru, SP.

3.2. Isolados de *Trichosporon asahii*

Foram estudadas dez cepas clínicas de *T. asahii* isoladas de urina, abscesso de ferida, pele inguinal, unha e mucosa oral. Esses isolados compõem a micoteca do Laboratório de Micologia e Parasitologia do Núcleo de Ciências Biomédicas do Instituto Adolfo Lutz, CLR II Bauru-SP. Os isolados estão mantidos criopreservados a -80°C e foram identificados fenotípica e genotipicamente em estudo anterior (Lara *et al.*, 2023) por meio do sequenciamento da região IGS e por espectrometria de massa MALDI-TOF. Como controles, foram utilizadas as cepas de referência: *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 6258) e *Trichosporon asahii* (CBS 2479).

Quadro 1 - Origem e sítio de isolamento dos dez isolados clínicos de *Trichosporon asahii*.

Isolado	Origem	Sítio de isolamento
1	Clínica humana	Urina
2	Clínica humana	Urina
3	Clínica humana	Urina
4	Clínica humana	Urina
5	Clínica humana	Abscesso de ferida cirúrgica
6	Clínica humana	Urina
7	Clínica humana	Pele inguinal
8	Clínica humana	Pela inguinal
9	Clínica animal	Mucosa oral
10	Clínica humana	Unha

3.3. Extrato de própolis verde brasileira

O extrato alcoólico de própolis verde brasileira (EPP-AF®, Lote 200300223, Certificado de Análise - Anexo 1) utilizado no presente trabalho, foi produzido e fornecido pela empresa Apis Flora Indl. Coml (Ribeirão Preto, São Paulo). As atividades biológicas e de segurança do extrato foram estudadas em modelos experimentais. A composição química foi considerada reprodutível e o processo de produção e extração foi padronizado (Berretta *et al.*, 2023; Bobiş *et al.*, 2023; Cusinato *et al.*, 2019). A padronização é um processo importante para garantir a composição química qualitativa e quantitativamente. A extração da própolis foi realizada pelos

técnicos da empresa, utilizando etanol e água purificada e envolveu etapas de maceração e percolação da própolis, seguido de evaporação do solvente em condições controladas de temperatura e pressão, e o extrato resultante foi solubilizado em propilenoglicol. A caracterização química foi feita por meio de HPLC/DAD. A solução de própolis, que foi utilizada como solução de partida deste estudo, foi preparada na concentração de 11,05%, (m/v), ou 110.500 mg/L. Para a realização dos testes, foram produzidas diversas diluições a partir da solução estoque a 110.500 mg/L utilizando soluções hidroalcólicas a 65% como solvente.

3.3.1. Preparo de solução hidroalcólica para diluição do extrato de própolis

Foi utilizado álcool etílico 95% (Êxodo Científica) refrigerado para a produção da solução hidroalcólica a 65% (Berretta *et al.*, 2023). Utilizando uma proveta de 1L, foram adicionados 0,684L de álcool etílico a 95%. A proveta foi completada com água destilada estéril e um alcoômetro de Gay-Lussac (Incoterm) foi inserido na solução. A leitura do menisco foi realizada visualmente. Em seguida, utilizando um termômetro, foi realizada a medição da temperatura da solução. O teor alcoólico foi calculado de acordo com a tabela de correção do alcoômetro para a temperatura da solução.

3.4. Teste de sensibilidade aos antifúngicos – células planctônicas

3.4.1. Preparo de soluções de antifúngicos comerciais

Foram utilizados os antifúngicos anfotericina B (Chemgold), caspofungina (Sigma), fluconazol (Sigma) e voriconazol (Sigma), obtidos comercialmente. Os antifúngicos foram preparados de acordo com as padronizações preconizadas pelo documento EDef 7.3 do EUCAST (Guinea *et al.*, 2023). O solvente utilizado foi dimetilsulfóxido (DMSO) para todos os antifúngicos testados. Para anfotericina B, caspofungina e voriconazol, as concentrações preparadas foram de 0,03-16 mg/L. Para o fluconazol, as soluções preparadas tinham concentrações de 0,25-128 mg/L. Os antifúngicos foram pesados utilizando balança analítica (Shimadzu AUY 220) em recipiente estéril e diluídos em DMSO filtrado em membrana milipore 0,22 µm. As soluções de cada antifúngico foram, então, misturadas ao meio RPMI suplementado com 2% de glicose. Para cada antifúngico, 100 µL de cada solução com concentração distinta, foram colocados em poços de placas de poliestireno de 96 poços. Após, as placas foram congeladas em freezer – 80 °C até o momento da realização do teste. As colunas 1 e 12 foram deixadas para serem preenchidas no momento da realização como controles de crescimento e de esterilidade do meio.

3.4.2. Preparo das diluições do extrato de própolis

Foram realizadas diluições do extrato de própolis a partir da solução de partida a 11,05% (m/v) ou 110.500 mg/L, para a produção de soluções de concentrações de 215 mg/L até 110.500 mg/L utilizando como solvente a solução hidroalcolica 65% como descrito no tópico 3.3.1. As diluições do extrato de própolis foram realizadas com base no documento do EUCAST E.Def 7.4 (Guinea *et al.*, 2023) para teste de suscetibilidade a antifúngicos, utilizando o extrato de própolis como composto antifúngico e a solução hidroalcolica a 65% como solvente. O meio de cultura utilizado para produzir as soluções de 2,15 a 1.105 mg/L foi o meio RPMI suplementado com 2% de glicose.

3.4.3. Preparo do inóculo

As leveduras foram semeadas 48 horas antes dos testes, em placas de Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) a 36°C, utilizando a semeadura por esgotamento de forma a viabilizar o crescimento isolado das colônias. Um inóculo foi preparado utilizando cinco colônias em 4 mL de água destilada estéril. A suspensão foi agitada a 2.000 rpm por 15 segundos e em seguida a turbidez foi corrigida para corresponder a escala de 0,5 de MacFarland ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL). A suspensão foi utilizada em até 30 minutos após o preparo para manter a viabilidade das células.

3.4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – antifúngicos comerciais

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada por meio de micro diluição em caldo, de acordo com o documento EUCAST EDef 7.4 (J. Guinea *et al.*, 2023). No momento da realização do teste, uma placa já preparada com as concentrações do teste foi descongelada. Após descongelamento, 100 µL de meio RPMI + 2% de glicose foram adicionados às colunas 1 e 12 da placa de poliestireno como controles de crescimento e esterilidade. O preparo do inóculo foi realizado de acordo com o descrito no tópico 3.4.3. Em seguida, foi realizada uma suspensão de trabalho de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL a partir de uma diluição 1:10 do inóculo preparado. Após, foram inoculados 100 µL da suspensão de trabalho em cada poço da placa, incluindo os controles de crescimento. As cepas de referência *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foram incluídas em cada placa testada. As placas foram incubadas a 35°C por 48h, e a leitura realizada em espectrofotômetro a 530 nm. As placas foram validadas quando houve crescimento com absorbância maior que 0,200 nos poços de controle de crescimento, e quando as cepas referência apresentaram valores de CIMs como especificado no documento EUCAST EDef 7.4 (J. Guinea *et al.*, 2023). A interpretação

dos valores considera: para anfotericina B, a $CIM_{AMB} \geq 90\%$ de crescimento em relação ao controle de crescimento (sem antifúngico) e para caspofungina, fluconazol e voriconazol a $CIM_{CASPO/FLUCO/VORICO} \geq 50\%$ de crescimento em relação ao controle de crescimento (sem antifúngico).

3.4.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – extrato de própolis verde

O teste de suscetibilidade para o extrato de própolis verde alcoólico foi realizado por meio da técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento EUCAST E. Def 7.4 (Guinea *et al.*, 2023) com algumas modificações. Para a realização do teste, placas de poliestireno de 96 poços foram preparadas contendo nas colunas de 2 a 11 as diferentes concentrações de própolis a serem testadas. As concentrações utilizadas no teste foram: 2,15 mg/L, 4,31 mg/L, 8,63 mg/L, 17,26 mg/L, 34,53 mg/L, 69,06 mg/L, 138,125 mg/L, 276,25 mg/L, 552,5 mg/L e 1.105 mg/L. No momento da realização do teste, um inóculo padronizado foi preparado de acordo com o tópico 3.4.3, assim como uma suspensão de trabalho que corresponde a $1-5 \times 10^5$ UFC/mL. Cada poço da placa foi preenchido com 100 μ L da suspensão de trabalho, correspondente para cada amostra a ser testada. A coluna 1 foi utilizada como controle de esterilidade do meio, e ao invés da solução padronizada que corresponde ao inóculo, foram colocados 100 μ L de água destilada estéril, do mesmo lote utilizado no preparo do inóculo. Para a coluna 12, que representa o controle de crescimento, não houve adição da solução com antifúngico, apenas meio RPMI+2% de glicose e inóculo. Nesse esquema, cada linha da placa foi utilizada para o teste de uma amostra, com dez diferentes concentrações do extrato. Uma linha da placa foi utilizada como controle de cor da solução de própolis, sendo preenchida com 100 μ L de água destilada estéril adicionada de 100 μ L de solução de própolis nas diferentes concentrações. Os valores de absorbância obtidos nesses poços foram subtraídos do valor final da leitura, para permitir calcular o a absorbância apenas do crescimento fúngico. A interpretação foi feita considerando $CIM_{própolis} \geq 100\%$ de inibição em relação ao controle de crescimento (sem própolis).

3.4.6. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) – antifúngicos comerciais e extrato de própolis

Após a leitura das CIMs, uma alíquota de 10 μ L de cada poço, incluindo controles de crescimento e esterilidade, foram semeados em placas de petri de Ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol e incubados a 35°C por 24-48 horas. A Concentração Fungicida Mínima

(CFM) foi determinada pela menor concentração onde não houve o crescimento fúngico, considerando ausência de crescimento até cinco colônias fúngicas.

3.5. Avaliação da atividade combinada entre extrato de própolis e os antifúngicos anfotericina B e fluconazol

Cinco amostras representativas foram selecionadas para avaliar a atividade sinérgica entre diferentes concentrações do extrato de própolis com diferentes concentrações dos antifúngicos anfotericina B e fluconazol. Esses antifúngicos foram selecionados dentre os quatro testados por apresentarem os maiores valores de CIM, sem considerar a caspofungina, que é caracterizada pela resistência intrínseca. A combinação dos produtos foi realizada por meio do método do “Tabuleiro de Damas” tradução de (Cuenca-Estrella, 2004), por meio de um sistema de microdiluição com diluições 2x exponenciais. Uma faixa intervalar de sete concentrações do extrato foi utilizada em combinação com sete concentrações de cada um dos antifúngicos clínicos. As concentrações foram escolhidas a partir resultados obtidos nos ensaios de suscetibilidade *in vitro*, a partir da determinação da CIM.

O preparo das placas para o teste, foi realizado adicionando 50 µL de cada uma das diluições do extrato de própolis em placas de poliestireno de 96 poços, em posição horizontal (linhas A ao H). Após, foram adicionados 50 µL de cada uma das diluições de antifúngico (anfotericina B ou fluconazol) em posição vertical (colunas 3 a 9). A coluna 1 foi representada pelo controle de esterilidade do meio e o controle de turbidez da própolis (controle negativo) e no momento do teste, era preenchida com 100 µL de água destilada estéril do mesmo lote em que foi preparado o inóculo. A coluna 11 representou o controle do solvente utilizado na diluição dos extratos (solução hidroalcolica, sem própolis). A coluna 12 foi utilizada como controle de crescimento e para a determinação da CIM do antifúngico, e a linha A para a determinação da CIM do extrato de própolis. Dessa forma, cada placa continha diferentes combinações entre a própolis e os antifúngicos clínicos a serem testados em conjunto. As placas preparadas poderiam ser utilizadas imediatamente ou vedadas com parafilme e armazenadas a temperatura -80 °C para uso posterior.

Para a realização do teste foram adicionados aos poços, contendo as diferentes combinações, 100 µL de um inóculo padronizado na escala 0,5 de MacFarland, preparado como descrito no tópico 3.4.3. O inóculo também foi adicionado aos poços controles do extrato de própolis, dos antifúngicos e da solução hidroalcolica. Após, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 530nm, como definido pelo EUCAST.

O resultado obtido de uma combinação de diferentes concentrações entre dois produtos foi expresso na forma de um ICIF (Índice de Concentração Inibitória Fracionária). O índice foi calculado a partir da soma das Combinações Inibitória Fracionária (CIF) de cada produto. A determinação do ICIF foi realizada da seguinte forma:

$$ICIF = \frac{(CIM \text{ própolis em combinação})}{CIM \text{ própolis sozinho}} + \frac{(CIM \text{ antifúngico em combinação})}{CIM \text{ antifúngico sozinho}}$$

Valores de ICIF $\leq 0,5$ indicaram interação sinérgica; valores $>0,5$ até $4,0$ ausência de interação e $>4,0$ indicaram antagonismo (Cuenca-Estrella, 2004).

3.6. Ensaio de formação de biofilme

3.6.1. Erradicação de biofilme por extrato de própolis verde

A técnica de formação de biofilme foi realizada de acordo com Ramage *et al.* (2001) com modificações sugeridas por Melo *et al.* (2011) e Lara *et al.* (2023). O meio utilizado na realização do teste foi RPMI acrescido de 2% de glicose, tamponado com MOPS e pH 7,0. Foram adicionados 100 μ L de meio RPMI + 2% glicose em todos os poços a serem utilizados de uma placa de poliestireno de 96 poços. Além dos isolados de *Trichosporon*, na placa também foram testados a cepa controle *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e controle negativo (meio RPMI e água destilada estéril do mesmo lote de preparo do inóculo).

As leveduras foram semeadas em placas de Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas por 48 horas a 36°C. Após, um inóculo foi preparado utilizando cinco colônias em 4 mL de água destilada estéril. A suspensão foi agitada a 2.000 rpm por 15 segundos e em seguida a turbidez foi corrigida para corresponder a escala de 0,5 de MacFarland ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL). A suspensão foi utilizada em até 30 minutos após o preparo para garantia da manutenção da viabilidade celular. Em triplicata, foram adicionados 100 μ L do inóculo padronizado de cada amostra, aos poços da placa de poliestireno, somando aos 100 μ L de RPMI. As placas foram incubadas a 35°C por 6 horas para o período de adesão (Lara *et al.*, 2023). Após esse período, o meio de cultura foi retirado cuidadosamente, e os poços lavados duas vezes com solução tampão de fosfato (Phosphate Buffer Solution – PBS) acrescido de Tween 20%. Após, 200 μ L do meio RPMI foram adicionados aos poços e as placas re-incubadas por 24 horas para o período de desenvolvimento dos biofilmes.

Após o período de desenvolvimento do biofilme, o meio de cultura foi retirado cuidadosamente e os poços foram lavados duas vezes com PBS + Tween 20%. As soluções de

própolis em concentrações subinibitórias a 75% da CIM, 50% da CIM, 25% da CIM e 20% da CIM foram adicionadas aos poços. A coluna 1 das placas foi utilizada como controle sem tratamento, e foram adicionados 200 µL de RPMI livre de própolis. As placas foram novamente incubadas a 35°C por mais 48 horas. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado cuidadosamente e os poços lavados 2x com PBS+Tween 20%. Em seguida, foram realizados dois ensaios, um para avaliar a biomassa e outro para avaliação da atividade metabólica dos biofilmes formados.

