

Vanessa Cristina Pin Piazzentin Queiroz

Avaliação do potencial antifúngico de própolis
de *Apis mellifera* contra leveduras do gênero
Candida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

Co-orientadora: Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

**Piracicaba
2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099

Q32a	Queiroz, Vanessa Cristina Pin Piazzentin. Avaliação do potencial antifúngico de própolis de <i>Apis mellifera</i> contra leveduras do gênero <i>Candida</i> / Vanessa Cristina Pin Piazzentin Queiroz. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010. Orientador: Pedro Luiz Rosalen. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Candidíase bucal. I. Rosalen, Pedro Luiz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (eras/fop)
------	---

Título em Inglês: Evaluation of the antifungal activity of propolis of *Apis mellifera* against *Candida* species

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Oral candidiasis

Área de Concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca Examinadora: Pedro Luiz Rosalen, Cláudio Lima de Aguiar, Gilson César Nobre Franco

Data da Defesa: 30-07-2010

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 30 de Julho de 2010, considerou a candidata VANESSA CRISTINA PIN PIAZENTIN QUEIROZ aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pedro Luiz Rosalen", written over a horizontal line.

Prof. Dr. PEDRO LUIZ ROSALEN

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Claudio Lima de Aguiar", written over a horizontal line.

Prof. Dr. CLAUDIO LIMA DE AGUIAR

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Gilson César Nobre Franco", written over a horizontal line.

Prof. Dr. GILSON CÉSAR NOBRE FRANCO

Dedicatória e agradecimentos sinceros,

A ***Deus e Nossa Senhora*** por direcionarem nossos caminhos e abençoarem nossas vidas sempre.

A minha amada filha ***Ana Carolina Piazzentin Marcondes Queiroz***, filha querida, luz dos meus dias, meu grande amor, agradeço simplesmente por existir.

Aos ***meus pais queridos, Sonia Maria Pin Piazzentin e Moacir Irineu Piazzentin***, pelo incentivo, por tanto amor, dedicação e sabedoria; exemplos de força, dignidade e superação. Minha humilde gratidão diante de tão sublimes atitudes e sentimentos; minha admiração e meu amor incondicional.

Ao ***meu esposo Murilo Telles Marcondes Queiroz***, companheiro e namorado, pela compreensão, palavras amigas e por ser um pai tão dedicado e presente.

Ao ***meu irmão Marcelo Gustavo Pin Piazzentin*** por ser parte da minha vida e ser tão companheiro em todos os momentos, desde nossa infância.

A ***minha avó Isaura Ferreira Neves Pin e minha tia avó Alzira Ferreira Neves***, pelos inúmeros ensinamentos e por todo amor.

A minha prima ***Andressa Pin Scaglia*** pela fundamental ajuda.

Aos ***meus familiares*** pelo carinho e apoio sempre.

A ***minha sogra, professora Odaléia Telles Marcondes Queiroz*** pelo incentivo e ajuda e ao ***meu sogro (in Memoriam) João Batista Meira de Queiroz***, por ter sempre evidenciado meu potencial.

Agradecimentos especiais,

Ao ***meu orientador Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen***, pela oportunidade concedida, pela confiança, pela sabedoria, que me proporcionaram crescimento pessoal e profissional. Minha admiração e meu sincero agradecimento.

A ***minha co-orientadora Prof. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte***, a quem retribuo imenso respeito, amizade e carinho; pela orientação, ensinamentos, paciência e generosidade absoluta.

Ao ***meu co-orientador Prof. Dr. Severino Matias Alencar***, pelos ensinamentos, pela contribuição efetiva e disponibilidade plena. Exemplo a ser seguido.

Ao ***Prof. Dr. Masaharu Ikegaki*** pelos ensinamentos e contribuição fundamental.

A ***Profa. Dra. Vivian Fernandez Furletti*** pela participação nos ensaios microbiológicos para finalização deste trabalho, pelas sugestões e pelo incentivo.

A ***FAPESP*** (FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO) pelo auxílio à pesquisa concedido (Processo N° 08/51048-5).

Ao ***CNPq*** (Processo N° 131844/2008-3) pela bolsa de estudo concedida.

Agradecimentos,

A Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) na pessoa do magnífico Reitor ***Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa*** e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), por meio do Diretor ***Prof. Dr. Francisco Haiter Neto***.

Ao ***Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior*** responsável pela coordenação do curso de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP e a ***Profa. Dra Maria Beatriz Duarte Gavião*** coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP.

Aos professores da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, ***Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, Profa. Dra. Maria Cristina Volpato, Prof. Dr. Eduardo Dias Andrade, Prof. Dr. José Ranali, Prof. Dr. Thales Rocha de Matos Filho***.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) e a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (USP).

Ao ***Prof. Dr. Severino Matias Alencar, Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte e Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezi***, membros de minha banca de qualificação de primeira fase pela disponibilidade e pelas sugestões que contribuíram muito para estruturação deste trabalho.

Ao ***Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezi, Profa. Dra. Renata Maria Teixeira Duarte, Profa. Dra. Mary Ann Foglio*** membros de minha banca de qualificação de segunda fase pela disponibilidade e pelas sugestões que contribuíram muito para finalização deste trabalho.

Ao ***Prof. Dr. Cláudio Lima de Aguiar, Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco, Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen***, membros titulares da Comissão Julgadora da Dissertação e ***Profa.***

Dra. Glyn Mara Figueira, Profa. Dra. Karina Cogo, membros suplentes da Comissão Julgadora da Dissertação, anticipo-lhes os agradecimentos sinceros.

Aos meus amigos e amigas, companheiros de laboratório no CPQBA-UNICAMP, ***Renata Maria Teixeira Duarte, Camila Delarmelina, Alessandra Caselatto de Medeiros, Éricka Letícia da Silva, Márcio de Oliveira***, pela amizade e carinho com que fui recebida.

A todos os meus amigos e amigas, companheiros de laboratório da ESALQ-USP, em especial ***Tatiane Oldoni, Adna Prado, Ivani Moreno*** por muito me ensinarem e me receberem carinhosamente.

A ***Marilene Girello*** bibliotecária desta Faculdade, pela atenção e prestatividade.

Aos colegas do curso de pós-graduação ***Andreza Fabiana Begnami, Luciana Aranha Berto, Patrícia Maria Wiziack Zago, Daniela Baroni, Leila Servat, Sidney Figueroba Raimundo, Mirella Lessio Castro, Bruno Bueno Silva, Luciana Salles Branco de Almeida, Paulo César Venâncio, Júlio César Leite da Silva, Márcia Thaís Pochapski, Karina Cogo, Michelle, Leandro Augusto Pinto Pereira, Livia Câmara de Carvalho Galvão, Salete Meiry Fernandes*** pelo companheirismo e ajuda.

A ***Eliane de Mello Franco***, pelo auxílio, prestividade e amizade e ***Maria Elisa dos Santos***, secretária do departamento de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, pelo carinho, atenção e incentivo.

As minhas grandes amigas de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica ***Amanda Marcelino, Fabiana Izilda Bizo, Milena Komniski, Tarsila Cury, Priscila Morales*** pela amizade.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Resumo

A candidíase oral é uma infecção fúngica que tem sido relatada como problema de saúde pública e em decorrência de um crescente índice de cepas resistentes de *Candida* spp., tem-se aumentado o interesse em produtos naturais como fonte de novos compostos bioativos. Neste sentido, a própolis brasileira apresenta importantes propriedades farmacológicas como antimicrobiana e poderia ser estudada quanto à sua atividade antifúngica. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-*Candida* de três tipos de própolis brasileiras contra formas planctônicas e em biofilme de *Candida* spp. de maiores incidências em patologias da cavidade oral. Foram utilizados três tipos de própolis selecionadas por suas propriedades antimicrobianas em estudos prévios, os quais estão classificadas na literatura como: tipo 3 (interior do estado do Paraná), tipo 6 (região de mata atlântica do estado da Bahia) e tipo 13 (região de mangue da cidade de Maceió, estado de Alagoas). Para cada tipo de própolis foram obtidos o extrato etanólico (EEP) e suas respectivas frações com diferentes gradientes de polaridade (hexano, diclorometano e acetato de etila). Aos EEP e respectivas frações foram aplicadas as seguintes metodologias para avaliação da atividade antifúngica contra *Candida* spp. de forma a conduzir um estudo bioguiado: 1- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos EEP dos tipos 3, 6 e 13 e frações hexânica (fr-hex), diclorometânica (fr-dicloro) e acetato de etila (fr-acet) contra as formas planctônicas das leveduras, obtidas de um banco internacional de cepas *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS): *Candida albicans* (CBS 562), *Candida dubliniensis* (CBS 7987), *Candida glabrata* (CBS 07), *Candida krusei* (CBS 573), *Candida parapsilosis* (CBS 604), *Candida tropicalis* (CBS 94), pelo método da microdiluição. 2- Determinação da CIM das própolis 3 e 13 (EEP e respectivas frações diclorometânicas) sobre biofilmes em pré-adesão. 3- Verificação de possíveis alterações ou danos na estrutura celular das leveduras quando submetidas às própolis 3 e 13 (EEP e respectivas frações diclorometânicas) pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em biofilmes em pré-adesão e formados. De maneira geral, as própolis dos tipos 3 e 13 demonstraram forte atividade anti-*Candida* contra as leveduras analisadas (valores mínimos e máximos de CIM 4,0 e 31,3 µg/mL para EEP da própolis 3 e 1,0 e 7,8 µg/mL para EEP da própolis 13) em relação a do tipo 6 que

demonstrou baixa atividade. O EEP tipo 13 e respectiva fr-dicloro se destacaram, por apresentarem efeito fungicida contra todas as cepas analisadas com valores mínimos e máximos de CFM 125 e 500 $\mu\text{g/mL}$ para a fr-dicloro tipo 13. As própolis 3 e 13 (EEP e respectivas fr-dicloro) apresentaram atividade anti-biofilme em pré-adesão com valores máximos de 250 $\mu\text{g/mL}$ para EEP tipo 3 (*C. parapsilosis*) e 250 $\mu\text{g/mL}$ para fr-dicloro tipo 3 (*C. parapsilosis*) e CIM 125 $\mu\text{g/mL}$ para EEP tipo 13 (*C. tropicalis*) e 31,3 $\mu\text{g/mL}$ para fr-dicloro tipo 13 (*C. parapsilosis*). As imagens de MEV mostram a interferência dos EEP tipos 3 e 13 e respectivas fr-dicloro sobre biofilmes em pré-adesão, entretanto as própolis não foram capazes de desagregar completamente os biofilmes formados de *Candida* spp se comparadas ao grupo controle (Nistatina). Conclui-se que os três tipos de própolis estudadas apresentaram atividade anti-*Candida* tanto em organização planctônica quanto em biofilme, entretanto, a fração diclorometânica da própolis do tipo 13 é a fração ativa, que contém importantes compostos efetivos contra *Candida* spp. e pode ser fonte de novos princípios bioativos para prevenção ou tratamento da candidíase oral, a qual deve ser objeto de estudos futuros.

Palavras-chave: própolis, atividade anti-*Candida*, candidíase oral.

Abstract

Oral candidiasis is a fungal infection that has been reported as a public health problem and due to increased rate of resistant strains of *Candida* spp. has increased the interest in natural products as sources for new bioactive compounds. Brazilian propolis have important biological properties such as antimicrobial and anticariogenic activity, thus antifungal activity could also be evaluated. The aim of this study was to evaluate the anti-*Candida* activity of three Brazilian propolis against planktonic and biofilm forms of *Candida* spp. of higher incidences in oral cavity diseases. Three types of propolis were selected for antimicrobial properties in previous studies, which are classified in the literature as type 3 (within the state of Parana state), type 6 (Atlantic Rainforest of Bahia state) and type 13 (mangrove region, Maceió city, Alagoas state). For each type of propolis were obtained the ethanolic extract (EEP) and respective fractions with different gradient polarity (hexane, dichloromethane and ethyl acetate). The following methodologies were applied on EEP and correspondent fractions to evaluate antifungal activity against *Candida* spp. by a bioguided study: 1 - Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentrations (MFC) of EEP types 3, 6 and 13 and hexane (hex-fr), dichloromethane (dichlo-fr) and ethyl acetate (ethyl-fr) against planktonic forms of yeasts from an international bank *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS): *Candida albicans* (CBS 562), *Candida dubliniensis* (CBS 7987), *Candida glabrata* (CBS 07), *Candida krusei* (CBS 573), *Candida parapsilosis* (CBS 604), *Candida tropicalis* (CBS 94) using the microdilution method. 2 - Determination of MIC of propolis 3 and 13 (EEP and dichloromethane fractions) on preformed biofilm. 3 - Verification of possible changes or damages of the yeast cell structure when subjected to 3 and 13 propolis (EEP and dichloromethane fractions) by Scanning Electron Microscopy (SEM) in preformed and mature biofilms. In most cases, propolis types 3 and 13 demonstrated strong anti-*Candida* activity against the yeasts tested (minimum and maximum MIC values 4.0 and 31.3 µg/mL for EEP type 3 and 1.0 and 7.8 µg/mL for EEP type 13 compared to the low effect of propolis type 6. EEP type 13 and respective dichlo-fr had the best fungicidal effect against all strains (minimum and maximum MFC values 125 and 500

µg/mL). EEP type 3 and 13 and their dichlo-fr presented anti-biofilm activity 250 µg/mL for EEP type 3 (*C. parapsilosis*), 250 µg/mL for dichlo-fr type 3 (*C. parapsilosis*) and (maximum MIC 125 µg/mL for EEP type 13 (*C. tropicalis*), 31.3 µg/mL for dichlo-fr type 13 (*C. parapsilosis*). SEM images show the influence of propolis samples on preformed biofilms, however these samples were not capable of completely disrupting the mature biofilms, if compared to control (Nistatin). Thus, we concluded that the three types of propolis studied presented anti-*Candida* activity both in organization and in planktonic biofilm, however, the dichloromethane fraction of propolis type 13 is the active fraction, which contains important compounds effective against *Candida* spp. and could be a source of new bioactive principles for prevention or alternative treatment of oral candidiasis, which should be the object of future studies.

Keywords: propolis, anti-*Candida* activity, oral candidiasis.

Sumário

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 - <i>Anti-Candida</i> activity and Chemical Composition of Brazilian propolis from <i>Apis mellifera</i>	7
CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
APÊNDICE	43
ANEXO - Confirmação de submissão do artigo	70

INTRODUÇÃO

Produtos de origem natural formam a base da medicina tradicional há milhares de anos. Um registro farmacêutico egípcio, data 1500 a.C., denominado “Ebers Papyrus”, menciona mais de 700 drogas e fórmulas como líquidos para gargarejo, aromas, infusões, leite, vinho, mel comumente usados como veículos (Newman *et al.*, 2000), inclui-se também a própolis utilizada pela civilização egípcia para embalsamar cadáveres ou como parte do preparo do complexo processo de mumificação.

A busca por substâncias ativas puras começou em 1780 com o trabalho de Scheele, um renomado pesquisador, quem trabalhou com ácidos orgânicos de plantas. Princípios bioativos foram muito procurados, quando no início do século XIX, a investigação de diversas plantas medicinais, conduziram à descoberta de alguns dos mais importantes alcalóides biologicamente ativos: morfina, atropina, papaverina e codeína (Cordell, 2000).

Pesquisas que envolvem fontes naturais, tem culminado na descoberta de muitos fármacos importantes para o tratamento de doenças humanas de alta prevalência (Shu, 1998). A relevância destas fontes naturais se confirma através dos números relacionados às novas drogas em uso neste contexto. Dentre as aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) ou órgãos compatíveis em outros países de 1981 a 2006, 6% são essencialmente de origem natural, 57% são derivados de produtos naturais e 37% são drogas sintéticas (Newman *et al.*, 2003; 2007; Cragg *et al.*, 2009).

Segundo Clard & Walsh (2004), os produtos naturais apresentam rica e complexa diversidade moleculares, que muitas vezes limitam a síntese química destes compostos ou modificações estruturais para otimização das suas ações terapêuticas. O isolamento, identificação e síntese destes compostos são procedimentos que iniciaram uma nova era de investigações de compostos ativos.

Dentre os produtos de origem natural, destaca-se a própolis, que é uma complexa resina de coloração e consistência variadas produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera* pela coleta de resinas de diversas partes das plantas como brotos, botões florais (Ghisalberti, 1979; Bonhevi *et al.*, 1994; Burdock 1998; Silva *et al.*, 2008). Sua

composição química também é variável, dependente da biodiversidade e efeitos sazonais apresentados pela região de polinização (Park *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2004, 2007).

Burdock (1998) relatou que a coloração da própolis pode variar do amarelo esverdeado ao marrom escuro dependendo da origem e tempo decorrido desde sua produção. Sua composição geralmente é representada por 50% de resinas e bálsamos vegetais, 30% de ceras, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outros materiais orgânicos.

A própolis destaca-se pelas suas importantes propriedades biológicas, como antimicrobianas, antiinflamatórias, cicatrizante, anestésica, antitripanossomal (Sforcin *et al.*, 2000; Marcucci *et al.*, 2001; Montpied *et al.*, 2003; Cunha *et al.*, 2004; Ayres *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007; Solomão *et al.*, 2008; Popova *et al.*, 2009), anticariogênica (Park *et al.*, 1998a, 1998b; Koo *et al.*, 2000a, 2000b, 2002; Rosalen *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2003, 2006a, 2006b), antiviral, anticarcinogênica, antioxidante (Kujumigiev *et al.*, 1999; Alencar, 2002; Chen *et al.*, 2003; Kumazawa *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2007, Alencar *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2009; Avci *et al.*, 2010) entre outras, que são relacionadas à composição química específica de cada tipo de própolis. Estas propriedades biológicas, em sua maioria, têm sido associadas aos compostos da classe dos flavonóides presentes em vários tipos de própolis (Burdock, 1998).

No Brasil, a própolis é classificada como medicamento opoterápico, que são preparações a partir de secreções de animais; em relação à própolis, abelhas (ANVISA, 2010), sendo classificado pelo FDA nos EUA como GRAS (*Generally Recognized as Safe*).

As própolis brasileiras foram classificadas em 13 tipos segundo o perfil químico (Park *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2008). As principais origens botânicas das própolis estudadas dos tipos 3 (região Sul do Brasil), 6 (região Nordeste do Brasil) e 13 (região de mangue da cidade de Maceió, estado de Alagoas, região Nordeste do Brasil), são relacionadas as resinas da *Populus sp.*, a *Hyptis divaricata* e *Dalbergia ecastophillum*, respectivamente.

A própolis dos tipos 3 e 6 têm sido muito estudadas pelo nosso grupo de pesquisa e aparece como um promissor agente anticárie e antiplaca, por suas propriedades

antimicrobianas e sua capacidade de reduzir os fatores de virulência associados aos micro-organismos causadores de cárie dental, bem como a produção de ácidos, a síntese de glucanos solúveis e insolúveis em água, entre outros (Park *et al.*, 1998a, 1998b; Koo *et al.*, 2000a, 2000b, 2003; Duarte *et al.*, 2003; Hayacibara *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2006).

A própolis tipo 3 é composta prevalentemente por flavonóides, terpenóides e ácidos fenólicos que são considerados as principais classes de compostos bioativos da própolis (Ghisalberti, 1979; Bankova *et al.*, 1982, 1996; Koo *et al.*, 1999; Bankova *et al.*, 2005). Apesar dos flavonóides agliconas serem considerados as classes químicas biologicamente ativas das própolis (Ghisalberti, 1979; Bankova *et al.*, 1982, 1996; Koo *et al.*, 1999), outros compostos também estão envolvidos, como os derivados do ácido cinâmico e seus ésteres (Ikeno *et al.*, 1991; Koo *et al.*, 1999) e os diterpenos (Bankova *et al.*, 1996).

A própolis tipo 6, tem um perfil químico diferente dos outros tipos de própolis, determinado pela ausência completa de flavonóides e derivados de ácido cinâmico e pela presença de uma grande quantidade de compostos apolares de cadeia longa, e também pela presença de uma benzofenona prenilada denominada Plukenetiona H, que é relacionada a atividade antimicrobiana deste tipo de própolis (Castro *et al.*, 2009).

A própolis do tipo 13, conhecida como própolis vermelha brasileira é composta em grande parte, por isoflavonóides, uma subclasse dos flavonóides, cujo consumo é relacionado a inúmeros benefícios a saúde. Dietas ricas em isoflavonóides parecem prevenir problemas de saúde relacionados a menopausa, doenças cardiovasculares, osteoporose, câncer de cólon de útero e próstata (Greenwood *et al.*, 2000; Luthria *et al.*, 2007). Segundo Campo Fernandez *et al.* (2008), os isoflavonóides constituem um distinto grupo de origem natural derivados de compostos fenilpropanóides, sendo abundantes em soja e outras plantas leguminosas.

As atividades antimicrobianas relatadas pelas própolis brasileiras dos tipos 3, 6 e 13 e suas complexidades químicas, despertam interesse e fomenta pesquisas para identificação e isolamentos de compostos bioativos das própolis que atuem no tratamento ou prevenção de patologias causadas por fungos, por exemplo.

Os fungos são microrganismos eucariotos, podendo ser unicelulares ou pluricelulares. O gênero *Candida* pertence à família Crytoccaceae, da classe Ascomycetes e filo Ascomycota e é caracterizado por leveduras que apresentam formas arredondadas ou ovais e reproduzem-se por brotamento ou gemulação (Guarro, 1998).

