

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RUTHE FIDELIS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA COMBINADA DE PRÓPOLIS
VERDE E FLUCONAZOL SOBRE *Candida albicans* E *Candida krusei*.**

ALFENAS/MG

2025

RUTHE FIDELIS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA COMBINADA DE PRÓPOLIS
VERDE E FLUCONAZOL SOBRE *Candida albicans* E *Candida krusei*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Amanda Latércia Tranches Dias

ALFENAS/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Silva, Ruthe Fidelis da .

Avaliação da atividade antifúngica combinada de própolis verde e fluconazol sobre *Candida albicans* e *Candida krusei* / Ruthe Fidelis da Silva.
- Alfenas, MG, 2025.

36 f. : il. -

Orientador(a): Amanda Latércia Tranches Dias.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. *Candida* spp.. 2. Própolis verde. 3. Antifúngico. I. Dias, Amanda Latércia Tranches , orient. II. Título.

RUTHE FIDELIS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA COMBINADA DE PRÓPOLIS
VERDE E FLUCONAZOL SOBRE *Candida albicans* E *Candida krusei*.**

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 12 de dezembro de 2025

Prof.^a Dra. Amanda Latércia Tranches Dias
Universidade Federal de Alfenas

Prof. Me. Alessandro Vieira Ferreira
Universidade Federal de Alfenas

Prof.^a Me. Virginia Vieira Mendes Silva
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:  Documento assinado digitalmente
AMANDA LATERCIA TRANCHES DIAS
Data: 31/12/2025 12:05:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dedico este trabalho de conclusão de curso à minha irmã, Esther, e à minha mãe, Sara, que me acompanharam e apoiaram de forma incondicional em toda esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder força, sabedoria e perseverança ao longo de toda esta trajetória.

Aos meus familiares, pelo amor incondicional, apoio constante e por sempre acreditarem no meu potencial, mesmo nos momentos mais desafiadores. Aos meus amigos, pela compreensão, incentivo e por tornarem esse caminho mais leve e divertido.

À minha orientadora, Amanda Latercia Tranches Dias, expresso minha sincera gratidão pela oportunidade, orientação dedicada, paciência e confiança no desenvolvimento deste trabalho. Sua orientação foi essencial para o meu crescimento acadêmico e profissional.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, deixo aqui o meu muito obrigada.

RESUMO

Candidíase é o nome dado a infecções fúngicas causadas pelo gênero *Candida* spp., podendo se manifestar desde infecções superficiais localizadas a infecções sistêmicas graves. Essas leveduras compõem a microbiota de indivíduos saudáveis, mas podem se tornar patogênicas quando o microambiente a que pertencem se torna propício para seu crescimento exacerbado, o que lhe classifica como fungo oportunista. Fluconazol é o antifúngico convencional usado para o tratamento desta infecção fúngica, porém algumas espécies como *Candida krusei* e algumas cepas de *Candida albicans* apresentam resistência ao fármaco, dificultando o tratamento. Nos últimos anos, tem crescido o interesse por terapias baseadas em produtos naturais como alternativas aos tratamentos convencionais. As plantas e seus derivados destacam-se por apresentarem compostos biologicamente ativos com propriedades medicinais relevantes. Entre esses produtos naturais, a própolis — substância resinosa produzida por abelhas a partir de exsudatos vegetais — tem despertado atenção científica devido ao seu comprovado potencial antifúngico. **Objetivos:** Avaliar, *in vitro*, os efeitos da adição de extratos alcoólicos e não alcoólicos de própolis verde sobre a resposta ao antifúngico fluconazol em células planctônicas de *C. albicans* e *C. krusei*. **Metodologia:** Foi verificada a sensibilidade de *Candida* spp. frente a extratos aquoso e alcoólico de própolis verde e de uma mistura com o antifúngico fluconazol, por meio dos testes de difusão em discos, viabilidade celular por ensaio de azul de tripan e microdiluição em caldo. **Resultados:** Extrato aquoso de própolis verde apresentou baixa atividade antifúngica quando utilizado isoladamente nas duas espécies de *Candida*. Entretanto, em *C. albicans*, sua associação com o fármaco proporcionou aumento de aproximadamente 48% da ação inibitória. O extrato alcoólico se mostrou promissor em ambas as espécies, com inibição de mais de 50% do crescimento do fungo em diluições variadas. **Conclusão:** Os resultados indicam que a atividade biológica da própolis varia de acordo com o solvente utilizado na extração. Neste estudo, o extrato alcoólico de própolis verde bruta foi o mais eficaz na inibição do crescimento das espécies de *Candida* avaliadas.

Palavras-chave: *Candida* spp.; Própolis Verde; Antifúngico.

ABSTRACT

Candidiasis is the name given to fungal infections caused by the genus *Candida* spp., which can manifest as anything from localized superficial infections to severe systemic infections. These yeasts make up the microbiota of healthy individuals, but they can become pathogenic when the microenvironment to which they belong becomes conducive to their exacerbated growth, which classifies them as an opportunistic fungus. Fluconazole is the conventional antifungal agent used for the treatment of this fungal infection; however, some species like *Candida krusei* and some strains of *Candida albicans* show resistance to the drug, making treatment difficult. In recent years, interest has grown in therapies based on natural products as alternatives to conventional treatments. Plants and their derivatives stand out for presenting biologically active compounds with relevant medicinal properties. Among these natural products, propolis—a resinous substance produced by bees from plant exudates—has garnered scientific attention due to its proven antifungal potential. **Objectives:** To evaluate, in vitro, the effects of adding alcoholic and non-alcoholic green propolis extracts on the response to the antifungal fluconazole in planktonic cells of *C. albicans* and *C. krusei*. **Methodology:** The sensitivity of *Candida* spp. to aqueous and alcoholic green propolis extracts and to a mixture with the antifungal fluconazole was verified using disk diffusion tests, cell viability by trypan blue assay, and broth microdilution. **Results:** Aqueous green propolis extract showed low antifungal activity when used alone in both *Candida* species. However, in *C. albicans*, its association with the drug provided an approximately 48% increase in inhibitory action. The alcoholic extract proved promising in both species, with over 50% inhibition of fungal growth at varied dilutions. **Conclusion:** The results indicate that the biological activity of propolis varies according to the solvent used in the extraction. In this study, the crude green propolis alcoholic extract was the most effective in inhibiting the growth of the evaluated *Candida* species.

Keywords: *Candida* spp.; Green Propolis; Antifungal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da sequência de ensaios.	17
Figura 2 - Esquematização do teste de difusão de discos.	18
Figura 3 - Esquematização das etapas realizadas na análise da viabilidade celular	19
Figura 4 - Esquematização das etapas realizadas no teste de sensibilidade.....	20
Figura 5 - Teste de difusão de discos contendo fluconazol, extratos aquoso e alcoólico de própolis verde em <i>Candida albicans</i>	22
Figura 6 - Teste de difusão de discos contendo fluconazol, extratos aquoso e alcoólico de própolis verde em <i>Candida krusei</i>	23