3.6.1.1. Quantificação da biomassa

A quantificação da biomassa de biofilme foi avaliada utilizando cristal violeta a 0,4%. Após a lavagem da placa com PBS + Tween 20%, foram adicionados 100 µL de metanol em cada poço para desidratação dos biofilmes, durante cinco minutos. O metanol foi retirado e a placa foi colocada para secar em estufa a 35°C por 20 minutos. Após a secagem das placas, 200 µL de cristal violeta a 0,4% foram adicionados aos poços, e deixados durante 20 minutos. Após esse período, o corante foi retirado de cada poço e lavado 2x com 200 µL de água destilada estéril. Após, foram adicionados aos poços 200 µL de ácido acético a 33%. Foram, então, transferidos 100 µL do sobrenadante a uma nova placa de poliestireno de fundo chato. A placa foi lida em espectrofotômetro a 595 nm. O crescimento máximo foi considerado na coluna A, onde não houve adição de extrato de própolis. A maior absorbância indicou a maior quantidade de células (biomassa) formando os biofilmes. A classificação quanto a produção de biofilmes, para os isolados sem tratamento, foi realizada de acordo com Montoya *et al.* (2018) onde $A_{595} \leq 0,531$ indicou fraco produtor, $A_{595} = 0,532 - 0,763$ intermediário produtor, $A_{595} = 0,764 - 0,999$ forte produtor e $A_{595} \geq 1,0$ fortemente produtor de biofilmes.

3.6.1.2. Atividade metabólica

A avaliação da atividade metabólica do biofilme, foi realizada por meio do ensaio de redução do XTT [2,3-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide)] conforme método descrito por Ramage *et al.* (2001), com algumas modificações. Após a lavagem dos poços com PBS + Tween 20%, foram adicionados 200 µL de PBS em cada poço. Uma solução de XTT e menadiona a 0,4 mM foi previamente preparada e uma alíquota de 12 µL da solução XTT+menadiona foi adicionada aos poços. A placa foi incubada a 35°C em abrigo da luz, por 5 horas. Após esse período, 100 µL de cada poço foram transferidos para uma nova placa de poliestireno de fundo chato e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm. A mudança de coloração para o laranja é proporcional ao número de células vivas, assim, quanto maior a absorbância, maior o número de células viáveis.

metabolicamente ativas formando os biofilmes. A atividade metabólica, para os isolados sem tratamento, foi classificada de acordo com Miranda-Cadena *et al.* (2021) onde $A \geq 0,500$ indica alta atividade metabólica, $A=0,300$ e $0,499$ indica moderada atividade metabólica e $A \leq 0,300$ indica baixa atividade metabólica.

3.6.2. Inibição da formação de biofilme por extrato de própolis verde

Foram adicionados aos poços da placa de poliestireno 100 μL das soluções de tratamento de própolis em diferentes concentrações subinibitórias (75%, 50%, 25% e 20% da CIM) preparadas em meio RPMI + 2% de glicose. Um inóculo padronizado foi preparado de acordo com o item 3.4.3, e 100 μL foram adicionados aos poços com soluções de tratamento, em triplicata. As placas foram incubadas a 35°C por 6 horas para o período de adesão. Após esse período, o meio de cultura foi retirado cuidadosamente e os poços lavados 2x com solução tampão de fosfato (*Phosphate Buffer Solution* – PBS) acrescido de Tween 20%. Após, 200 μL do meio RPMI foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas por 24 horas a 35°C para o período de desenvolvimento dos biofilmes.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado cuidadosamente e os poços foram lavados 2x com PBS + Tween 20%. Foram adicionados mais 200 μL de meio RPMI +2% de glicose e as placas foram novamente incubadas a 35°C por mais 48 horas. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado cuidadosamente e os poços lavados 2x com PBS+Tween 20%. O estudo foi realizado em triplicata. Em seguida, foram realizados os ensaios para avaliação da biomassa e da atividade metabólica dos biofilmes formados, de acordo com os itens 3.5.1.1 e 3.5.1.2, respectivamente.

3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de biofilmes tratados e não tratados com própolis

Os biofilmes formados por *T. asahii* foram analisados por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de acordo com Cordeiro *et al.* (2015) e Di Bonaventura *et al.* (2006). Foram selecionadas duas cepas dentre as maiores produtoras de biofilmes e os biofilmes foram produzidos como descrito no tópico 3.6.1 em placas de poliestireno de 12 poços com uma lamínula circular ao fundo. Para a placa utilizada, o volume final nos poços foi de 1mL, sendo 500 μL de meio RPMI e 500 μL de inóculo padronizado na escala 0,5 de MacFarland.

Depois de desenvolvidos, os biofilmes foram tratados com diferentes concentrações da própolis, sendo duas concentrações acima e duas concentrações abaixo (25% da CIM, 50% da CIM, CIM, 200% da CIM e 400% da CIM), além da amostra sem tratamento para comparação.

Ao final do processo de formação de biofilme as placas foram lavadas com PBS + Tween 20% e em seguida 1mL de solução de fixador glutaraldeído a 2,5% (em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3) foram adicionados aos poços e mantidos por 24 horas em temperatura ambiente até serem levados ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, onde foram processadas e analisadas.

O processamento das amostras foi realizado pelo técnico responsável pela MEV no CME e consistiu em processos de lavagem e desidratação em série das amostras, depois secagem pelo ponto crítico. As lamínulas contendo os biofilmes fixados e secos foram posicionadas nos *stubs* para metalização com ouro. A análise das estruturas foi realizada no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 200 (FEI Company) em diferentes magnificações (de 200 a 16.000x) e as fotomicrografias foram registradas utilizando o software próprio do equipamento.

3.8. Citotoxicidade

Para analisar a possível ação tóxica do extrato de própolis verde nas concentrações testadas nesse trabalho sobre células animais, foi realizado o teste de citotoxicidade utilizando fibroblastos murinos embrionários da linhagem NIH/3T3 (CRL-1658, ATCC) (Dos Santos *et al.*, 2024). O ensaio foi realizado em parceria com o laboratório de Biologia Celular do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL – Bauru/SP). O protocolo do teste foi realizado de acordo com os padrões estabelecidos na ISO 10993-5/2009 (Biological evaluation of medical devices, Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity), utilizando o ensaio colorimétrico de atividade metabólica MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich, EUA), indicando efeito citotóxico quando a viabilidade celular é menor que 70%.

Os ensaios foram realizados em placas de poliestireno de 96 poços. Para cada poço, foram semeadas a densidade de 15.000 células ($1,5 \times 10^4$ céls/poço). O meio de cultura utilizado foi o Meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM – High Glucose Modificado, Nova Biotecnologia). As células mantidas criopreservadas em nitrogênio líquido passaram pelos processos de descongelamento e adesão em garrafas de cultivo celular por 48 horas em meio DMEM completo, DMEM + 10% Soro Fetal Bovino (SFB) + solução de antibióticos estreptomicina e penicilina (P/S), em estufa 37°C a 5% de CO₂. As células, depois de aderidas nas garrafas foram lavadas com meio completo, tripsinizadas, centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm a 20°C e ressuspensas em 4mL de meio completo. Uma alíquota de 20 µL da suspensão celular foi corada em 180 µL azul de tripan para contagem celular em Câmara de Neubauer. O volume da suspensão foi calculado de forma a distribuir 15.000 células por poço em uma placa de poliestireno de 96 poços. A placa foi incubada a 37°C a 5% de CO₂ por 24

horas. Após, o tratamento com seis concentrações de própolis foi aplicado aos poços, em triplicata. Foram incluídos no teste os controles positivo (células em meio DMEM completo), negativo (células mortas por aplicação de DMSO em meio DMEM completo) e branco (meio DMEM completo, sem células).

As soluções de própolis foram diluídas inicialmente na solução hidroalcolica a 65% assim como descrito no tópico 3.4.2. O meio de cultura utilizado para o preparo da solução de tratamento foi o meio DMEM restrito (DMEM, 1% SFB e 1% solução P/S). As concentrações testadas foram: 69,06 mg/L, 138,125 mg/L, 276,25 mg/L, 552,5 mg/L, 1105 mg/L e 2210 mg/L. Após aplicado o tratamento, as placas foram incubadas a 37°C a 5% de CO₂ por 48 horas.

Para o teste de viabilidade celular utilizando MTT, foi preparada uma solução estoque a 5mg/mL de MTT em PBS estéril. No dia do teste, essa solução foi diluída em 9 mL de DMEM, produzindo uma solução de trabalho de concentração final 0,5 mg/mL de MTT. Foram adicionados 100 µL de DMSO aos poços do “branco” e após 1 minuto o DMSO foi retirado. Após, foram adicionados 50 µL da solução de trabalho de MTT a 0,5 mg/mL em todos os poços a serem testados. A placa foi incubada a 37°C a 5% de CO₂ por 2 horas. Após, o sobrenadante foi removido e 100 µL de DMSO foi adicionado em todos os poços e a placa foi reincubada a 37°C a 5% de CO₂ por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

Para quantificar a viabilidade celular, a seguinte fórmula foi aplicada:

$$V\% = \frac{(absorbância da amostra - absorbância branco) * 100}{(absorbância controle negativo - absorbância branco)}$$

Um decréscimo no número de células vivas é indicado pelo decréscimo de atividade metabólica. Assim, quanto menor o valor de porcentagem de viabilidade células (V%), maior o potencial citotóxico do produto. Se a V% < 70%, há potencial citotóxico (ISO 10993-5, 2009).

3.9. Análise Estatística

A análise de normalidade dos dados foi realizada por meio do Teste de Shapiro-Wilk. O Teste de Friedman seguido pelo teste post-hoc de Dunn foram aplicados para dados não paramétricos. Os dados paramétricos foram analisados pelo teste de variância ANOVA one-way, com teste post-hoc de Dunnet. O valor de p<0,05 foi considerado significativo para todas as avaliações. As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* GraphPad Prism® 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

Os resultados do teste de suscetibilidade aos antifúngicos comerciais e a própolis estão reunidos na Tabela 1. Os maiores valores de CIM e CFM entre os antifúngicos comerciais foram obtidos para caspofungina e fluconazol, seguidos de anfotericina B, enquanto os menores valores foram observados para voriconazol. Os valores de CIM e CFM para própolis foram uniformes entre as 10 cepas testadas, variando entre as três maiores concentrações testadas.

Para anfotericina B, os valores de CIM variaram entre 0,5 e 4,0 mg/L e os valores de CFM de 1,0-4,0 mg/L. Para caspofungina, os valores de CIM foram de 16 ou >16 mg/L, e todos os valores de CFM foram >16mg/L. Para o fluconazol, os valores de CIM foram de 1,0 a 4,0mg/L e CFM de 4,0 a 8,0 mg/L. Para voriconazol, os valores de CIM foram de 0,06 a 0,25 mg/L e CFM de 0,5 a 2,0 mg/L. Para o extrato alcoólico de própolis, os valores de CIM e CFM foram de 276,25 a 1.105 mg/L e 276,25 a <1.105 mg/L, respectivamente.

Tabela 1- Valores de CIM (mg/L) e CFM (mg/L) dos 10 isolados de *T. asahii* estudados, frente aos antifúngicos comerciais anfotericina B, caspofungina, fluconazol, voriconazol e ao extrato alcoólico da própolis.

Isolados	Anfotericina B		Caspofungina		Fluconazol		Voriconazol		Própolis	
	CIM (mg/L)	CFM (mg/L)	CIM (mg/L)	CFM (mg/L)	CIM (mg/L)	CFM (mg/L)	CIM (mg/L)	CFM (mg/L)	CIM (mg/L)	CFM (mg/L)
1	4,0	4,0	>16,0	>16,0	1,0	4,0	0,25	1,0	552,50	552,5
2	2,0	2,0	>16,0	>16,0	2,0	8,0	0,125	0,5	276,25	1105
3	2,0	2,0	>16,0	>16,0	1,0	4,0	0,06	0,5	276,25	276,25
4	4,0	4,0	>16,0	>16,0	2,0	8,0	0,125	1,0	276,25	552,5
5	2,0	2,0	>16,0	>16,0	2,0	8,0	0,5	2,0	276,25	276,25
6	2,0	4,0	16,0	>16,0	2,0	8,0	0,5	2,0	552,50	552,5
7	2,0	4,0	>16,0	>16,0	4,0	8,0	0,125	1,0	276,25	1105
8	0,5	1,0	>16,0	>16,0	1,0	4,0	0,25	1,0	276,25	1105
9	1,0	2,0	>16,0	>16,0	1,0	4,0	0,25	0,5	552,50	552,5
10	1,0	4,0	16,0	>16,0	1,0	4,0	0,06	0,5	276,25	552,5

* Valores testados para anfotericina B, caspofungina e voriconazol = 0,03-16 mg/L Para fluconazol: 0,25-128mg/L e para própolis 2,15-1.105 mg/L.

** Interpretações de CIM: CIM_{AMB} ≥ 90% de inibição do crescimento; CIM_{CASPO, FLUCO} e VORICO ≥ 50% de inibição do crescimento e CIM_{PRÓPOLIS} ≥ 100% inibição do crescimento

No ensaio de combinação da própolis com os antifúngicos clínicos, as concentrações utilizadas estão expressas na Tabela 2.

Tabela 2- Concentrações do extrato de própolis, anfotericina B e fluconazol utilizados nos ensaios de combinação de produtos.

Extrato de própolis	Anfotericina B	Fluconazol
P1 = 1.105 mg/L	A1 = 16 mg/L	F1 = 64 mg/L
P2 = 552,5 mg/L	A2 = 8 mg/L	F2 = 32 mg/L
P3 = 276,25 mg/L	A3 = 4 mg/L	F3 = 16 mg/L
P4 = 138,125 mg/L	A4 = 2 mg/L	F4 = 8 mg/L
P5 = 69,06 mg/L	A5 = 1 mg/L	F5 = 4 mg/L
P6 = 34,53 mg/L	A6 = 0,5 mg/L	F6 = 2 mg/L
P7 = 17,26mg/L	A7 = 0,25 mg/L	F7 = 1 mg/L

Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Os resultados da combinação das concentrações obtidas para o extrato de própolis com as concentrações dos antifúngicos anfotericina B e fluconazol estão representados na Tabela 3. Para ambos antifúngicos, a interação observada foi do tipo antagonista em 100% dos isolados (5/5) para anfotericina B e 80% (4/5) para o fluconazol.

Tabela 3 - Suscetibilidade de células planctônicas de cinco isolados contra os antifúngicos anfotericina B e fluconazol sozinhos e em combinação com o extrato de própolis.

Combinação entre própolis e anfotericina B					
Isolados	Compostos sozinhos		Compostos em combinação		ICIF
	CIM _{AMB} (mg/L)	CIM _{próp} (mg/L)	CIM _{comb AMB} (mg/L)	CIM _{comb próp} (mg/L)	
1	0,25	552,5	8	1105	34
3	0,25	276,25	8	69,06	32,25
4	0,25	276,25	4	17,26	16,06
5	0,25	276,25	16	17,26	64,06
7	0,25	552,5	16	17,26	64,03

Combinação entre própolis e fluconazol					
Isolados	Compostos sozinhos		Compostos em combinação		ICIF
	CIM _{FLUCO} (mg/L)	CIM _{próp} (mg/L)	CIM _{comb FLUCO} (mg/L)	CIM _{comb próp} (mg/L)	
1	8	276,25	64	17,26	8,06
3	8	276,25	32	1105	8
4	8	1105	32	1105	5
5	8	1105	1	1105	1,125
7	2	1105	16	69,06	8,06

* ICIF = Índice de Concentração Inibitória Fracionária, onde: $ICIF \leq 0,5$ indica sinergismo; $0,5 < ICIF < 4,0$ indica ausência de interação; e $ICIF \geq 4,0$ indica antagonismo. Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Par anfotericina B houve aumento da CIM quando combinado com o extrato, e mesmo que tenha havido redução da CIM para o extrato de própolis, a interação é considerada negativa, pois houve piora do efeito em relação a utilização dos compostos separados.