Estas leveduras comumente são encontradas no meio ambiente, mas estão presentes também na mucosa normal do homem em simbiose a outros microrganismos. Podem colonizar superfícies dentárias conhecidas como biofilme dental ou placa dental, coagregando-se à bactérias presentes, ou ainda, aderindo-se diretamente à película salivar (Arendorf & Walker, 1980; Bagg & Silverwood, 1986; Nikawa *et al.*, 1998a, 1998b).

A maioria das infecções em seres humanos ocasionadas por leveduras do gênero *Candida* originam-se de cepas comensais, que habitavam superfícies mucosas como cavidade oral, vaginal ou o trato gastrointestinal, anteriormente à infecção (Kam & Xu, 2002). Sob determinadas condições, estes fungos podem adquirir a forma patogênica e provocar o aparecimento de lesões frequentes em crianças ou pacientes imunodeprimidos (Menezes *et al.*, 2005).

A candidíase bucal é considerada a mais frequente infecção fúngica da cavidade oral humana e *Candida albicans* é também a principal espécie relacionada, embora as espécies não-*albicans*, tais como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*, dentre outras, estejam sendo comumente encontradas em alguns grupos de pacientes (Pfaller, 1995; Xu *et al.*, 1999; Repentigny *et al.*, 2004; Menezes *et al.*, 2005).

Segundo Menezes *et al.*, (2007) vários fatores são citados como responsáveis pela ocorrência das patologias orais ocasionadas pelas leveduras do gênero *Candida*, alguns são relacionados ao hospedeiro e outros à própria levedura. Os mais citados relacionados ao hospedeiro são: diabetes *mellitus* (DM), perda de dentes, restaurações, aparelhos (ortodônticos e protéticos), mudanças de hábitos alimentares, higiene oral, doenças sistêmicas, alterações hormonais, certas drogas sistêmicas e locais, imunodepressão, radiação e quimioterapia.

Entre os fatores relacionados à levedura (também denominados fatores de virulência) encontram-se o fenômeno de aderência (adesina), a forma miceliana, a variabilidade fenotípica, a produção de enzimas extracelulares (protease e fosfolipase) e as

toxinas. A patogenia das *Candida* spp. está relacionada a uma combinação de fatores que contribuem para a sua virulência, destacando-se a produção de enzimas extracelulares, como a proteinase e a fosfolipase, como um dos principais mecanismos de virulência (Menezes *et al.*, 2007) capazes de promover destruição nas membranas celulares por meios hidrolíticos (Menezes *et al.*, 2005).

Em infecções fúngicas provocadas por *Candida*, a identificação da espécie é importante, uma vez que a patogenicidade e a sensibilidade a um determinado antifúngico são variáveis entre as diferentes espécies (Mímica *et al.*, 2009).

O uso difundido de antifúngicos azólicos para tratamento da candidíase oral parece ser um fator preponderante no aumento da frequência de espécies de *Candida* não-*albicans*, especialmente aquelas naturalmente mais resistentes a esta classe de antifúngicos, tais como *C. glabrata* e *C. krusei* (Dronda *et al.*, 1996). Estudos recentes indicam uma crescente resistência entre espécies de *Candida* aos antifúngicos disponíveis no mercado (Begnami, *et al.*, 2010).

Antifúngicos da classe dos azólicos e poliênicos são alguns dos medicamentos mais utilizados no tratamento de infecções fúngicas e, particularmente o fluconazol e a nistatina, são considerados fármacos de escolha no tratamento da candidíase oral (Odds *et al.*, 2003; Furletti, 2007). O mecanismo de ação do fluconazol visa a via biossintética do ergosterol, através da inibição da enzima 3A do citocromo P-450, lanosina 14 α -desmetilase, que é responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, o principal esterol da membrana celular fúngica (Rangue & Dale, 2007).

A depleção do ergosterol, altera a permeabilidade da membrana do fungo, interferindo na ação das enzimas associadas a membrana e na formação da parede celular, resultando na perda da capacidade de replicação do microrganismo (Odds *et al.*, 2003; Rangue & Dale, 2007)

Um inconveniente dos azólicos é que eles são dependendo da concentração, fungistáticos e não fungicidas, fato que pode contribuir para o desenvolvimento de resistência nos isolados clínicos (Furletti, 2007). A resistência aos antifúngicos azólicos pode ser consequência da mutação de sítios alvos ou um aumento da expressão gênica de proteínas responsáveis pelo transporte do antifúngico para o meio externo, ou ainda, a

associação destes dois mecanismos, o que tem sido verificado em isolados de *C. albicans* (Odds *et al.*, 2003).

Comparada às infecções bacterianas, poucas drogas estão disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas, em parte, devido ao aumento na incidência de cepas resistentes aos antifúngicos atuais e a toxicidade destes medicamentos, provocada pela natureza eucariótica dos fungos, que dificultam a identificação de sítios alvos específicos, não compartilhados pelo hospedeiro.

Este fato, tem impulsionado a crescente busca por novos agentes antimicrobianos de fontes naturais e a própolis surge como importante aliada por apresentar ampla diversidade de compostos ativos, muitos ainda desconhecidos, com propriedades biológicas relatadas, podendo viabilizar a descoberta de novas moléculas bioativas para tratamentos de patologias orais.

Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo bioguiado quanto a atividade anti-*Candida* de três tipos de própolis brasileiras contra formas planctônicas e em biofilme de *Candida* spp. de maiores incidências em patologias da cavidade oral.

CAPÍTULO 1

Esta dissertação está de acordo com a Informação CCPG/002/06, UNICAMP, que regulamenta o formato alternativo para dissertação e tese, permitindo a inserção de artigo(s) científico(s) de autoria ou co-autoria do candidato.

Assim sendo, este capítulo é composto por um estudo em fase de submissão em revista científica conforme descrito abaixo:

Estudo: “Anti-*Candida* activity and Chemical composition of Brazilian propolis from *Apis mellifera*”.

Autores: Vanessa Cristina Pin Piazzentin Queiroz, Vivian Fernandez Furletti, Masaharu Ikegaki, Hyun Koo, Severino Mathias Alencar, Marta Cristina Teixeira Duarte, Pedro Luiz Rosalen.

Submetido a Revista Minerva Stomatológica, sob número: Stomatol-3311 (Anexo, p.70).

Anti-*Candida* activity and Chemical Composition of Brazilian propolis from *Apis mellifera*

Vanessa Cristina Pin Piazzentin Queiroz^a, Vivian Fernandez Furletti^b, Masaharu Ikegaki^c, Hyun Koo^d, Severino Mathias Alencar^e, Marta Cristina Teixeira Duarte^b, Pedro Luiz Rosalen.^{a*}

^a Department of Physiological Sciences, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), 901 Limeira Av., Zip Code 13414-018, Piracicaba, SP, Brazil.

^b Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center (CPQBA), University of Campinas (UNICAMP) Box. 6171, Zip Code: 13081-970, Campinas, SP, Brazil.

^c Federal University of Alfenas, Zip Code: 37130-000, Alfenas, Minas Gerais, Brazil.

^d School of Medicine and Dentistry, University of Rochester, 601 Elmwood Av., Box 611, Rochester, NY, USA.

^e Department of Agri-food industry, Food and Nutrition, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", University of São Paulo (USP), 11 Pádua Dias Avenue, Zip Code: 13418-900, Piracicaba, SP, Brazil.

*Corresponding author:

Phone +55 19 2106-5208; fax: +55 19 2106-5250.

rosalen@fop.unicamp.br

Abstract

Oral candidiasis infection is an important concern for oral health due to the virulence, resistance and pathogenesis of *Candida* spp. The aim of this study was realize a bioguided study to evaluate anti-*Candida* activity of Brazilian propolis types 3, 6, and 13 against planktonic cells and biofilms of *Candida* spp.; and in addition to analyze the chemical composition of ethanolic extracts (EEP) and fractions of these propolis. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Fungicidal Concentration (MFC) of EEP and fractions of propolis were screened against the planktonic cells of *Candida albicans* (CBS 562), *Candida dubliniensis* (CBS 7987), *Candida glabrata* (CBS 07), *Candida krusei* (CBS 573), *Candida parapsilosis* (CBS 604), and *Candida tropicalis* (CBS 94). MIC test was determined for EEP types 3, 13 and respective active fractions against preformed biofilms; and the effect of these samples was observed against preformed and mature biofilms by Scanning Electron Microscopy (SEM). The GC-MS technique was used to determine the chemical composition of EEP and dichloromethane fraction (dichlo-fr) which was the active fraction. All EEPs from propolis types 3, 6 and 13 showed anti-*Candida* activity. Dichlo-fr type 13 (red propolis) was considered the most effective as this fraction showed fungicidal effect for all strains with minimum and maximum MFC values of 125 µg/mL and 500 µg/mL, respectively. EEP type 6 revealed fungistatic effects against most of the strains and EEP type 3 showed fungicidal activity against three different *Candida* spp. strains tested (MFC 250-500 µg/mL). Propolis 3, 13 (EEP) and the respective dichloromethane fraction interfered in biofilm formation and integrity, however did not desegregate the structure of the mature biofilm. Isoflavonoid compounds in propolis 13 and flavonoids and ester of phenolic acids in propolis 3 were detected using GC-MS. Our results showed anti-*Candida* activity in all the propolis studied, however propolis type 13 (red) presented the best results with fungicidal activity against all strains and could be a target for future research; such as isolation of bioactive compounds and *in vivo* studies.

Keywords: propolis, anti-*Candida* activity, red propolis, isoflavonoids, oral candidiasis.

1. Introduction

Propolis has been used in folk medicine as a therapeutic agent for centuries. This fact is justified by the remarkable pharmacological properties of propolis (Alencar et al., 2007) such as anti-inflammatory activity (Marcucci et al., 2001), antimicrobial activity (Popova et al. 2009, Solomão et al., 2008, Ferreira et al., 2007); antioxidant (Ahn et al., 2007, Alencar et al., 2007, Kumazawa et al., 2004), anticarcinogenic (Chen et al., 2003, Li et al., 2008, Castro et al., 2009; Avci et al., 2010), among other properties described.

However, the constituents of each propolis type vary widely and depend up on the biodiversity and seasonality of the collection region. These environmental features lead to a qualitative and quantitative variability of the propolis chemical profile (Marcucci et al., 2000, Saltino et al., 2005; Castro et al., 2007).

Brazilian propolis was classified into 13 types according to the chemical composition (Park et al., 2000, Silva et al., 2008). Propolis types 3 (South Brazil), 6 and 13 (Northeast Brazil) have been described as important sources of chemical agents (Silva et al., 2008; Alencar et al. 2007). The chemical composition of propolis type 3 contains a well-known class of flavonoid compounds, considered the major bioactive compounds of this propolis (Ghisalberti, 1979, Bankova et al., 1982, 1996, Koo et al., 1999). However, propolis type 6, has a different chemical profile, noteworthy owing to the complete absence of flavonoids and to the presence of prenylated benzophenone (Castro et al., 2009).

Propolis type 13, namely Brazilian red propolis, is rich in isoflavones (Alencar et al., 2007); and according to Trusheva et al. (2006), some of the isoflavones of the red propolis, are important antimicrobial components, especially against *Candida albicans*. Alencar et al., 2007, presented the antimicrobial activity of propolis type 13 against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. Siqueira et al., (2009) demonstrated the effective antifungal activity of the alcoholic extract of red propolis, using the microdilution method and correlating this to the high concentration of flavonoids and phenolic acids present in this type of propolis.

Our research group has intensively studied Brazilian propolis types 3 and 6 as a natural source of compounds with bactericide activity against *Streptococcus mutans* and the effects on the virulence factors, such as inhibition of adherence cells on dental enamel

surface by inhibition of glucosyltransferase and consequent production of soluble and insoluble glucans, inhibition of acid production and anti-caries effect demonstrated in the experimental rat caries model (Park et al., 1998a;b; Koo et al., 1999, 2000a,b; Duarte et al., 2003 and Hayacibara et al., 2005).

There is a rising interest in discovering new bioactive compounds from natural sources that could be effective in treating or preventing several human diseases, especially in maintaining the oral mucosa healthy. Infections caused by opportunistic microorganisms, especially *Candida* spp., are very frequent and are considered a public health problem, these infections are responsible for severe lesions in the oral mucosa (candidiasis), and in specific cases, may advance to serious systemic infections (Begnami, et al., 2010; Menezes et al., 2005).

Candida albicans has often been described as one of the main yeasts related to human oral diseases (Obando-Pereda et al., 2008). However, for the last couple of decades an increased incidence of infection caused by non-albicans species such as *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida dubliniensis*; has been observed (Van Asbeck et al., 2009; Menezes et al., 2005, 2007).

Compared to bacterial infections, there is a restricted number of drugs available for the treatment of infections caused by fungi (Newman et al., 2003) and recent studies indicate a growing resistance developed by *Candida* species to the antifungal agents available, which could be related to the extensive use of a number of drugs (Begnami et al., 2010). Currently, approximately 25-50% of the drugs are derived from natural products, however up to the present moment, none with antimicrobial indication (Duarte et al., 2007). Hence, propolis could be an important natural source of bioactive compounds, representing an efficient, safe, and low-cost alternative for the management of oral candidiasis.

This study was designed to evaluate the activity of propolis types 3, 6 and 13 against planktonic and biofilm of *Candida* spp. Furthermore, this study aims to define the chemical profile of the active extracts and fractions of propolis.

2. Material and methods

2.1. Propolis samples and fractionation

Samples of crude Brazilian propolis types 3, 6 and 13 produced by *Apis mellifera* bees were collected throughout different regions of Brazil, such as type 3 (South Brazil); type 6 (Atlantic Rainforest, Bahia State, Northeast Brazil) and type 13 (Maceio City, Alagoas State, Northeast Brazil). The samples were collected during the period from January to March 2008, based on Castro et al. (2007) and Silva et al. (2008). The propolis samples (100 g) were extracted with 80% ethanol (v/v) (450 mL) in a water bath, at 70 °C for 30 min and then filtered to obtain the ethanolic extract (EEP). EEP was further partitioned by a liquid-liquid extraction with hexane (hex-fr), dichloromethane (dichlo-fr) and ethyl acetate (ethyl-fr). The resulting fractions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using anisaldehyde reagent (4-methoxy-benzaldehyde, acetic-acid, sulfuric acid/1.0:48.5:0.5), followed by heating at 100 °C for 5 min. Fluorescent substances were visualized under UV light at wavelengths 254 and 366 nm (Alencar et al., 2007) for all samples of propolis analyzed (EEP and fractions). The UV-VIS Spectra (200-500 nm) of EEP propolis and fractions were also used to monitor the fractionation process. EEP types 3, 6 and 13 were concentrated in an under vacuum at 70 °C, freeze-dried and the resulting yield of crude extract was 58.46%, 20.52% and 42.62%, respectively.

This investigation was carried out as a bioguided study meaning the answers obtained by biologic assays were used as a guide to select the propolis and fractions containing the chemically active compound against *Candida* spp.

2.2 . Anti-*Candida* assays

2.2.1. Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

Standard strains of different *Candida* species *C. albicans* CBS 562, *C. dubliniensis* CBS 7987, *C. glabrata* CBS 07, *C. kruzei* CBS 573, *C. tropicalis* CBS 94 and *C. parapsilosis* CBS 604 were obtained from the international bank of microorganisms “Centraalbureau voor Schimmelcultures” (CBS). These strains were chosen for research as they represent species of major incidence in oral cavity diseases, such as oral candidiasis.

The yeasts were grown overnight at 36 °C in Sabouraud Dextrose Agar (SDA-Merck) plates, and inocula for the assays were prepared using the microdilution method,

following the recommendations of the M27-A2 protocol for yeasts (CLSI, 2002), by diluting cell mass in 0.85% NaCl solution, adjusting the turbidity to McFarland scale 0.5 and confirming by spectrophotometric reading at 530 nm. Cell suspensions were finally diluted to 10^3 UFC/mL.

A tissue culture test plate (96 wells) was used and 2% alcoholic extract of the propolis was transferred into the first well, serial dilutions were then performed to reach a concentration in the range of 0.2-500 μ g/mL. The yeast inoculum was added to all wells and the plates were incubated at 36 °C for 48 h. Anti-*Candida* activity was detected by adding 20 μ L of 0.5% triphenyltetrazolium chloride (TTC, Merck) aqueous solutions. MIC was defined as the lowest concentration of extract that inhibited visible growth, as indicated by the TTC staining (dead *Candida* spp. cells were not stained by TTC). Tests were carried out in triplicate.

2.2.2. Minimal Fungicidal Concentration (MFC)

Based on the results obtained from the MIC test (2.2.1) aliquots of suspensions from the wells where there was no visible growth of yeast were used. Aliquots of 20 μ L were removed from these wells and subcultured in Petri dishes containing SDA medium. The plates were incubated at 30 °C for five days. MFC was considered the lowest concentration of the compound where there was no cell growth on the surface of inoculated agar (CLSI, 2002). The tests were carried out in triplicate.

2.3. Biofilms assays

2.3.1. MIC test from preformed biofilm.

The effect of the propolis samples was evaluated when applied after pre-adhesion (3 h). For this study, 96 well tissue culture plates were used (TPP) containing RPMI-1640 medium with 2% sucrose and the tested *Candida* spp. cells (1.0×10^3 cells/mL). The plates were incubated at 37 °C for 3 h to promote initial cell adhesion and after this period propolis samples were applied at decreased concentrations (500-0.2 μ g/mL) in each specific well. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. Biofilm inhibition was detected by adding 20 μ L of 0.5% triphenyltetrazolium chloride (TTC,

Merck) aqueous solution. MIC was defined as the lowest concentration of extract that inhibited visible growth, as indicated by the TTC staining (dead *Candida* spp. cells were not stained by TTC).

2.3.2 Scanning Electron Microscopy (SEM) of preformed and mature biofilms.

SEM was used for cellular integrity evaluation of preformed and mature biofilms.

Biofilms were formed on wells of tissue culture plates, by adding RPMI-1640 medium with 2% sucrose and the tested *Candida* spp. cells (1.0×10^3 cells/mL). The plates were incubated at 37 °C during 3 h (period of initial cell adherence) and after this period propolis samples were applied at 500 µg/mL in the specific well and incubated for 24 h under similar conditions. Nystatin was used as the positive control at 1 mg/mL. After this period, non-adhered microorganisms were removed by PBS (phosphate buffer solution) washing. The resulting cell pallets in each well were fixed in 2.5% glutaraldehyde 0.15 M PBS (v/v) for 1h at room temperature. The wells were washed in an increasing ethanol series (50%, 70%, 90% and 100%) and then dried completely. The plates were sputter-coated with gold and the images were observed under SEM (5600 LV). Anastomosis cells were examined and compared to controls as described by Obando-Pereda et al., 2008, modified for this study.

The evaluation of the mature biofilm was carried out as described above, except for incubation time; yeasts were initially grown during 24 h aiming biofilm formation prior to the addition of propolis samples.

2.4 . Chemical Composition of propolis and fractions

2.4.1. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).

Constituents of propolis samples 3 and 13 (EEP and dichloromethane fraction) were identified using a gas chromatograph GC 2010 (Shimadzu Co.) coupled to a mass spectrometer QP 2010 Plus (Shimadzu Co.). Approximately 5 mg of freeze-dried propolis was added to 100 µL of derivatizing reagent N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluor acetamide (MSTFA). The mixture was homogenized and heated at 70 °C for 10 min. The reagent was

then evaporated under nitrogen gas flow and the derivatization product (trimethylsilyl derivatives - TMS) was diluted again in hexane (600 to 800 μ L). After homogenization, the supernatant was transferred to another vial that followed injection in GC-MS. The samples were separated on a capillary column (RTX5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). The temperature program started at 80 $^{\circ}$ C (1 min), the heating rate of 20 $^{\circ}$ C/min reached 250 $^{\circ}$ C (1 min), then 300 $^{\circ}$ C (5 min) at a rate of 6 $^{\circ}$ C/min, up to 310 $^{\circ}$ C (5 min) at a rate of 15 $^{\circ}$ C/min, up to 320 $^{\circ}$ C (10 min) at a rate of 20 $^{\circ}$ C per minute. The total time of analysis was 67 min. Helium was used as the carrier gas. The injector temperature was 280 $^{\circ}$ C and injection volume was 0.5 μ L in *Splitless* mode. The interface was maintained at 280 $^{\circ}$ C and the detector was operated in *scanning* (m/z 40-800) mode. Integration was carried out using the LabSolutions-GC-MS software. Flavonoids, phenolic acids and derivatives were identified by comparison with data obtained from GC-MS (retention time and ion fragmentation) of silane and authentic standards eluted under the same conditions and with the Wiley 8 library.

3. Results

3.1. Anti-Candida assays

MIC values obtained from EEP types 3, 6 and 13 are shown in Table 1. Most propolis samples showed MIC values below 62.5 μ g/mL against all yeasts, however, propolis type 6 showed no inhibition against *C. parapsilosis* until the maximum tested concentration was reached (500 μ g/mL).

EEP type 13 presented the lowest MIC values for most yeasts (minimum/maximum MIC values 1.0 and 7.8 μ g/mL for *C. dubliniensis* and *C. glabrata*, respectively and fungicidal effect (MFC) against all yeasts: minimum MFC value 250 μ g/mL for *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* and maximum MFC value 500 μ g/mL for *C. krusei* and *C. tropicalis*, furthermore, EEP type 13 showed MIC values close to those observed for nystatin, the antifungal drug used as the test reference (range MIC values from 0.5 to 1.0 μ g/mL and MFC values between 2.0 and 15.6 μ g/mL).