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Ação isolada do extrato aquoso de própolis verde sobre <i>Candida albicans</i>	25
Gráfico 2 - Ação isolada do extrato alcoólico de própolis verde sobre <i>Candida albicans</i>	26
Gráfico 3 - Ação isolada do extrato aquoso de própolis verde sobre <i>Candida krusei</i>	27
Gráfico 4 - Ação isolada do extrato alcoólico de própolis verde sobre <i>Candida krusei</i>	28
Gráfico 5 - Ação combinada do extrato aquoso de própolis verde e fluconazol sobre <i>Candida albicans</i>	29
Gráfico 6 - Ação combinada do extrato alcoólico de própolis verde e fluconazol sobre <i>Candida albicans</i>	30
Gráfico 7 - Ação combinada do extrato aquoso de própolis verde e fluconazol sobre <i>Candida krusei</i>	31
Gráfico 8 - Ação combinada do extrato alcoólico de própolis verde e fluconazol sobre <i>Candida krusei</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medidas dos halos formados por difusão de discos em <i>Candida albicans</i> e <i>Candida krusei</i>	21
Tabela 2 - Viabilidade celular de <i>Candida</i> spp. frente a extratos de própolis verde.	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. OBJETIVOS	13
1.1.1. Objetivo Geral	13
1.1.2. Objetivos Específicos	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1. <i>Candida</i> spp.	14
2.2. TRATAMENTO COM ANTIFÚNGICO FLUCONAZOL.....	15
2.3. PRÓPOLIS VERDE	15
3. METODOLOGIA	16
3.1. LOCAL DE EXECUÇÃO E AMOSTRAS.....	16
3.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS LINHAGENS	17
3.3. FLUXOGRAMA DA SEQUÊNCIA DE ENSAIOS.....	17
3.4. TESTE DE SENSIBILIDADE DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE EM <i>Candida</i> spp. POR DIFUSÃO DE DISCOS EM ÁGAR.....	18
3.5. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DE <i>Candida albicans</i> E <i>Candida krusei</i> FRENTE A EXTRATOS ALCOÓLICOS E AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE.....	18
3.6. TESTE DE SENSIBILIDADE DE <i>Candida albicans</i> E <i>Candida krusei</i> FRENTE A DILUIÇÕES DE EXTRATOS ALCOÓLICO E AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE E DE UMA ASSOCIAÇÃO COM O FLUCONAZOL.	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
4.1. TESTE DE SENSIBILIDADE DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE EM <i>Candida</i> spp. POR DIFUSÃO DE DISCOS EM ÁGAR.....	21
4.3. TESTE DE SENSIBILIDADE DE <i>Candida albicans</i> E <i>Candida krusei</i> FRENTE A DILUIÇÕES DE EXTRATOS ALCOÓLICO E AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE E DE UMA ASSOCIAÇÃO COM O FLUCONAZOL.	24
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
6. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas oportunistas causadas por leveduras do gênero *Candida*, têm se tornado um desafio em centros de saúde pública, especialmente em pacientes imunocomprometidos e/ou hospitalizados por um longo período. Dentre as leveduras patogênicas deste gênero, destacam-se as espécies *Candida albicans* e *Candida krusei*, pela persistência em ambientes hostis e pela capacidade de formação de biofilmes. A busca por terapias preventivas seguras e eficazes tem aumentado a procura por produtos naturais com atividade antimicrobiana que reduza ou substitua concentrações altas de fármacos com efeitos colaterais adversos e de resistência microbiana frequentemente descritas.

A própolis verde tem se destacado devido a sua composição rica em compostos fenólicos e flavonoides, que possuem propriedades biológicas importantes que incluem ação antioxidante, antimicrobiana e antiinflamatória. Porém sua performance pode variar significativamente de acordo com o tipo de extração da própolis empregado, uma vez que a composição do solvente pode auxiliar na extração de classes distintas de metabólitos, intensificando ou reduzindo as propriedades do produto. Dessa forma, a comparação entre os extratos alcoólicos e a base de água é relevante para averiguar quais dos dois solventes apresentam maior eficácia na inibição do crescimento da levedura.

Portanto, a avaliação da atividade antifúngica de diferentes extratos de própolis verde frente a células planctônicas de *C. albicans* e *C. krusei* é fundamental para averiguar a possibilidade de diversificar alternativas terapêuticas e que possam complementar ou substituir antifúngicos tradicionais, além de contribuir para estudos futuros acerca do desenvolvimento de produtos naturais padronizados.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

Verificar os impactos da adição de extratos de própolis sobre a resposta a antifúngico em células planctônicas de *Candida albicans* e *Candida krusei*.

1.1.2. Objetivos Específicos

- a) Verificar a sensibilidade de células planctônicas de *Candida albicans* e *Candida krusei* frente à fluconazol;
- b) Verificar a sensibilidade de células planctônicas de *C. albicans* e *C. krusei* frente aos extratos alcoólico e a base de água, de própolis verde;
- c) Verificar a sensibilidade de células planctônicas de *C. albicans* e *C. krusei* frente a uma mistura de fluconazol e extratos de própolis;
- d) Analisar e comparar os resultados dessas adições em células planctônicas para verificar a relevância dos extratos de própolis quando comparados ao fluconazol e se há efeito aditivo e ou potencializador quando os dois são administrados em conjunto.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Candida* spp.

Candidíase é o nome dado às infecções superficiais ou profundas causadas por fungos do gênero *Candida*. Este microrganismo está associado com elevadas taxas de mortalidade e morbidades, especialmente em pacientes hospitalizados e/ ou imunossuprimidos. (GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020). As leveduras deste gênero contam com cerca de 200 espécies descritas que pertencem ao reino Fungi, mas apenas 10% são agentes etiológicos de infecções que acometem humanos. Algumas espécies, como *Candida albicans* e *Candida krusei*, fazem parte da microbiota de indivíduos saudáveis, podendo ocasionar infecção em situação de oportunismo, quando o microambiente em que se faz presente se torna propício para o seu desenvolvimento. (NAVES *et al.*, 2013; BERMAN, 2012).

Candida albicans é a espécie considerada de maior relevância devido à sua prevalência dentre os isolados de infecções fúngicas associadas ao gênero *Candida* (DA ROCHA *et al.*, 2021; TALAPKO *et al.*, 2021). Essa espécie apresenta colônias úmidas, cremosas e branco-amareladas em ágar Sabouraud, com odor característico e superfície lisa ou rugosa. Forma tubo germinativo, realiza assimilação de carbono e fermentação, crescendo entre 20–38 °C, em pH ideal de 2,5 a 7,5. Microscopicamente, possui células esféricas, ovais ou alongadas, de 3–5 µm, corando-se como Gram positivas. Seus principais fatores associados à virulência incluem aderência, polimorfismo, variabilidade fenotípica, produção de enzimas extracelulares (proteases e fosfolipases), toxinas e formação de biofilme, que favorecem colonização e infecção (SANTANA *et al.*, 2013).

Candida krusei diferencia-se de outras espécies de *Candida* por características estruturais e metabólicas, e pelo modo como interage com as defesas do hospedeiro. Suas células são alongadas que variam entre 2,2–5,6 µm por 4,3–15,2 µm, e podem aparecer como leveduras ou pseudo-hifas. As colônias apresentam aspecto fosco ou áspero e coloração amarelo-esbranquiçada em ágar Sabouraud, crescendo até 43–45 °C. A espécie fermenta e assimila glicose e metaboliza diferentes ácidos graxos em meios com lactose. Possui notável capacidade de colonizar superfícies inertes, como cateteres e implantes, devido à hidrofobicidade celular, favorecendo a formação de biofilmes quando há nutrientes disponíveis (SAMARANAYAKE, 1994). Embora essa espécie não seja isolada com frequência quando comparadas com outras espécies de *Candida*, as infecções decorrentes de *C. krusei* se tornaram relevantes clinicamente devido à resistência intrínseca ao antifúngico azólico, Fluconazol, usado no tratamento de candidíases, além de apresentar menor sensibilidade aos fármacos fluocitosina e anfotericina B (GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020; PFALLER; DIEKEMA *et al.*, 2008).

2.2. TRATAMENTO COM ANTIFÚNGICO FLUCONAZOL

O fluconazol, um dos triazóis mais utilizados no tratamento de infecções fúngicas, apresenta limitações importantes, incluindo ausência de eficácia contra fungos filamentosos e resistência natural de espécies como *C. krusei*, além da resistência adquirida observada em algumas cepas de *C. albicans*. Seu mecanismo de ação envolve a inibição da lanosterol 14- α -desmetilase, impedindo a conversão de lanosterol em ergosterol e levando ao acúmulo de precursores tóxicos e à perda da integridade da membrana fúngica (DOS SANTOS JR *et al.*, 2005; FICA, 2004). No Brasil, o uso crescente deste antifúngico exige vigilância contínua para detectar alterações nos padrões de sensibilidade fúngica (COLOMBO *et al.*, 2002). O surgimento de cepas resistentes, tem limitado as opções terapêuticas para esta infecção fúngica, além dos efeitos nefrotóxicos e hepatotóxicos dos antifúngicos escolhidos para tratamento de infecção sistêmica, como o caso do fluconazol. Com isso, há uma crescente busca por produtos naturais eficientes e com baixa toxicidade que possam ser usados no tratamento de infecções (SHIGIHARA *et al.*, 2022).