Em relação a formação de biofilmes sem tratamento com a própolis, observou-se que todas as cepas foram capazes de produzir biofilmes, variando entre fraco (7/10 – 70%), intermediário (1/10 – 10%) e fortemente (2/10 - 20%) produtores de acordo com a produção de biomassa observada por meio da quantificação com cristal violeta. A atividade metabólica das cepas foi classificada entre baixa (9/10 – 90%) e moderada (1/10 – 10%), determinada por meio da quantificação de atividade metabólica pelo ensaio de redução do XTT. Os valores de absorbância a 595nm e 495nm para quantificação de biomassa e atividade metabólica, respectivamente, assim como a classificação estão reunidas na Tabela 4.

Tabela 4 - Classificação dos isolados de *T. asahii* quanto a quantificação da produção de biomassa (Cristal Violeta) e atividade metabólica (XTT).

Isolados	Biomassa		Atividade Metabólica	
	Absorbância (595 nm)	Classificação Montoya <i>et al.</i> (2018)	Absorbância (495nm)	Classificação Miranda-Cadena <i>et al.</i> (2021)
1	0,407	Fraco produtor	0,269	Baixa atividade metabólica
2	0,410	Fraco produtor	0,080	Baixa atividade metabólica
3	2,655	Fortemente produtor	0,156	Baixa atividade metabólica
4	0,527	Fraco produtor	0,185	Baixa atividade metabólica
5	1,064	Fortemente produtor	0,220	Baixa atividade metabólica
6	0,659	Intermediário produtor	0,263	Baixa atividade metabólica
7	0,207	Fraco produtor	0,053	Baixa atividade metabólica
8	0,197	Fraco produtor	0,302	Moderada atividade metabólica
9	0,235	Fraco produtor	0,227	Baixa atividade metabólica
10	0,218	Fraco produtor	0,297	Baixa atividade metabólica

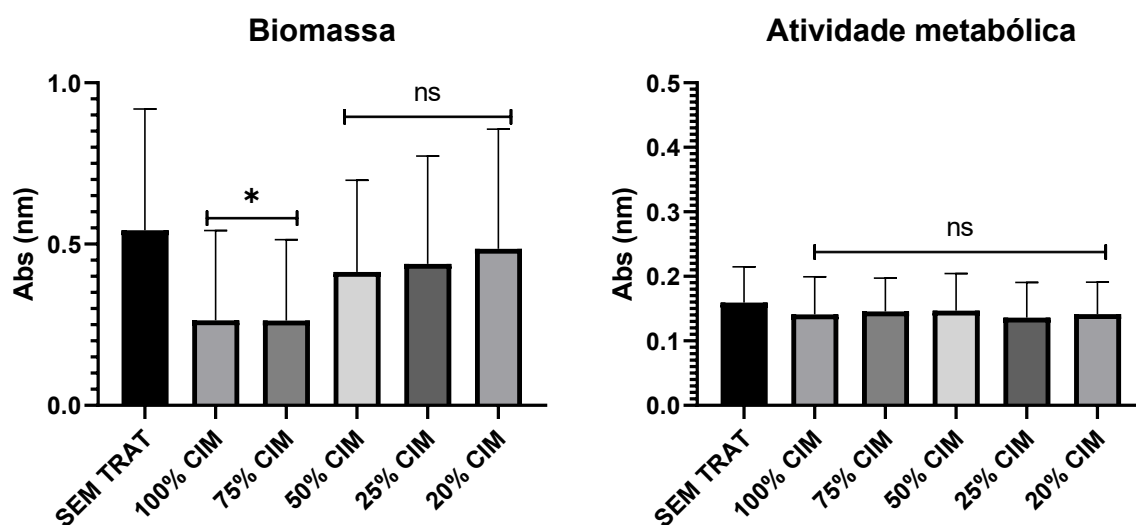
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Para determinar a ação da própolis na formação de biofilmes, foram realizados os ensaios de erradicação e inibição da formação de biofilmes. As concentrações utilizadas de própolis foram 100% CIM (552,5 ou 276,25 mg/L), 75% CIM (414,37 ou 207,19 mg/L), 50% CIM (276,25 ou 138,13 mg/L), 25% CIM (138,13 ou 69,06 mg/L) e 20% CIM (110,5 ou 55,25mg/L).

A quantificação de biomassa e atividade metabólica para os ensaios de erradicação de biofilmes, avaliando as 10 amostras em conjunto, estão demonstradas na Figura 2. É possível observar que a redução da biomassa ocorreu em todas as concentrações testadas de própolis. A maior redução ocorreu quando o tratamento dos biofilmes foi realizado com 100% da CIM, e os valores de crescimento se elevaram à medida que as concentrações de própolis foram reduzidas (75% da CIM, 50% da CIM, 25% da CIM e 20% da CIM). Em relação a quantificação de atividade metabólica das células sésseis frente as diferentes concentrações da própolis, foi

observado que os valores pouco variaram quando comparados ao controle, demonstrando baixo efeito na atividade metabólica das células na presença de própolis nos ensaios de erradicação de biofilmes formados. As diferenças de valores, demonstram significância estatística apenas para as concentrações de 100% CIM e 75% CIM dos ensaios de biomassa. Para atividade metabólica, nenhum valor mostrou diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Figura 2 - Produção de biomassa e atividade metabólica totais dos 10 isolados em relação ao controle sem tratamento para os ensaios de erradicação de biofilmes.



* indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento

As porcentagens de redução de biomassa de cada isolado, para os ensaios de erradicação de biofilmes, estão reunidas na Tabela 5. Nos 10 isolados estudados, foi observada redução da biomassa, em uma ou mais concentrações de própolis estudadas, comparando com o grupo sem tratamento. As taxas de redução variaram de 1,6% a 99%. A concentração de própolis com 75% e 100% da CIM, demonstraram uma variação de redução da biomassa do biofilme formado por cada isolado de 12,3% a 94% e 12,8% a 99,0%, respectivamente. Para as demais concentrações a variação de redução foi menor, sendo que, nestes casos, a maior redução no geral foi de 60,7%. Em cinco isolados, em concentrações distintas, não ocorreu nenhuma redução da biomassa, ao contrário, foi observado aumento da mesma.

A atividade metabólica, para os 10 isolados de *T. asahii* estudados, também foi avaliada nos ensaios de erradicação de biofilmes formados (Tabela 6). Foi observada uma baixa redução metabólica, com taxas de redução variando de 0,46% a 50,77%. Em cinco isolados não foi

observada redução, sendo que, em um destes, a redução foi nula em todas as concentrações de própolis testadas.

Tabela 5 - Efeito da própolis na erradicação da biomassa de biofilmes dos 10 isolados de *T. asahii* estudados.

Isolados	Sem tratamento (Abs)	Concentrações Própolis									
		100% CIM		75% CIM		50% CIM		25% CIM		20% CIM	
		Abs	% redução	Abs	% redução	Abs	% redução	Abs	% redução	Abs	% redução
1	0,413	0,034	91,8*	0,145	64,9	0,289	30,1	0,375	9,3	0,298	27,8
2	0,100	0,001	99,0	0,006	94,0	0,077	22,6	0,100	0	0,144	0
3	0,633	0,345	45,5	0,369	41,7	0,417	34,2	0,378	40,3	0,559	11,6
4	0,696	0,174	75,0	0,169	75,7	0,304	56,3	0,275	60,5	0,292	58,0
5	1,389	0,915	34,1	0,851	38,7*	1,017	26,8	1,254	9,7	1,367	1,6
6	0,581	0,135	76,8	0,323	44,4	0,286	50,8	0,655	0	0,482	17,0
7	0,324	0,283	12,8	0,284	12,3	0,201	38,0	0,474	0	0,536	0
8	0,566	0,440	22,3	0,429	24,2	0,783	0	0,609	0	0,666	0
9	0,561	0,077	86,6*	0,177	68,4	0,314	44,0	0,299	46,7	0,453	19,2
10	0,503	0,421	16,3	0,166	67,1	0,476	5,5	0,198	60,7	0,580	0

* indica diferença estatística significativa em relação ao controle sem tratamento

Tabela 6 - Efeito da própolis na atividade metabólica de biofilmes dos 10 isolados de *T. asahii* estudados. Ensaio de erradicação.

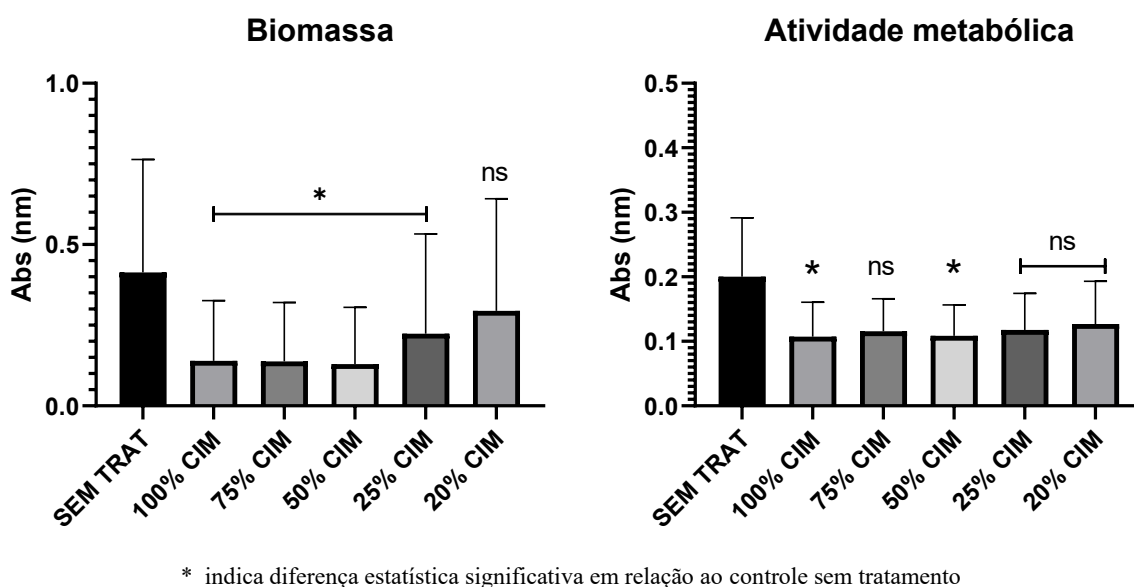
Isolados	Sem tratamento (Abs)	Concentrações Própolis									
		100% CIM		75% CIM		50% CIM		25% CIM		20% CIM	
		Abs	% redução	Abs	% redução	Abs	% redução	Abs	% redução	Abs	% redução
1	0,163	0,16	1,84	0,147	9,82	0,136	16,56	0,1265	22,39	0,137	15,95
2	0,101	0,07	30,35	0,0775	22,89	0,063	37,31	0,065	35,32	0,0755	24,88
3	0,135	0,139	0	0,147	0	0,1605	0	0,17	0	0,1875	0
4	0,204	0,215	0	0,2085	0	0,173	15,20	0,153	25,00	0,1755	13,97
5	0,230	0,211	8,26	0,209	9,13	0,2025	11,96	0,1655	28,04	0,1655	28,04
6	0,149	0,1255	15,49	0,168	0	0,1405	5,39	0,122	17,85	0,1075	27,61
7	0,059	0,062	0	0,079	0	0,0815	0	0,079	0	0,0955	0
8	0,202	0,214	0	0,1945	3,71	0,217	0	0,197	2,48	0,189	6,44
9	0,130	0,092	29,23	0,084	35,38	0,0775	40,38	0,064*	50,77	0,076	41,54
10	0,220	0,123	43,96	0,1405	35,99	0,2145	2,28	0,2185	0,46	0,2025	7,74

* indica diferença estatística significativa em relação ao controle sem tratamento

O ensaio de inibição de biofilmes foi realizado para avaliar a capacidade da própolis de inibir a produção de biomassa e de alterar a atividade metabólica das células em relação ao controle sem tratamento.

Como demonstrado na Figura 3, foi possível observar uma redução significativa ($p < 0,05$) tanto da produção de biomassa quanto da atividade metabólica das células, nas concentrações de 100%CIM a 25%CIM e 100%CIM e 50%CIM, respectivamente.

Figura 3 - Produção de biomassa e atividade metabólica totais, em relação ao controle sem tratamento, nos ensaios de inibição da produção de biofilmes dos 10 isolados de *T. asahii* estudados.



A porcentagem de redução de biomassa, nos ensaios de inibição da produção de biofilmes, para cada amostra separadamente está demonstrada na Tabela 7. A maioria dos isolados mostrou redução de biomassa em alguma das concentrações testadas, porém a maioria sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). A variação de redução entre os 10 isolados foi de 5,3% a 100% em relação ao controle sem tratamento com própolis. Em uma amostra, a inibição foi 100% para toda as concentrações de própolis testadas. Dois isolados, em concentrações distintas, mostraram aumento de biomassa.

Em relação a porcentagem de atividade metabólica nos ensaios de inibição de formação de biofilmes (Tabela 8), foi possível identificar redução da mesma na maioria dos isolados. A porcentagem de redução variou de 11,9% a 81,1%. Em concentrações distintas da própolis, duas amostras apresentaram aumento da atividade metabólica do biofilme.

Tabela 7 - Efeito da própolis na inibição da biomassa de biofilmes dos 10 isolados de *T. asahii* estudados.

Isolados	Sem tratamento (Abs)	Concentrações Própolis									
		100% CIM		75% CIM		50% CIM		25% CIM		20% CIM	
		Abs	% redução	Abs	% redução	Abs	% redução	Abs	% redução	Abs	% redução
1	0,407	0,227	44,3	0,302	25,8	0,310	23,7	0,385	5,3	0,357	12,2
2	0,360	0,013	96,4*	0,079	78,2	0,047	86,9	0,097	73,1	0,110	69,6
3	0,731	0,386	47,2	0,487	33,4	0,343	53,1	0,855	0	0,782	0
4	0,563	0,194	65,5	0,529*	6,0	0,298	47,1	0,357	36,6	0,379	32,7
5	0,879	0,290	67,0	0,336	61,8	0,367	58,2	0,560	36,3	0,698	20,6
6	0,187	0,009	95,2	0	100	0	100	0	100	0,099	47,1
7	0,054	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
8	0,098	0,005	94,9	0	100*	0,001	99,0	0,008	91,8	0,025	74,5
9	0,235	0,089	62,1	0,087	63,0	0,020	91,5*	0,061	74,0	0,037	84,3
10	0,140	0,019	86,4	0,006	95,7	0,013	90,7	0,002	98,6*	0,013	90,7

* indica diferença estatística significativa em relação ao controle sem tratamento. Fonte: elaborado pela autora, 2025.