EEP type 3 demonstrated minimum/maximum MIC values of 4.0 and 31.3 µg/mL *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, respectively. EEP type 3 showed fungicidal activity only against *C. glabrata* (minimum MFC value 250 µg/mL) and *C. dubliniensis* and *C. krusei* (maximum MFC value 500 µg/mL).

EEP type 6 presented minimum MIC values of 1.0 µg/mL for *C. albicans* and ineffective activity for (MIC value > 500 µg/mL) *C. parapsilosis*. EEP type 6 demonstrated fungistatic effect against all the strains studied.

Table 1. Anti-*Candida* activity (MIC and MFC, µg/mL) of propolis EEP types 3, 6 and 13.

<i>Candida</i> spp.	Types of Propolis (EEP)						Control (Nystatin)	
	3		6		13 (red)			
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. albicans</i> CBS 562	4.0	#	1.0	#	2.0	250 *	0.5	7.8 *
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	4.0	500 *	2.0	#	1.0	250 *	0.5	4.0 *
<i>C. glabrata</i> CBS 07	7.8	250 *	2.0	#	7.8	250 *	1.0	2.0 *
<i>C. krusei</i> CBS 573	15.6	500 *	7.8	#	4.0	500 *	0.5	15.6 *
<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	31.3	#	#	#	4.0	250 *	1.0	2.0 *
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	31.3	#	62.5	#	2.0	500 *	0.5	2.0 *

MIC and MFC unit: µg/mL

Fungistatic action = MIC and MFC > 500 µg/mL

* Fungicidal action

Control: Ethanol 2% (v/v).

Upon the results of MIC and MFC of EEP of propolis types 3, 6 and 13 previously described, and based on in the bioguide strategy to select the promising EEP to continue the further assays, we decided to select the EEP of propolis types 3 and 13 for further testing due to their fungicidal effect and eliminated propolis type 6 from this point.

MIC and MFC values of propolis fractions types 13 and 3 showed the lowest values (Table 2). MIC values of hex-fr, dichlo-fr and ethyl-fr from propolis type 13 showed anti-*Candida* activity, most of them below 16 $\mu\text{g/mL}$. Dichlo-fr alone showed fungicidal effect for all the *Candida* spp. yeasts studied, with the same result for the respective EEP. Hex-fr and ethyl-fr presented fungistatic effect; ethyl-fr however, also presented fungicidal effect against *C. dubliniensis*. For type 3, all fractions showed MIC values below 126 $\mu\text{g/mL}$ against all strains analyzed.

Propolis type 3 dichlo-fr presented minimum/maximum MIC values of 1.0 and 62.5 $\mu\text{g/mL}$ for *C. glabrata* and *C. parapsilosis*, respectively. Compared to the respective EEP, propolis type 3 dichlo-fr presented similar MIC values for *C. dubliniensis*, *C. krusei* and *C. tropicalis* and even lower values for *C. albicans* and *C. glabrata*. Dichlo-fr type 3 demonstrated fungicidal effect against *C. dubliniensis* (MFC 250 $\mu\text{g/mL}$) and *C. glabrata* (MFC 500 $\mu\text{g/mL}$) and due to the high yield was considered for further analysis.

In general, fractions of propolis 13 demonstrated lower anti-*Candida* values and fungicidal action than the fractions of propolis type 3 analyzed against the tested strains.

3.2. Biofilm assays

EEP of propolis types 13 and 3 and the respective dichloromethane fractions, previously chosen as the active fractions by bioguided study, were selected for biofilm assays. The others fractions of propolis types 13 and 3, such as, hex-fr and ethyl-fr of propolis were eliminated because the fungistatic effect for most of the strains (undesired in this study) or lower yield. MIC values determined for preformed biofilms (3 h cells adherence) reported anti-*Candida* activity at maximum MIC values 125 $\mu\text{g/mL}$ for EEP type 13 (*C. tropicalis*); 31.3 $\mu\text{g/mL}$ for dichlo-fr type 13 (*C. parapsilosis*) and 250 $\mu\text{g/mL}$ for EEP type 3 (*C. parapsilosis*); 250 $\mu\text{g/mL}$ for dichlo-fr type 3 (*C. parapsilosis*). The

samples were not effective against preformed biofilms of *C. krusei* at the tested range concentration (0.2-500 µg/mL).

SEM pellets images from preformed and mature biofilm showed that all samples, EEP types 3 and 13 and their dichlo-fr, interfered in the preformed biofilms at 500 µg/mL, however, the mature biofilm was not completely disintegrated, by EEP or by dichlo-fr samples of both propolis at 500 µg/mL. Areas of cellular damage were observed for all samples.

Figures 1 and 2 illustrate the effects of samples of propolis types 3 and 13 and their dichlo-fr against preformed and mature biofilms of *C. glabrata*. Both preformed and mature biofilms, of the other yeasts tested, were similarly affected.

Table 2: Anti-*Candida* activity (MIC/MFC – µg/mL) of fractions propolis types 3 and 13.

<i>Candida</i> spp.	Hex-fr				Dichlo-fr				Ethyl-fr				Control (Nystatin)	
	MIC		MFC		MIC		MFC		MIC		MFC		MIC	MFC
Propolis Types	3	13	3	13	3	13	3	13	3	13	3	13		
<i>C. albicans</i> CBS 562	7.8	0.5	#	#	2.0	7.8	#	125 *	4.0	4.0	#	#	0.5	7.8 *
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	7.8	0.5	500 *	#	4.0	2.0	250 *	125 *	2.0	2.0	500 *	500 *	0.5	4.0 *
<i>C. glabrata</i> CBS 07	7.8	2.0	500 *	#	1.0	2.0	500 *	250 *	2.0	4.0	125 *	#	1.0	2.0 *
<i>C. krusei</i> CBS 573	15.6	0.2	#	#	15.6	0.2	#	250 *	15.6	2.0	500 *	#	0.5	15.6 *
<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	125	2.0	#	#	62.5	7.8	#	500 *	31.3	15.6	#	#	1.0	2.0 *
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	125	0.5	#	#	31.3	4.0	#	250 *	62.5	15.6	#	#	0.5	2.0 *

MIC and MFC unit: µg/mL

Fungistatic action = MIC and MFC > 500 µg/mL

* Fungicidal action

Control: Ethanol 2% (v/v).

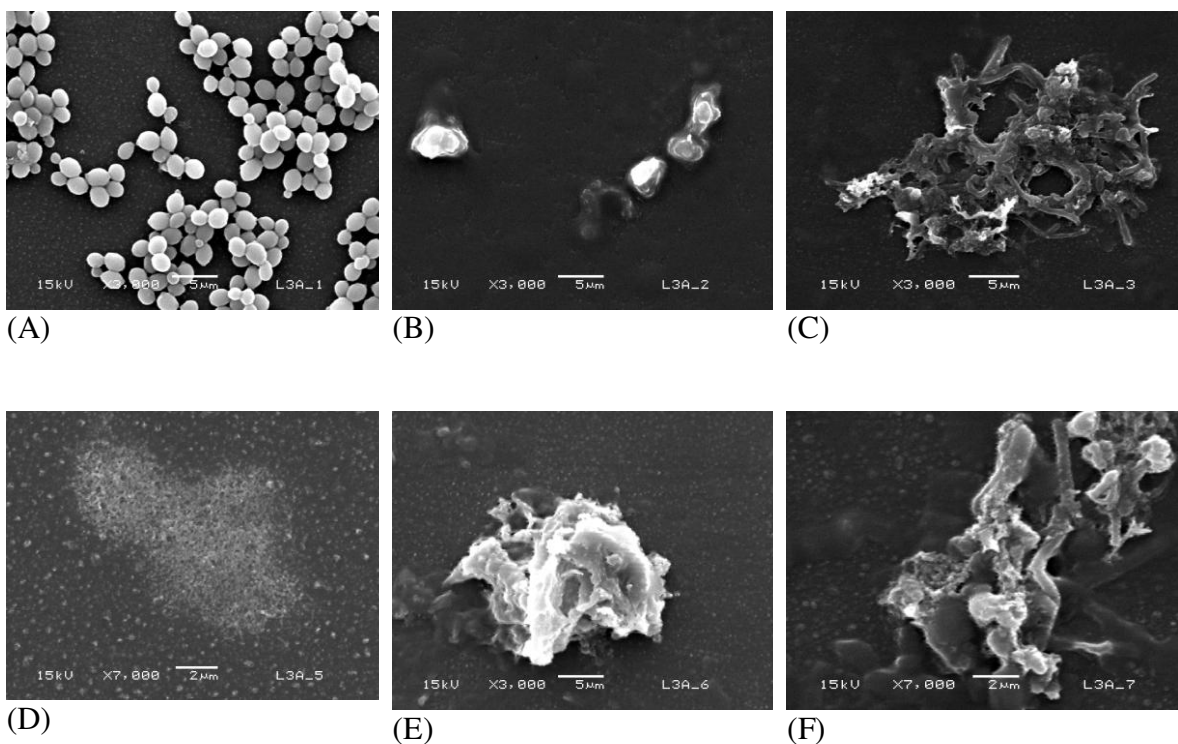


Figure 1: Preformed biofilms of *Candida glabrata* CBS 07. (A) Preformed biofilm of *C. glabrata* (SEM, X 3.000); (B) Effect of EEP type 3 on preformed biofilm of *C. glabrata* (SEM, X 3.000); (C) Effect of dichlo-fr type 3 on preformed biofilm of *C. glabrata* (SEM, X 3.000); (D) Effect of Nystatin on preformed biofilm of *C. glabrata* (SEM, X 7.000); (E) Effect of EEP type 13 on preformed biofilm of *C. glabrata* (SEM, X 3.000); (F) Effect of dichlo-fr type 13 on preformed biofilm of *C. glabrata* (SEM, X 7.000).

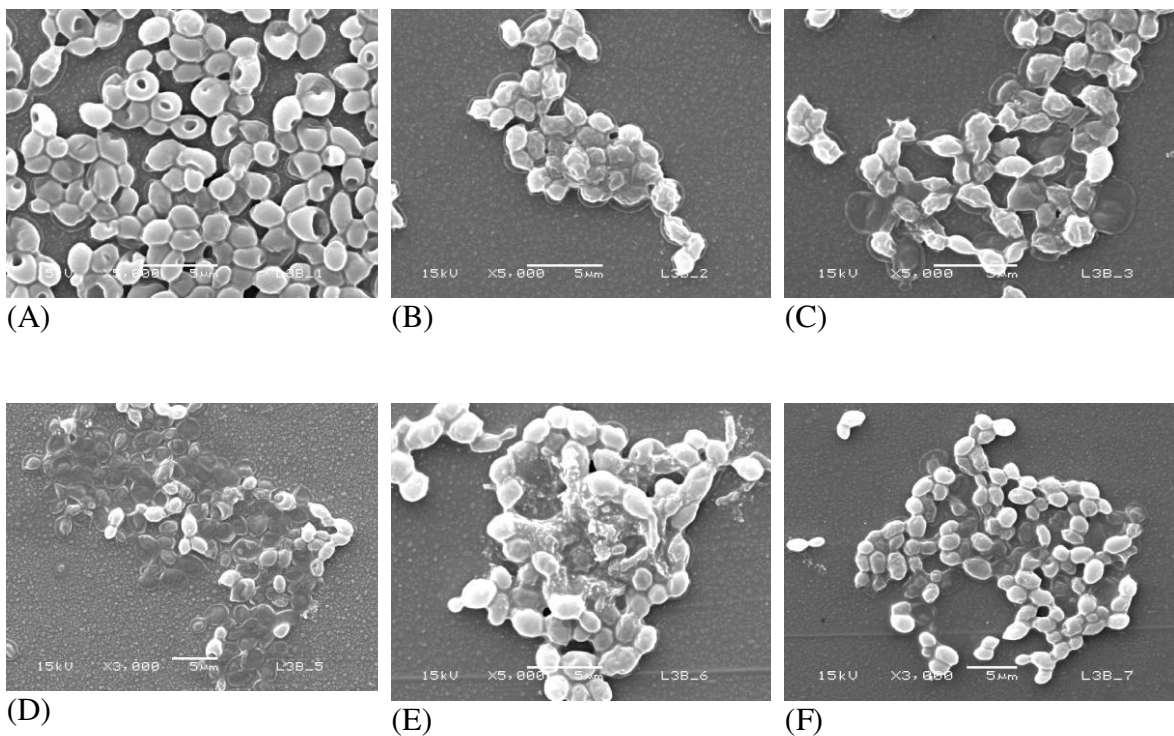


Figure 2: Mature biofilm of *Candida glabrata* CBS 07. (A) Mature biofilm of *C. glabrata* (SEM, X 5.000); (B) Effect of EEP type 3 on mature biofilm of *C. glabrata* (SEM, X 5.000); (C) Effect of dichlo-fr type 3 on mature biofilm of *C. glabrata* (SEM, X 5.000); (D) Effect of Nystatin on mature biofilm of *C. glabrata* (SEM, X 3.000); (E) Effect of EEP type 13 on mature biofilm of *C. glabrata* (SEM, X 5.000); (F) Effect of dichlo-fr type 13 on mature biofilm of *C. glabrata* (SEM, X 3.000).

3.3. Chemical Composition of propolis and fractions

Propolis 3 and 13 (EEP) and fractions (dichlo-fr) were chemically analyzed using the GC-MS technique as they demonstrated better anti-*Candida* activity and fungicidal effect.

Based on mass spectrum of EEP and dichlo-fr from propolis type 13, we identified phenolic compounds in both samples (1, 3, 6, 7, 9 10, 12, and 15). Substances present in EEP were similar to those in the dichlo-fr, except for compound 19 and 20 that were present only in EEP (Table 3). Isoflavonoid compounds such as medicarpin, vestitol, and formononetin together with chalcone isoliquiritigenin were identified in propolis type 13. Vestitol and medicarpin and compound 5 (unknown) were the major compounds in EEP (54.88%) and dichlo-fr (59.28%) (Table 3). All substances in propolis type 13 were more concentrated in dichlo-fr than in EEP, except for compounds 4, 5, 17, and 18.

We identified flavonoids (2',4',6'-tris(trimethylsilyloxy) chalcone, 3,5,7-Tris(trimethylsilyloxy)flavone, kaempferol and quercetin), cinnamic acids (*p*-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid) and cinnamic acid derivatives (cinnamic acid, 3,4-dimethoxy-, trimethylsilyl ester and caffeic acid phenethyl ester) in both EEP and dichlo-fr from propolis 3 samples (Table 4). Compounds 14, 18, 20 (Unknown) and 3,5,7-Tris(Trimethylsilyloxy)Flavone were the major compounds in EEP and dichlo-fr type 3.

EEP and respective dichlo-fr of propolis type 3 were qualitatively identical, however the quantitative composition showed that the dichlo-fr type 3 presented some constituents at low concentration in relation to EEP type 3 (compounds 1, 2, 3, 11, 14, 17, 20, 21) (Table 4).

Table 3. Retention Times, % area compounds and important Ions Present in the Mass Spectra of Silylated Compounds in propolis type 13 (Brazilian red propolis) and respective dichlo-fr.

Peaks	PROPOLIS TYPE 13 (RED PROPOLIS)				
	Compounds	EEP	diclo-fr	T _R (min) ^a	ion (m/z abundance in parentheses)
		%	%		
1	4,4' Bis[(Trimethylsilyl)Ethyne]-2,2'-Bithiophene-5,5'-Dicarbaldehyde	0.81	1.22	36,511	414(100), 399(66), 342(64), 265(33) 238(60), 208(41), 73(95).
2	-	4.99	5.46	37,417	358(64), 222(100), 210(40) 209(88), 207(81), 73(46).
3	Medicarpin	13.58	16.21	37,755	342(100), 327(34), 73(29), 148(15), 341(38)
4	-	3.95	3.38	38,117	401(36), 400(95), 385(24), 369(22), 204(22), 73(100).
5	-	16.57	16.46	38,241	416(51), 280(90), 268(40), 267(100), 265(60), 73(88).
6	Vestitol	24.73	26.61	38,376	416(51), 222(100), 209(55), 207(57), 73(48).
7	4,4'-Bis[(Trimethylsilyl)Ethyne]-2,2'-Bithiophene-5,5'-Dicarbaldehyde	7.10	8.20	39,075	415(35), 414(100), 413(54), 383(10), 341(8), 219(7), 73(54).
8	-	1.97	2.67	39,441	400(61), 399(44), 192(67), 179(100), 177(40), 73(60).
9	3,4-Dihydroxy-9-Methoxypterocarpan	1.52	1.66	39,684	430(95), 415(23), 399(46), 267(29), 161(16), 73(100).

10	3,8-Dihydroxy-9-Methoxypterocarpan (3-Hydroxy-8,9-Dimethoxypterocarpan)	0.79	1.01	40,132	372(100), 371(12), 357(25), 219(5), 206(13), 178(10), 73(43)
11	-	2.90	4.44	40,517	252(100), 446(45), 240(38), 237(40), 222(48), 179(15), 73(57).
12	Formononetin	1.85	2.98	40,868	340(100), 325(38), 208(9), 132(26), 73(18).
13	-	0.79	1.60	41,175	503(16), 413(29), 369(52), 296(38), 222(100), 207(34), 73(53).
14	-	1.78	2.31	41,443	473(100), 268(91), 296(34), 269(26), 179(16), 73(78).
15	Isoliquiritigenin	2.66	4.18	41,742	457(100), 472(9), 458(35), 307(7), 73(52).
16	-	0.70	1.11	42,016	460(35), 252(100), 237(25), 206(7), 73(51).
17	-	3.31	0.32	44,916	556(100), 297(39), 296(62), 281(19), 69(42), 73(96).
18	-	0.78	0.18	45,601	307(100), 73(59), 308(25), 696(9), 219(11).
19	Beta-Amyrin Trimethylsilyl Ether	2.34	*	47,574	498(3), 218(100), 203(45), 69(25), 73(24).
20	-	3.11	*	49,267	218(91), 189(75), 135(45), 109(55), 95(61), 43(100).

^a Retention times were determined employing the 30m column. Symbols: (*) not detected and (-) Unknown compound.

Table 4. Retention Times, % area compounds and important Ions Present in the Mass Spectra of Silylated Compounds in propolis type 3 and respective dichlo-fr.

Peaks	PROPOLIS TYPE 3				ion (m/z abundance in parentheses)
	Compounds	EEP %	diclo-fr %	T _R (min) ^a	
1	Benzoic Acid Trimethylsilyl Ester	1.87	1.41	10,392	194(8),181(5),179(100),135(73),105(89),77(59),136(10).
2	-	0.76	0.51	19,642	73(100);130(31),75(20);91(8);233(7);
3	-	2.48	2.12	24,200	246(22), 231(23); 157(31),129(37),128(100); 115(10) 102(8), 73(61).
4	<i>p</i> -Coumaric Acid	0.75	0.87	26,217	308(60), 294(23), 293(91), 249(58), 219(80), 250(15), 73(100).
5	Cinnamic Acid, 3,4-Dimethoxy-, Trimethylsilyl Ester	0.61	0.74	27,908	280(86),265(78), 221(58), 191(100), 73(32),75(25).
6	Ferulic Acid	1,12	1,48	29,133	338(100), 339(29), 323(65), 308(59), 293(43), 249(51), 219(20), 73(85).
7	Caffeic Acid	0.44	0.53	29,958	398(12); 397(22); 396(67); 381(19), 219(100), 73(81).
8	-	1.06	1.17	33,692	392(54), 307(20), 280(8), 236(16), 219(82), 191(13), 73(100),41(21).
9	-	0.79	0.94	34,283	392(26) ,307(18), 294(25), 280(16); 219(42), 191(10), 73(100),41(20).
10	-	0.84	0.93	34,558	392(42), 324(20), 308(15), 220(17), 219(87), 249(6), 69(15), 73(100), 41(25).
11	-	1.70	1.32	36,200	328(23), 327(100), 326(27), 281(19), 238(12), 219(20), 192(31), 91(56), 73(63).
12	2',4',6'-tris(Trimethylsilyloxy)Chalcone	0.31	0.46	36,350	472(6), 460(6), 459(18), 458(42), 457(100), 444(9),

					131(9), 73(50).
13	-	0.64	0.90	36,467	513(3), 304(24), 303(100), 95(34), 73(79).
14	-	19.24	17.64	36,667	385(100), 387(10), 386(31), 296(8), 185(4), 73(36).
15	-	6.44	6.47	37,417	473(48), 369(62), 296(89), 192(61), 73(100).
16	Trimethylsilyl (3-Ethoxy-4-Trimethylsiloxy)Phenyl- Trimethylsiloxy-Ethanoate	4.92	5.19	38,425	430(5), 415(8), 311(100), 238(34), 192(99), 73(65).
17	-	1.64	0.25	38,625	443(6), 356(100), 222(42), 192(42), 105(31), 91(85), 73(84).
18	-	15.08	16.17	38,708	443(100), 296(95), 73(81), 297(33), 444(30), 43(22).
19	-	7.38	7.66	39,175	414(65), 325(24), 307(8), 280(28), 219(9), 91(65), 73(100).
20	-	10.17	10.06	39,625	397(1), 383(100), 384(32), 73(15), 311(15), 385(12).
21	3,5,7- Tris(Trimethylsiloxy)Flavone	13.54	12.84	39,767	486(1), 472(40), 471(100), 399(8), 373(19), 73(20).
22	Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE)	2.14	2.45	40,325	428(63), 324(47), 307(17), 219(72), 105(72), 73(100).
23	-	0.72	1.12	40,550	413(100), 414(31), 398(3), 295(5), 73(15).
24	-	0.39	0.44	40,825	471(11), 268(36), 219(100), 117(64), 115(48), 73(66).
25	-	0.85	1.05	42,658	382(33), 117(100), 249(91), 298(46), 115(68), 73(66).
26	-	1.33	1.54	43,433	440(21), 356(53), 307(36), 117(71), 115(35), 73(100).
27	Kaempferol	1.43	1.70	44,167	574 (1), 561(26), 560(53), 559(100), 501(19), 73(32).
28	-	0.38	0.33	44,908	501(11), 472(42), 471(100), 399(8), 73(23).
29	Quercetin	0.24	0.29	45,583	648(65), 647(100), 575(7), 559(11), 487(3), 73(33).
30	-	0.74	0.87	45,733	594(1), 590(50), 589(100), 559(7), 73(21).