2.3. PRÓPOLIS VERDE

A própolis é um material resinoso produzido por abelhas melíferas a partir de

substâncias colhidas de vegetais acrescidas de suas próprias enzimas salivares, cera e pólen, o que resulta em um produto final capaz de proteger a colméia contra ações externas além da utilização para a mumificação de insetos invasores (FUNARI; FERRO, 2006; PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019). No Brasil, há uma diversidade de tipos de própolis que são classificadas de acordo com a vegetação da região produtora, o que confere uma coloração variada, como verde, vermelho e marrom. Esses diferentes tipos resultam em propriedades farmacológicas de grande relevância, incluindo atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais, além de contribuir para a modulação do sistema imune (REIS *et al.*, 2021). Dentre as substâncias que estão presentes nos extratos de própolis, destacam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos responsáveis por suas propriedades descritas anteriormente (SALGUEIRO; CASTRO, 2016). Para dissolver e liberar essas substâncias ativas, a própolis bruta deve ser extraída. Os solventes comumente usados no processo de extração incluem etanol, metanol, água, clorofórmio, acetona e diclorometano. Eles estão diretamente relacionados com o teor de compostos extraídos, ou seja, a escolha do solvente e a concentração da própolis bruta, interferem na atividade biológica do produto final da extração (DEVEQUI-NUNES *et al.*, 2018; PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019).

Dentre os tipos de extratos de própolis produzidos no Brasil, a própolis verde, que possui como fonte botânica a planta *Bccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como Alecrim do Campo, é um dos extratos que possui atividade antifúngica já descritas por autores (TOBALDINI-VALERIO *et al.*, 2016; SOKOLONSKI *et al.*, 2021; BARROS *et al.*, 2022). Entretanto, ainda são poucos os estudos que comparam a atividade biológica de extratos alcoólicos e aquoso de própolis isoladamente e associados a outras substâncias.

3. METODOLOGIA

3.1. LOCAL DE EXECUÇÃO E AMOSTRAS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Para a realização dos testes, foram utilizados os isolados padrão de *Candida* spp.: *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida krusei* (ATCC 6258).

Os extratos de própolis verde a 18%, nas formulações alcoólica e aquosa, foram adquiridos de forma comercial da empresa Apis Flora®, garantindo padronização e procedência certificada do material utilizado nos experimentos.

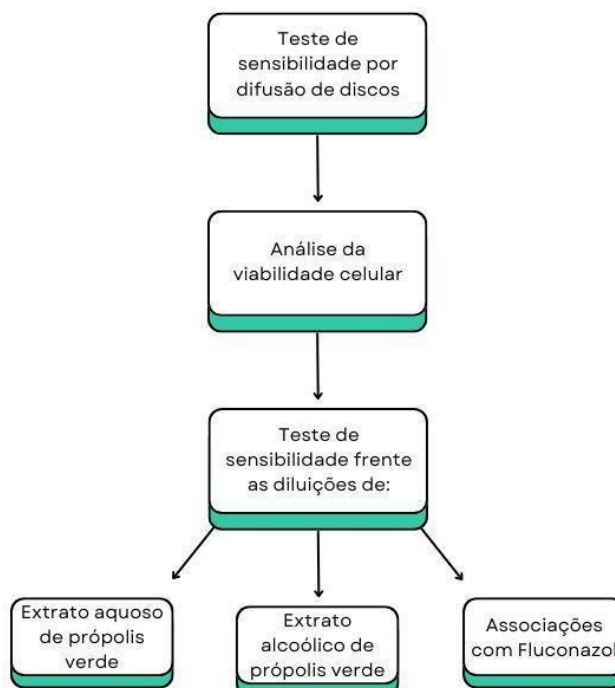
3.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS LINHAGENS

Os isolados de *Candida spp.*, que estavam armazenados a -80°C em criofreezer no biobanco da Universidade, foram cultivados em ágar Sabouraud Dextrose previamente preparado e mantido em estufa específica para cultivo de fungos, a 37°C por 24 horas. Após o cultivo em ágar, ambas as espécies de *Candida* foram cultivadas em caldo Mueller Hinton, meio de cultura utilizado para testes de sensibilidade padrões estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), sob agitação em agitador orbital (“shaker”) a 180 rpm a 37°C .

3.3. FLUXOGRAMA DA SEQUÊNCIA DE ENSAIOS

Abaixo, Figura 1, está ilustrado por meio de um fluxograma a sequência de ensaios realizados em ordem cronológica.

Figura 1 - Fluxograma da sequência de ensaios.



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

3.4. TESTE DE SENSIBILIDADE DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE EM *Candida* spp. POR DIFUSÃO DE DISCOS EM ÁGAR

Os testes de difusão em ágar foram realizados em duplicata, conforme descrito no documento M44-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009), com algumas modificações. A cepa padrão de *C. albicans* e *C. krusei* foi previamente cultivada em meio Ágar Sabouraud Dextrose por 24 horas a 37 °C, em estufa para microrganismos (modelo SP-101, SPLABOR). Após a incubação, preparou-se uma suspensão da levedura em solução salina (NaCl 0,85%), ajustada à turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, foi inoculado em meio Ágar Mueller-Hinton, em placas, o microrganismo suspenso em salina por toda a superfície do meio, deixando-se secar brevemente. Posteriormente, discos de papel filtro com diâmetro padronizados (6 mm) foram posicionados na placa, como esquematizado na Figura 2, e sob eles foram pipetados 20 µL de extratos aquoso e alcoólico de própolis verde 18%, e fluconazol na concentração inicial de 128 µg/ml. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e, ao final do período, procedeu-se à análise dos resultados.

Figura 2 - Esquemática do teste de difusão de discos.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

3.5. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DE *Candida albicans* E *Candida krusei* FRENTE A EXTRATOS ALCOÓLICOS E AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE.

Para avaliar a viabilidade celular de *Candida* spp., utilizou-se a metodologia descrita por Oliveira (2018), com modificações. Após o cultivo inicial, as células de *C. albicans* e *C. krusei* foram suspensas em solução salina de NaCl e ajustadas por espectrofotometria. A

concentração celular do fungo foi padronizada em 5×10^7 células/mL, correspondente à densidade óptica de 0,4, equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Para investigar a ação antifúngica dos extratos de própolis, as espécies de *Candida* foram cultivadas isoladamente e em conjunto com os extratos aquoso e alcoólico de própolis verde 18% em tubos Falcon em agitador orbital “shaker” a 180 rpm, 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, a viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de exclusão com azul de tripano, método que permite distinguir células viáveis (não coradas) de inviáveis (coradas em azul), devido à maior permeabilidade da membrana plasmática nas células mortas (MARTINS, 2017). O corante foi preparado a 0,2%, sendo misturado na proporção de 1:4 (0,1 mL da suspensão celular para 0,3 mL do corante). Uma alíquota da mistura foi transferida para a câmara de Neubauer para realização da contagem. Essa câmara é uma lâmina espessa gravada com quadrantes de 1 mm² de área, que permite a quantificação celular por observação microscópica e aplicação de uma fórmula matemática, resultando na concentração de células por mililitro (SILVA *et al.*, 2014).

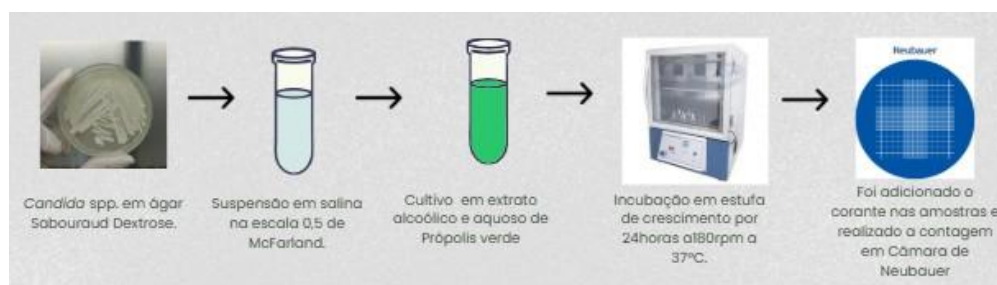
O cálculo da concentração (células/ml) foi realizado conforme a seguinte equação:

$$\text{Concentração (células/ml)} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

Considerando que o volume de cada quadrado da câmara é de 0,1 mm³, foi aplicado o fator 10.000 para converter o valor obtido para células por mililitro.