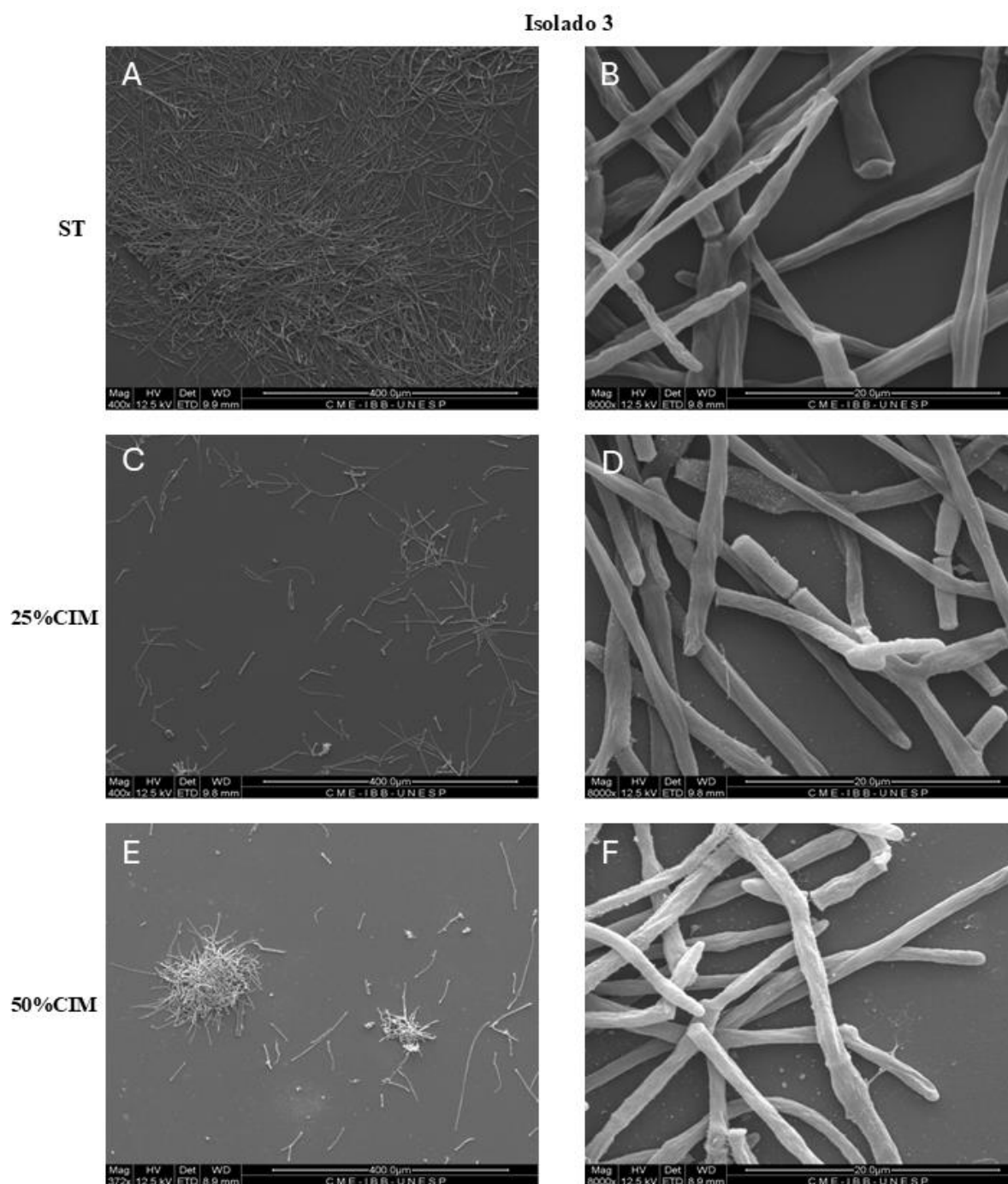
Tabela 8 - Efeito da própolis na atividade metabólica de biofilmes dos 10 isolados de *T. asahii* estudados. Ensaio de inibição.

Isolados	Sem tratamento (Abs)	Concentrações Própolis									
		100% CIM		75% CIM		50% CIM		25% CIM		20% CIM	
		Abs	% redução	Abs	% redução	Abs	% redução	Abs	% redução	Abs	% redução
1	0,269	0,130	51,8	0,137	49,0	0,129	52,0	0,156	42,1	0,217	19,2
2	0,080	0,041	49,4	0,098	0	0,047	41,2	0,062	22,5	0,051	36,9
3	0,107	0,177	0	0,146	0	0,167	0	0,177	0	0,191	0
4	0,185	0,091	50,7*	0,157	14,9	0,128	30,9	0,163	11,9	0,135	27,1
5	0,220	0,166	24,6	0,163	25,7	0,143	34,8	0,112	49,0	0,128	41,7
6	0,263	0,173	34,2	0,192	27,0	0,161	39,0	0,145	44,9	0,106	59,7*
7	0,053	0,040	23,8	0,044	17,1	0,040	24,8	0,045	15,2	0,046	13,3
8	0,302	0,120	60,3	0,070	77,0*	0,132	56,5	0,196	35,3	0,230	24,0
9	0,227	0,061	73,0	0,069	69,5	0,056	75,5*	0,068	70,0	0,084	63,1
10	0,297	0,074	75,2	0,072	75,9	0,081	72,9	0,056	81,1*	0,080	73,2

* indica diferença estatística significativa em relação ao controle sem tratamento. Fonte: elaborado pela autora, 2025.

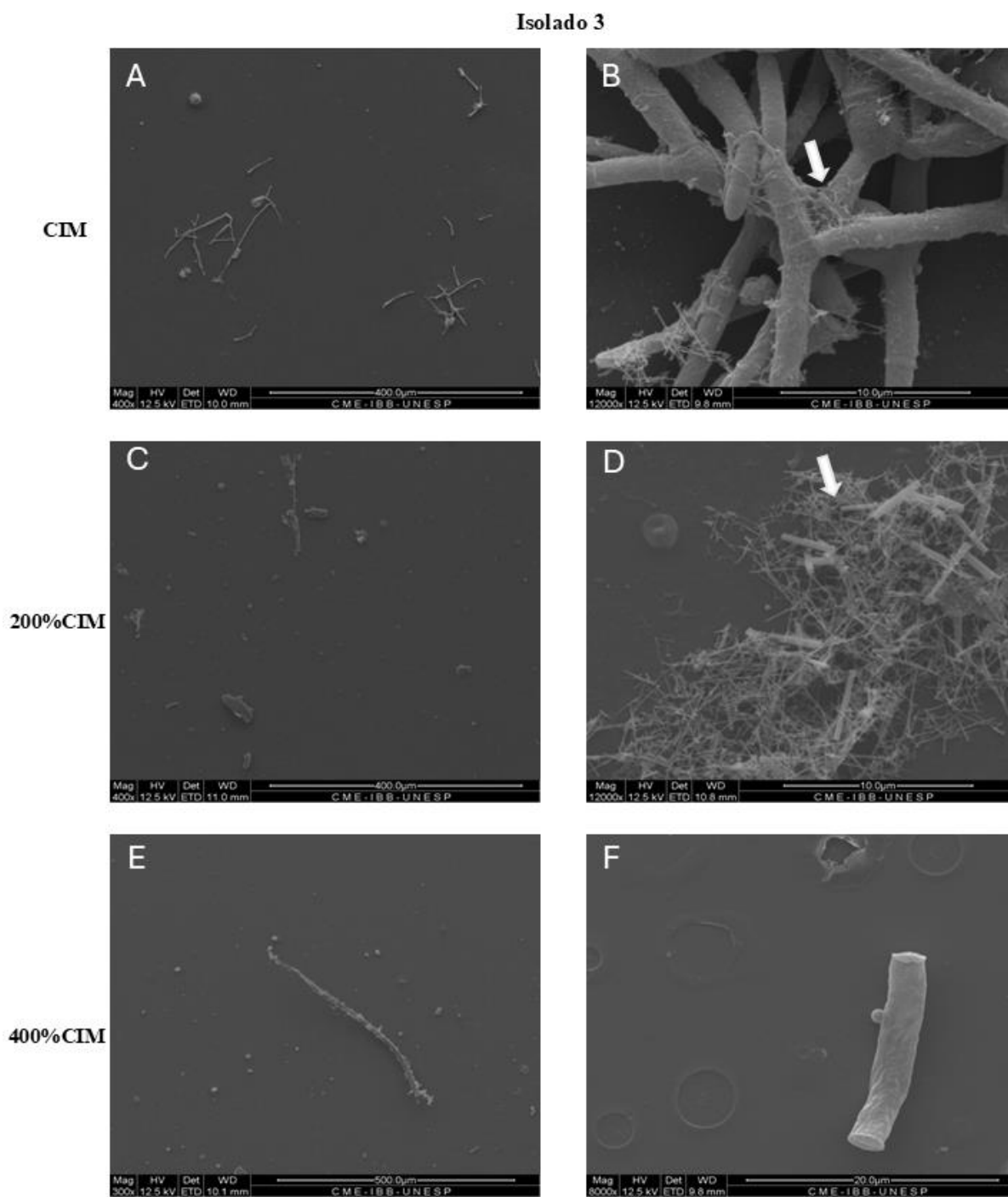
A ultraestrutura dos biofilmes não tratados e tratados com diferentes concentrações do extrato de própolis pode ser observadas nas Figuras 3, 4, 5 e 6. A estrutura dos biofilmes formados pelos isolados sem tratamento mostra camadas densas e complexas de células intrincadas (principalmente hifas e artroconídios), com presença de material extracelular. Em ambos os isolados testados o extrato de própolis foi capaz de produzir uma redução nessa rede intrincada de células, que passam a exibir aglomerados mais simples e isolados à medida que a concentração do extrato aumenta.

Figura 4 - Fotomicrografias do isolado 3, biofilmes sem tratamento (A e B), biofilmes tratados com CIM-2 (C e D) e com CIM-1 (E e F). Aumento de 372x a 8000x.



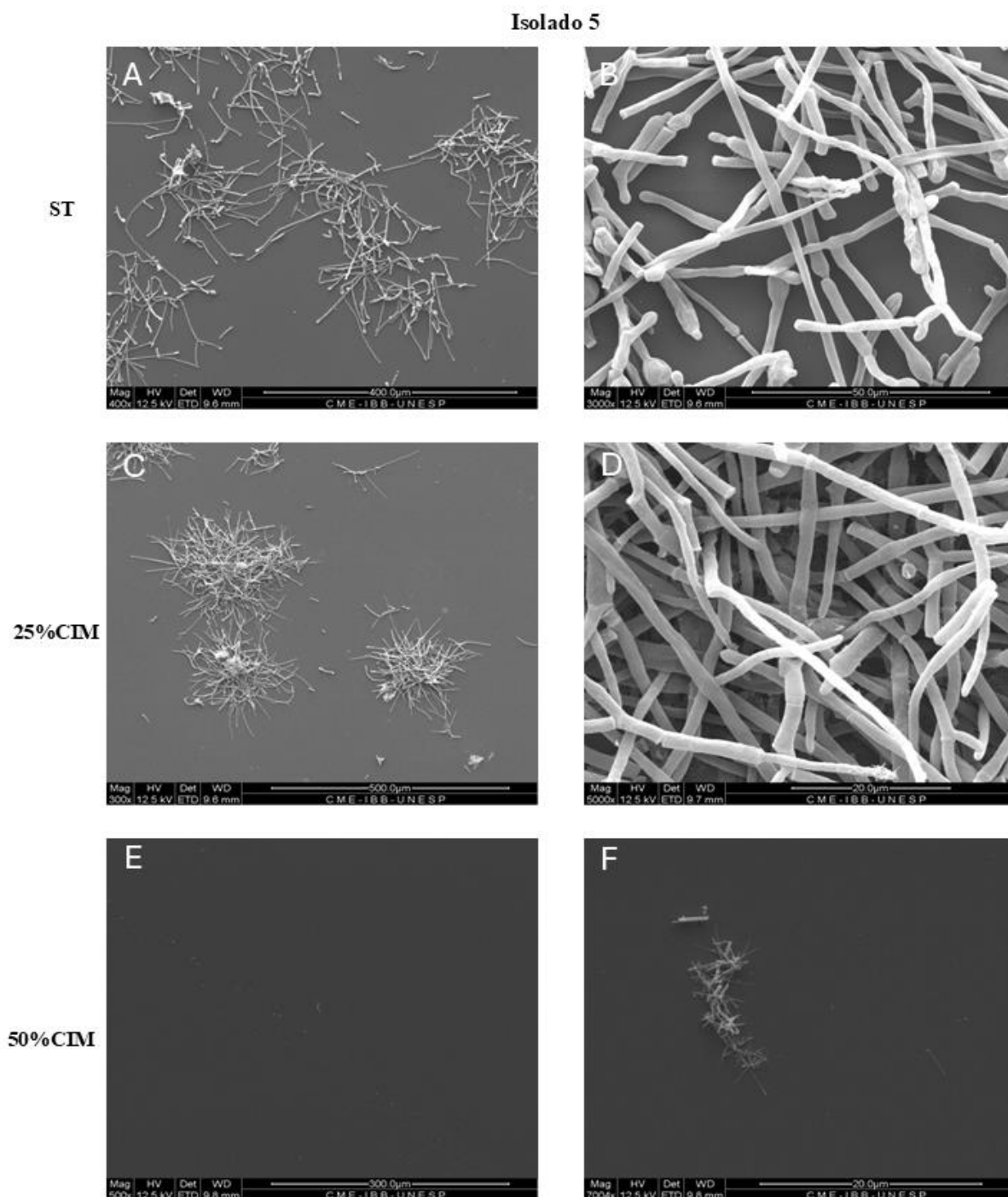
A e B, sem tratamento, hifas e pseudohifas numerosas e intimamente entrelaçadas. C e D: hifas e pseudohifas menos numerosas, menos entrelaçadas. E e F: hifas e pseudohifas formando colônias isoladas.

Figura 5 - Fotomicrografias do isolado 3, biofilmes tratados com CIM (A e B), CIM+1 (C e D) e CIM+2 (E e F). Aumento de 400x a 12000x.



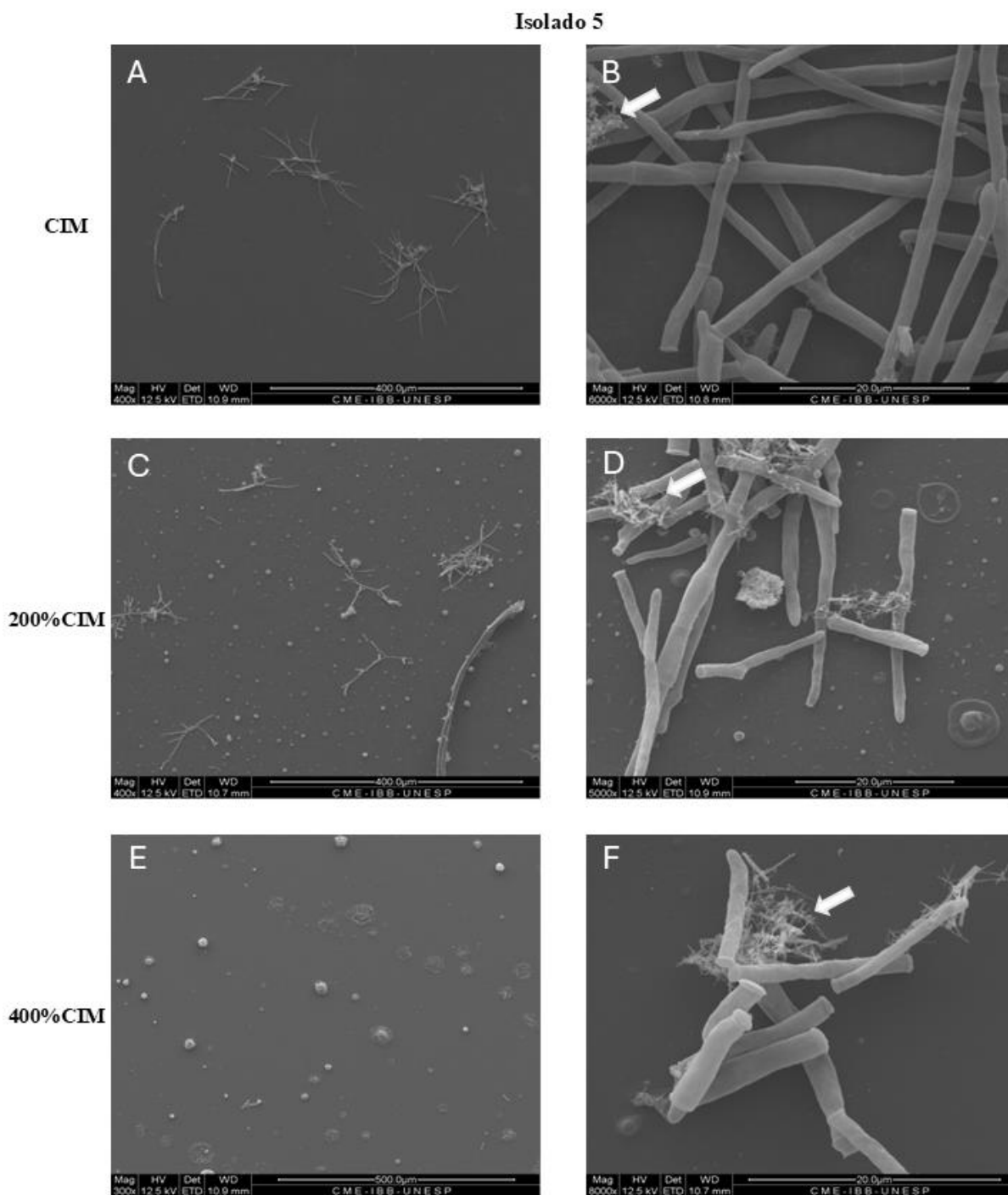
A e B: tratados com CIM, hifas e pseudohifas isoladas ou pouco entrelaçadas, presença de matriz extracelular (seta). C e D: hifas e pseudohifas menos numerosas e menos entrelaçadas, aumento da quantidade de matriz extracelular (seta). E e F: hifas, pseudohifas e artroconídios isolados.