^a Retention times were determined employing the 30m column. Symbol: (-) Unknown compound.

4. Discussion

Several studies have demonstrated anti-*Candida albicans* and *non-albicans* properties in propolis (Ota et al., 2001; Dias et al., 2007; Murugan et al., 2008; Quintero-Mora et al., 2008; Salomão et al., 2008; Siqueira et al., 2009; Dalben-Dota et al., 2010). The present study evaluated the anti-*Candida* activity of propolis type 3, 6 and 13.

Based on the MIC results determined in different studies carried out by our research group with natural products, we have classified antimicrobial activity as follows: MIC values up to 500 µg/mL represent strong antimicrobial activity; from 600 to 1500 µg/mL, moderate antimicrobial activity; and over 1600 µg/mL weak antimicrobial activity (Duarte et al., 2005). Thus, the MIC values obtained for EEP type 3, 6 and 13 showed strong anti-*Candida* activity (Table 1 and 2).

Propolis 13 demonstrated the best results with the lowest MIC values observed, and fungicidal effect against all strains tested (MFC values ranging from 250 to 500 µg/mL for EEP and MFC values ranging from 125 to 500 µg/mL for dichlo-fr). Despite the lower MIC value observed in relation to *C. dubliniensis* (1.0 µg/mL), MIC values observed for EEP type 13 were near to these values (2.0 µg/mL) and therefore similar to the anti-*Candida* activity of EEP type 13 against *C. albicans* and *C. tropicalis*.

Nystatin was used as control for tests and presented MIC values between 0.5 to 1.0 µg/mL and fungicidal effect against all the strains (MFC 2.0 - 15.6 µg/mL). Among the antimicrobial profiles obtained for EEP types 3, 6 and 13 studied, type 13 EEP presented a complex chemical composition, demonstrated by anti-*Candida* activity (MIC) and an antifungicidal effect (MFC) similar to Nystatin. Propolis, which is a combination of several compounds, was tested in the same concentration as Nystatin and presented a similar antifungicidal effect; therefore, the identification and isolation of the chemical bioactive compound responsible for anti-*Candida* activity in propolis could be even more effective than Nystatin, as a lower concentration of the compound would be needed to achieve a similar effect.

The *in vitro* results of Dalben-Dota et al. (2010) from a propolis type collected in Paraná (South Brazil), showed high inhibitory effect upon *Candida albicans* and *non-*

albicans isolated from human vaginal exsudates (maximum of 393.19 µg/mL of the total flavonoid content). EEP type 3 and 13 maximum MIC values obtained in the present study were 31.3 and 7.8 µg/mL, respectively. Considering that the crude extract was used, the concentrations of flavonoids are even smaller rendering our findings promising.

The antifungal and antibacterial activity of Brazilian red propolis were also determined by Siqueira et al. (2009) and Alencar et al. (2007) who demonstrated MIC values from 8 to 1024 µg/mL against different species of *Trichophyton* and MIC values between 25 and 50 µg/mL against both *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Staphylococcus mutans* UA159; reinforcing the importance of the excellent results presented with EET type 13 in our study, with maximum MIC values of 7.8 µg/mL against *C. glabrata*.

EEP type 6 presented lower MIC values, which according to Duarte et al. (2005), denotes high anti-*Candida* activity, however EEP type 6 demonstrated only a fungistatic effect against all the strains studied, an exclusion factor for subsequent analyses.

EEP type 3, in general, demonstrated lower anti-*Candida* activity when compared to other propolis studied, such as types 6 and 13, nevertheless EEP type 3 presented fungicidal effects against *C. dubliniensis*, *C. glabrata* and *C. krusei*. These anti-*Candida* results and the higher yields obtained from propolis 3 and 13, in relation to propolis type 6, pointed towards these two types of propolis as the most promising for further assays.

Propolis type 13 fractions (hex-fr, dichlo-fr and ethyl-fr) presented MIC values below 16 µg/mL indicating strong anti-*Candida* activity; however, dichlo-fr was elected the active fraction for the capability of reproducing the antimicrobial EEP profile, such as fungicidal effect against all the strains, contrary to that observed for hex-fr and ethyl-fr. The ethyl-fr of propolis 3 reproduced the fungicidal profile of EEP type 3 and despite of presenting fungicidal effect against three *Candida* spp., presented a lower yield than dichlo-fr, which was therefore indicated for further analyzes instead.

In general, fractions of propolis 13 demonstrated better anti-*Candida* activity (lower MIC values) and fungicidal effect than fractions of the propolis type 3 analyzed,

against the strains tested. Other authors have also demonstrated many interesting antifungal results of Brazilian red propolis (Salomão et al., 2008; Siqueira et al., 2009).

A noteworthy observation is the antifungicidal effect presented by the three types of propolis 3, 6 and 13 against *C. krusei* and *C. glabrata*, considering that these yeasts showed resistance or a lower sensibility to azole antifungals (Dronda et al., 1996; Mimica et al., 2009).

Murugan et al. (2008) evaluated the antimicrobial activity of 95% ethanolic extracts of Indian propolis against microorganisms, amongst them *Candida albicans* and *Candida krusei*; and observed a high resistance (MIC 700 µg/mL) corroborating our findings for *C. krusei* using propolis 3, 6 and 13 and *C. albicans* which was inhibited by propolis type 13 in levels under 250 µg/mL.

Propolis types 3, 13 and the respective fractions were evaluated in preformed and mature biofilm. *Candida* spp. biofilms are difficult to eradicate as they commonly present antifungal resistance, especially to drugs such as amphotericin and fluconazole (Hasan et al., 2009; Seneviratne et al., 2008). However lower concentrations of EEP and dichlo-fr types 3 and 13 (red propolis) showed anti-biofilm activity according to MIC values obtained from preformed biofilms. Thus, no effectiveness of propolis type 13 was observed against *C. krusei* preformed biofilm, different from that previously observed against the planktonic cells of this yeast (MIC values 4.0 µg/mL for EEP type 13 and 0.2 µg/mL for dichlo-fr type 13) (Tables 1 and 2).

According to Seneviratne et al. (2008), *Candida* biofilms can be 30 to 2000 times as resistant as planktonic cells to several antifungal agents, which could explain those data and other higher MIC values obtained from preformed biofilms regarding planktonic assays for *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* using propolis 3 and 13 and dichlo-fr, in general. Nevertheless, the MIC values obtained classified the samples as having strong anti-*Candida* activity against the biofilms of most yeast according to Duarte et al. (2005).

The SEM images obtained from EEP type 3, 13 and the respective dichlo-fr against preformed and mature biofilm, showed many degraded cells and lengthening regions indicating changed growth zones. Although, the samples were not able to disrupt the mature biofilm, furthermore, there was the presence of damaged cells (Figures 1 and 2).

The GC-MS technique has been widely used in the analysis of chemical composition. Campo Fernandez et al. (2008) analyzed samples of Cuban red propolis, collected in different regions using this implement and suggesting this as an important technical tool for chemical analysis of red propolis tropical origin.

Propolis type 13 was analyzed by GC-MS and presence of phenolic compounds, such as isoflavonoids, could be observed (Table 3). Isoflavonoids compounds could be responsible for higher anti-*Candida* activity as in propolis type 13, according to the report by Trusheva et al. (2006) that reported isoflavonoids as important antimicrobial compounds of Brazilian red propolis, especially concerning the activity against *C. albicans*.

Most of MFC values presented for dichlo-fr type 13 were lower than the respective EEP value, except for *C. glabrata* and *C. parapsilosis* (Table 1 and 2). This fact could be related to a higher concentration of most isoflavonoids compounds presented by dichlo-fr compared to EEP (Trusheva et al., 2006). Thus, the isoflavonoids could be important biomarkers of the Brazilian type 13 propolis (red) as suggested by Alencar et al. (2007) and Silva et al. (2008).

Some compounds had lower concentrations in dichlo-fr type 13 than in the respective EEP (4, 5, 17 and 18 compounds) which would justify the lower activity of this fraction against *C. tropicalis* compared to EEP. Thus, the absence of the last two compounds (19 and 20) in dichlo-fr and present in EEP type 13 were not related to the anti-*Candida* activity of propolis type 13.

The synergic effect of propolis constituents has not been herein suggested, as anti-*Candida* activity was observed for dichlo-fr even in the absence of two compounds; however this effect should be evaluated in part of the compounds, such as in the isoflavonoid class, in future studies.

Propolis type 3 (EEP and respective dichlo-fr) were also chemically analyzed. The compounds *p*-coumaric, ferulic acid, caffeic acid, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), kaempferol, quercetin and some flavonoid derivative compounds were identified. All these belong to the class of phenolic compounds and could be related to anti-*Candida* activity reported, according to Kujumgiev et al. (1999).

CAPE is one of the most important active compounds of the poplar type propolis, typical from temperate zones. The botanical origin of the poplar type propolis is the *Populus* sp, of the same origin as Brazilian propolis type 3 (South Brazil). CAPE has been considered to be the biomarker of both propolis (Banskota et al., 2001; Park et al., 2002; Bankova et al., 2005).

According to Bankova et al. (2005), the main bioactive compounds of poplar type propolis were flavones, flavanones, cinnamic acids and their esters, which corroborated with those identified herein in Brazilian propolis type 3.

The compounds present in propolis type 3 (EEP) were also present in dichlo-fr (Table 4). Some compounds presented lower abundance in dichlo-fr compared to EEP type 3 (compounds 1, 2, 3, 11, 14, 17, 20, 21) and could justify the absence of fungicidal effect of dichlo-fr against *C. krusei* compared to EEP type 3 and lower anti-*Candida* activity against *C. glabrata* of dichlo-fr compared to EEP type 3.

5. Conclusion

The results of all types of propolis 3, 6 and 13 revealed anti-*Candida* activity, however propolis type 13 (red propolis) was the most effective. The dichlo-fr of propolis 13 was the active fraction and showed fungicidal effect for all yeasts, this effect could be related to the isoflavonoid class found in this type of propolis.

These results report the importance of Brazilian natural sources and bioactivity compound screening. The higher anti-*Candida* activity of propolis type 13 suggests the need of a bio-guided study to identify the active compounds which could be effective in the treatment or prevention of oral Candidiasis.

6. Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESP (Proc. 08/51048-5 and Proc. 04/08635-6, SP, Brazil) and CNPq (Proc. 131844/2008-3, Brazil) for the financial support for this research.

7. References

- Ahn, M.R., et al., 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*. 101, 1383-1392.
- Alencar, S.M., et al., 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 113, 278-283.
- Avci, C.B., 2010. Caffeic acid phenethyl ester triggers apoptosis through induction of loss of mitochondrial membrane potential in CCRF-CEM cells [Article in Press]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*.
- Bankova, V., 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*. 100, 114-117.
- Bankova, V.S., Popov, S.S., Marekov, N.L., 1982. High-performance liquid chromatographic analysis flavonoids from propolis. *Journal of Chromatography*. 242, 135-143.
- Bankova, V., et al., 1996. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*. 51, 277-280.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Kadota, S., 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*. 15, 561-571.
- Begnami, A.F., et al., 2010. Antimicrobial potential of *Coriandrum sativum* L. against different *Candida* species in vitro. *Food Chemistry*. 118, 74-77.
- Campo Fernández, M., et al., 2008. GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 9927-9932.
- Castro, M.L., et al., 2007. Propolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova*. 30, 1512-1516.
- Castro, M.L., et al., 2009. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 17, 5332-5335.
- Chen, C.N., et al., 2003. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propolis. *Journal of Natural Products*. 66, 503-506.

Clinical and Laboratorial Standards Institute (CLSI), 2002. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: NCCLS document M27-A2, 2. ed. NCCLS, Pennsylvania.

Dalben-Dota, K.F., et al., 2010. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 16, 285-290.

Dias, S.M.D., et al., 2007. Antifungal activity of commercial ethanolic and aqueous extracts of Brazilian propolis against *Candida* spp. *Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada*. 28, 259-263.

Dronda, F., et al., 1996. Mixed oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans* and non *albicans Candida* strains in HIV- infected patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 15, 446- 452.

Duarte, S., et al., 2003. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 26, 527-531.

Duarte, M.C.T, et al., 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 97, 305-311.

Duarte, M.C.T., et al., 2007. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*. 111, 197-201.

Ferreira, F.B., et al., 2007. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 104, 709-716.

Ghisalberti, E.L., 1979. Propolis: a review. *Bee World*. 60, 59-84.

Hasan, F., et al., 2009. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and Infection*. 11, 753-761.

Hayacibara, M.F., et al., 2005. *In vitro* and *in vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *Journal of Ethnopharmacology*. 101, 110-115.

Koo, H., et al., 1999. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated. *Caries Research*. 33, 393-400.

- Koo, H., et al., 2000a. Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *Caries Research*. 34, 418-426.
- Koo, H., et al., 2000b. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on *mutans streptococci*. *Current Microbiology*. 4, 192-196.
- Kujumgiev, A., et al., 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*. 64, 235-240.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. 84, 329-339.
- Li, F., et al., 2008. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 16, 5434-5440.
- Marcucci, M.C., 2000. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*. 55, 76-81.
- Marcucci, M.C., et al., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 74, 105-112.
- Menezes, E.A., et al., 2005. Frequência e atividade enzimática de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche da prefeitura de Fortaleza. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 41, 9-13.
- Menezes, E.A., et al., 2007. Frequência e atividade enzimática de *Candida* spp. na cavidade oral de pacientes diabéticos do serviço de endocrinologia de um hospital de Fortaleza-CE. *Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine*. 43, 241- 244.
- Mímica, J.M.L., et al., 2009. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 45, 17-23.
- Murugan, S., et al., 2008. Antimicrobial potential of Ethanolic Extracts of Indian Propolis (EEIP's) against human pathogens. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*. 10, 557-561.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural Products as Sources of New Drugs over the period 1982-2002. *Journal of Natural Products*. 66, 1022-1037.

- Obando-Pereda, G.A., et al., 2008. Evidence of Heterokaryon compatibility on *Candida albicans* biofilm. Brazilian Journal of Oral Sciences. 7, 1678-1681.
- Ota, C., et al., 2001. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. Mycoses. 44, 375-378.
- Park, Y.K., Alencar, S.M., Aguiar, C.L., 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50, 2502-2506.
- Park, Y.K., et al., 1998a. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganism. Current Microbiology. 36, 24-28.
- Park, Y.K., et al., 1998b. Effects of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*". Revista de Microbiologia. 29, 143-148.
- Park, Y.K., et al., 2000. Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. Honeybe Science. 21, 85-90.
- Popova, M.P., et al., 2009. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. Phytochemistry. 70, 1262-1271.
- Quintero-Mora, M.L., et al., 2008. Effect of Mexican propolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans* in vitro growth. Revista Iberoamericana de Micologia. 25, 22-26.
- Salatino, A., et al., 2005. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2, 33-38.
- Salomão, K., et al., 2008. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 5, 317-324.
- Seneviratne, C.J, Jin, L., Samaranayake, L.P., 2008. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. Oral Diseases. 14, 582-590.
- Silva, B.B., et al., 2008. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 5, 313-316.
- Siqueira, A.B.S., et al., 2009. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. Letters in Applied Microbiology. 48, 90-96.
- Trusheva, B., et al., 2006. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 3, 249-254.

Van Asbeck, E.C., Clemons, K.V., Stevens, D.A., 2009. *Candida parapsilosis*: A review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Critical Reviews in Microbiology*. 35, 283-309.

CONCLUSÃO

1. As própolis dos tipos 3, 6 e 13 apresentaram atividade anti-*Candida* e de maneira geral, a própolis tipo 13 apresentou melhores resultados, determinados pelos efeitos fungicidas contra todas as cepas estudadas.
2. A fração diclorometânica da própolis do tipo 13 foi considerada a fração ativa da própolis do tipo 13 e apresentou atividade fungicida com valores de MFC menores que os obtidos para o EEP, exceto contra duas cepas.
3. As própolis dos tipos 3 e 13 e respectivas frações diclorometânicas, interferiram no processo de adesão do biofilme, contudo não desagregaram completamente o biofilme já formado.
4. Os isoflavonóides estão associados a forte atividade anti-*Candida* apresentada pela própolis do tipo 13.
5. A própolis do tipo 13 (própolis vermelha) é fonte de compostos bioativos com propriedades anti-*Candida* podendo ser uma nova alternativa no tratamento preventivo ou complementar da candidíase oral.

REFERÊNCIAS ¹

1. Ackermann T. Fast chromatography study of propolis crudes. Food Chemistry. 1991; 42(2): 135-8.
2. Alencar SM. Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil [tese]. Campinas: UNICAMP/FEA; 2002. 120p.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica sobre o Registro de Produtos Contendo Própolis. Brasília: ANVISA; 2010 [acesso 2010 Abr 19]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm>.
4. Arendorf TM & Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. Arch Oral Biol. 1980; 25(1): 1-10.
5. Ayres DC, Marcucci MC, Giorgio S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(2):215-20.
6. Bagg J, Silverwood RW. Coagglutination reactions between *Candida albicans* and oral bacteria. J Med Microbiol. 1986; 22(2): 165-9.
7. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, *et al*. Cytotoxic hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. J Ethnopharmacol. 2000; 72(1/2): 239-46.
8. Bonhevi JS, Coll FV. Phenolic composition of propolis from China and from South-America. Z Naturforsch [C]. 1994; 49(11/12): 712-8.
9. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food Chem Toxicol. 1998; 36(4): 347-63.
10. Castro ML, Duarte S, Koo H, Bowen WH, Cury JA, Ikegaki M *et al* . Evaluation of the seasonal effect on the antimicrobial activity of propolis typ 12, in 6 months. Braz J Oral Sci. 2004; 3(10): 533.
11. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents *Chem. Rev.* 2009; 109 (7): 3012–43.

¹ Baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed

12. Cunha IBDS, Salomão K, Shimazu M., Bankova VS, Custodio AR, De Castro SL, et al., Antitrypanosomal Activity of Brazilian Propolis from *Apis mellifera*. Chem. Pharm. Bull. 2004; 52(5):602- 4.
13. Clardy J, Walsh C. Lessons from natural molecules. Nature. 2004; 432(7019): 829-37.
14. Cordell AG. Biodiversity and drug Discovery – a symbiotic relationship. Phytochemistry 2000; 55(6): 463-80.
15. Cunha IBDS, Salomao K, Shimizu M, Bankova VS, Custodio AR, De Castro SL, *et al.* Antitrypanosomal activity of Brazilian Propolis from *Apis mellifera*. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2004; 52(5): 602-4.
16. Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2005; 97(2): 305-11.
17. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE, *et al.* The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilmes and caries development in rats. Arch Oral Biol. 2006; 51(1):15-22.
18. Furletti, VF. Ação de extratos, oleos exxenciais e frações isoladas de plantas medicinais sobre a formação do biofilme em *Candida* spp. [tese]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2009.
19. Greenwood S, Barnes S, Clarkson TB., Eden J, Helferich WG, Hughes C, et al. The role of isoflavones in menopausal health: Consensus opinion of the North American Menopause Society. Menopause; 2000 7(4): 215-29.
20. Guarro J, Rajendran C Comments on recent human infections caused by ascomycetes. Medical Mycology 1998; 36(5): 349-350.
21. Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. Caries Res. 1991; 25(5): 347-51.
22. Johnson KS, Eischen FA, Giannasi DE. Chemical-compositing of North-American bee propolis and biological-activity towards larvae of greater wax moth (*Lepidoptera, Pyralidae*). J Chem Ecol. 1994; 20(7): 1783-91.
23. Kam AP, Xu J. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002; 43(1): 19-28.

24. Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, Abranches J, Cury JA, Rosalen PL, *et al.* Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol.* 2002; 17(6):337-43.
25. Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, *et al.* Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt- farnesol. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52(5): 782-9.
26. Luthria DL, Biswas R., Natarajan S. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chem.* 2007; 105(1): 325-33.
27. Montpied P, De Bock F, Rondouin G, Niel G, Briant L, Courseau AS, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. *Mol Brain Res.* 2003; 115(2): 111-20.
28. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep.* 2000; 17(3): 215-34.
29. Newman DJ, Cragg GM (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70:1022–37.
30. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. *J Dent.* 1998a; 26(4): 299-304.
31. Nikawa H, Nishimura H, Hamada T, Makihiro S, Samaranayake LP. Relationship between thigmotropism and *Candida* biofilm formation *in vitro*. 1998b ; *Mycopathologia.* 144(3):125-129.
32. Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends in Microbiology.* 2003; 11(6): 272-9.
33. Pfaller MA. Epidemiology of candidiasis. *J Hosp Infect.* 1995; 30 (Suppl): 329-38.
34. Rang HP, Dale MM. *Farmacologia.* 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.
35. Repentigny L, Lewandowski D, Jolicoeur P. Immunopathogenesis of Oropharyngeal Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17(4): 729-59.