As etapas da análise de viabilidade podem ser observadas na Figura 3.

Figura 3 - Esquematização das etapas realizadas na análise da viabilidade celular.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

3.6. TESTE DE SENSIBILIDADE DE *Candida albicans* E *Candida krusei* FRENTE A DILUIÇÕES DE EXTRATOS ALCOÓLICO E AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE E DE UMA ASSOCIAÇÃO COM O FLUCONAZOL.

Os testes foram realizados em duplicata seguindo a metodologia de acordo com protocolos padronizados internacionalmente para testes de sensibilidade antifúngica, como os descritos pelo CLSI M27, com algumas modificações.

Após o cultivo inicial de *C. albicans* e *C. krusei* em ágar Sabouraud Dextrose, as espécies foram inoculadas em caldo Mueller Hinton contendo diluições dos extratos alcoólico e a base de água de própolis verde, fluconazol e diluições das duas substâncias em associação, como ilustrado na Figura 4. Foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 poços, contendo 200 µl de cada diluição. Poços contendo apenas meio de cultura e com tratamento sem microrganismo foram preparados para o controle de esterilidade e o controle branco. A concentração mais alta utilizada de fluconazol e de extrato de própolis verde foram respectivamente, 128 µg/ml e 0,18 g/ml. As placas de 96 poços com os tratamentos foram incubadas a 37°C por 24 horas em estufa de crescimento microbiano. Após o período de incubação, a quantificação do crescimento celular fúngico foi estabelecido por espectrofotometria a 570nm, utilizando os controles brancos (tratamento sem o microrganismos) para descontar a turvação ocasionada pela coloração natural da própolis verde diluída no meio de cultura. Os resultados foram representados em gráficos formados pelo software GraphPad Prism.

Figura 4 - Esquemática das etapas realizadas no teste de sensibilidade.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. TESTE DE SENSIBILIDADE DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE EM *Candida* spp. POR DIFUSÃO DE DISCOS EM ÁGAR.

Os testes de difusão de discos foram realizados em duplicata. Os resultados obtidos (Tabela 1), demonstraram variações na atividade antifúngica dos extratos alcoólico e aquoso de própolis verde. Observou-se a formação de halos maiores em discos contendo o extrato alcoólico para ambas as espécies de *Candida*, enquanto o diâmetro do halo do extrato aquoso foi inferior. Durante o experimento, foi observado que o extrato alcoólico possui maior difusão no meio sólido, o que ocasionou o aumento da sua superfície de contato.

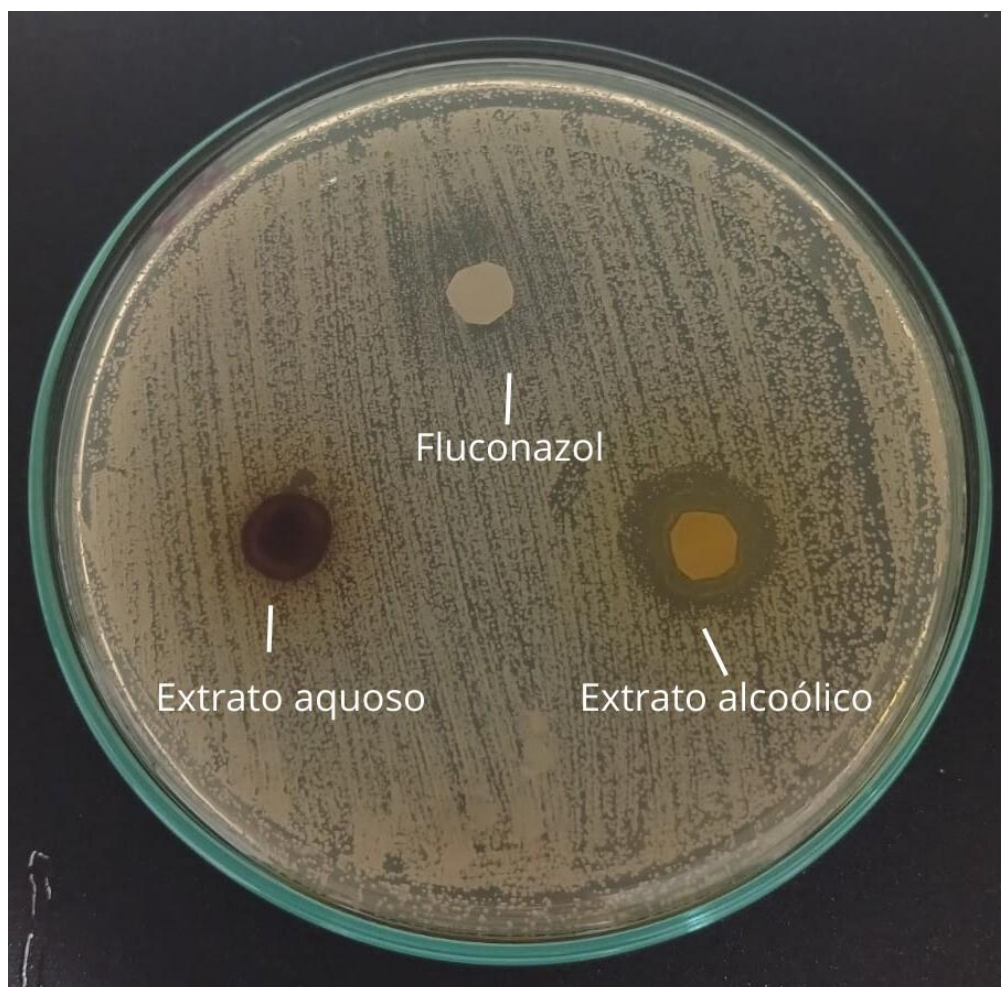
Tabela 1 - Medidas dos halos formados por difusão de discos em *Candida albicans* e *Candida krusei*.

Diâmetro do halo de inibição			
<i>Candida</i> spp.	Extrato aquoso	Extrato alcoólico	Fluconazol
<i>Candida albicans</i>	11 mm	17 mm	18 mm
<i>Candida krusei</i>	15,5 mm	19,5 mm	-

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Em *C. albicans*, o diâmetro do halo de inibição formado pelo extrato alcoólico foi similar ao halo formado pelo antifúngico fluconazol, para o qual a levedura é sensível (Figura 5).

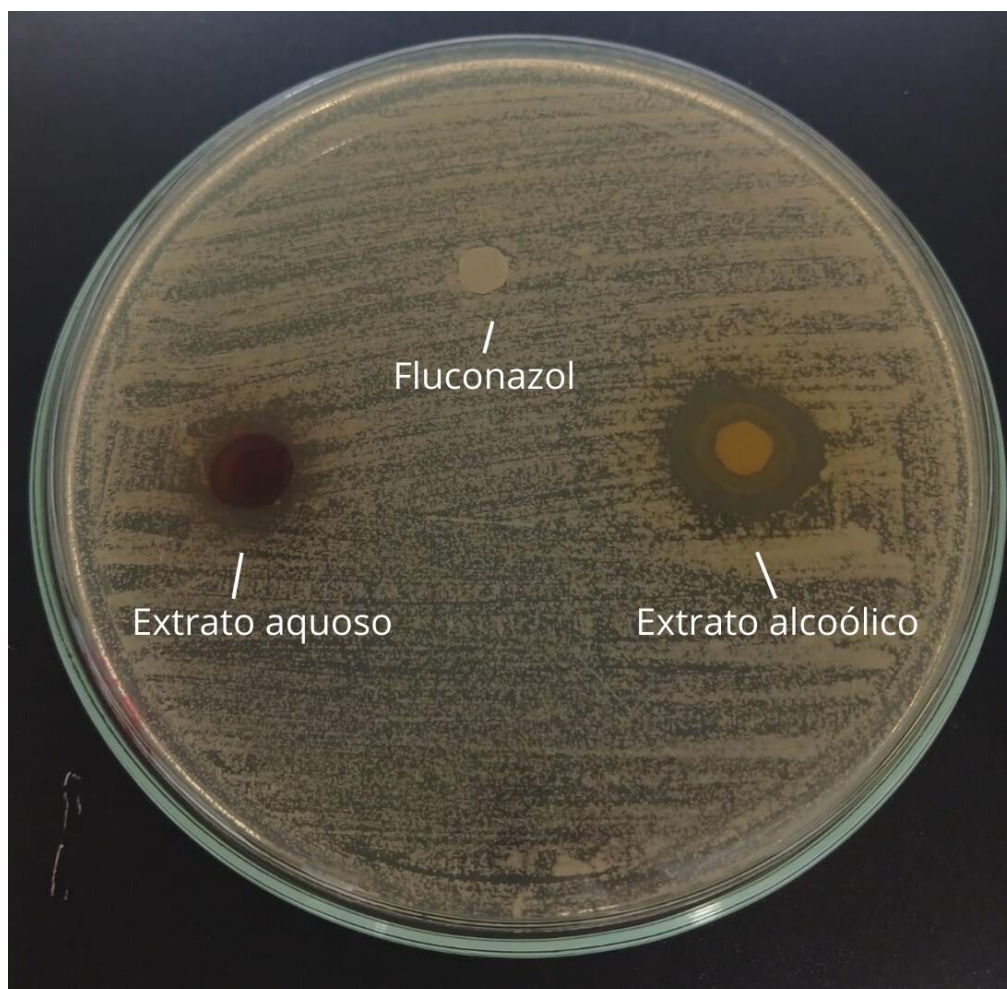
Figura 5 - Teste de difusão de discos contendo fluconazol, extratos aquoso e alcoólico de própolis verde em *Candida albicans*.