Figura 6 - Fotomicrografias do isolado 5, biofilmes sem tratamento (A e B), biofilmes tratados com CIM-2 (C e D) e com CIM-1 (E e F). Aumento de 300 a 7004x.



A e B, sem tratamento, hifas e pseudohifas numerosas e entrelaçadas. C e D: hifas e pseudohifas formando colônias entrelaçadas, E e F: células isoladas, com presença de matriz extracelular.

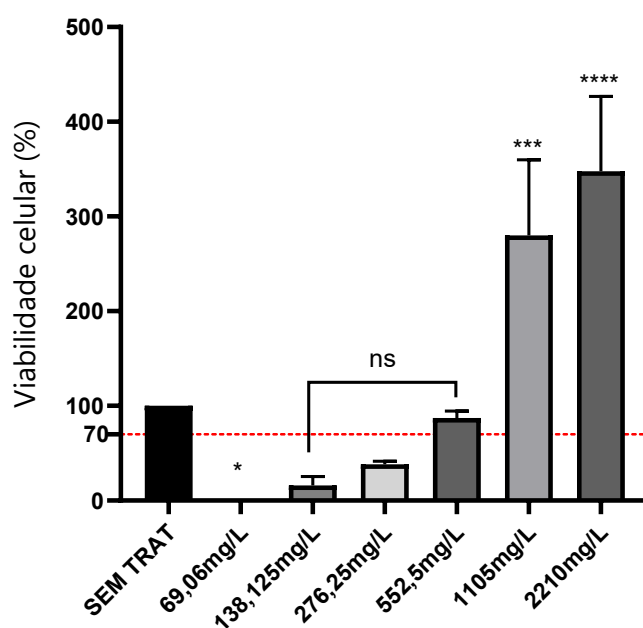
Figura 6 – Fotomicrografias do isolado 5, biofilmes tratados com CIM (A e B), CIM+1 (C e D) e CIM+2 (E e F). Aumento de 400x a 8000x.



A e B: tratados com CIM, hifas e pseudohifas isoladas ou pouco entrelaçadas, presença de matriz extracelular (seta). C e D: hifas e pseudohifas menos numerosas e menos entrelaçadas, aumento da quantidade de matriz extracelular (seta). E e F: células isoladas, presença de matriz extracelular.

Em relação ao ensaio de citotoxicidade da própolis em células animais, obteve-se a relação expressa na Figura 7. Foi possível observar que o tratamento celular com o extrato de própolis nas concentrações 69,06 mg/L, 138,125 mg/L e 276,25 mg/L apresentam viabilidade celular abaixo de 70% e são, portanto, tóxicas para os fibroblastos da linhagem 3T3. Porém, à medida que a concentração dos extratos aumenta, a viabilidade celular aumenta significativamente, em até 402%.

Figura 7 - Viabilidade celular (%) de diferentes concentrações do extrato de própolis sobre fibroblastos 3T3.



*, *** e **** indicam diferença estatística significativa em relação ao controle sem tratamento

5 DISCUSSÃO

O aumento de infecções invasivas por leveduras do gênero *Trichosporon* tem sido descrito por muitos autores (Guo *et al.*, 2019; Kourti; Roilides, 2022; Rodrigues; Nosanchuk, 2020; Singh *et al.*, 2019). Neste contexto, *T. asahii* se destacam pela alta virulência e tolerância a antifúngicos (Basu; Tilak; Kumar, 2015; Padovan *et al.*, 2019). Este cenário tem estimulado estudos voltados à busca de alternativas terapêuticas para esses patógenos e ao melhor entendimento de seus mecanismos de virulência.

Desta forma, a avaliação da suscetibilidade de *T. asahii* a antifúngicos é essencial, especialmente considerando sua relevância clínica em infecções disseminadas. Nos resultados obtidos neste estudo, a anfotericina B apresentou um intervalo de CIM variando de 0,5 a 4,0 mg/L, com apenas três entre 10 isolados apresentando CIMs menores que 2,0 mg/L. Esses dados indicam uma suscetibilidade variável à anfotericina B, refletindo a preocupação com a resistência ao tratamento. Esses achados são semelhantes aos encontrados em estudos como o de Chagas-Neto *et al.* (2009), que relataram CIMs entre 0,25 e 4,0 µg/mL, sendo que a maioria dos isolados apresentou CIMs acima de 2,0 mg/L. De Almeida *et al.* (2016) descreveram que a maioria dos isolados também mostrou resistência significativa a anfotericina B. Valores de CIMs para anfotericina B frente a isolados de *Trichosporon* spp., geralmente são incompatíveis com os níveis séricos normalmente alcançáveis em pacientes que recebem uma formulação convencional deste polieno (Colombo; Padovan; Chaves, 2011).

Para a caspofungina, as leveduras demonstraram resistência, com CIMs de 16 mg/L ou mais e CFM superiores a 16 mg/L, refletindo a tendência observada em diversos estudos, como os de Chagas-Neto *et al.* (2009) e Lara *et al.* (2023), que destacaram altas CIMs para esta classe de antifúngicos. A resistência à caspofungina é preocupante, pois são consideradas fármacos de escolha em muitas situações clínicas de alto risco para infecções fúngicas invasivas, e como visto, seu uso pode ser menos eficiente em caso de infecções por *T. asahii*.

Os azóis tem apresentado melhor atividade antifúngica *in vivo* e *in vitro* sobre *Trichosporon* spp. quando comparado aos demais antifúngicos (Dabas; Xess; Kale, 2017; Francisco *et al.*, 2023; Suzuki *et al.*, 2010), sendo que estudos descreveram o voriconazol como uma opção terapêutica para infecções por *Trichosporon* spp. (Asada *et al.*, 2006; Colombo; Padovan; Chaves, 2011; Ding *et al.*, 2020; Lee; Koh, 2020; Paphitou *et al.*, 2002; Serena *et al.*, 2005). Neste estudo, o voriconazol demonstrou ser o antifúngico mais eficaz entre os testados, com CIMs de 0,06 a 0,25 mg/L e CFMs de 0,5 a 2 mg/L. Esses resultados corroboram os achados de Liao *et al.* (2015) e de outros estudos, que também identificaram o voriconazol como o agente mais potente contra *T. asahii* (Chagas-Neto *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2019;

Taverna *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2012). Em relação ao fluconazol, os valores de CIM variaram entre 1 e 4 mg/L, com CFMs de 4 a 8 mg/L. Esses dados são consistentes com os de Koç *et al.* (2011), que relataram CIMs que variavam de 0,125 a 8 µg/mL.

Porém, recentemente, vários autores têm documentado isolados clínicos exibindo altos valores de CIMs *in vitro* para os triazóis, especialmente fluconazol e voriconazol, que como já relatado são considerados as melhores opções para o tratamento da tricosporonose (Arabatzis *et al.*, 2014; Arendrup *et al.*, 2020; Francisco *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2019; Oliveira dos Santos *et al.*, 2016). Estes dados, além de ressaltarem a necessidade de monitoramento contínuo e testes de suscetibilidade para guiar decisões terapêuticas eficazes, também enfatizam a complexidade do tratamento de infecções por *T. asahii*.

Considerando a baixa disponibilidade de antifúngicos disponíveis e a crescente resistência dos organismos patogênicos, a busca por moléculas com ação antifúngica nos produtos naturais se mostra uma importante alternativa para superar essa barreira (Fuentefria *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2022). A própolis é um produto natural apícola, com uso tradicional conhecido pela humanidade por séculos. Dentre as propriedades biológicas conhecidas estão a atividade antineoplásica, antioxidante, anti-inflamatória e antibiótica, incluindo atividade antifúngica (Bhargava *et al.*, 2021; Bobiş *et al.*, 2023; Bouchelaghem, 2022).

No Brasil, a primeira publicação sobre a própolis, em 1981, apresentou estudo comparativo do efeito da mesma e antibióticos na inibição de *Staphylococcus aureus* (Shub *et al.*, 1981). Mundialmente, vários estudos vêm relatando o efeito antimicrobiano conhecido com ação contra fungos (Ghaly; Ezzat; Sarhan, 1998; Ożarowski *et al.*, 2022; Siqueira *et al.*, 2015; Sokolonski *et al.*, 2021).

A própolis tem se mostrado um agente antimicrobiano promissor que apresenta diversos tipos de ação, incluindo ação antifúngica em diferentes concentrações e tipos de extratos e com efeito que varia de acordo com o organismo e a composição química da própolis. Diversos estudos exploram a ação sobre fungos filamentosos como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. e *Trycophyton* spp (Hassanien *et al.*, 2021; Mahmoodzadeh Hosseini *et al.*, 2020; Vică *et al.*, 2022), fitopatógenos como *Biscogniauxia* spp. e *Colletotrichum* spp (Passão; Almeida-Aguiar; Cunha, 2023) e leveduras como *Candida* spp., *Rhodotorula* spp. e *Saccharomyces* spp. (Barros *et al.*, 2022; Gniewosz *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2006; Petruzzi *et al.*, 2020; Silici *et al.*, 2005)

Alguns autores descrevem que a própolis possui uma forte ação antifúngica contra fungos filamentosos, com valores de CIM mais baixos do que para leveduras, demonstrando maior sensibilidade a esse produto (Barros *et al.*, 2022; Vică *et al.*, 2022). Os autores revelaram

também que a eficácia variou entre diferentes tipos de própolis, com os extratos aquosos mostrando maior efeito antifúngico. A composição química da própolis, que varia de acordo com a origem geográfica, influenciou diretamente a sua potência antimicrobiana.

A ação da própolis sobre leveduras tem sido amplamente estudada, com resultados de atividade antifúngica variados dependendo da espécie e do extrato testado. O trabalho de Oliveira *et al.* (2006) demonstrou a eficácia da própolis contra leveduras isoladas de onicomioses, como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. lusitaniae*. Os valores de CIM variaram entre $1,25 \times 10^{-2}$ e $5,00 \times 10^{-2}$ mg/mL para *C. albicans* e entre $0,63 \times 10^{-2}$ e 50×10^{-2} mg/mL para *C. parapsilosis*, confirmando a atividade antifúngica da própolis contra as diferentes espécies da levedura. Silici *et al.* (2005) verificaram que a própolis obtida de diferentes espécies de abelhas apresentou CIMs baixos para *C. glabrata* (0,03-7,5 µg/mL) e *C. albicans* (0,05-7,50 µg/mL). Sokolonski *et al.* (2021) observaram variações significativas nos valores de CIM (0,015 a >9 mg/mL) ao testar diferentes extrações de própolis verde e vermelha contra isolados orais de *Candida* spp., e Capoci *et al.* (2015) relataram que a própolis foi eficaz contra isolados de *C. albicans* de candidíase vulvovaginal, com valores de CIM variando de 68,35 a 546 µg/mL de fenóis totais, sendo que a concentração de 546,87 µg/mL resultou na morte de 75,8% dos isolados.

A análise da suscetibilidade de *Trichosporon asahii* a produtos naturais com propriedades antifúngicas é fundamental para compreender a efetividade das opções terapêuticas disponíveis, e neste contexto a própolis foi avaliada neste estudo.

Poucos estudos relatam a atividade da própolis em leveduras do gênero *Trichosporon* spp. Alguns estudos mostram que a própolis também apresenta potencial como agente antifúngico sobre esta levedura. Oliveira *et al.* (2006) e Silici *et al.* (2005) demonstraram uma ação inibitória significativa sobre *Trichosporon* spp., frequentemente associadas a infecções em pacientes imunocomprometidos. Koç *et al.* (2011) inclusive ao comparar o efeito da própolis com diferentes leveduras como *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*, encontraram valores de CIM baixos para *Trichosporon* spp., destacando a sensibilidade dessas espécies à própolis, sugerindo seu uso potencial no tratamento de infecções por esses patógenos.

No presente estudo, foi observado que, o extrato de própolis apresentou um intervalo de CIM e CFM de 276,25 a 1105 mg/L entre os 10 isolados testados. Na literatura, observa-se que os valores de CFM para própolis tendem a ser consideravelmente maiores do que os valores de CIM, o que indica que as doses necessárias para matar as células fúngicas são mais elevadas do que as requeridas para inibir seu crescimento. Waller *et al.* (2017) demonstraram essa diferença ao testar própolis marrom contra cepas de *Sporothrix brasiliensis*, onde, apesar das CIMs

variarem entre 0,19 e 1,56 mg/mL, as CFMs apresentaram um intervalo muito mais amplo, de 0,78 a >3125 mg/mL. De forma semelhante, Barros *et al.* (2022) reportaram que as CFMs podem ser até três vezes superiores às CIMs.

Sokolonski *et al.* (2021) também destacaram essa discrepância ao testar própolis verde e vermelha frente a isolados de *Candida* spp., com CFMs variando de 0,125 a >8 mg/mL. Os resultados obtidos no presente estudo, reforçam a mesma tendência para as cepas de *Trichosporon* spp., onde as CFMs variaram entre 276 a > 1.105 mg/L. Esses achados sugerem que, para alcançar um efeito fungicida completo, a concentração de própolis precisa ser consideravelmente maior, mostrando que a mesma tem pouco potencial fungicida contra *T. asahii* o que pode ter implicações na formulação e administração terapêutica da própolis como agente antifúngico para esse grupo.

Os resultados de Barros *et al.* (2022) indicaram que o extrato de própolis possui um efeito tanto fungistático quanto fungicida, dependendo da cepa e da dose aplicada. Essa variabilidade na eficácia pode ser explorada para direcionar tratamentos mais personalizados, considerando a suscetibilidade de cada isolado de *T. asahii*.

No presente estudo, os valores de CIMs do extrato de própolis verde obtidos foram maiores em comparação aos relatados por Koç *et al.* (2011), Silici *et al.* (2005) e Oliveira *et al.* (2006). Koç *et al.* (2011) observaram CIMs entre 0,0125 e 0,2 µg/mL para *Trichosporon* spp., enquanto Silici *et al.* (2005) relataram valores variando de 0,2 a 0,4 µg/mL. Ambos os estudos utilizaram o mesmo método de obtenção e extração da própolis, com coleta manual de colmeias em um período específico do ano, dissolução do própolis bruta em etanol 80% com agitação a 50°C por três dias, seguida de filtração e concentração. No entanto, uma diferença fundamental entre os dois trabalhos foi a concentração do extrato: Koç *et al.* (2011) usaram uma concentração final de extrato de 3 mg/mL, e Silici *et al.* (2005) utilizaram 100 mg/mL, o que pode ter influenciado os diferentes resultados de CIM.