36. Rosalen PL, Murata RM, Yatsuda R, Duarte S, Goncalves RB, Koo H, *et al.* Effect of propolis from eight Brazilian regions on oral microorganisms [abstract 2794]. J Dent Res. 2002; 81: A349.
37. Vilela D, Araujo PMM, organizadores. Contribuições das Câmaras Setoriais e Temáticas à Formulação de Políticas Públicas e Privadas para o Agronegócio: Câmara Setorial da Cadeia Produtiva do Mel e Produtos Apícolas. Brasília: MAPA/SE/CGAC; 2006. 496p.
38. Sforcin JL, Lopes CA, Bankova V, Funari SR. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. J Ethnopharmacol. 2000; 73(1/2): 243-9.
39. Shu YZ. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. J Natural Products. 1998; 61: 1053-71.
40. Xu J, Boyd CM, Livingston E, Meyer W, Madden JF, Mitchell TG. Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. J Clin Microbiol. 1999; 37(12): 3835-43.
41. Zheng CJ, Yoo JS, Lee TG, Cho HY, Kim YH, Kim WG. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids [abstract]. FEBS Lett. 2005; 579(23): 5157-62.

APÊNDICE

Tabela 1: Rendimentos da própolis dos tipos 3, 6 e 13, resultantes da metodologia descrita no item 2.1 para obtenção dos EEP.

Tipo de Própolis	Massa de Própolis (g)	Rendimento do EEP (%)
3	4,87	58,46
6	1,71	20,52
13	3,55	42,62

Massa de propolis (g)
Rendimento: (%)

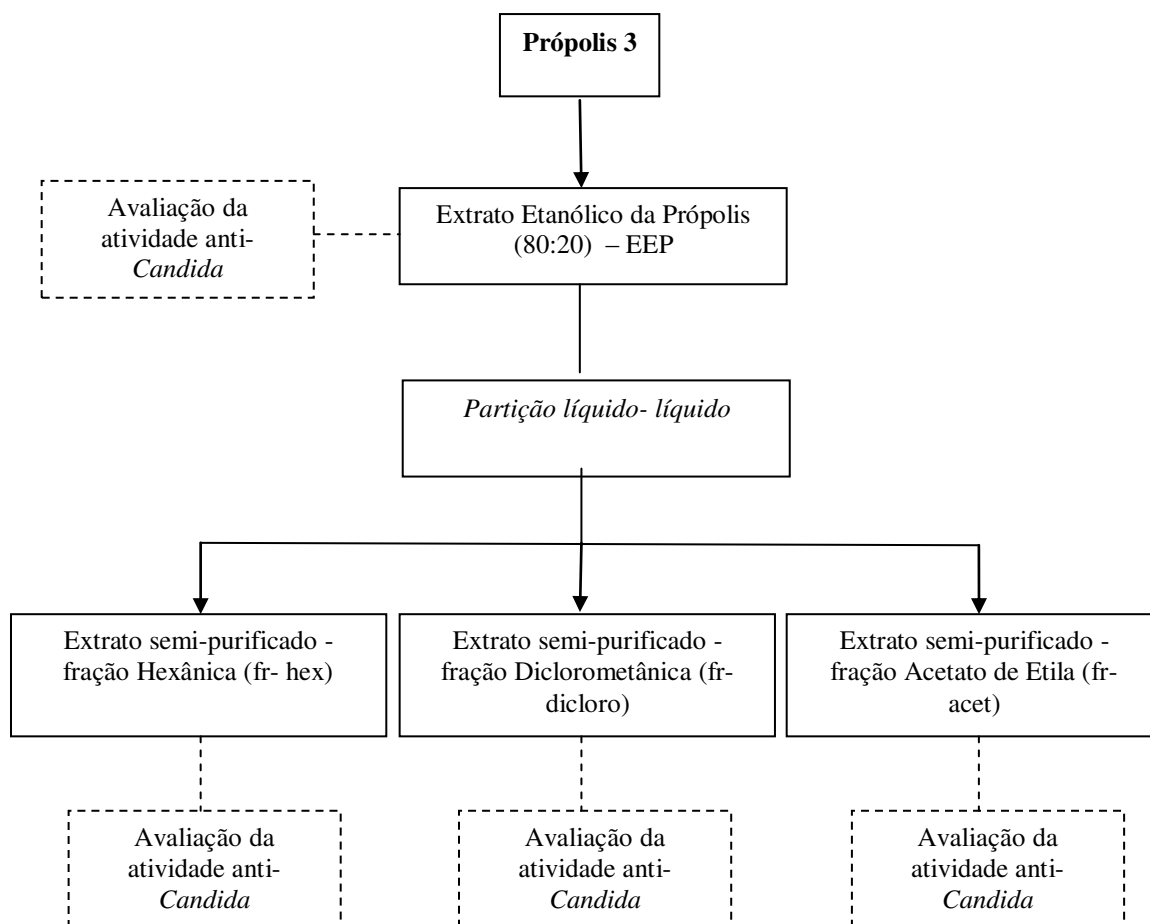


Figura 1. Fluxograma do processo de fracionamento da própolis tipo 3.

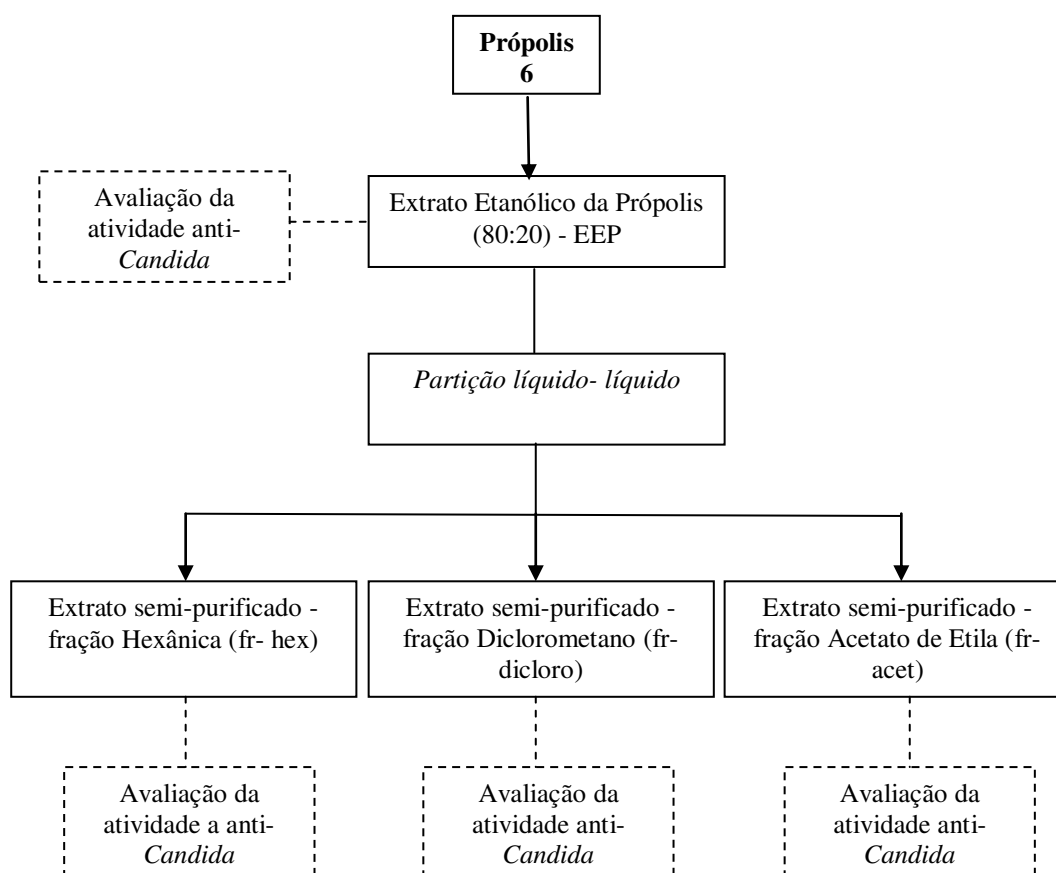


Figura 2. Fluxograma do processo de fracionamento da própolis tipo 6.

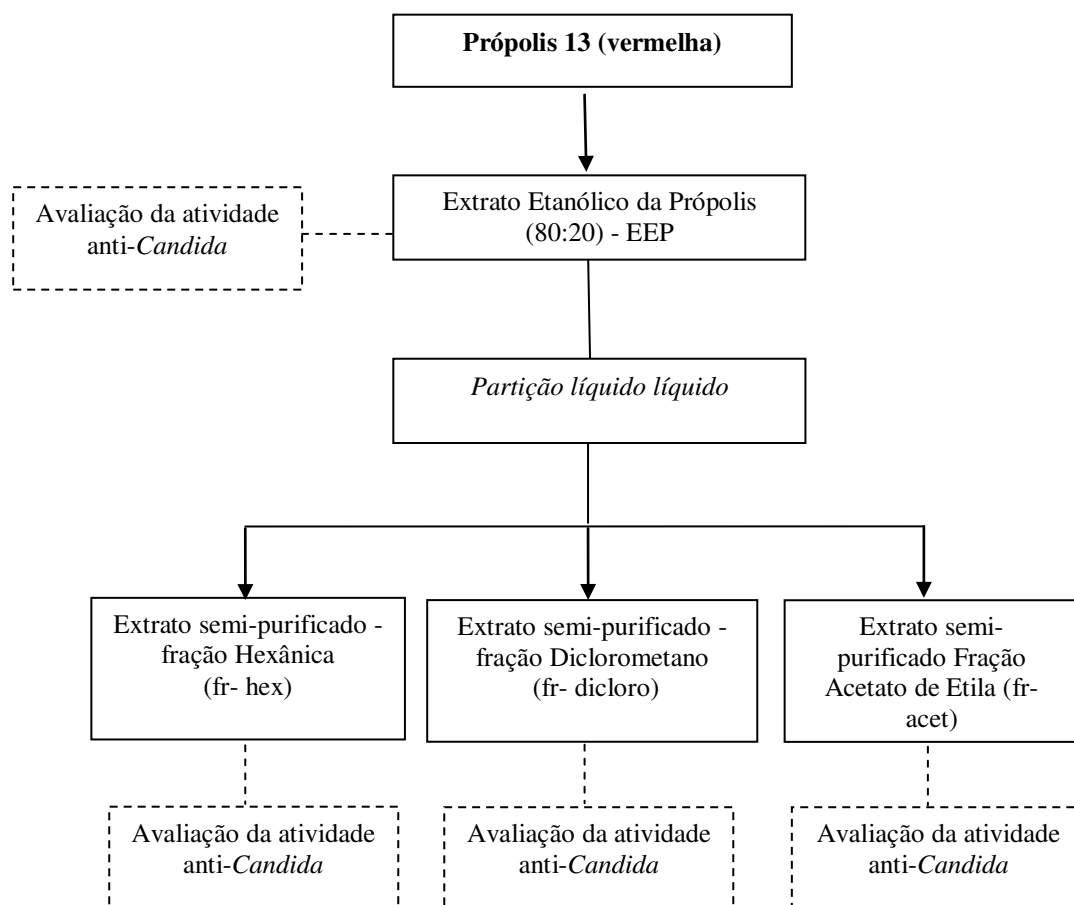


Figura 3. Fluxograma do processo de fracionamento da própolis tipo 13 (própolis vermelha).

Tabela 2. Rendimentos obtidos no fracionamento das própolis com os solventes indicados, a partir de 41,6 g extrato etanólico da própolis (EEP).

Tipo de Própolis (EEP)	Solvente	Fração	Rendimento em massa (g)	Rendimento (%)
3	Hexano	Fr-hex	1,48	3,56
	Diclorometânica	Fr-dicloro	18,28	43,94
	Acetato de Etila	Fr-acet	0,64	1,53
6	Hexano	Fr-hex	2,20	5,29
	Diclorometânica	Fr-dicloro	2,50	6,00
	Acetato de Etila	Fr-acet	-	-
13	Hexano	Fr-hex	3,94	9,47
	Diclorometânica	Fr-dicloro	8,29	19,93
	Acetato de Etila	Fr-acet	0,57	1,37

Rendimentos em massa: (g)

Rendimentos em porcentagem: (%)

Símbolo: (-): quantidade obtida insuficiente.

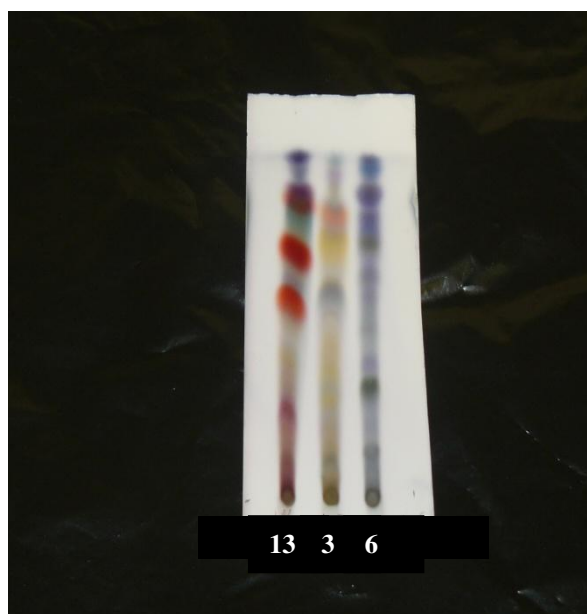


Figura 4a. Perfil cromatográfico do EEP dos tipos 13, 3 e 6 revelados com anisaldeído sulfúrico. Fase móvel: acetato de etila:clorofórmio (30:70 v/v). Volume aplicado: 10 µL.

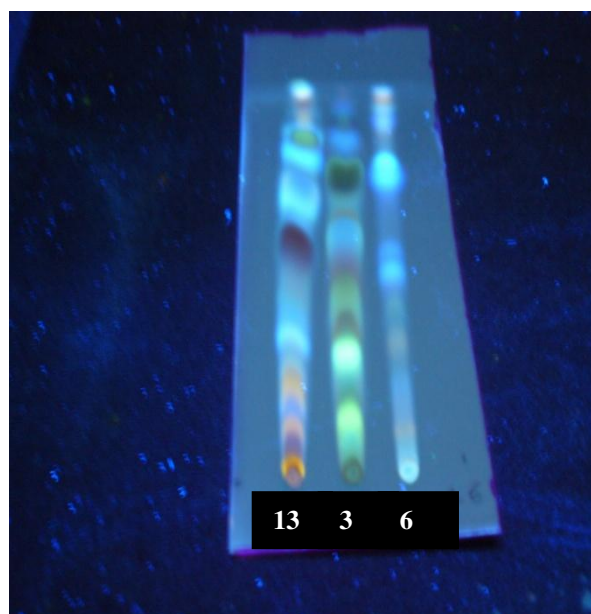


Figura 4b. Perfil cromatográfico do EEP dos tipos 13, 3 e 6, observados em UV a 366 nm. Fase móvel: acetato de etila:clorofórmio (30:70 v/v). Volume aplicado: 10 µL.

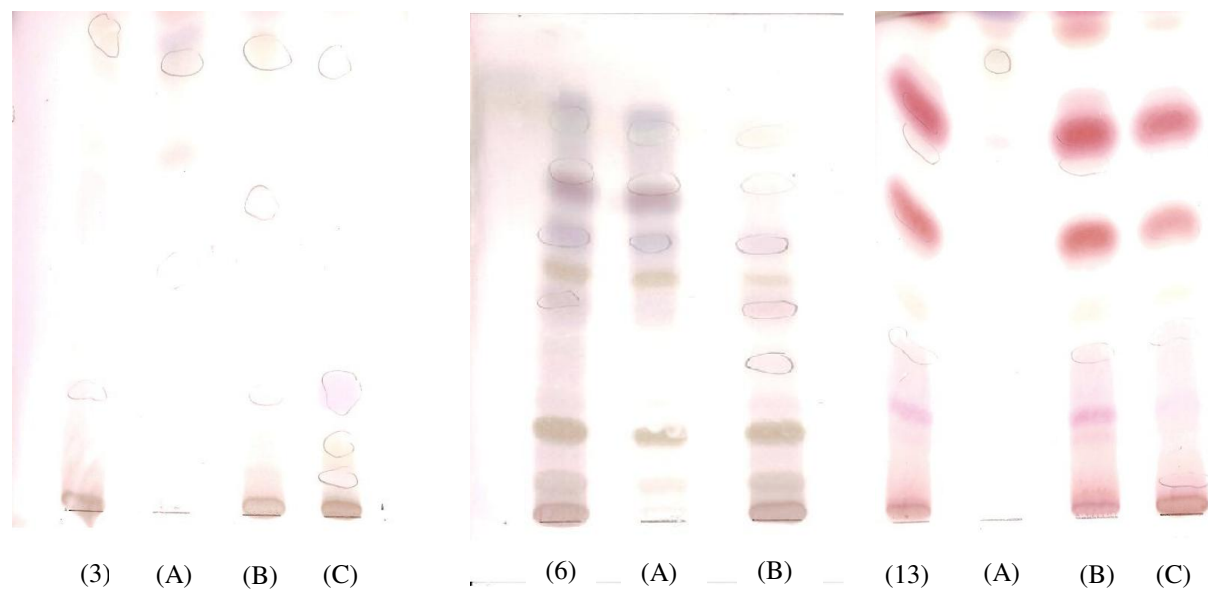


Figura 5b. Perfil cromatográfico dos EEP tipos 3, 6 e 13, e respectivas frações, revelados com anisaldeído sulfúrico a quente. Fase móvel: acetato de etila:clorofórmio (30:70 v/v). (3) EEP tipo 3; (6) EEP tipo 6; (13) EEP tipo 13; (A) Fração Hexânica; (B) Fração Diclorometânica; (C) Fração Acetato de Etila.

Tabela 3. Picos de absorção observados através da análise por espectrofotometria no UV-visível realizada para própolis tipo 3 e respectivas frações.

Própolis 3		
Amostra	Comprimento de onda (nm)	Absorbância
EEP	292	1,9210
	213	2,8468
Fração Hexânica	285	0,7524
Fração Diclorometânica	290	2,4139
	235	2,0208
Fração Acetato de Etila	290	1,6895

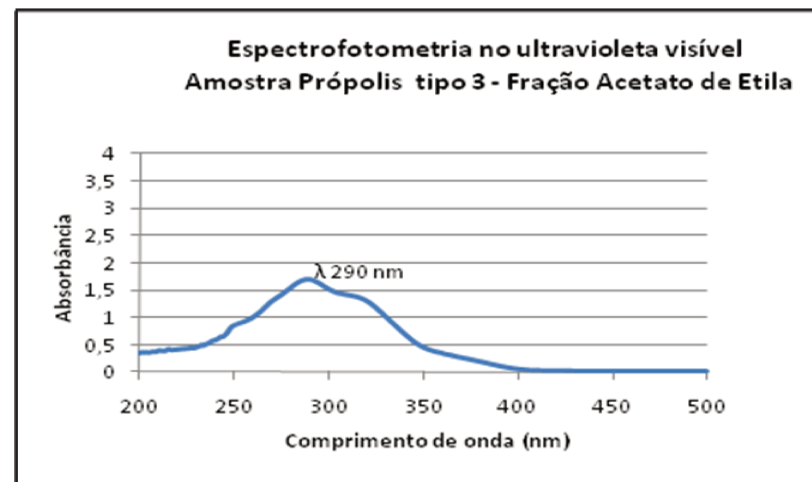
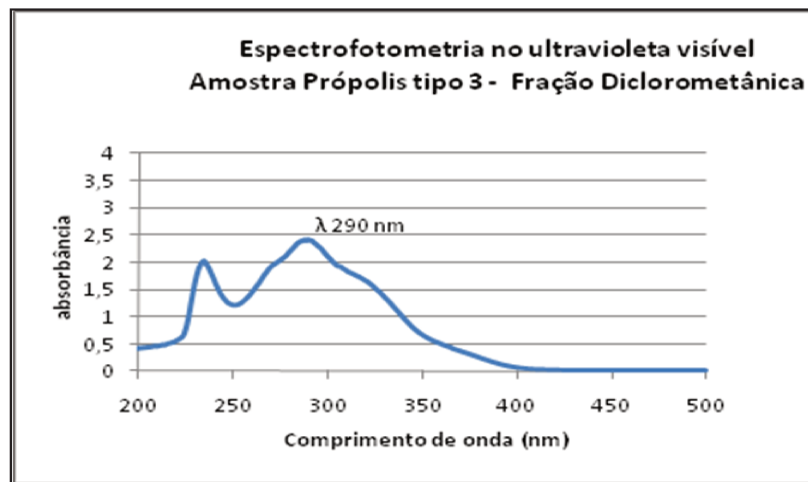
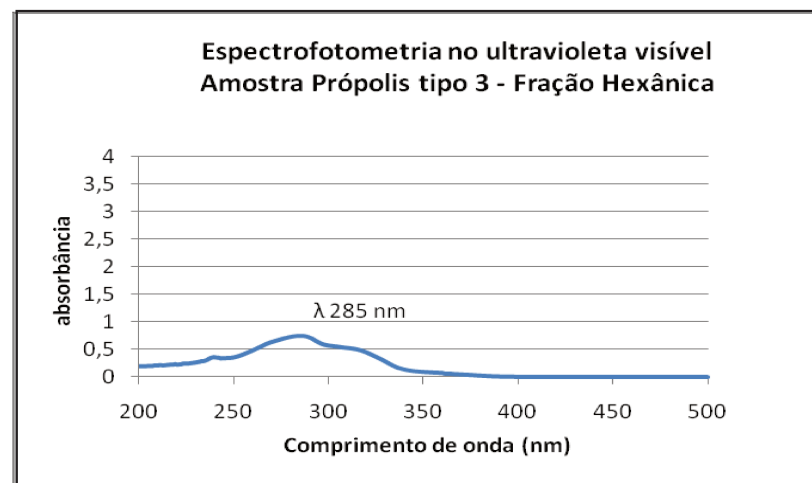
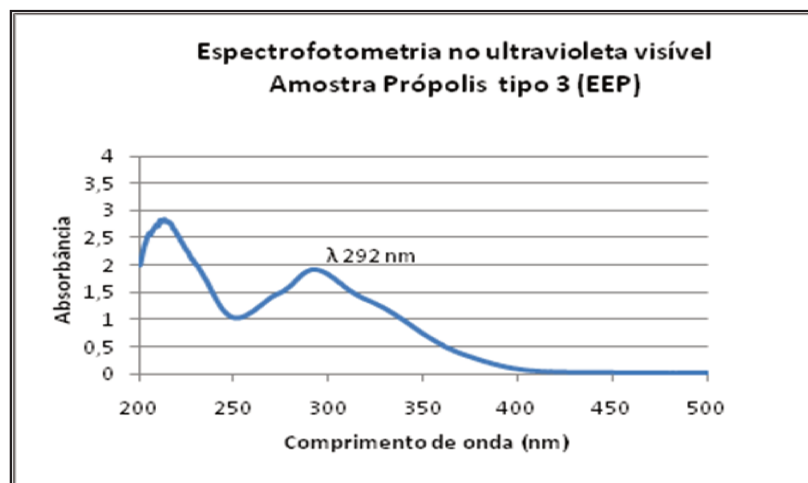


Figura 6: Espectrofotometrias de Absorção no Ultravioleta Visível das amostras de Própolis tipo 3 (EEP) e respectivas frações, obtidas em espectrofotômetro UV- mini 1240 (Shimadzu-Co.).