Fonte: Arquivo pessoal (2025).

Para *C. krusei*, não houve formação de halo de inibição no disco em que foi aplicado o fluconazol, comprovando a resistência intrínseca dessa espécie ao fármaco. Nos discos contendo os extratos de própolis verde, visualizou-se a formação de zonas de inibição do crescimento, sendo o halo de inibição formado pelo extrato alcoólico aproximadamente 25% maior que o diâmetro do halo formado para o extrato aquoso (Figura 6).

Figura 6 - Teste de difusão de discos contendo fluconazol, extratos aquoso e alcoólico de própolis verde em *Candida krusei*.



Fonte: Arquivo pessoal (2025).

Neste teste é possível concluir que o solvente usado no processo de extração da própolis verde interfere na sua atividade biológica, como descrito por Devequi-Nunes e colaboradores (2018).

4.2. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DE *Candida albicans* E *Candida krusei* FRENTE A EXTRATOS ALCOÓLICOS E AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE.

A concentração celular das duas espécies de *Candida* frente a extratos de própolis verde foi dada como descrito no item 3.4. Os resultados expressos na Tabela 2 demonstram que 74,3% do total de células de *C. albicans* que estavam em contato com o extrato alcoólico eram viáveis, enquanto para o extrato aquoso houve um decaimento de apenas 5,7% da

viabilidade celular, quando comparado ao grupo controle contendo meio de cultura e a levedura. Para *C. krusei* o valor de células viáveis para o extrato alcoólico é ainda menor, totalizando 62%. Para o extrato aquoso, a porcentagem de viabilidade para essa espécie se manteve similar ao resultado obtido em *C. albicans*, comprometendo apenas 5,13% das células total.

Tabela 2 - Viabilidade celular de *Candida* spp. frente a extratos de própolis verde.

<i>Candida</i> spp	Concentração celular (células/ml)		
	Extrato aquoso	Extrato alcoólico	Meio de cultura
<i>Candida albicans</i>	3,9 ⁷	3,13 ⁷	4,21 ⁷
<i>Candida krusei</i>	1,85 ⁷	1,21 ⁷	1,95 ⁷

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

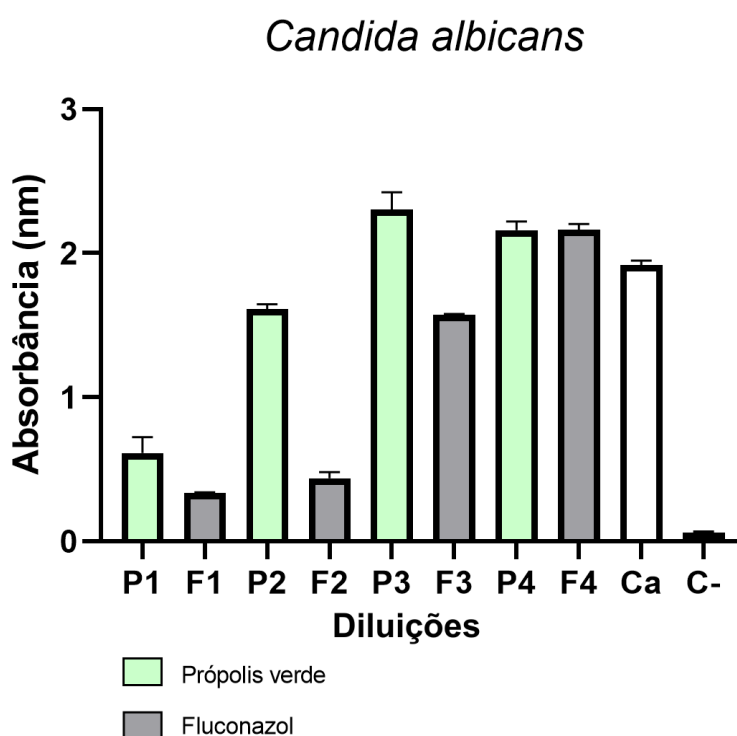
Mediante os resultados obtidos, é importante destacar que a porcentagem de células viáveis não indica, necessariamente, que elas estejam metabolicamente ativas. Em condições ambientais desfavoráveis, o microrganismo pode reduzir sua taxa metabólica como estratégia de sobrevivência, entrando em um estado de dormência, ou seja, células viáveis porém não cultiváveis (XIE *et al.*, 2021).

4.3. TESTE DE SENSIBILIDADE DE *Candida albicans* E *Candida krusei* FRENTE A DILUIÇÕES DE EXTRATOS ALCOÓLICO E AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE E DE UMA ASSOCIAÇÃO COM O FLUCONAZOL.

Os resultados obtidos por espectrofotometria demonstram que tanto os extratos aquosos de própolis (P1–P4) quanto as diluições de fluconazol (F1–F4) apresentam comportamento dependente da concentração no que se refere à inibição do crescimento de *C. albicans*. Frente aos extratos de própolis, para P1 (18%, a concentração mais elevada) observaram-se os menores valores de densidade óptica, indicando maior eficácia na inibição da levedura. À medida que a própolis foi diluída (P2, P3 e P4), observou-se aumento progressivo da turvação, evidenciando redução da atividade antifúngica. Esses resultados confirmam que a própolis aquosa exerce efeito dose-dependente, sendo as concentrações mais altas claramente mais eficientes (Gráfico 1).

O antifúngico fluconazol também apresentou variação relacionada à concentração. Na concentração mais alta F1 (128 $\mu\text{g/ml}$) resultou em menor crescimento fúngico, enquanto as demais diluições (F2–F4) exibiram crescimento gradativo da levedura. Embora as diluições dos extratos de própolis verde aquosa não alcancem o mesmo nível de inibição observado nas concentrações mais potentes de fluconazol, elas ainda demonstram atividade antifúngica relevante frente a *C. albicans*.

Gráfico 1 - Ação isolada do extrato aquoso de própolis verde sobre *Candida albicans*.