Por outro lado, Oliveira *et al.* (2006) relataram CIMs entre 0,32 e 1,25 µg/mL para extratos de própolis coletados manualmente em apiários localizados em reservas de eucalipto, com o material sendo armazenado a -20°C. O extrato foi preparado em uma concentração de 30% utilizando álcool 96°GL como solvente, e o controle de qualidade incluiu análises de flavonas, pH e densidade. A maior rigidez no controle de qualidade e a especificidade do ambiente de coleta podem ter influenciado positivamente os resultados observados nesse estudo.

No presente estudo, a própolis verde utilizada foi diluída em solução hidroalcoólica de 70-80%, seguido de percolação, centrifugação e filtração, e passou por uma análise minuciosa

dos parâmetros físico-químicos. Este método de extração se distingue dos utilizados nos estudos anteriores, o que pode ter contribuído para as diferenças observadas nos valores de CIM. Esses valores podem refletir variações na composição química do própolis verde utilizado (Anexo 1).

Importante destacar que tanto Koç *et al.* (2011) quanto Silici *et al.* (2005) e Oliveira *et al.* (2006) conduziram testes de suscetibilidade utilizando apenas o gênero *Trichosporon*, sem especificar as espécies testadas. Isso limita a comparação direta com estudos que levam em consideração diferenças intra-gênero, uma vez que diferentes espécies de *Trichosporon* podem apresentar variações significativas em sua suscetibilidade a compostos antifúngicos.

Os dados sobre a ação da própolis contra espécies fúngicas reforçam seu potencial como tratamento complementar no controle de infecções. Contudo, há diferenças nos valores de CIMs para estudos e microrganismos distintos.

Diante da variação dos resultados apresentados pela literatura, é fundamental a padronização dos processos de produção dos extratos de própolis para uso medicinal. Fatores como a origem botânica, método de extração e composição química precisam ser controlados para garantir a reprodutibilidade dos efeitos terapêuticos. A ausência dessa padronização pode comprometer tanto a eficácia quanto a segurança dos produtos, limitando seu uso clínico.

Uma alternativa promissora para tratar as infecções causadas por fungos é a terapia combinada, possibilitando a redução da dose e citotoxicidade de ambos os compostos (Pippi *et al.*, 2015). O presente trabalho identificou ação antagonista ao combinar o extrato de própolis verde com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol, o que significa que a combinação entre os dois produtos não produz efeitos melhores do que a ação dos efeitos de ambos isolados para células planctônicas nas concentrações testadas para *T. asahii*. Não foram encontrados outros trabalhos que analisaram o efeito da combinação da própolis com antifúngicos clínicos para *Trichosporon* spp. e o efeito antagonista não foi encontrado na literatura para combinação da própolis com outros produtos ou antifúngicos contra *T. asahii*.

Ao analisar a espécie *T. asahii*, Suteng Yang *et al.* (2016), encontraram efeito sinérgico ao combinar fármacos anti-inflamatórios não esteroidais com antifúngicos, em especial para combinações entre ibuprofeno e caspofungina ou anfotericina B. Os efeitos encontrados incluem tanto a inibição do crescimento planctônico como o efeito antibiofilme. Cong *et al.*, (2016) testaram a combinação do fármaco sertralina com diferentes antifúngicos clínicos, obtendo sinergismo para anfotericina B, caspofungina e fluconazol. Já ao combinar o fármaco prometazina com fluconazol e anfotericina contra *T. asahii*, Aguiar *et al.*, (2023) encontraram sinergismo para ambos antifúngicos, com redução significativa das CIMs para ambos compostos.

Diferentes tipos de própolis já foram testados em combinação com antifúngicos para leveduras, especialmente do gênero *Candida* spp. Um dos primeiros trabalhos encontrou aumento de atividade de nistatina quando combinado com extrato de própolis da Sérvia contra *Candida* spp. (Stepanović *et al.*, 2003). Gucwa *et al.*, (2018) testaram extratos alcoólicos de própolis com fluconazol e voriconazol, encontrando sinergismo para ambos antifúngicos contra *C. albicans*. Contra *C. parapsilosis* e *C. glabrata* a própolis combinada apresentou interação sinérgica para fluconazol, efeito indiferente para anidulafungina (Pippi *et al.*, 2015) e efeito sinérgico com redução de citotoxicidade causada por anfotericina B (Argüelles *et al.*, 2023).

Além das leveduras de importância médica, também foram testadas combinações contra leveduras relacionadas a podridão de alimentos como *Torulaspora delyruueckii*, *Millererozyma farinosa* e *Brettanomyces bruxellensis*, encontrando sinergismo entre extrato de própolis e sorbato de potássio, sugerindo o possível uso como conservante natural de alimentos (Stagkos-Georgiadis *et al.*, 2021). Além do efeito sinérgico para células planctônicas, muitas combinações apresentam efeito antibiofilme (Argüelles *et al.*, 2021; Cong *et al.*, 2016; Suteng Yang *et al.*, 2016).

A capacidade de *T. asahii* em produzir biofilmes é um aspecto crítico que deve ser considerado no contexto do tratamento de infecções fúngicas. No presente trabalho, todos os isolados de *T. asahii* foram capazes de formar biofilmes antes do tratamento com a própolis, variando de fracos a fortemente produtores. Esse achado é corroborado pelos dados de Lara *et al.* (2023), que mostraram que todos os isolados, sejam eles de origem clínica, animal ou ambiental, são capazes de produzir biofilmes, com uma significativa maioria (54,3%) classificada como fortemente produtora. Importante ressaltar que *T. asahii* se destacou como a espécie com o maior número de isolados classificados como fortemente produtores. Por outro lado, os resultados de Almeida *et al.* (2016) e de Espírito Santo *et al.* (2020) revelaram que, embora a maioria dos isolados também haviam formado biofilmes, os níveis de formação foram considerados baixos. Corroborando com o presente estudo, onde a maior parte dos isolados se mostraram fracos produtores de biofilmes.

A formação de biofilmes por *T. asahii* é preocupante, pois esses agregados celulares conferem resistência a antifúngicos e dificultam a erradicação do patógeno durante o tratamento. O estudo de Espírito Santo *et al.* (2020), destaca que não foram encontradas diferenças significativas na formação de biofilmes entre as diferentes espécies do gênero *Trichosporon* ou entre os genótipos de *T. asahii*. Os biofilmes formados por *T. asahii* podem compartilhar características com os biofilmes de outros fungos patogênicos, como *Candida albicans*, que também exibem um aumento nas CIMs em comparação às células planctônicas.

Não foram encontrados trabalhos analisando a ação da própolis sobre biofilmes produzidos por *T. asahii*, porém alguns autores mostraram que o extrato de própolis é eficaz na inibição da fase inicial de biofilmes, especialmente em *C. albicans* (Barros *et al.*, 2022). Capoci *et al.*, 2015 demonstraram o potencial do extrato de própolis ao testá-lo em biofilmes formados por *C. albicans* isoladas de infecções vulvovaginais. No estudo conduzido por eles, o extrato de própolis reduziu a formação de biomassa em 93,34% dos isolados testados, com inibição variando entre 26,44% e 95,35%, evidenciando uma ação significativa contra biofilmes. O efeito do extrato de própolis ou seus componentes sobre biofilmes formados por outras leveduras do gênero *Candida* também foi avaliado por outros autores (de Barros *et al.*, 2021; Fernández-Calderón *et al.*, 2021).

Neste estudo, também foi observada redução de biomassa nos ensaios de inibição e erradicação de biofilmes formados de *T. asahii* quando tratados com diferentes concentrações de própolis. A variação de redução de biomassa foi de 5,3% a 100% e 4,4% a 97,7%, respectivamente. A capacidade da própolis de inibir a formação inicial de biofilmes sugere seu potencial como uma ferramenta complementar no controle de infecções causadas por este patógeno, especialmente em situações em que o biofilme desempenha um papel fundamental na resistência ao tratamento como no caso de infecções relacionadas a cateteres, onde a tricomonose invasiva é comum.

Nos ensaios de erradicação de biofilme, na presente pesquisa, foi possível observar redução de biomassa sem redução significativa de atividade metabólica. Um resultado semelhante foi observado por Hamid *et al.* (2017) ao tratar biofilmes de *Candida* com nanopartículas de prata, onde a redução de atividade metabólica foi menor que a redução de biomassa. Os autores justificaram esta diferença pela associação das células em uma comunidade neutralizando os efeitos produzidos pelo composto antifúngico, que passa a agir de forma compartilhada entre as células, reduzindo seu efeito tóxico, mantendo estável a atividade metabólica.

Porém, Cordeiro *et al.*, (2021) mostram que os biofilmes produzidos por *T. asahii* e *T. inkin* são formados de 2 a 5% de células persistentes, justificando diferenças entre produção de biomassa reduzida sem alteração da atividade metabólica. Os autores mostraram que essas células são capazes de sobreviver em status de dormência em resposta ao estresse oxidativo induzido por altas concentrações de fármacos. Os biofilmes formados por essas células são menos densos e mais tolerantes a anfotericina B, em relação às células planctônicas. Essas células podem estar associadas a infecções recalcitrantes.

Fernández-Calderón *et al.*, (2021), avaliaram o efeito de própolis espanhol contra biofilmes de *C. glabrata* concluindo que há redução significativa na formação de biofilmes e redução na atividade metabólica das células. Galinari *et al.* (2022) investigaram o uso de um sistema bioadesivo contendo própolis contra dermatófitos, observando que o prolongamento da ação do composto sobre os sítios de infecção tem ação positiva tanto em células planctônicas como em biofilmes em diferentes estágios de desenvolvimento, sugerindo o uso como alternativa para tratamento dessas infecções.

Semelhante a alguns isolados observados no presente estudo, Capoci *et al.*, 2015 também relataram um aumento na produção de biomassa para alguns isolados (6,66%) após tratamento com a própolis, mostrando variação na resposta. As diferentes dinâmicas entre a inibição e erradicação de biofilmes por *T. asahii* foram analisadas por Yang *et al.*, (2023) utilizando alicina, um composto natural presente no alho. Os autores observaram inibição significativa do crescimento de células planctônicas e sésseis causada pela alicina nos estágios de adesão e desenvolvimento, mas, assim como o observado para própolis, em alguns isolados no presente estudo, até em altas concentrações a alicina exibiu atividade limitada (18,9%) contra biofilmes maduros.

Os mecanismos específicos da interação entre a própolis e os biofilmes de *T. asahii* precisam ser investigados a nível molecular de forma a compreender melhor as vias de ação dessa interação. Considerando a robustez e complexidade de biofilmes formados por *T. asahii* e a eficácia demonstrada da própolis contra outras espécies fúngicas, como *C. albicans* e *C. glabrata*, são necessários futuros estudos que explorem o potencial da própolis, ou de seus componentes, no combate a biofilmes de *T. asahii*

Com base nos dados que indicam a resistência dos biofilmes a antifúngicos tradicionais, o uso de própolis poderia, após maiores estudos, ser integrado a esquemas terapêuticos combinados, oferecendo uma abordagem multifacetada que considera tanto a suscetibilidade quanto a formação de biofilmes. Essa estratégia pode ser crucial para o desenvolvimento de abordagens eficazes no tratamento de infecções fúngicas, especialmente em casos de infecções disseminadas associadas a cateteres, onde a resistência é frequentemente um desafio significativo.

A ultraestrutura morfológica dos biofilmes maduros formados pelas cepas clínicas de *T. asahii* foi analisada e descrita por Di Bonaventura *et al.*, (2006), e segundo os autores é possível observar a estrutura compacta multicamada altamente organizada, com hifas e artroconídios. Neste estudo, após o tratamento com diferentes concentrações do extrato de própolis foi possível observar uma desorganização na estrutura, diminuição tanto da quantidade, quanto da

aglomeração das microcolônias formadas por pseudohifas e artroconídios, além de filamentos fragmentados.

Não foram encontrados trabalhos analisando a influência de extrato de própolis sobre a micromorfologia dos biofilmes de *T. asahii*. De Aguiar Cordeiro *et al.*, (2021, 2023) ao tratar os biofilmes maduros de *T. asahii* com butirato de sódio e prometazina com a CIM e 10xCIM mostram que o tratamento é capaz de dissociar as estruturas densas, resultando em filamentos mais finos, fragmentados e hifas colapsadas. Resultado semelhante pode ser obtido ao tratar os biofilmes com alicina (Yang *et al.*, 2023) onde observa-se também alteração na superfície das células que se tornam ásperas, com caroços e severamente enrugadas. No presente trabalho não se observou expressiva alteração no aspecto da superfície das células tratadas, com aumento sutil de enrugamento e poucas hifas colapsadas observadas. Observou-se, porém, aumento de artroconídios isolados e matriz extracelular.

O extrato de própolis ou seus componentes derivados parecem ter efeito semelhante em biofilmes maduros produzidos por *Candida*. Barros *et al.*, (2022) ao testar duas formas de extrato de própolis sobre *C. albicans* mostram redução na contagem de unidades formadoras de colônias e desorganização de estrutura de biofilmes tratados. Capoci *et al.*, (2015) ao analisar a ultraestrutura de *C. albicans* originadas de candidíase vaginal demonstraram uma diferença entre as cepas de acordo com o tipo celular presente nos biofilmes. Nas cepas onde os biofilmes eram compostos por leveduras e pseudohifas, houve redução desses biofilmes após exposição aos extratos. Já nas cepas que produziram biofilmes compostos apenas de pseudohifas formando agregados não-contínuos, após o tratamento com o extrato de própolis, houve interrupção no crescimento dessas células. Um dos principais compostos da própolis, o ácido cafeico fenetil éster (CAPE) foi testado contra biofilmes formados por *Candida* de candidíase oral. Após o tratamento, os biofilmes maduros antes densos e formados por multicamadas de hifas e leveduras entrelaçados, passou a mostrar camada única e dispersa, com redução do número de hifas e leveduras (de Barros *et al.*, 2021).

O presente estudo apresentou a primeira análise dos efeitos do extrato de própolis sobre os biofilmes de *T. asahii*. Embora os mecanismos específicos de interação entre o extrato de própolis e *T. asahii* ainda precisem ser mais profundamente investigados, os resultados apresentados fornecem uma base importante para futuras investigações.

Em relação a citotoxicidade da própolis em células 3T3, foi observado que as concentrações mais baixas testadas (69.06, 138,125 e 276.25 mg/L) apresentaram baixa viabilidade celular e foram, portanto, tóxicas. As concentrações de 552.5, 1105 e 2210 mg/L apresentaram viabilidade celular acima de 70%, consideradas assim, não tóxicas. Esses

resultados podem ser comparados aos obtidos por De Luca et al., (2017) realizados com fibroblastos 3T3 ATCC CL 173, no qual foi utilizado um extrato alcoólico de própolis a 15%. Apesar dos autores relatarem valores de viabilidade celular ficarem acima dos 75%, deve-se considerar que o extrato testado no presente estudo está a 11,05%, o que corresponde a concentração de 1.105 mg/L, que também possui alta viabilidade celular. Por outro lado, ao realizar o teste com fibroblastos dérmicos humanos (HDF), Queiroga et al., 2023) encontraram alta viabilidade celular em concentrações até 1 mg/mL de extrato alcoólico de própolis marrom português. Acima de 1 mg/ml a viabilidade celular cai para 40% e é totalmente perdida em 2,5 mg/mL

Diversos trabalhos indicam que a toxicidade de diferentes tipos de própolis em diferentes linhagens celulares é dose-dependente (Aljohani et al., 2022; Barros et al., 2022; Veiga et al., 2018). No presente trabalho, a viabilidade celular aumenta proporcionalmente ao aumento da concentração do extrato de própolis. Resultado semelhante foi encontrado por Santos et al., (2021) que ao testar modelos para o tratamento de paracoccidiodomicose utilizado própolis vermelha encontrou efeito estimulatório em esplenócitos. Os autores concluíram que a própolis vermelha possui mecanismos de proteção celular que envolvem ativação de neutrófilos e controle de processo inflamatório, o que pode explicar o aumento da viabilidade celular em maiores concentrações do produto.