Tabela 4. Picos de absorção observados através da análise por espectrofotometria no UV-visível realizada para própolis tipo 6 e respectivas frações.

Própolis tipo 6		
Amostra	Comprimento de onda (nm)	Absorbância
EEP	280	1,1030
	209	2,8892
Fração Hexânica	244	1,1953
Fração Diclorometânica	278	0,9286
	234	1,5016

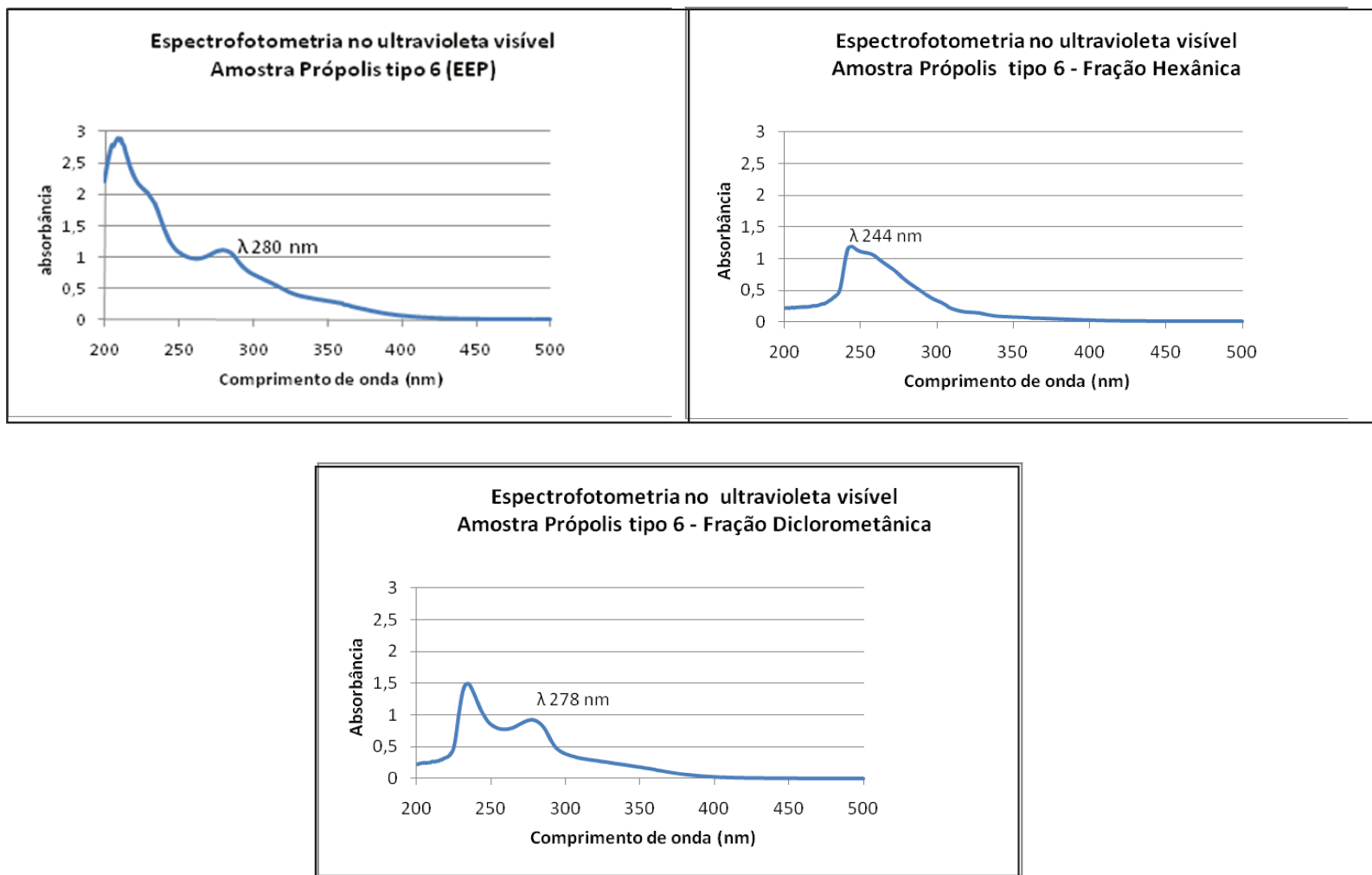


Figura 7: Espectrofotometrias de Absorção no Ultravioleta Visível das amostras de Própolis tipo 6 (EEP) e respectivas frações, obtidas em espectrofotômetro UV-mini 1240 (Shimadzu-Co.).

Tabela 5. Picos de absorção observados através da análise por espectrofotometria no UV-visível realizada para própolis tipo 13 e respectivas frações.

Própolis 13		
Amostra	Comprimento de onda (nm)	Absorbância
EEP	282	0,7653
	208	2,4585
Fração Hexânica	353	0,4512
	244	0,9102
Fração Diclorometânica	281	1,5564
	234	1,9479
Fração Acetato de Etila	320	0,4987
	284	0,6545

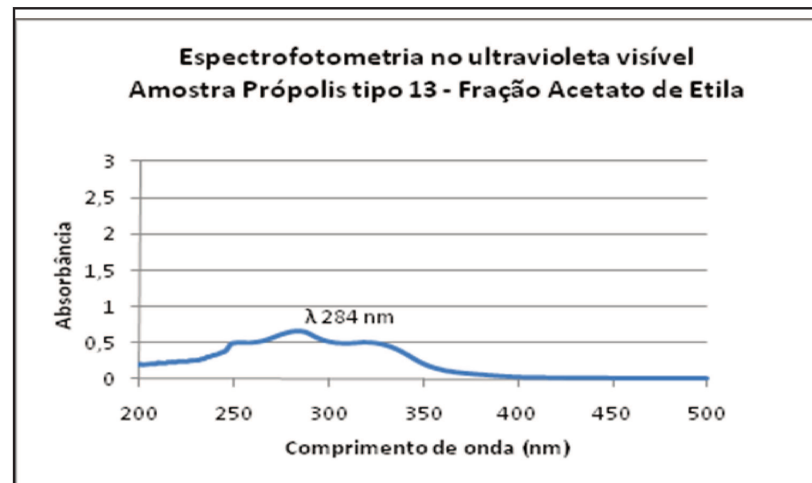
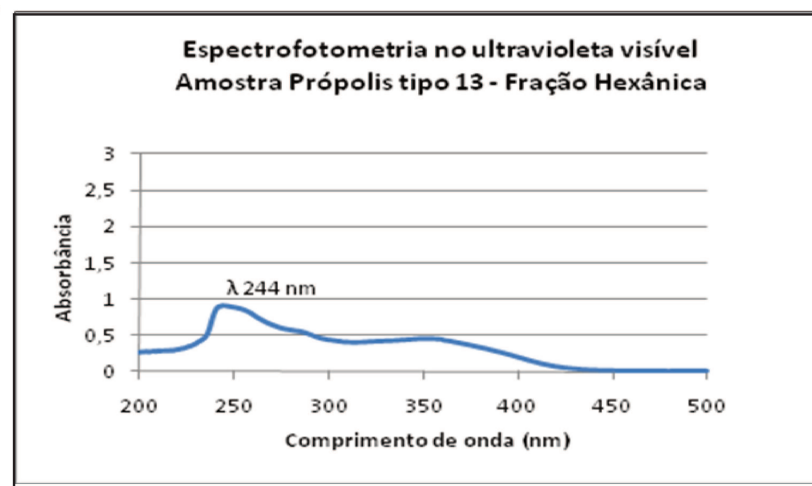
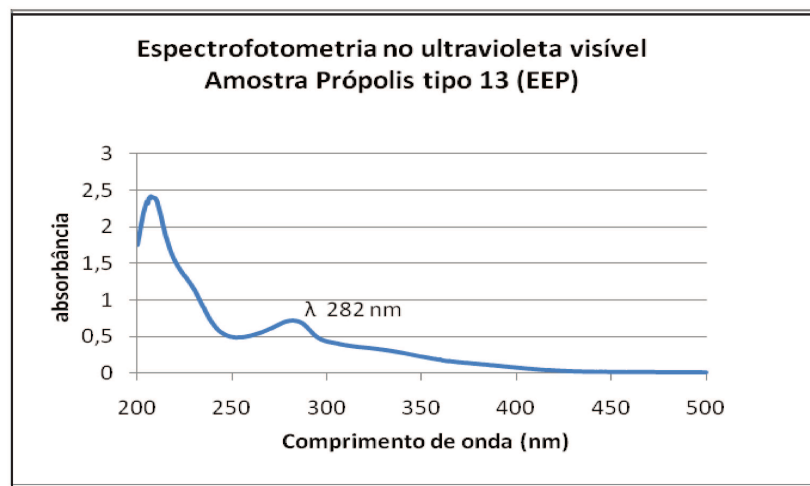


Figura 8: Espectrofotometrias de Absorção no Ultravioleta visível das amostras de Própolis tipo 13 (EEP) e respectivas frações, obtidas em espectrofotômetro UV-mini 1240 (Shimadzu-Co.).

Tabela 6: Atividade anti-*Candida* (MIC/MFC – µg/mL) do EEP da própolis 6 e respectivas frações estudadas.

<i>Candida</i> spp.	Própolis 6 e Frações						Nistatina (controle)	
	Própolis 6 (EEP)		Fração Hexânica		Fração Diclorometânica		MIC	MFC
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC		
<i>C. albicans</i> CBS 562	1,0	#	4,0	#	4,0	#	0.5	7.8 *
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	2,0	#	2,0	#	4,0	#	0.5	4.0 *
<i>C. glabrata</i> CBS 07	2,0	#	2,0	#	2,0	#	1.0	2.0 *
<i>C. krusei</i> CBS 573	7,8	#	125	#	125	#	0.5	15.6 *
<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	#	#	31,3	#	62,5	#	1.0	2.0 *
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	62,5	#	15,6	#	31,3	#	0.5	2.0 *

MIC e MFC unit: µg/mL

Ação fungistática = MIC e MFC > 500 µg/mL

* Ação fungicida

Controle: Etanol 2% (v/v).

Tabela 7. Valores de MIC ($\mu\text{g/mL}$) obtidos para a Própolis tipo 13 (vermelha) e respectiva fração diclorometânica contra biofilmes em pré-adesão de *Candida* spp.

<i>Candida</i> spp.	EEP	Fração diclorometânica
<i>C. albicans</i> (CBS 562)	0,2	7,8
<i>C. dubliniensis</i> (CBS 7987)	1,0	7,8
<i>C. glabrata</i> (CBS 07)	0,2	1,0
<i>C. krusei</i> (CBS 573)	>500	>500
<i>C. parapsilosis</i> (CBS 604)	7,8	31,3
<i>C. tropicalis</i> (CBS 94)	125	15,6

Tabela 8. Valores de MIC ($\mu\text{g/mL}$) obtidos para a Própolis tipo 3 e respectiva fração diclorometânica contra biofilmes em pré-adesão de *Candida* spp.

<i>Candida</i> spp.	EEP	Fração diclorometânica
<i>C. albicans</i> (CBS 562)	2,0	4,0
<i>C. dubliniensis</i> (CBS 7987)	0,2	4,0
<i>C. glabrata</i> (CBS 07)	0,2	2,0
<i>C. krusei</i> (CBS 573)	2,0	62,5
<i>C. parapsilosis</i> (CBS 604)	250	250
<i>C. tropicalis</i> (CBS 94)	15,6	62,5

Imagens dos Biofilmes em pré-adesão e formados de *Candida* spp. sob ação dos EEP tipos 3 e 13e respectivas frações diclorometânicas, analisadas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Imagens dos biofilmes em pré-adesão.

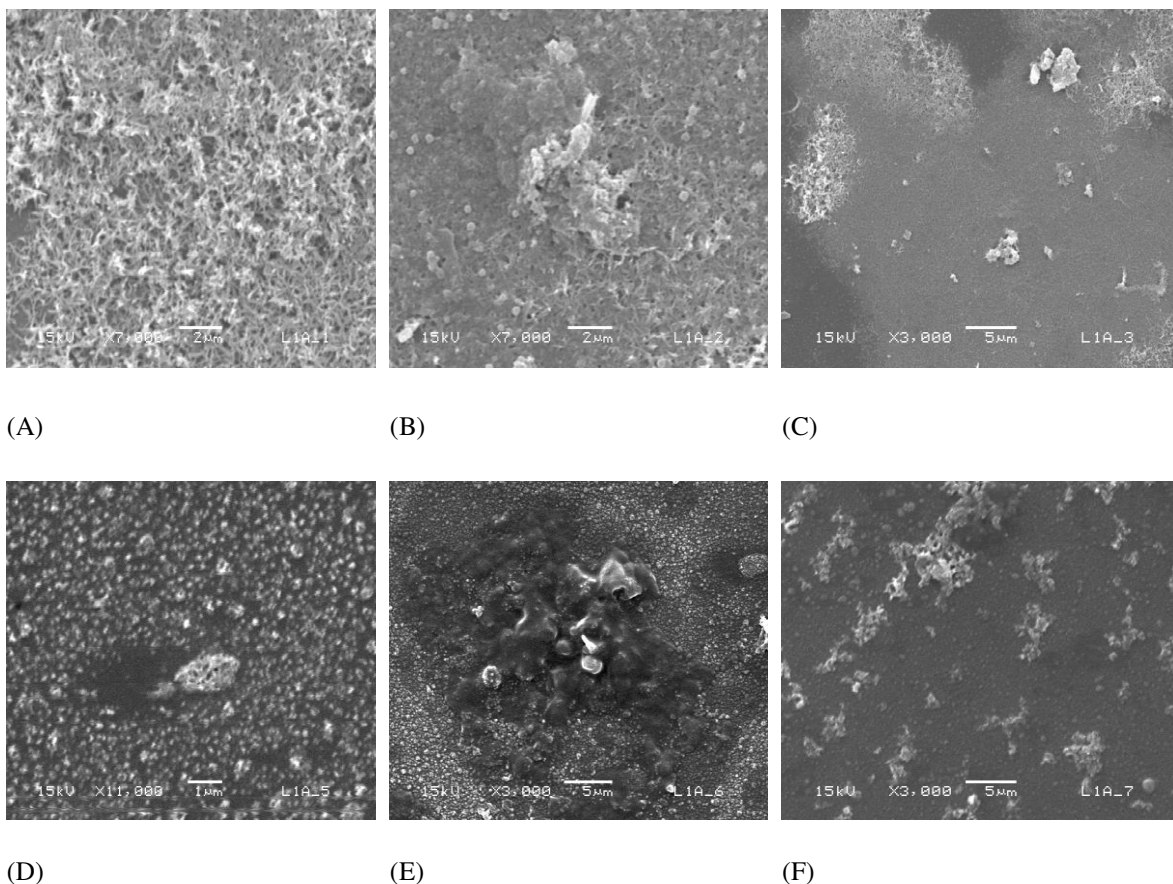


Figura 11: Biofilmes em pré-adesão de *Candida albicans* CBS 562. (A) Biofilme em pré-adesão de *C. albicans* (MEV-aumento de 7.000 X); (B) Efeito do EEP tipo 3 sobre o biofilme em pré-adesão de *C. albicans* (MEV-aumento de 7.000 X). (C) Efeito da fr-dicloro da própolis 3 sobre o biofilme em pré-adesão de *C. albicans* (MEV-aumento de 7.000 X). (D) Efeito da Nistatina sobre o biofilme em pré-adesão de *C. albicans* (MEV-aumento de 11.000 X). (E) Efeito do EEP tipo 13 sobre biofilme em pré-adesão de *C. albicans* (MEV-aumento de 3.000 X). (F) Efeito da fr-dicloro da própolis 13 sobre biofilme em pré-adesão de *C. albicans*(MEV-aumento de 3.000 X).

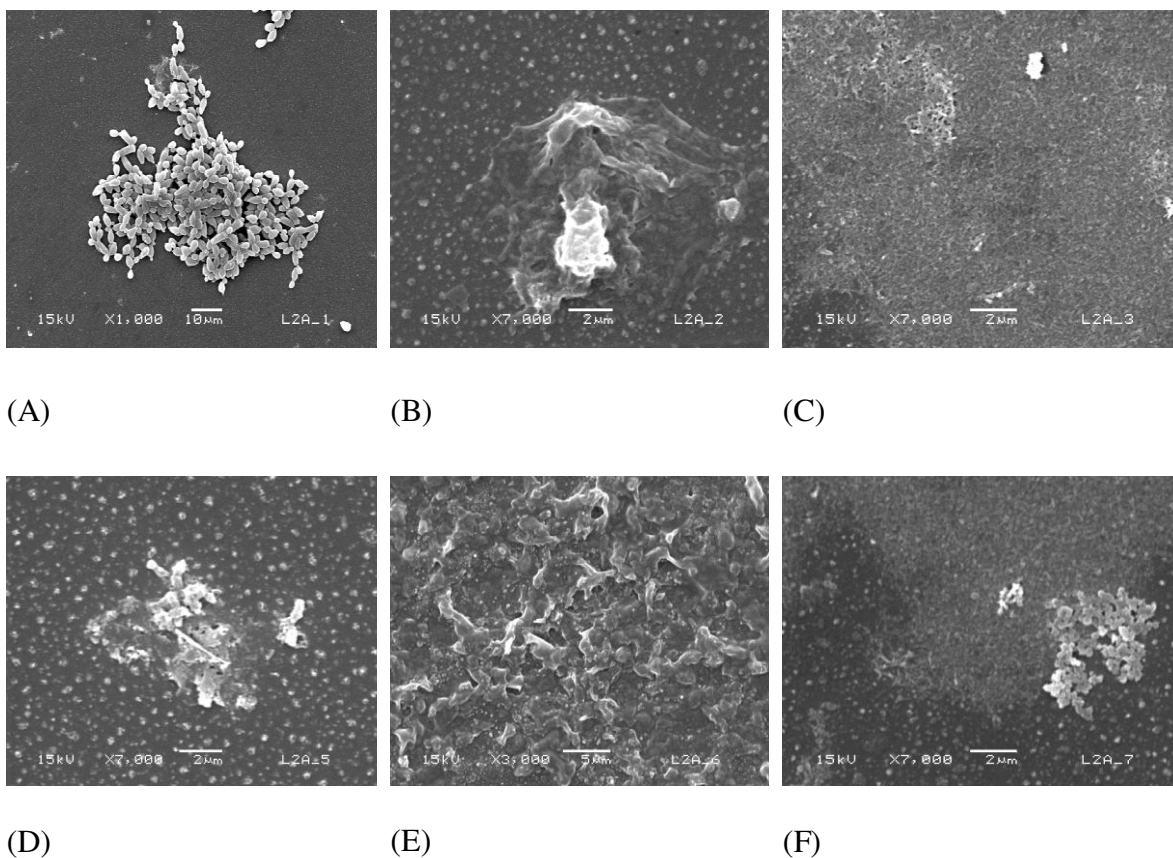
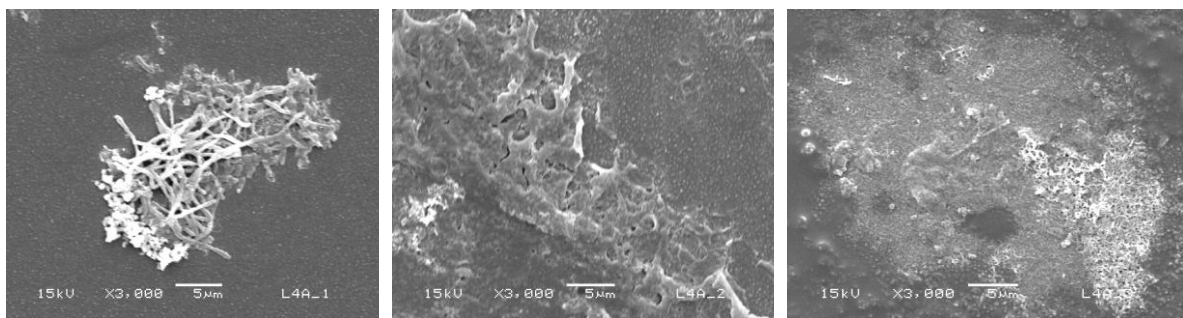


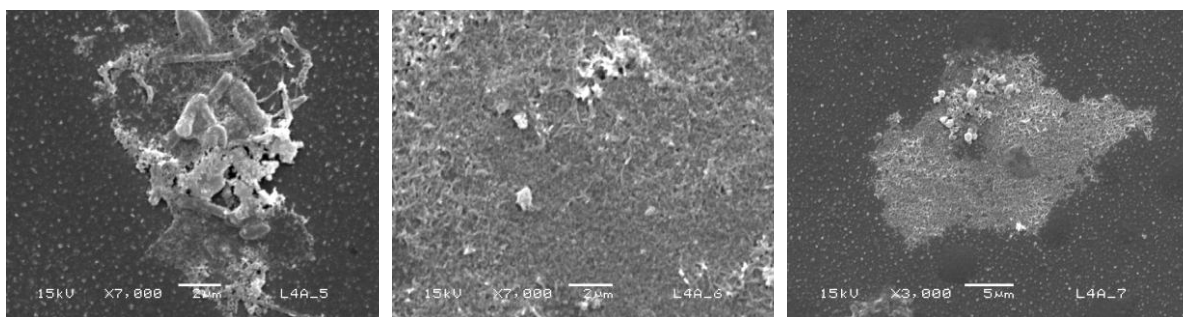
Figura 12: Biofilmes em pré-adesão de *Candida dubliniensis* CBS 7987. (A) Biofilme em pré-adesão de *C. dubliniensis* (MEV-aumento de 1.000 X); (B) Efeito do EEP tipo 3 sobre o biofilme em pré-adesão de *C. dubliniensis* (MEV-aumento de 7.000 X); (C) Efeito da fr-dicloro da própolis 3 sobre biofilme em pré-adesão de *C. dubliniensis* (MEV-aumento de 7.000 X). (D) Efeito da Nistatina sobre o biofilme em pré-adesão de *C. dubliniensis* (MEV-aumento de 7.000 X); (E) Efeito do EEP da própolis 13 sobre biofilme em pré-adesão de *C. dubliniensis* (MEV-aumento de 3.000 X); (F) Efeito da fr-dicloro da própolis 13 sobre biofilme em pré-adesão de *C. dubliniensis* (MEV-aumento de 7.000 X).