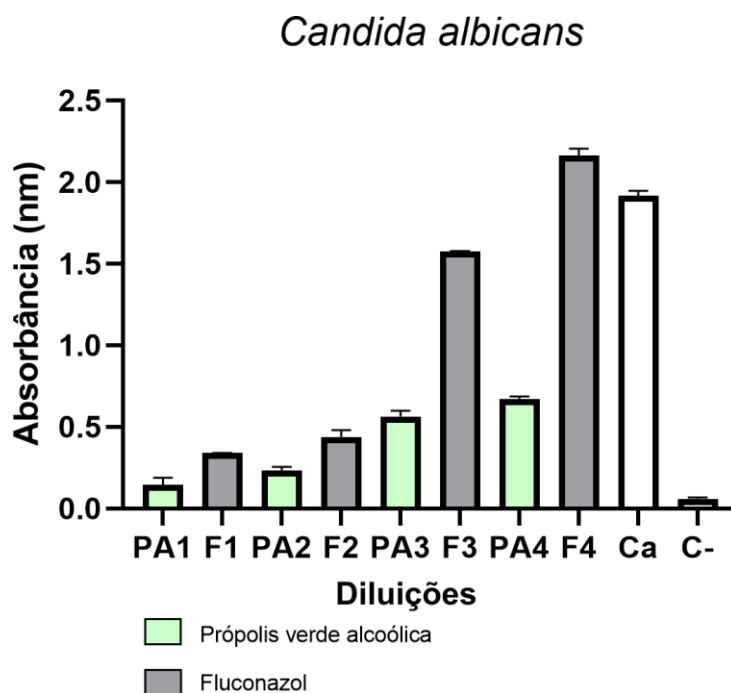


Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: P(1, 2, 3 e 4)= refere-se às concentrações 18, 9, 3 e 1,5%, respectivamente, do extrato aquoso de própolis verde, F(1, 2, 3 e 4)= refere-se às concentrações 128, 64, 32 e 16 $\mu\text{g/ml}$ de fluconazol; Ca = *Candida albicans*; C- = controle negativo.

As diluições dos extratos alcoólicos de própolis verde apresentaram uma melhor performance na inibição do crescimento de *C. albicans* (Gráfico 2). A concentração mais alta do extrato alcoólico (PA1) é aproximadamente 50% mais eficiente que a maior concentração de fluconazol testada (F1).

Gráfico 2 - Ação isolada do extrato alcoólico de própolis verde sobre *Candida albicans*.



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: PA(1, 2, 3 e 4)= refere-se às concentrações 18, 9, 3 e 1,5%, respectivamente, do extrato alcoólico de própolis verde, F(1, 2, 3 e 4)= refere-se às concentrações 128, 64, 32 e 16 µg/ml de fluconazol; Ca = *Candida albicans*; C- = controle negativo.

Nos ensaios realizados com os diferentes extratos de própolis verde e nas comparações com distintas concentrações de fluconazol, observou-se que o extrato alcoólico de própolis apresenta a melhor ação inibitória sobre o crescimento de células de *C. albicans* em estado planctônico.

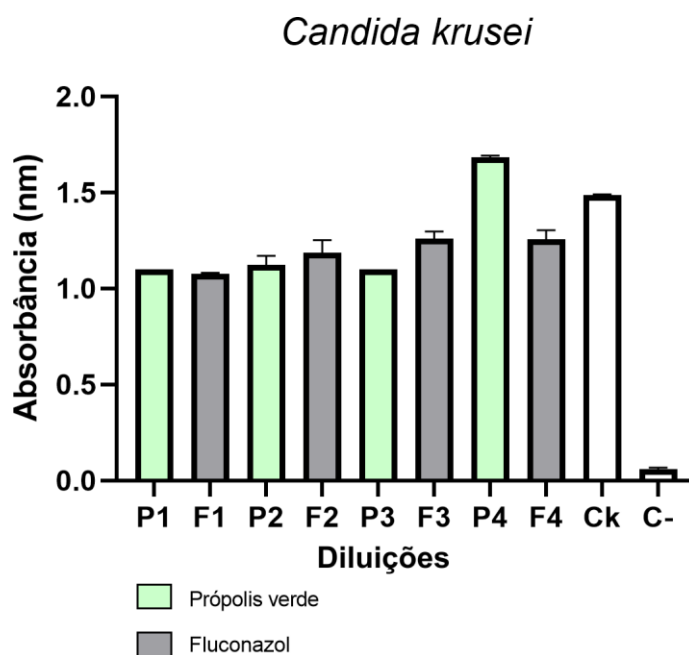
Ambos os extratos de própolis verde demonstraram atividade antifúngica; entretanto, o extrato aquoso foi mais eficiente apenas na maior concentração testada (P1 – 18%), na qual inibiu aproximadamente 90% do crescimento de *C. albicans*. Já o extrato alcoólico manteve uma taxa de inibição superior a 50% em todas as concentrações avaliadas.

Os resultados obtidos revelam que *C. krusei* apresenta menor sensibilidade aos extratos de própolis verde quando comparada a outras espécies, como *C. albicans*, fato já descrito na literatura para essa espécie naturalmente menos sensível a diversos antifúngicos (PFALLER; DIEKEMA, 2007; KULLBERG; ARENDRUP, 2015).

A própolis aquosa apresentou efeito inibitório limitado (Gráfico 3), com redução

mínima do crescimento do fungo nas concentrações mais elevadas. A baixa eficácia pode estar relacionada à menor solubilidade de alguns compostos naturais, como os flavonoides presentes na própolis bruta, em água, o que reduz o potencial de ação desse tipo de extrato (CHENG *et al.*, 2021). Entretanto, a própolis alcoólica demonstrou ser o extrato mais eficiente contra *C. krusei*, apresentando redução clara do crescimento fúngico mesmo em concentrações intermediárias (Gráfico 4). Esse resultado confirma que compostos bioativos derivados da extração alcoólica, contribuem de maneira mais efetiva para a inibição do crescimento.

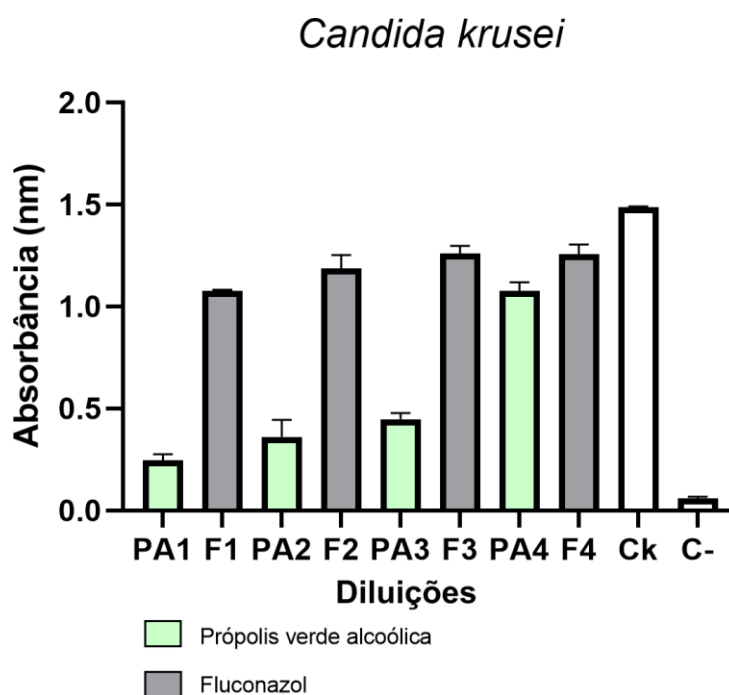
Gráfico 3 - Ação isolada do extrato aquoso de própolis verde sobre *Candida krusei*.



Fonte: Elaborada pela autora (2025)

Legenda: P(1, 2, 3 e 4) = refere-se às concentrações 18, 9, 3 e 1,5%, respectivamente, do extrato aquoso de própolis verde, F(1, 2, 3 e 4) = refere-se às concentrações 128, 64, 32 e 16 µg/ml de fluconazol; Ck = *Candida krusei*; C- = controle negativo.

Gráfico 4 - Ação isolada do extrato alcoólico de própolis verde sobre *Candida krusei*.



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: PA(1, 2, 3 e 4) = refere-se às concentrações 18, 9, 3 e 1,5%, respectivamente, do extrato alcoólico de própolis verde, F(1, 2, 3 e 4) = refere-se às concentrações 128, 64, 32 e 16 $\mu\text{g/ml}$ de fluconazol; Ck = *Candida krusei*; C- = controle negativo.