Apesar de o presente trabalho ter mostrado citotoxicidade quando testado na concentração inibitória planctônica (276,25mg/L), é importante considerar o papel da própolis como inibidora da formação de biofilmes, uma vez que biofilmes necessitam de maiores concentrações para efeito inibitório, e maiores concentrações são menos tóxicas para células animais. Considerando a produção de biofilmes um dos principais fatores de virulências das infecções causados por *T. asahii*, o efeito antibiofilme é o de maior potencial ao se considerar o extrato de própolis verde. Alguns trabalhos estão sendo realizados com biomateriais associados a dispositivos médicos como ponta de cateter e até nanoestruturas de prata ou ouro estabilizadas ou encapsuladas com a presença de extrato de própolis (Aljohani et al., 2022; Kischkel et al., 2020).

Em síntese, os resultados deste estudo demonstram que o extrato de própolis apresenta um promissor efeito antifúngico contra cepas clínicas de leveduras da espécie *T. asahii*, especialmente como potencial antibiofilme, mas também contra o crescimento planctônico. A baixa toxicidade em altas concentrações torna a própolis uma alternativa interessante, especialmente quando associado ao seu baixo custo, alta aceitação popular e amplo acesso. Embora a padronização do extrato seja um desafio devido a diversidade na sua composição,

dado o seu potencial terapêutico, o uso da própolis em modelos *in vivo* e ensaios clínicos pode representar uma importante estratégia na redução da carga de infecções fúngicas invasivas, especialmente em um contexto em que alternativas terapêuticas eficazes são limitadas.

6 CONCLUSÕES

- ❖ Voriconazol foi o antifúngico que apresentou os menores valores de CIMs frente aos isolados de *T. asahii* estudados. A anfotericina B apresentou uma suscetibilidade variável, com CIMs elevadas em muitos isolados. A caspofungina e o fluconazol foram os antifúngicos com os maiores valores de CIMs.
- ❖ O extrato de própolis, testado como uma alternativa natural, mostrou-se promissor enquanto antifúngico para isolados de *T. asahii*, embora os valores de CIM e CFM encontrados tenham sido relativamente elevados em comparação com a literatura.
- ❖ O extrato de própolis apresentou efeito antagonista quando combinado com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol.
- ❖ Todos os isolados de *T. asahii* estudados foram capazes de formar biofilmes.
- ❖ Em relação à inibição de biofilmes, o extrato de própolis mostrou ser capaz de reduzir tanto a produção de biomassa quanto a atividade metabólica na maioria dos isolados testados em concentrações inibitórias e subinibitórias.
- ❖ Os ensaios de erradicação de biofilmes formados, mostraram uma redução da biomassa e pouca alteração na atividade metabólica.
- ❖ O extrato de própolis foi capaz de promover desorganização na estrutura de biofilmes, diminuição das microcolônias formadas por pseudohifas e artroconídios, e fragmentação dos filamentos.
- ❖ A partir desses resultados, é possível considerar a própolis como um potencial antifúngico no manejo de infecções fúngicas complexas, embasando decisões futuras para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBES, S. *et al.* Implication of efflux pumps and ERG11 genes in resistance of clinical *Trichosporon asahii* isolates to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, n. 3, 2021.
- AGUIAR, A. L. R. *et al.* Promethazine inhibits efflux, enhances antifungal susceptibility and disrupts biofilm structure and functioning in *Trichosporon*. **Biofouling**, v. 39, n. 2, p. 218–230, 2023.
- ALI, G. A. *et al.* *Trichosporon asahii* fungemia and COVID-19 co-infection: An emerging fungal pathogen; case report and review of the literature. **IDCases**, Netherlands, v. 25, p. e01244, 2021.
- ALJOHANI, F. S. *et al.* *In vivo* bio-distribution and acute toxicity evaluation of greenly synthesized ultra-small gold nanoparticles with different biological activities. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 6269, 2022.
- ALMEIDA, A. A. de *et al.* Genotype, antifungal susceptibility, and biofilm formation of *Trichosporon asahii* isolated from the urine of hospitalized patients. **Revista Argentina De Microbiologia**, v. 48, n. 1, p. 62–66, 2016.
- ALMEIDA, E. C.; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. **J. venom. anim. toxins**, p. 191–212, 2002.
- ARABATZIS, M. *et al.* Sequence-based identification, genotyping and EUCAST antifungal susceptibilities of *Trichosporon* clinical isolates from Greece. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 8, p. 777–783, 2014.
- ARENDRUP, M. C. *et al.* How to interpret MICs of antifungal compounds according to the revised clinical breakpoints v. 10.0 European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 26, n. 11, p. 1464–1472, 2020.
- ARGÜELLES, A. *et al.* A Specific Mixture of Propolis and Carnosic Acid Triggers a Strong Fungicidal Action against *Cryptococcus neoformans*. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 11, p. 1395, 2021.
- ARGÜELLES, A. *et al.* Insight into the Antifungal Effects of Propolis and Carnosic Acid—Extension to the Pathogenic Yeast *Candida glabrata*: New Propolis Fractionation and Potential Synergistic Applications. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 4, p. 442, 2023.
- ASADA, N. *et al.* Successful Treatment of Breakthrough *Trichosporon asahii* Fungemia with Voriconazole in a Patient with Acute Myeloid Leukemia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 4, p. e39–e41, 2006.
- AUGUSTO-OBARA, T. R. *et al.* Benefits of superfine grinding method on antioxidant and antifungal characteristic of Brazilian green propolis extract. **Scientia Agricola**, v. 76, p. 398–404, 2019.

- AURICCHIO, M. T. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de preparações de própolis comercializadas na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 3, p. 209–212, 2006.
- BARBOSA, M. H. *et al.* Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 3, p. 318–322, 2009.
- BARROS, I. L. E. *et al.* Performance of Two Extracts Derived from Propolis on Mature Biofilm Produced by *Candida albicans*. **Antibiotics**, v. 12, n. 1, p. 72, 2022.
- BASU, S.; TILAK, R.; KUMAR, A. Multidrug-resistant *Trichosporon*: an unusual fungal sepsis in preterm neonates. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 4, p. 202–206, 2015.
- BENELLI, J. L. *et al.* Fungal Bloodstream Co-infection by *Trichosporon asahii* in a COVID-19 Critical Patient: Case Report and Literature Review. **Mycopathologia**, v. 187, n. 4, p. 397–404, 2022.
- BENTUBO, H. D. L.; GOMPERTZ, O. F. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNases by different species of *Trichosporon*. **SpringerPlus**, v. 3, p. 377, 2014.
- BERRETTA, A. A. *et al.* Development and Characterization of High-Absorption Microencapsulated Organic Propolis EPP-AF® Extract (i-CAPs). **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 20, p. 7128, 2023.
- BERRETTA, A. A. *et al.* Development and Characterization of New Green Propolis Extract Formulations as Promising *Candidates* to Substitute for Green Propolis Hydroalcoholic Extract. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 8, p. 3510, 2023.
- BHARGAVA, P. *et al.* Experimental Evidence for Therapeutic Potentials of Propolis. **Nutrients**, v. 13, n. 8, p. 2528, 2021.
- BITTERMAN, R.; MARINELLI, T.; HUSAIN, S. Strategies for the Prevention of Invasive Fungal Infections after Lung Transplant. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 2, p. 122, 2021.
- BOBIŞ, O. *et al.* Editorial: Therapeutic potential of propolis-from in vitro studies to clinical trials. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1192045, 2023.
- BOJSEN, R.; REGENBERG, B.; FOLKESSON, A. *Saccharomyces cerevisiae* biofilm tolerance towards systemic antifungals depends on growth phase. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 305, 2014.
- BOUCHELAGHEM, S. Propolis characterization and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p. 1936–1946, 2022.
- BOZÓ, A. *et al.* The in vitro and in vivo efficacy of fluconazole in combination with farnesol against *Candida albicans* isolates using a murine vulvovaginitis model. **Journal of Microbiology (Seoul, Korea)**, v. 54, n. 11, p. 753–760, 2016.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 36, n. 4, p. 347–363, 1998.

CAPOCI, I. R. G. *et al.* Propolis Is an Efficient Fungicide and Inhibitor of Biofilm Production by Vaginal *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2015, p. 287693, 2015.

CASALINI, G.; GIACOMELLI, A.; ANTINORI, S. The WHO fungal priority pathogens list: a crucial reappraisal to review the prioritisation. **The Lancet Microbe**, v. 5, n. 7, p. 717–724, 2024.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73 Suppl 1, p. S1-6, 2002.

CASTANO, G.; YARRARAPU, S. N. S.; MADA, P. K. **Trichosporonosis**: StatPearls Publishing, 2022.

CERQUEIRA, P.; CUNHA, A.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Potential of propolis antifungal activity for clinical applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 3, p. 1207–1228, 2022.

CHAGAS-NETO, T. C. *et al.* Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1074–1081, 2009.

COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C. B.; CHAVES, G. M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and *Trichosporonosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 682–700, 2011.

CONG, L. *et al.* In Vitro Antifungal Activity of Sertraline and Synergistic Effects in Combination with Antifungal Drugs against Planktonic Forms and Biofilms of Clinical *Trichosporon asahii* Isolates. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0167903, 2016.

CORDEIRO, R. de A. *et al.* The HIV aspartyl protease inhibitor ritonavir impairs planktonic growth, biofilm formation and proteolytic activity in *Trichosporon* spp. **Biofouling**, v. 33, n. 8, p. 640–650, 2017.

CORDEIRO, R. de A. *et al.* *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin* Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 645812, 2021.

CRONYN, V. *et al.* *Trichosporon asahii* Urinary Tract Infection in a Patient with Severe COVID-19. **Case reports in infectious diseases**, Egypt, v. 2021, p. 6841393, 2021.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 854–869, 2004.

CUSINATO, D. A. C. *et al.* Evaluation of potential herbal-drug interactions of a standardized propolis extract (EPP-AF®) using an in vivo cocktail approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 245, p. 112174, 2019.

DA SILVA, R. O. *et al.* Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 170, p. 66–71, 2015.

DA SILVA, J. F. M. *et al.* Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 431–435, 2006.

DABAS, Y.; XESS, I.; KALE, P. Molecular and antifungal susceptibility study on *Trichosporonemia* and emergence of *Trichosporon mycotoxinivorans* as a bloodstream pathogen. **Medical Mycology**, v. 55, n. 5, p. 518–527, 2017.

DE ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; HENNEQUIN, C. Invasive *Trichosporon* Infection: a Systematic Review on a Re-emerging Fungal Pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1629, 2016.

DE BARROS, P. P. *et al.* The Anti-Biofilm Efficacy of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) In Vitro and a Murine Model of Oral Candidiasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 700305, 2021.

DE LUCA, M. P. *et al.* The anti-caries activity and toxicity of an experimental propolis-containing varnish. **Brazilian Oral Research**, v. 31, p. e45, 2017.

DE SÁ ASSIS, M. A. *et al.* Antimicrobial and Antibiofilm Effect of Brazilian Green Propolis Aqueous Extract against Dental Anaerobic Bacteria. **Molecules**, v. 27, n. 23, p. 8128, 2022.

DEMIR, F.; KUŞTIMUR, S. [Investigation of some virulence factors in *Trichosporon* spp. strains]. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 48, n. 4, p. 628–638, 2014.

DENNING, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 24, n. 7, p. e428–e438, 2024.

DI BONAVENTURA, G. *et al.* Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 10, p. 3269–3276, 2006.

DING, C. H. *et al.* *Trichosporon asahii* fungaemia in an immunocompetent polytrauma patient who received multiple antibiotics. **The Malaysian Journal of Pathology**, v. 42, n. 2, p. 293–296, 2020.

DO ESPÍRITO SANTO, E. P. T. *et al.* Molecular Identification, Genotyping, Phenotyping, and Antifungal Susceptibilities of Medically Important *Trichosporon*, *Apiotrichum*, and *Cutaneotrichosporon* Species. **Mycopathologia**, v. 185, n. 2, p. 307–317, 2020.

DUARTE-OLIVEIRA, C. *et al.* The Cell Biology of the *Trichosporon*-Host Interaction. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 118, 2017.

FARIDA, S. *et al.* In-vitro antioxidant, in-vivo anti-inflammatory, and acute toxicity study of Indonesian propolis capsule from *Tetragonula sapiens*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p. 2489–2500, 2022.

FERNÁNDEZ-CALDERÓN, M. C. *et al.* Antifungal and anti-biofilm activity of a new Spanish extract of propolis against *Candida glabrata*. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 21, n. 1, p. 147, 2021.

FLEMMING, H.-C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FRANCISCO, E. C. *et al.* In vitro activity of isavuconazole against clinically relevant *Trichosporon* species: a comparative evaluation of EUCAST broth microdilution and MIC Test Strip methods. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 78, n. 3, p. 817–822, 2023.

FRANCISCO, E. C. *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility of 358 *Trichosporon* clinical isolates collected in 24 medical centres. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 25, n. 7, p. 909.e1-909.e5, 2019.

FRANCISCO, E. C. *et al.* Unveiling *Trichosporon austroamericanum* sp. nov.: A Novel Emerging Opportunistic Basidiomycetous Yeast Species. **Mycopathologia**, v. 189, n. 3, p. 43, 2024.

FUENTEFRIA, A. M. *et al.* Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 2–13, 2018.

GALINARI, C. B. *et al.* New approach to the use of propolis against dermatomycosis. **Natural Product Research**, v. 36, n. 16, p. 4215–4220, 2022.

GHALY, M. F.; EZZAT, S. M.; SARHAN, M. M. Use of propolis and ultragriseofulvin to inhibit aflatoxigenic fungi. **Folia Microbiologica**, v. 43, n. 2, p. 156–160, 1998.

GNIEWOSZ, M. *et al.* Characterization and Antifungal Activity of Pullulan Edible Films Enriched with Propolis Extract for Active Packaging. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 15, p. 2319, 2022.

GOMES, M. Z. R. *et al.* Incidence density of invasive fungal infections during primary antifungal prophylaxis in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients in a tertiary cancer center, 2009 to 2011. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 865–873, 2014.

GUCWA, K. *et al.* Antifungal Activity and Synergism with Azoles of Polish Propolis. **Pathogens**, v. 7, n. 2, p. 56, 2018.

GUINEA, J. *et al.* **Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts, version 7.4**, 2023.

GUO, L.-N. *et al.* Invasive Infections Due to *Trichosporon*: Species Distribution, Genotyping, and Antifungal Susceptibilities from a Multicenter Study in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 2, p. e01505-18, 2019.

HAMID, S. *et al.* Deterrence in metabolic and biofilms forming activity of *Candida* species by mycogenic silver nanoparticles. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 15, n. 4, p. 249–255, 2017.

HASSANIEN, A. A. *et al.* Antifungal and antitoxin effects of propolis and its nanoemulsion formulation against *Aspergillus flavus* isolated from human sputum and milk powder samples. **Veterinary World**, v. 14, n. 9, p. 2306–2312, 2021.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, 2017.

HAZIROLAN, G.; KOÇAK, N.; KARAGÖZ, A. Sequence-based identification, genotyping and virulence factors of *Trichosporon asahii* strains isolated from urine samples of hospitalized patients (2011-2016). **Journal De Mycologie Medicale**, v. 28, n. 3, p. 452–456, 2018.