(A)

(B)

(C)



(D)

(E)

(F)

Figura 13: Biofilmes em pré-adesão de *Candida krusei* CBS 573. (A) Biofilme em pré-adesão de *C. krusei* (MEV-aumento de 3.000 X); (B) Efeito do EEP da própolis 3 sobre o biofilme em pré-adesão de *C. krusei* (MEV-aumento de 3.000 X); (C) Efeito da fr-dicloro da própolis 3 sobre o biofilme em pré-adesão de *C. krusei* (MEV-aumento de 3.000 X); (D) Efeito da Nistatina sobre o biofilme em pré-adesão de *C. krusei* (MEV-aumento de 7.000 X); (E) Efeito do EEP da própolis 13 sobre o biofilme em pré-adesão de *C. krusei* (MEV-aumento de 7.000 X); (F) Efeito da fr-dicloro da própolis 13 sobre o biofilme em pré-adesão de *C. krusei* (MEV-aumento de 3.000 X).

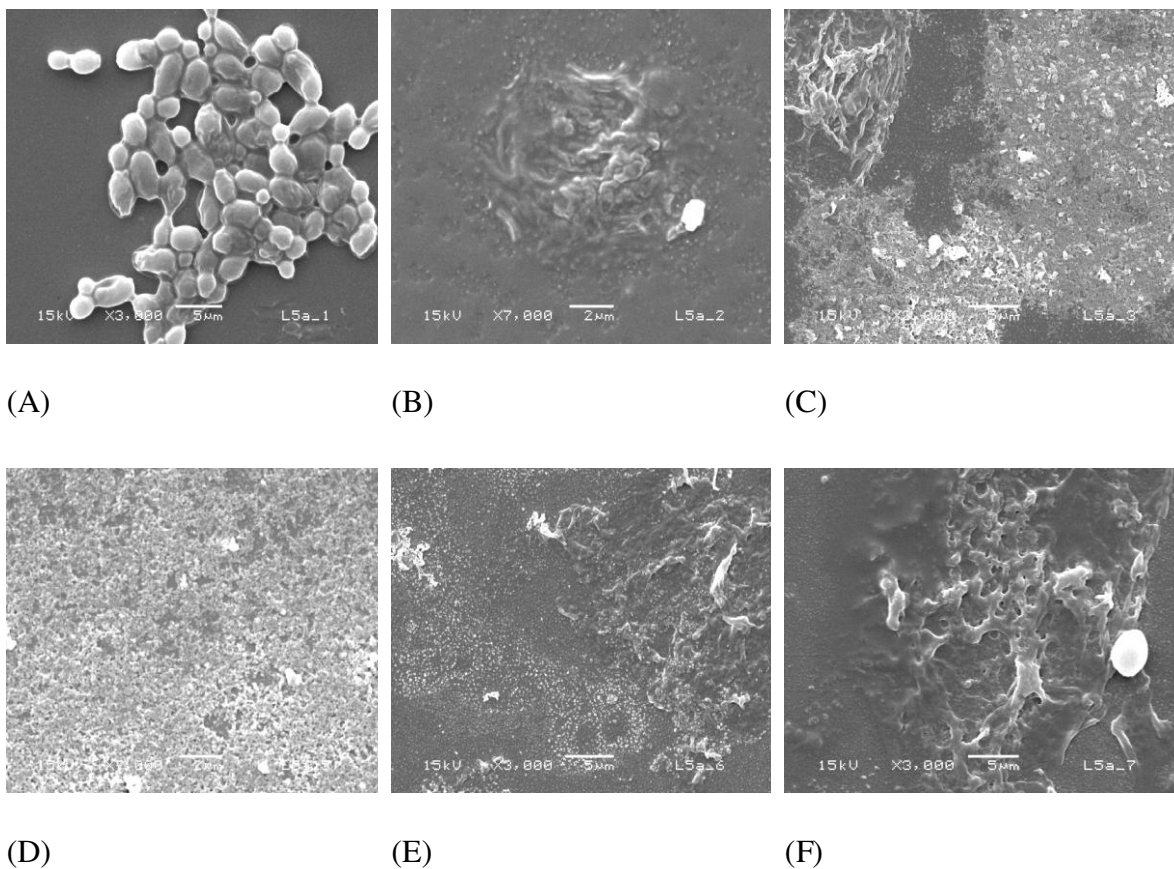


Figura 14: Biofilmes em pré-adesão de *Candida parapsilosis* CBS 604. (A) Biofilme em pré-adesão de *C. parapsilosis* (MEV-aumento de 3.000 X); (B) Efeito do EEP da própolis 3 sobre o biofilme em pré-adesão de *C. parapsilosis* (MEV-aumento de 7.000 X); (C) Efeito da fr-dicloro da própolis 3 sobre o biofilme em pré-adesão de *C. parapsilosis* (MEV-aumento de 3.000 X); (D) Efeito da Nistatina sobre o biofilme em pré-adesão de *C. parapsilosis* (MEV-aumento de 1.000 X); (E) Efeito do EEP da própolis 13 sobre o biofilme em pré-adesão de *C. parapsilosis* (MEV-aumento de 3.000 X); (F) Efeito da fr-dicloro da própolis 13 sobre biofilme em pré-adesão de *C. parapsilosis* (MEV-aumento de 3.000 X).

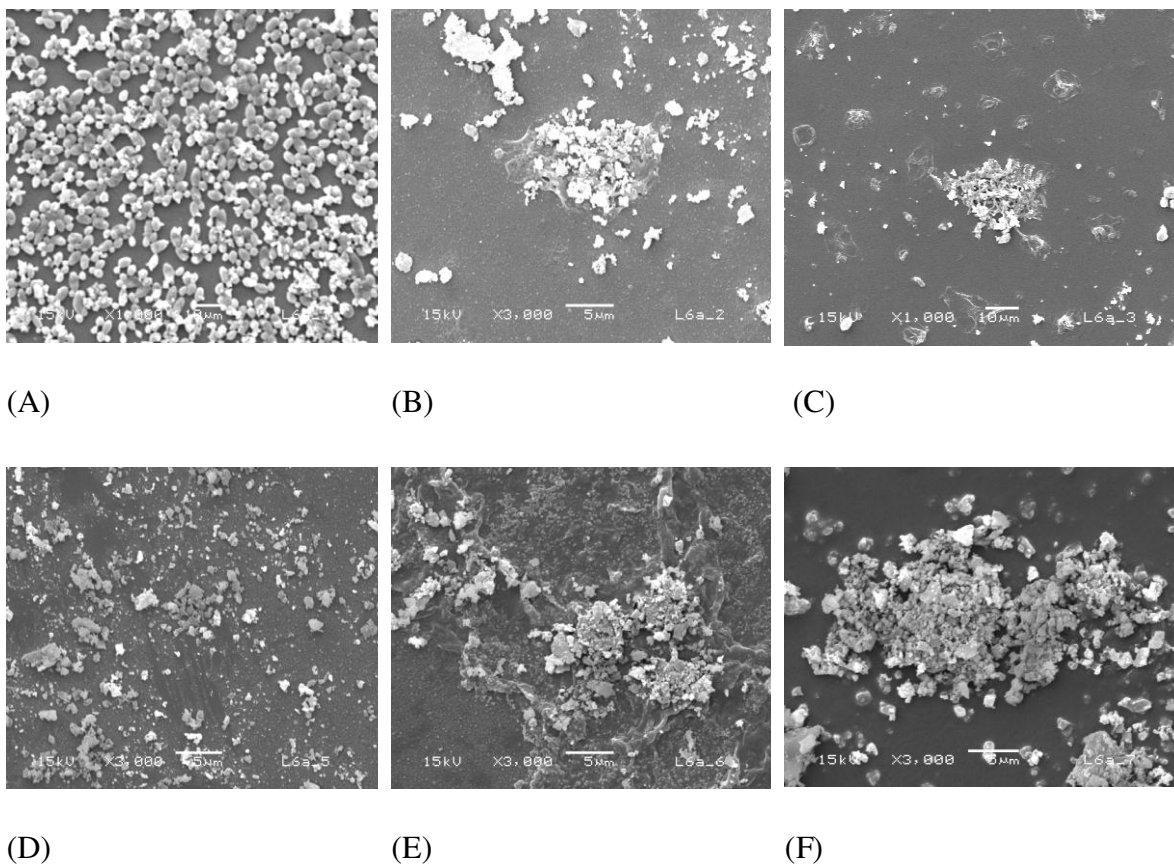


Figura 15: Biofilmes em pré-adesão de *Candida tropicalis* CBS 94. (A) Biofilme em pré-adesão de *C. tropicalis* (MEV-aumento de 1.000 X); (B) Efeito do EEP da própolis 3 sobre o biofilme em pré-adesão de *C. tropicalis* (MEV-aumento de 3.000 X); (C) Efeito da fr-dicloro da própolis 3 sobre o biofilme em pré-adesão de *C. tropicalis* (MEV-aumento de 1.000 X); (D) Efeito da Nistatina sobre o biofilme em pré-adesão de *C. tropicalis* (MEV-aumento de 3.000 X); (E) Efeito do EEP da própolis 13 sobre biofilme em pré-adesão de *C. tropicalis* (MEV-aumento de 3.000 X); (F) Efeito da fr-dicloro da própolis 13 sobre biofilme em pré-adesão de *C. tropicalis* (MEV-aumento de 3.000 X).

Imagens dos biofilmes formados de *Candida* spp.

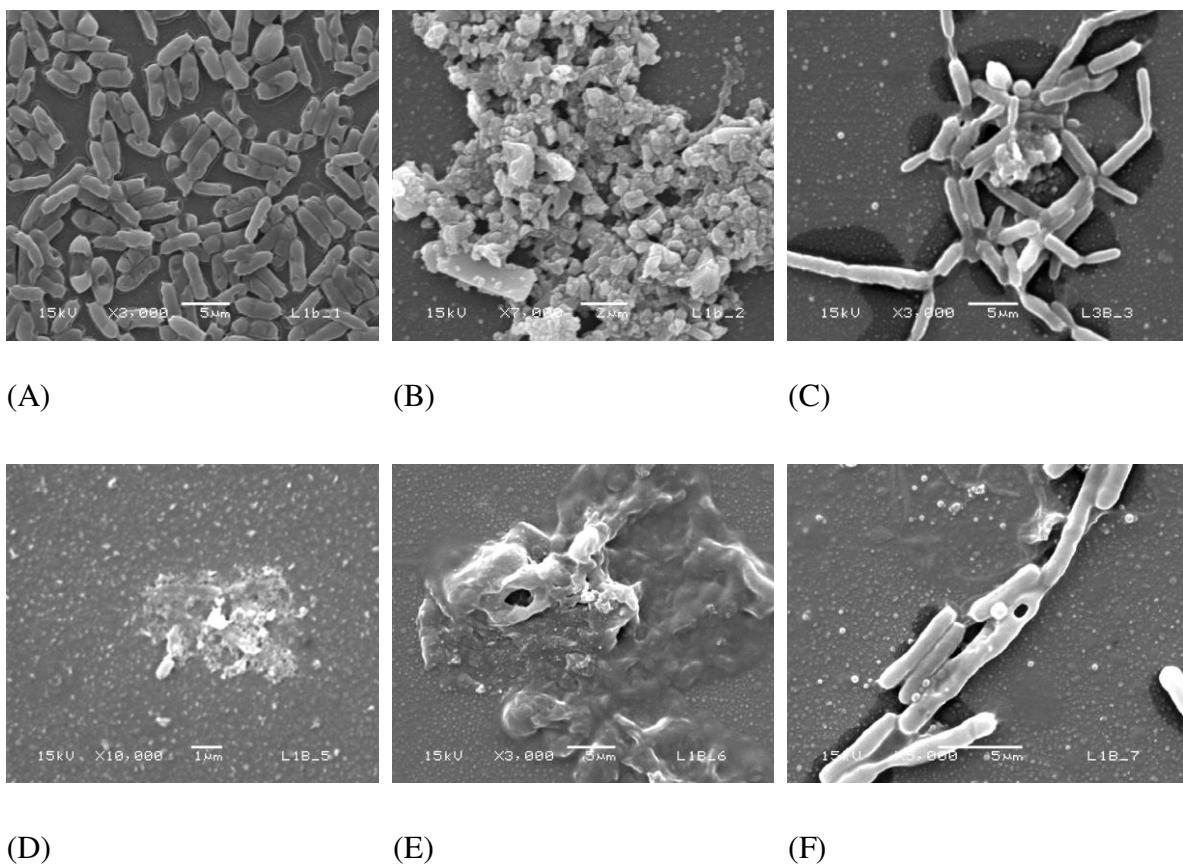
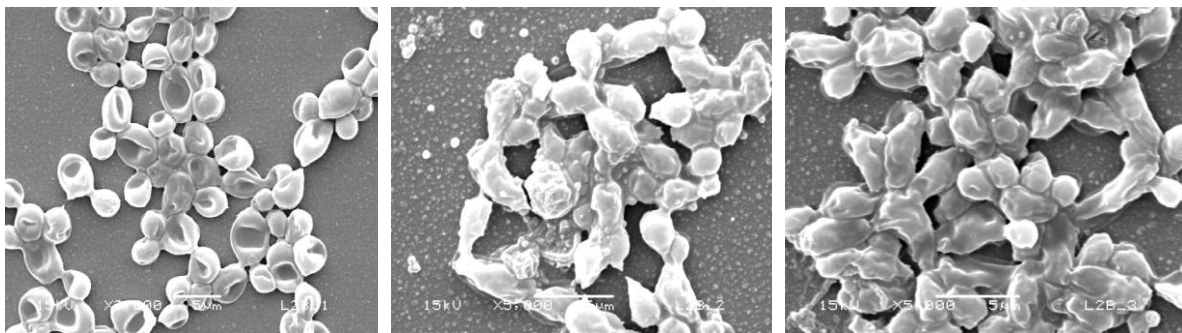


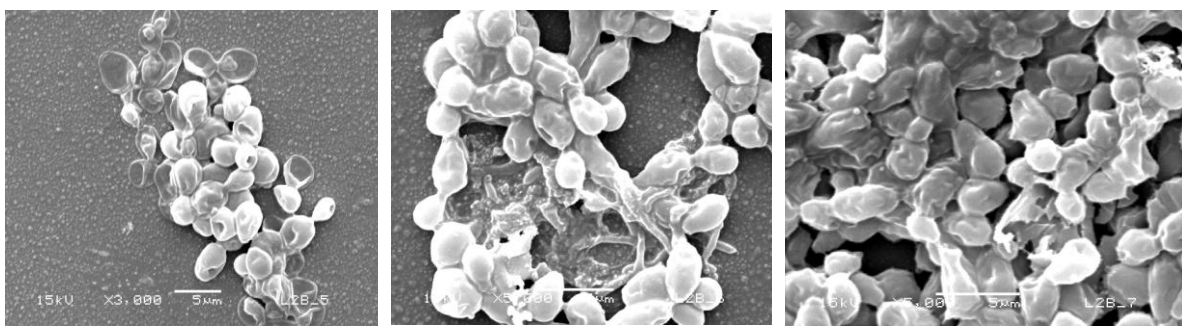
Figura 16: Biofilmes formados de *Candida albicans* CBS 562. (A) Biofilme formado de *C. albicans* (MEV-aumento de 3.000 X); (B) Efeito do EEP da própolis 3 sobre o biofilme formado de *C. albicans* (MEV-aumento de 7.000 X); (C) Efeito da fr-dicloro da própolis 3 sobre o biofilme formado de *C. albicans* (MEV-aumento de 3.000 X); (D) Efeito da Nistatina sobre o biofilme formado de *C. albicans* (MEV-aumento de 10.000 X); (E) Efeito do EEP da própolis 13 sobre o biofilme formado de *C. albicans* (MEV-aumento de 3.000 X); (F) Efeito da fr-dicloro da própolis 13 sobre o biofilme formado de *C. albicans* (MEV-aumento de 5.000 X).



(A)

(B)

(C)



(D)

(E)

(F)

Figura 17: Biofilmes formados *Candida dubliniensis* CBS 7987. (A) Biofilme formado de *C. dubliniensis* (MEV-aumento de 3.000 X); (B) Efeito do EEP da própolis 3 sobre o biofilme formado de *C. dubliniensis* (MEV-aumento de 5.000 X); (C) Efeito da fr-dicloro da própolis 3 sobre o biofilme formado de *C. dubliniensis* (MEV-aumento de 5.000 X); (D) Efeito da Nistatina sobre o biofilme formado de *C. dubliniensis* (MEV-aumento de 3.000 X); (E) Efeito do EEP da própolis 13 sobre o biofilme formado de *C. dubliniensis* (MEV-aumento de 5.000 X); (F) Efeito da fr-dicloro da própolis 13 sobre o biofilme formado de *C. dubliniensis* (MEV-aumento de 5.000 X).