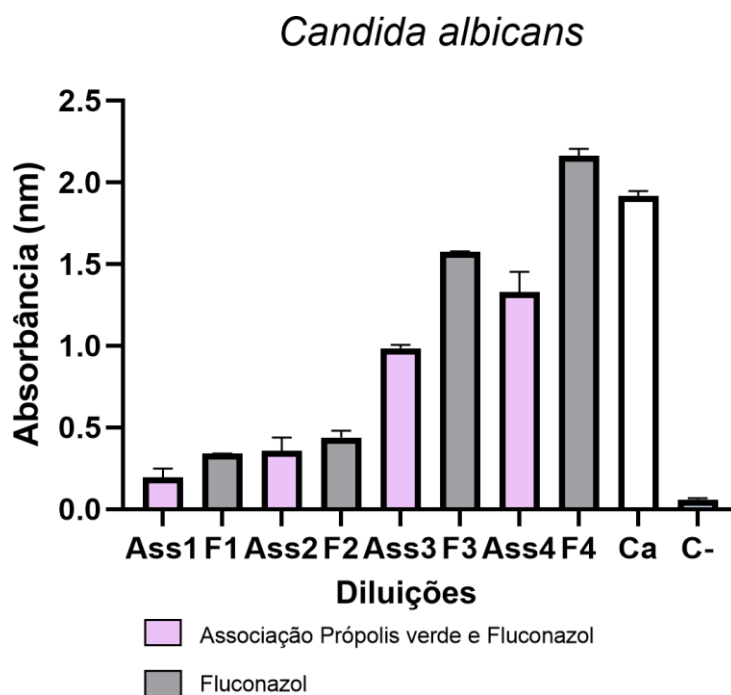
Dessa forma, os dados indicam que, entre os dois extratos testados, a própolis alcoólica é o agente mais promissor na inibição de *C. krusei* em condições de crescimento livre, enquanto a própolis aquosa apresenta potencial reduzido para essa espécie.

Nas associações entre fluconazol e extratos de própolis verde os resultados obtidos diferem-se dos dados anteriores. A maior concentração de fluconazol e de extratos de própolis verde usados, decaíram para 32 $\mu\text{g/mL}$ e 4,5% respectivamente, ilustradas nos Gráficos 5, 6, 7 e 8 como “Ass1”, abreviação de associação 1 (mais concentrada). Portanto as diluições de fluconazol ficaram na concentração de: 32, 16, 8 e 4 $\mu\text{g/mL}$, e as de extratos de própolis decaíram para: 4,5; 2,25; 1,125 e 0,56%.

O extrato aquoso de própolis, que isoladamente não apresentou efeito significativo na inibição do crescimento de *C. albicans*, passou a demonstrar um aumento de aproximadamente 48% da atividade antifúngica quando associado ao fluconazol nas concentrações mais altas. Todas as combinações testadas exibiram maior inibição do

crescimento fúngico, com destaque para Ass1, Ass2 e Ass3, que apresentaram os efeitos mais expressivos (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Ação combinada do extrato aquoso de própolis verde e fluconazol sobre *Candida albicans*.

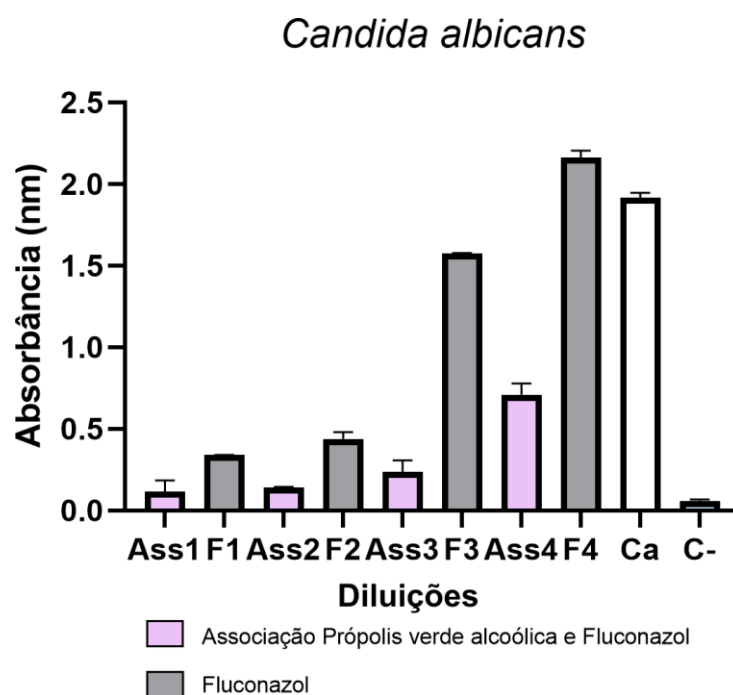


Fonte: Elaborada pela autora (2025)

Legenda: Ass(1, 2, 3 e 4) = refere-se às concentrações das associações de extrato aquoso de própolis verde e fluconazol, F(1, 2, 3 e 4) = refere-se às concentrações 128, 64, 32 e 16 µg/ml de fluconazol; Ca = *Candida albicans*; C- = controle negativo.

Na associação do fluconazol com o extrato alcoólico de própolis verde (Gráfico 6), os resultados foram ainda mais expressivos, com redução superior a 50% no crescimento fúngico. Os dados obtidos sugerem um efeito conjunto entre o fármaco e o extrato alcoólico, potencializando a inibição do desenvolvimento do microrganismo.

Gráfico 6 - Ação combinada do extrato alcoólico de própolis verde e fluconazol sobre *Candida albicans*.

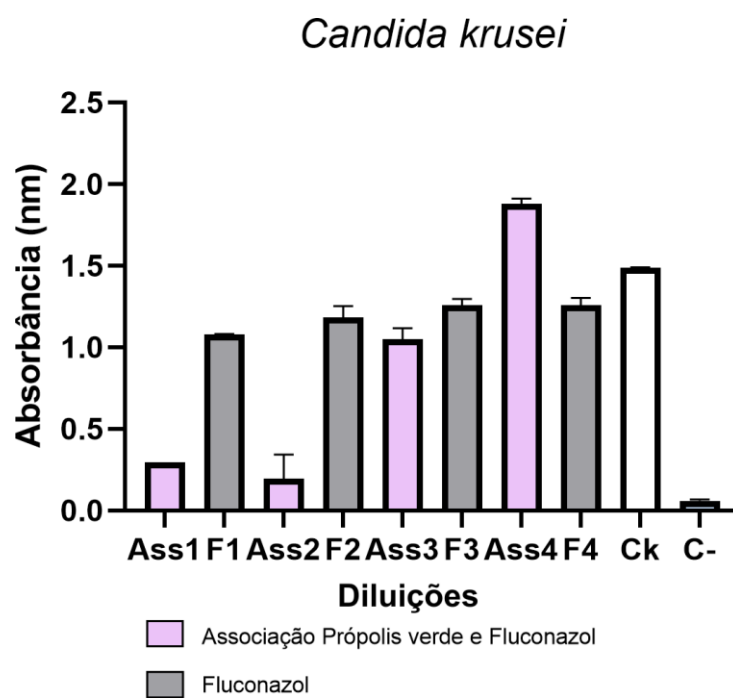


Fonte: Elaborada pela autora (2025)

Legenda: Ass(1, 2, 3 e 4) = refere-se às concentrações da associações de extrato alcoólico de própolis verde e fluconazol, F(1, 2, 3 e 4) = refere-se às concentrações 128, 64, 32 e 16 µg/ml de fluconazol; Ca = *Candida albicans*; C- = controle negativo.

Os efeitos da associação dos extratos de própolis com o fluconazol sobre *Candida krusei* (Gráfico 7 e 8), foram praticamente os mesmos observados nos testes realizados separadamente. Como essa espécie possui resistência intrínseca ao fluconazol, perfil descrito no item 2.1, a combinação não resultou em aumento da inibição fúngica, não indicando qualquer efeito aditivo ou potencializador em comparação ao uso isolado dos extratos.