HEGAZI, A. G.; ABD EL HADY, F. K.; ABD ALLAH, F. A. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. **Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v. 55, n. 1–2, p. 70–75, 2000.

HENNEQUIN, C.; DE ALMEIDA JUNIOR, J. N. Invasive *Trichosporon* infection in solid organ transplant patients: a report of two cases identified using IGS1 ribosomal DNA sequencing and a review of the literature. **Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society**, v. 16, n. 1, p. 135–140, 2016.

ISLAM, S. *et al.* Antibacterial potential of Propolis: molecular docking, simulation and toxicity analysis. **AMB Express**, v. 14, n. 1, p. 81, 2024.

ITURRIETA-GONZÁLEZ, I. A. *et al.* Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. **PloS One**, v. 9, n. 10, p. e109553, 2014.

IYER, P.; OJCIUS, D. M. Unveiling the mycobiota: The fungal frontier of human health. **Biomedical Journal**, v. 47, n. 3, p. 100751, 2024.

JENNY, J. C.; KUŚ, P. M.; SZWEDA, P. Investigation of antifungal and antibacterial potential of green extracts of propolis. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 13613, 2024.

JESUS, D. F. F. de. Caracterização molecular e análise da expressão gênica de adesivas na levedura emergente *Trichosporon asahii*, 2018.

KISCHKEL, B. *et al.* Silver nanoparticles stabilized with propolis show reduced toxicity and potential activity against fungal infections. **Future Microbiology**, v. 15, p. 521–539, 2020.

KOÇ, A. N. *et al.* Antifungal activity of the honeybee products against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 1–2, p. 128–134, 2011.

KOURTI, M.; ROILIDES, E. Invasive *Trichosporonosis* in Neonates and Pediatric Patients with Malignancies or Hematologic Disorders. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 2, p. 242, 2022.

KURAKADO, S. *et al.* Role of arthroconidia in biofilm formation by *Trichosporon asahii*. **Mycoses**, v. 64, n. 1, p. 42–47, 2021.

KURAKADO, S. *et al.* Tacrolimus inhibits stress responses and hyphal formation via the calcineurin signaling pathway in *Trichosporon asahii*. **Microbiology and Immunology**, v. 67, n. 2, p. 49–57, 2023.

- KUREK-GÓRECKA, A. *et al.* Comparison of the Antioxidant Activity of Propolis Samples from Different Geographical Regions. **Plants (Basel, Switzerland)** , v. 11, n. 9, p. 1203, 2022.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (org.). **The Yeasts (Fifth Edition)**. 5th. ed. London: Elsevier, 2011. v. 3
- LARA, B. R. *et al.* *Apiotrichum veenhuisii* isolated from a pediatric patient with acute myeloid leukemia: The first case in humans. **Mycologia** , v. 111, n. 5, p. 793–797, 2019.
- LARA, B. R. *et al.* Aspects related to biofilm production and antifungal susceptibility of clinically relevant yeasts of the genus *Trichosporon*. **Medical Mycology**., v. 61, n. 3, p. myad022, 2023.
- LARA, B. R. *et al.* Comparing the phenotypic, genotypic, and proteomic identification of *Trichosporon* species: A globally emerging yeast of medical importance. **Medical Mycology**, v. 59, n. 12, p. 1181–1190, 2021.
- LEE, E. Y.; KOH, M. J. A. A rare case of cutaneous *Trichosporon asahii* infection in an immunocompromised child. **Pediatric Dermatology**, v. 37, n. 5, p. 962–963, 2020a.
- LEE, E. Y.; KOH, M. J. A. A rare case of cutaneous *Trichosporon asahii* infection in an immunocompromised child. **Pediatric Dermatology** , v. 37, n. 5, p. 962–963, 2020b.
- LEITÃO, D. P. da S. *et al.* Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1834–1839, 2004.
- LIAO, Y. *et al.* Epidemiology and Outcome of *Trichosporon* Fungemia: A Review of 185 Reported Cases From 1975 to 2014. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, p. ofv141, 2015.
- LIMA, Y. P.; DIAS, V. C. *Trichosporon* spp.: what's new? **Future Microbiology**, v. 19, p. 373–375, 2024.
- LIU, X.-Z. *et al.* Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. **Studies in Mycology** , v. 81, p. 85–147, 2015.
- MAHMOODZADEH HOSSEINI, H. *et al.* The effect of Propolis on inhibition of *Aspergillus parasiticus* growth, aflatoxin production and expression of aflatoxin biosynthesis pathway genes. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 18, n. 1, p. 297–302, 2020.
- MARINÉ, M. *et al.* On and Under the Skin: Emerging Basidiomycetous Yeast Infections Caused by *Trichosporon* Species. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1004982, 2015.
- MEHTA, V. *et al.* A Comprehensive Review of *Trichosporon* spp.: An Invasive and Emerging Fungus. **Cureus**, v. 13, n. 8, p. e17345, 2021.
- MELO, A. S. *et al.* Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. **Medical Mycology**, v. 49, n. 3, p. 253–262, 2011.

- MIRANDA-CADENA, K. *et al.* *In vitro* activities of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol against *Candida* biofilms. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 143, p. 112218, 2021.
- MONTOYA, A. M. *et al.* Biofilm formation and antifungal susceptibility of *Trichosporon asahii* isolates from Mexican patients. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n. 1, p. 22–26, 2018.
- MONTOYA, A. M.; GONZÁLEZ, G. M. *Trichosporon* spp.: an emerging fungal pathogen. **Medicina Universitaria**, v. 16, n. 62, p. 37–43, 2014.
- MUNZEN, M. E.; GONCALVES GARCIA, A. D.; MARTINEZ, L. R. An update on the global treatment of invasive fungal infections. **Future Microbiology**, v. 18, n. 15, p. 1095–1117, 2023.
- NATH, R. *et al.* *Cutaneotrichosporon* (*Trichosporon*) *debeurmannianum*: A Rare Yeast Isolated from Blood and Urine Samples. **Mycopathologia**, v. 183, n. 3, p. 585–590, 2018.
- OLIVEIRA, A. C. P. *et al.* Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 493–497, 2006.
- OLIVEIRA DOS SANTOS, C. *et al.* Emerging pan-resistance in *Trichosporon* species: a case report. **BMC infectious diseases**, v. 16, p. 148, 2016.
- OŻAROWSKI, M. *et al.* Antifungal Properties of Chemically Defined Propolis from Various Geographical Regions. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 364, 2022.
- PADOVAN, A. C. B. *et al.* Exploring the resistance mechanisms in *Trichosporon asahii*: Triazoles as the last defense for invasive *Trichosporonosis*. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 133, p. 103267, 2019.
- PALDRYCHOVÁ, M. *et al.* Effect of resveratrol and Regrapex-R-forte on *Trichosporon cutaneum* biofilm. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 1, p. 73–81, 2019.
- PAPHITOU, N. I. *et al.* In Vitro Antifungal Susceptibilities of *Trichosporon* Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 4, p. 1144–1146, 2002.
- PASSÃO, C.; ALMEIDA-AGUIAR, C.; CUNHA, A. Modelling the In Vitro Growth of Phytopathogenic Filamentous Fungi and Oomycetes: The Gompertz Parameters as Robust Indicators of Propolis Antifungal Action. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 12, p. 1161, 2023.
- PAZIN, W. M. *et al.* Bioactivity and action mechanism of green propolis against *Pythium aphanidermatum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. e20180598, 2019.
- PETRUZZI, L. *et al.* Antifungal and Antibacterial Effect of Propolis: A Comparative Hit for Food-Borne *Pseudomonas*, Enterobacteriaceae and Fungi. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 5, p. 559, 2020.

PIPPI, B. *et al.* In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 839–850, 2015.

POLVI, E. J. *et al.* Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 72, n. 12, p. 2261–2287, 2015.

PUUMALA, E. *et al.* Advancements and challenges in antifungal therapeutic development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. e0014223, 2024.

QUEIROGA, M. C. *et al.* Antimicrobial, Antibiofilm and Toxicological Assessment of Propolis. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 2, p. 347, 2023.

RAMAGE, G. *et al.* Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3234–3240, 2001.

RAMAGE, G. *et al.* Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 528521, 2012.

RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 2, p. e0007964, 2020.

ROY, M. *et al.* Recent drug development and treatments for fungal infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 1695–1716, 2023.

SAH, R. *et al.* Disseminated *Trichosporon asahii* infection in a combined liver-kidney transplant recipient successfully treated with voriconazole. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 7, n. 3, p. 125–129, 2019.

SALOMÃO, K. *et al.* Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 5, n. 3, p. 317–324, 2008.

SANTOS, L. A. *et al.* Brazilian Red Propolis shows antifungal and immunomodulatory activities against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 277, p. 114181, 2021.

SANTOS, P. B. do R. E. D. *et al.* Effects of Brazilian green propolis extract on planktonic cells and biofilms of multidrug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Biofouling**, v. 36, n. 7, p. 834–845, 2020.

SANTOS, F. A. *et al.* *Trichosporon inkin* fungemia case report: clinical and laboratory management. **Future Microbiology**, v. 17, p. 81–87, 2022.

SEIDEL, D. *et al.* Impact of climate change and natural disasters on fungal infections. **The Lancet Microbe**, v. 5, n. 6, p. e594–e605, 2024.

SERENA, C. *et al.* In vitro interaction of micafungin with conventional and new antifungals against clinical isolates of *Trichosporon*, *Sporobolomyces* and *Rhodotorula*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 1020–1023, 2005.

SFORCIN, J. M. **Potencial da própolis: para o desenvolvimento de novas drogas**: Editora UNESP Digital, 2014.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 75, n. 2, p. 213–267, 2011.

SHIBATA, M.-A. *et al.* Natural products for medicine. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2012, p. 147120, 2012.

SHUB, T. A. *et al.* Effect of propolis on *Staphylococcus aureus* strains resistant to antibiotics]. **Antibiotiki**, v. 26, n. 4, p. 268–271, 1981.

SILICI, S. *et al.* Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, n. 1, p. 39–44, 2005.

SILVA, N. B. S. *et al.* Potential in vitro anti-periodontopathogenic, anti-Chikungunya activities and *in vivo* toxicity of Brazilian red propolis. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 21165, 2022.

SINGH, S. *et al.* Epidemiology and Antifungal Susceptibility of Infections Caused by *Trichosporon* Species: An Emerging Non-*Candida* and Non-*Cryptococcus* Yeast Worldwide. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 536–541, 2019.

SIQUEIRA, A. B. S. *et al.* Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis. **Brazilian Oral Research**, v. 29, p. S1806-83242015000100278, 2015.

SOKOLONSKI, A. R. *et al.* Activity of antifungal drugs and Brazilian red and green propolis extracted with different methodologies against oral isolates of *Candida* spp. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 21, n. 1, p. 286, 2021.

SPRUTE, R. *et al.* EQUAL *Trichosporon* Score 2022: an ECMM score to measure QUALity of the clinical management of invasive *Trichosporon* infections. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 77, n. 6, p. 1779–1784, 2022.

STAGKOS-GEORGIADIS, A. *et al.* Synergistic antifungal activity and substitution of sorbate with cyclodextrin-based aqueous extracts of propolis bioactives. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 2, p. e15145, 2021.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiological Research**, v. 158, n. 4, p. 353–357, 2003.

SUN, W. *et al.* *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. Pt 12, p. 1750–1757, 2012.

SUTENG YANG *et al.* *In Vitro* Interactions between Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Antifungal Agents against Planktonic and Biofilm Forms of *Trichosporon asahii*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157047, 2016.

- SUZUKI, K. *et al.* Fatal *Trichosporon* fungemia in patients with hematologic malignancies. **European Journal of Haematology**, v. 84, n. 5, p. 441–447, 2010.
- TAKASHIMA, M. *et al.* Recognition and delineation of yeast genera based on genomic data: Lessons from *Trichosporonales*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 130, p. 31–42, 2019.
- TANUGUR SAMANCI, A. E. *et al.* Efficacy and toxicity of Anatolian propolis on healthy nasal epithelial cells. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 2 Suppl, p. 103–111, 2022.
- TAVERNA, C. G. *et al.* Molecular identification, genotyping, and antifungal susceptibility testing of clinically relevant *Trichosporon* species from Argentina. **Medical Mycology**, v. 52, n. 4, p. 356–366, 2014.
- TSAL, M. S. *et al.* Susceptibilities to amphotericin B, fluconazole and voriconazole of *Trichosporon* clinical isolates. **Mycopathologia**, v. 174, n. 2, p. 121–130, 2012.
- URS, T. A. *et al.* Catheter associated urinary tract infections due to *Trichosporon asahii*. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 10, n. 4, p. 464–470, 2018.
- VEIGA, F. F. *et al.* Propolis Extract for Onychomycosis Topical Treatment: From Bench to Clinic. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 779, 2018.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, p. 519–528, 2005.
- VICĂ, M. L. *et al.* Qualitative Characterization and Antifungal Activity of Romanian Honey and Propolis. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 11, p. 1552, 2022.
- WALLER, S. B. *et al.* Chemical and cytotoxic analyses of brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its in vitro activity against itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 117–121, 2017.
- WHO, W. H. O. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action.** 2022.
- WU, F. *et al.* Unique dynamic mode between Artepillin C and human serum albumin implies the characteristics of Brazilian green propolis representative bioactive component. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 17277, 2020.
- YANG, X. *et al.* Antifungal Activity and Potential Action Mechanism of Allicin against *Trichosporon asahii*. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 3, p. e00907-23, 2023.

ANEXO 1



Ribeirão Preto, 26 de julho de 2023

Certificado de Análise

Produto: Extrato Alcoólico de Própolis BS (utilizado no preparo do Propodry I-Caps e Propodry Plus);
Lote: 200300223

Tabela 1 – Resultados Físico-químicos.

Parâmetros	Resultados	Especificação
Densidade Relativa	0,903	0,880 – 0,910 g/mL
Flavonoides totais (expressos em quercetina)	8,65	Mín. 4,50 mg/mL
Fenóis totais (expressos em ácido gálico)	17,74	Mín. 4,48 mg/mL
Ácido cafeico	0,13	Informativo (mg/mL)
Ácido p-cumárico	2,00	Informativo (mg/mL)
Ácido 3,5-dicafeoilquinico	2,73	Informativo (mg/mL)
Ácido 4,5-dicafeoilquinico	3,96	Informativo (mg/mL)
Aromadendrina	1,37	Informativo (mg/mL)
Drupanina	2,42	Informativo (mg/mL)
Artepin C	14,90	Informativo (mg/mL)
Bacharina	3,82	Informativo (mg/mL)

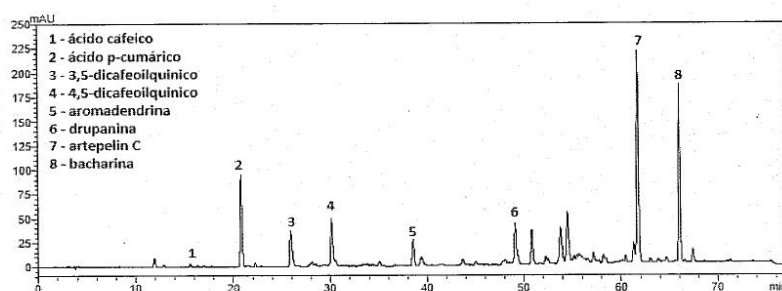


Figura 1. Perfil cromatográfico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD) de acordo com metodologia descrita em Berretta et al., 2023.

Responsible Pharmacist
 PhD Andresa A. Berretta - CRF/SP 26.257



Rua Triunfo, 945 Subsetor Sul 3
 Ribeirão Preto | CEP 14020-670



55 16 3514-4444



www.apisflora.com.br