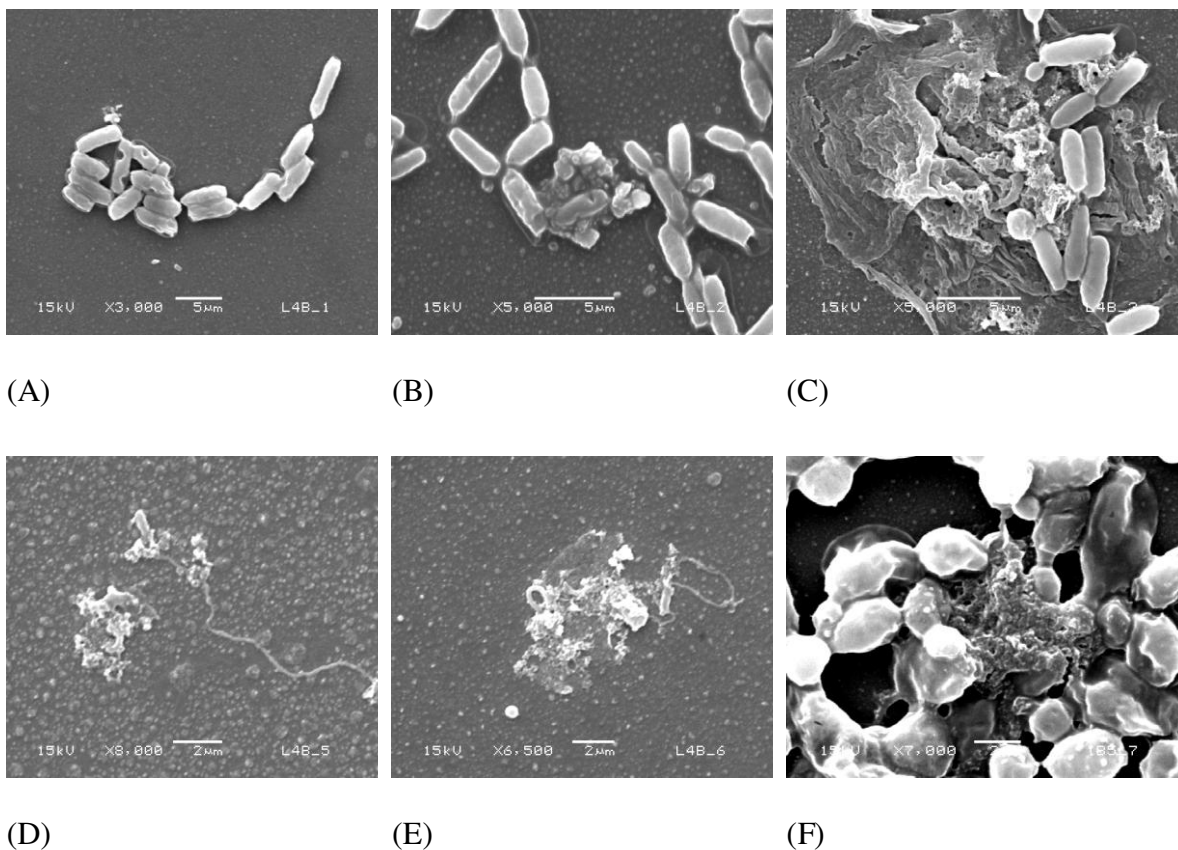
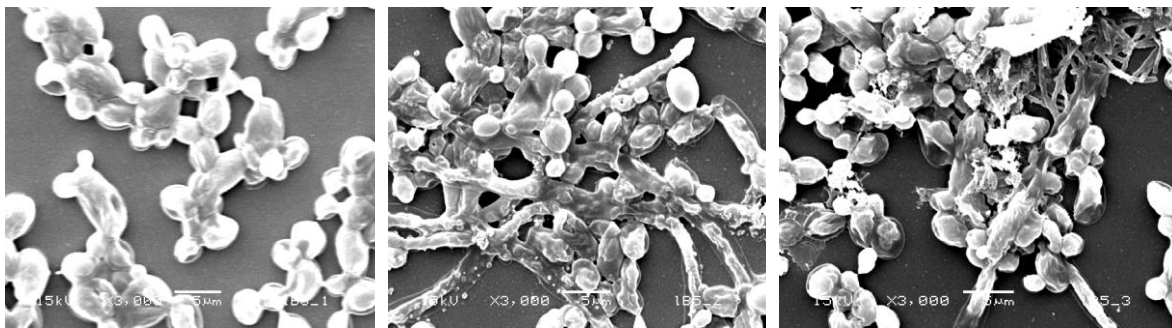


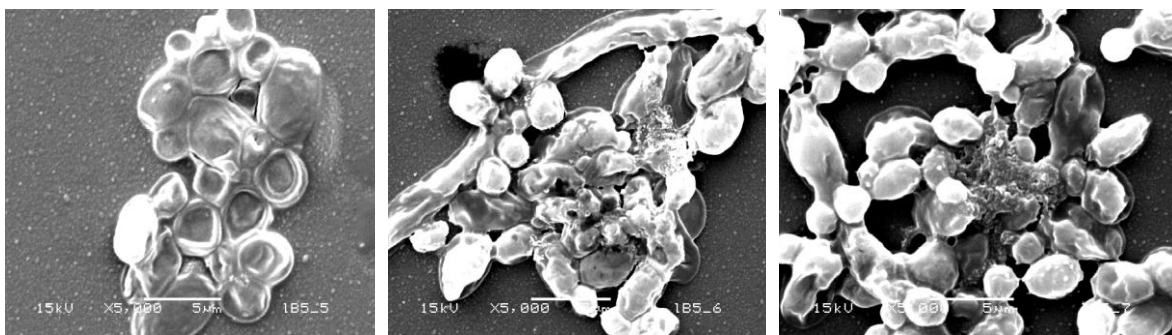
Figura 18: Biofilmes formados de *Candida krusei* CBS 573. (A) Biofilme formado de *C. krusei* (MEV-aumento de 3.000 X); (B) Efeito do EEP da própolis 3 sobre o biofilme formado de *C. krusei* (MEV-aumento de 5.000 X); (C) Efeito da fr-dicloro da própolis 3 sobre o biofilme formado de *C. krusei* (MEV-aumento de 5.000 X); (D) Efeito da Nistatina sobre o biofilme formado de *C. krusei* (MEV-aumento de 8.000 X); (E) Efeito do EEP da própolis 13 sobre o biofilme formado de *C. krusei* (MEV-aumento de 6.500 X); (F) Efeito da fr-dicloro da própolis 13 sobre o biofilme formado de *C. krusei* (MEV-aumento de 7.000 X).



(A)

(B)

(C)



(D)

(E)

(F)

Figura 19: Biofilmes formados de *Candida parapsilosis* CBS 604. (A) Biofilme formado de *C. parapsilosis* (MEV-aumento de 3.000 X); (B) Efeito do EEP da própolis 3 sobre o biofilme formado de *C. parapsilosis* (MEV-aumento de 3.000 X); (C) Efeito da fr-dicloro da própolis 3 sobre o biofilme formado de *C. parapsilosis* (MEV-aumento de 3.000 X); (D) Efeito da Nistatina sobre o biofilme formado de *C. parapsilosis* (MEV-aumento de 5.000 X); (E) Efeito do EEP da própolis 13 sobre o biofilme formado de *C. parapsilosis* (MEV-aumento de 5.000 X); (F) Efeito da fr-dicloro da própolis 13 sobre o biofilme formado de *C. parapsilosis* (MEV-aumento de 5.000 X).

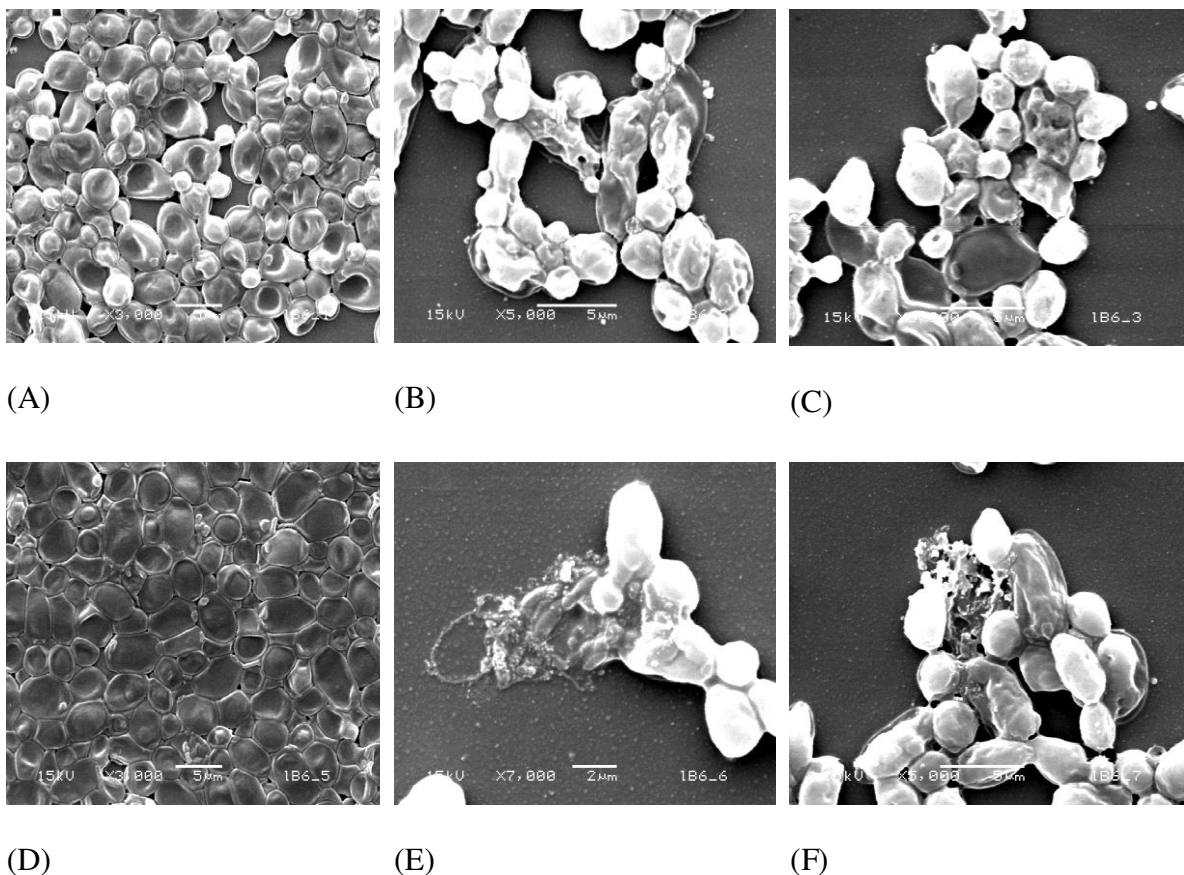


Figura 20: Biofilmes formados de *Candida tropicalis* CBS 94. (A) Biofilme formado de *C. tropicalis* (MEV-aumento de 3.000 X); (B) Efeito do EEP da própolis 3 sobre o biofilme formado de *C. tropicalis* (MEV-aumento de 5.000 X); (C) Efeito da fr-dicloro da própolis 3 sobre o biofilme formado de *C. tropicalis* (MEV-aumento de 3.000 X); (D) Efeito da Nistatina sobre o biofilme formado de *C. tropicalis* (MEV-aumento de 3.000 X); (E) Efeito do EEP da própolis 13 sobre o biofilme formado de *C. tropicalis* (MEV-aumento de 7.000 X); (F) Efeito da fr-dicloro da própolis 13 sobre o biofilme formado de *C. tropicalis* (MEV-aumento de 5.000 X).

Composição química das própolis tipos 3 e 13

Cromatograma do EEP tipo 13 e respectiva fr-dicloro estão ilustrados na Figura 21 (A) e (B).

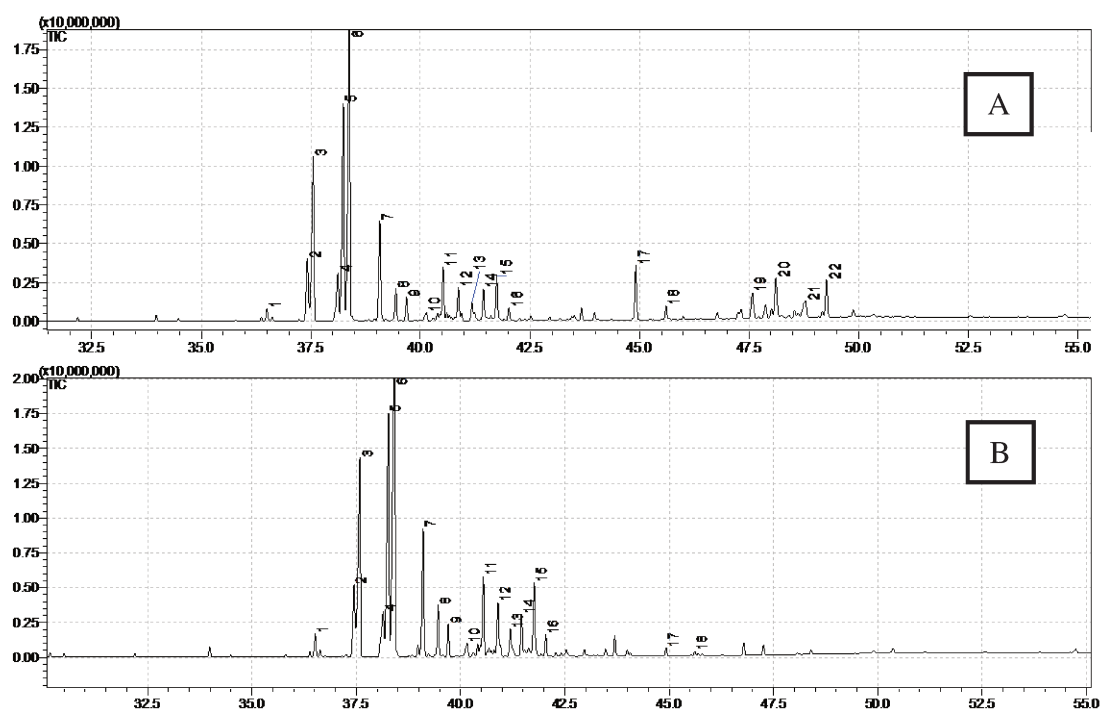


Figura (21) (A) Cromatograma em CG-MS representativo do EEP tipo 13 e (B) Cromatograma em CG-MS representativo da fr-dicloro da própolis tipo 13. Volume de amostra silanizada injetada: 0,5 μ L; tipo de injeção: “splitless”; coluna utilizada: coluna capilar (RTX5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m); modo de operação do detector de massa: “scanning” (m/z 40-800); programação de temperatura: 80 °C (1 min), com incremento de 20 °C/min, 250 °C (1 min), 300 °C (5 min), com um incremento de 6 °C/min, 310 °C (5 min), com um incremento de 15 °C/min, 320 °C (10 min) com um incremento de 20 °C/min.

Cromatograma do EEP tipo 3 e respectiva fr-dicloro estão ilustrados na Figura 22 (A) e (B).

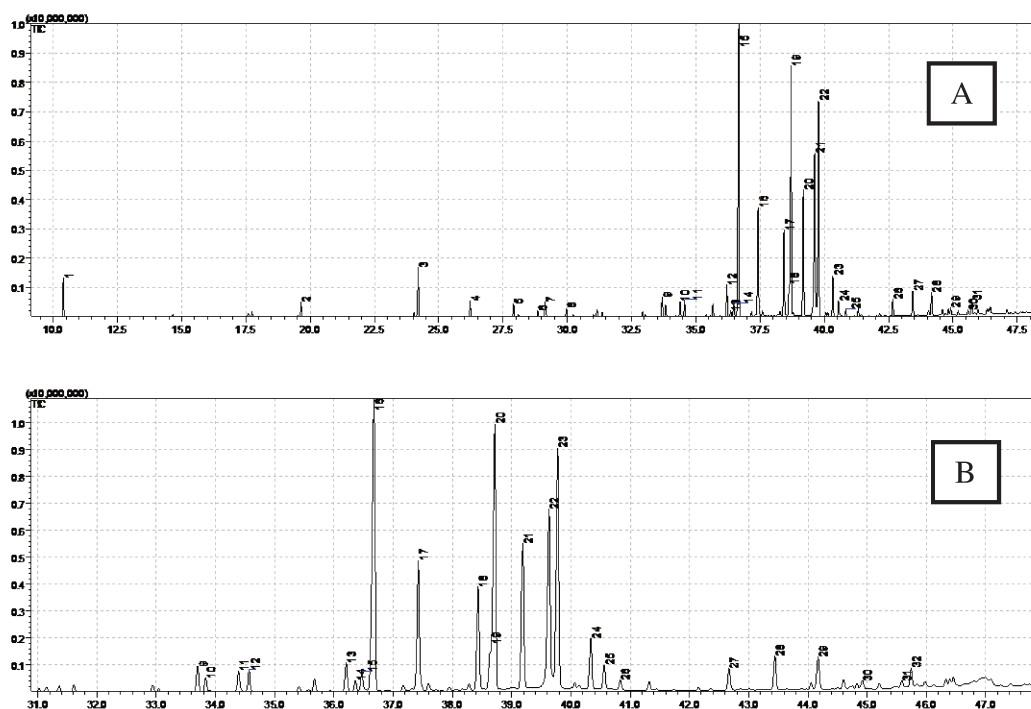


Figura (22) (A) Cromatograma em CG-MS representativo do EEP tipo 3 e (B) Cromatograma em CG-MS representativo da fr-dicloro da própolis tipo 3. Volume de amostra silanizada injetada: 0,5 μ L; tipo de injeção: “splitless”; coluna utilizada: coluna capilar (RTX5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m); modo de operação do detector de massa: “scanning” (m/z 40-800); programação de temperatura: 80 °C (1 min), com incremento de 20 °C/min, 250 °C (1 min), 300 °C (5 min), com um incremento de 6 °C/min, 310 °C (5 min), com um incremento de 15 °C/min, 320 °C (10 min) com um incremento de 20 °C/min.

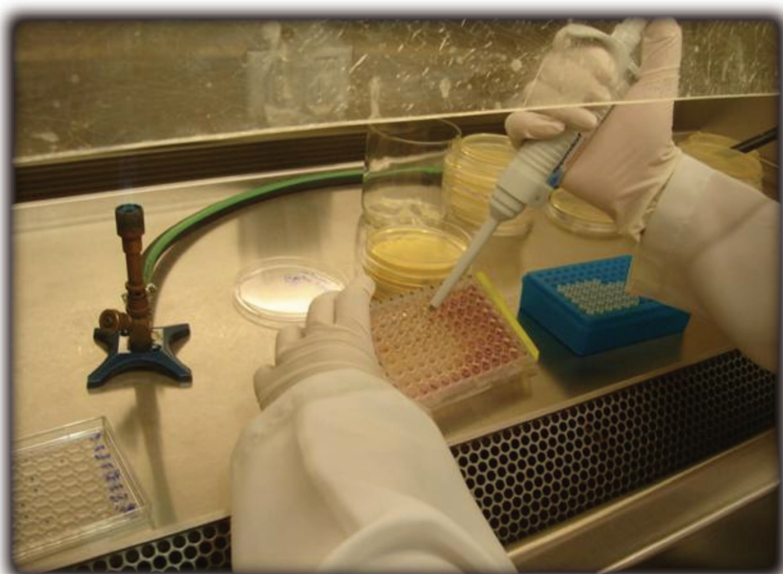


Figura 23: Transferência da suspensão de células dos poços da Placa de 96 poços para o meio sólido SDA, no ensaio de MFC.

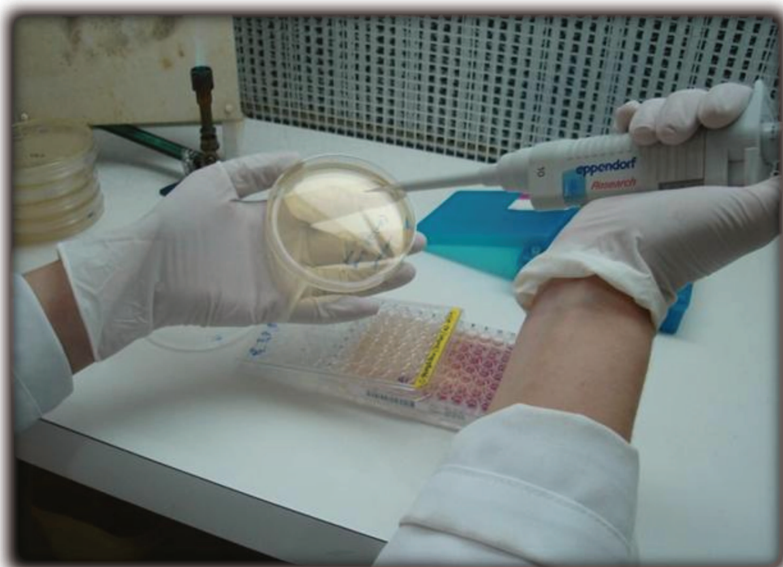


Figura 24: Plaqueamento da suspensão de células dos poços da Placa de 96 poços no meio sólido SDA, no ensaio de MFC.



Figura 25. Técnica de Filtração à vácuo do EEP tipo 13.



Figura 26. Aspectos das amostras dos EEP tipos 6, 3 e 13 liofilizados.



Figura 27. Técnica de Partição líquido-líquido dos EEP dos tipos 13, 6 e 3.



Edizioni Minerva Medica - New Account

Terça-feira, 15 de Junho de 2010 10:00

De:

"journals.dept@minervamedica.it" <journals.dept@minervamedica.it>

Para:

vanessa_cpp@yahoo.com.br

Dear Mrs. Vanessa Queiroz,

The following data have been added to the website www.minervamedicaonlinesubmission.it:

User ID: VCPPQ

Password: *****

Do not hesitate to contact us if you need any further information.

Sincerely,

Edizioni Minerva Medica
Editorial Office

.....
Edizioni Minerva Medica
Corso Bramante 83-85
10126 Torino, Italy
Phone +39 011-678282, fax +39-011-674502
www.minervamedica.it

For the purposes of the Italian Decree Law 196/2003 Minerva Medica guarantees the confidentiality of data and the possibility to modify them or cancel them upon receipt of a written request by the person responsible.

--- Em ter, 15/6/10, journals.dept@minervamedica.it
<journals.dept@minervamedica.it> escreveu:

De: journals.dept@minervamedica.it <journals.dept@minervamedica.it>

Assunto: PDF approval manuscript no. Minerva Stomatol-3311 - Minerva
Stomatologica

Para: vanessa_cpp@yahoo.com.br

Data: Terça-feira, 15 de Junho de 2010, 13:05

Dear Mrs. Vanessa Queiroz,

The PDF version of your submitted manuscript entitled

Anti-Candida activity and Chemical Composition of Brazilian propolis from *Apis mellifera*

registered under number Minerva Stomatol-3311, can be downloaded from the website www.minervamedica.it at the
"ONLINE SUBMISSION" section.

Thank you for your interest in Edizioni Minerva Medica journals.

Sincerely,

Edizioni Minerva Medica
Editorial Office

.....
Edizioni Minerva Medica
Corso Bramante 83-85; 10126 Torino, Italy. Phone +39 011-678282, fax +39-011-674502
www.minervamedica.it