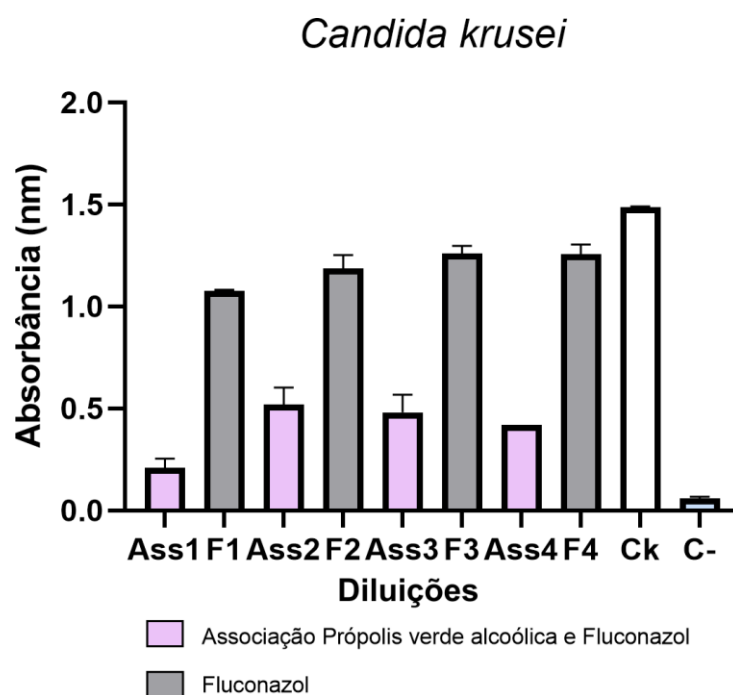
Gráfico 7 - Ação combinada do extrato aquoso de própolis verde e fluconazol sobre *Candida krusei*.



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: Ass(1, 2, 3 e 4) = refere-se às concentrações das associações de extrato aquoso de própolis verde e fluconazol, F(1, 2, 3 e 4) = refere-se às concentrações 128, 64, 32 e 16 $\mu\text{g/ml}$ de fluconazol; Ck = *Candida krusei*; C- = controle negativo.

Gráfico 8 - Ação combinada do extrato alcoólico de própolis verde e fluconazol sobre *Candida krusei*.



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: Ass(1, 2, 3 e 4) = refere-se às concentrações das associações de extrato alcoólico de própolis verde e fluconazol, F(1, 2, 3 e 4) = refere-se às concentrações 128, 64, 32 e 16 µg/ml de fluconazol; Ck = *Candida krusei*; C- = controle negativo.

Portanto, para *Candida krusei*, a associação não obteve resultados promissores, indicando que apenas os extratos possuem ação inibidora.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos testes realizados, pode-se concluir que os extratos alcoólico e aquoso de própolis verde apresentam atividades biológicas distintas, influenciadas pelos solventes utilizados na solubilização dos compostos bioativos presentes no material resinoso.

O extrato alcoólico demonstrou maior eficiência na inibição do crescimento de ambas as espécies de *Candida* avaliadas, demonstrando um efeito potencializador dependente da dose. O extrato aquoso também se mostrou eficaz em sua maior concentração para as duas espécies, entretanto, na associação com o antifúngico fluconazol em *C. albicans*, observou-se uma inibição significativa (50%) até a terceira maior dose testada (Ass3), sugerindo um

possível efeito adjuvante ao fármaco.

Na associação entre o extrato alcoólico e o fluconazol, *C. albicans* apresentou sensibilidade em todas as concentrações avaliadas. Para *Candida krusei*, os valores obtidos tanto nos testes isolados quanto nas associações com o fármaco para o extrato alcoólico permaneceram similares, indicando que para ocorrer efeito conjunto, a espécie deve ser sensível a ambas substâncias utilizadas.

Os resultados indicam que o extrato alcoólico de própolis verde é mais eficiente no controle do crescimento das espécies de *Candida* avaliadas *in vitro*, evidenciando seu potencial para uso isolado ou como coadjuvante em tratamentos antifúngicos. Esta associação pode contribuir para a redução da toxicidade decorrente de altas concentrações de fluconazol, sem comprometer sua eficácia.

6. REFERÊNCIAS

BARROS, I. L. E. *et al.* **Promising effect of propolis and a by-product on planktonic cells and biofilm formation by the main agents of human fungal infections.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 94, n. 2, p. e20210189, 2022. DOI: 10.1590/0001-3765202220210189.

BERMAN, J. **Candida albicans.** *Current Biology*, v. 22, n. 16, p. R620–R622, 2012.

BREIVIK, O. N.; OWADES, J. L. **Spectrophotometric semimicrodetermination of ergosterol in yeast.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 4, n. 4, p. 360–363, 1956.

CHENG, Y. *et al.* **Subcritical water extraction of natural products.** *Molecules*, v. 26, n. 13, p. 4004, 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts.** Approved Guideline M44-A2. 2nd ed. Wayne: NCCLS, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts.** 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: CLSI, 2017.

COLOMBO, A. L. *et al.* **Fluconazole susceptibility of Brazilian Candida isolates assessed by a disk diffusion method.** *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 6, n. 3, p. 121–127, 2002. DOI: 10.1590/S1413-86702002000300003.

DA ROCHA, W. R. V. *et al.* **Gênero Candida – fatores de virulência, epidemiologia, candidíase e mecanismos de resistência.** *Research, Society and Development*, v. 10, n. 4, p. e43910414283, 2021.

DEVEQUI-NUNES, D. *et al.* **Caracterização química e atividade biológica de seis diferentes extratos de própolis através de métodos convencionais e extração supercrítica.** *PLoS ONE*, v. 13, e0207676, 2018.

DOS SANTOS JR., I. D. **Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol.** *Scientia Medica*, v. 15, n. 3, p. 189–197, 2005.

FICA, A. C. **Tratamiento de infecciones fúngicas sistêmicas. Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol.** *Revista Chilena de Infectología*, v. 21, p. 26–38, 2004.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. **Análise de própolis.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 1, p. 171–178, 2006. DOI: 10.1590/S0101-20612006000100028.

GÓMEZ-GAVIRIA, M.; MORA-MONTES, H. M. **Current aspects in the biology, pathogeny, and treatment of *Candida krusei*, a neglected fungal pathogen.** *Infection and Drug Resistance*, v. 13, p. 1673–1689, 2020. DOI: 10.2147/IDR.S247944.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against yeast fungi involved in infectious diseases.** ISO 16256:2021. Geneva: ISO, 2021.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. **Invasive candidiasis.** *New England Journal of Medicine*, v. 373, p. 1445–1456, 2015.

NAVES, P. L. F. *et al.* **Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*.** *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 12, n. 2, p. 229–233, 2013. DOI: 10.9771/cmbio.v12i2.6953. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/6953>. Acesso em: 26 nov. 2025.

OLIVEIRA, N. M. de. **Influência da utilização de adesivos para prótese na adesão e formação de biofilme simples e misto.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2018.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. **Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

PRZYBYŁEK, I.; KARPIŃSKI, T. M. **Antibacterial properties of propolis.** *Molecules*, v. 24, n. 11, p. 2047, 2019.

REIS, T. C. *et al.* **Atividade antimicrobiana de própolis de diferentes origens.** *Brazilian Journal of Natural Sciences*, v. 4, n. 1, p. 630–645, 2021. DOI: 10.31415/bjns.v4i1.139.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. **Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde.** *Química Nova*, v. 39, n.

10, p. 1192–1199, 2016. DOI: 10.21577/0100-4042.20160136.

SANTANA, D. P.; RIBEIRO, E. L. *et al.* **Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*.** *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 12, n. 2, p. 229–233, 2013.

SHIGIHARA, T. H. *et al.* **Otimização da extração de própolis verde pela atividade antifúngica e incorporação em biofilme de quitosana.** *Revista Univap*, v. 28, n. 59, 2022.

SOKOLONSKI, A. R. *et al.* **Activity of antifungal drugs and Brazilian red and green propolis extracted with different methodologies against oral isolates of *Candida* spp.** *BMC Complementary Medicine and Therapy*, v. 21, p. 286, 2021. DOI: 10.1186/s12906-021-03445-5.

TALAPKO, J. *et al.* ***Candida albicans* – the virulence factors and clinical manifestations of infection.** *Journal of Fungi (Basel)*, v. 7, n. 2, p. 79, 2021. DOI: 10.3390/jof7020079.

TOBALDINI-VALERIO, F. K. *et al.* **Propolis: a potential natural product to combat infections caused by *Candida* species.** *Future Microbiology*, v. 11, n. 8, p. 1035–1046, 2016. DOI: 10.2217/fmb-2015-0016.

XIE, M. *et al.* **Viable but nonculturable state of yeast *Candida* sp. strain LN1 induced by high phenol concentrations.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 87, n. 18, e0111021, 2021. DOI: 10.1128/AEM.01110-21.