Universidade Federal da Bahia

Instituto de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE *Malassezia pachydermatis* FRENTE A ANTIFÚNGICOS ALOPÁTICOS E EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA, VERDE E MARROM.

KATHLEEN RAMOS DEEGAN

SALVADOR – BAHIA

FEVEREIRO DE 2018

KATHLEEN RAMOS DEEGAN

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE *Malassezia pachydermatis* FRENTE A ANTIFÚNGICOS ALOPÁTICOS E EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA, VERDE E MARROM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

SALVADOR – BAHIA

FEVEREIRO DE 2018

"O desejo só enxerga possibilidades."

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

...à natureza misteriosa da vida, que me motiva.

...à família em suas múltiplas apresentações, cenário, tela e terreno.

...às abelhas, biofábricas incríveis, incansáveis, corpos potentes pela união.

...à amizade e à solicitude, que juntas tem o poder de materializar.

...à infância, que me acorda todos os dias para a simplicidade da alegria.

...aos Professores revolucionários que tive, pela doação, pela troca e pelos conselhos.

...aos amores, em todas as suas manifestações, pela paciência, pelo carinho, incentivo e vibração.

AGRADECIMENTOS

Tem muito afeto envolvido nesta mistura. Encontros de intenções que maquinaram explosão de acontecimentos. Os sentimentos que me tomam só poderiam ser gratidão e satisfação. Afinal, mais do que o desenvolvimento de um trabalho repleto de colaborações amorosas, durante esse percurso, tive a certeza indescritível de que descobri minha missão na ciência. Para tudo acontecer, claro, muitas pessoas foram envolvidas. Agradeço a todos pela colaboração e envolvimento neste meu projeto de vida. De forma generalista irei listar alguns "culpados" cruciais pelo meu estado atual de felicidade.

Agradeço à minha mãe, primeira culpada. Foi ela quem me deu o primeiro microscópio, mesmo achando maluca minha ideia de ser cientista. Ela é minha maior apoiadora na missão materna. Sem ela, alguns experimentos, gráficos e escritos seriam bem mais dificultados.

Ao meu pai, por ter me ensinado a ser sonhadora. Por ser meu parceiro de atualizações tecno-científicas.

Aos meus pais, em conjunto, por terem me proporcionado o caminho da liberdade, mesmo não concordando com meus ideais ou achando meus modos de operacionalizar a vida um tanto rebeldes. Por terem se esforçado para financiar uma educação básica de qualidade, no contexto de um país cuja educação escolar pública e gratuita se encontra defasada.

Às minhas filhas, minhas "IC_s baby", pelas ponteiras arrumadas. Vocês me surpreendem e me ensinam a superar meus piores defeitos. São o motivo da minha existência empolgada.

À minha tia Mariana (*in memoriam*) por ter me levado para ver o primeiro microscópio de verdade, num laboratório de análises clínicas que ela trabalhava. Me lembro da imagem daquelas hemácias como se fosse hoje.

À Ricardo Portela por ser um grande líder, um modelo de orientador que inspira. O poder de agregar, manter o jogo de cintura e a produtividade são as especialidades dele. Tudo sempre com muita delicadeza com as pessoas e seus contextos únicos. Eu só acredito neste processo educacional: autônomo e libertador. Professor, obrigada por ter confiado em mim e me aceitado como orientada, num momento delicado, onde a atitude mais fácil seria a extrema oposta.

Aos amigos do grupo de pesquisa coordenado por Ricardo Portela. Vocês são os melhores amigos científicos do planeta Terra.

À Bruna Machado, (SENAI-CIMATEC) pela parceria com as própolis, o cerne deste trabalho.

À Samira Hanna, pela parceria, conselhos e empolgações fúngicas.

À Antônio Vicente Magnavita, que me recebeu com tratos à altura de sua grande alma e competência profissional. Idealizador do Laboratório de Micoses, estabelecemos uma parceria que mudou meus rumos. Um grande amigo e pai profissional. Muito obrigada, professor, por ser essa pessoa amorosa e humanitária.

À Elizabeth Ramalho por todos os conselhos e abraços de amiga. Por ter me cedido sua força, sua experiência e seu amor, na concretização de um sonho profissional. O Laboratório de Micoses tem muito da sua energia.

À Tânia Barros, por ter me introduzido ao mundo dos fungos patogênicos, onde as ideias começaram a tomar forma visível.

À equipe do LABIMUNO, pelas ajudas, conselhos e risadas.

À equipe do Lab. Micoses e Lab. Viroses pela convivência harmônica, pelo apoio, pela torcida, pela concretização diária de objetivos. Vocês renovam em mim, a paixão e a força.

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas e do Laboratório de Diagnóstico das Parasitores dos Animais, sempre solícitos em ajudar o “primo pobre”. Sem vocês, meus trabalhos seriam impossíveis.

À equipe do HOSPMEV, pelos dias prazerosos de trabalho.

À Ianei Carneiro, médica veterinária, parceira, pela coleta com os *Didelphis*.

Às amigas e amigos atemporais, pelo incentivo, pelas maluquices e pelos pitacos.

À Daniel Siqueira pela doação e apoio pessoal. Você é um ser humano que eu admiro muito. Sou muito grata por toda a ajuda e todo amor que você emana.

À Diogo Caribé pela atenção amiga e pelas habilidades com o *R*.

À Bruno Oliveira pela parceria nas madrugadas de trabalho.

A todos, um grande abraço de gratidão e carinho.

Conseguimos!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diâmetros (em centímetros) dos halos de inibição de *M. pachydermatis* isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomáticos, e cepa de referência, para cada concentração testada da anfotericina B, pela técnica da difusão em ágar..... **61**

Figura 2. Diâmetros (em centímetros) dos halos de inibição de *M. pachydermatis* isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomáticos, e cepa de referência, para cada concentração testada do cetoconazol B, pela técnica da difusão em ágar..... **62**

Figura 3. Diâmetros (em centímetros) dos halos de inibição de *M. pachydermatis* isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomáticos, e cepa de referência, para cada concentração testada do itraconazol, pela técnica da difusão em ágar..... **63**

Figura 4. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis,* isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (µg/mL) do fluconazol , com a técnica da microdiluição em caldo..... **65**

Figura 5. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis,* isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (µg/mL) da anfotericina B, com a técnica da microdiluição em caldo..... **66**

Figura 6. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis,* isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (µg/mL) do cetoconazol, com a técnica da microdiluição em caldo..... **67**

Figura 7. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis,* isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (µg/mL) do itraconazol, com a técnica da microdiluição em caldo..... **68**

Figura 8. Frequência relativa dos valores de **(A)** CIM (µg/mL) e **(B)** de CFM (µg/mL) encontrados para os isolados de *M. pachydermatis,* frente aos antifúngicos alopáticos comerciais..... **69**

Figura 9. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis*, isoladas de (**A**) peles de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (mg/mL) do extrato etanólico de própolis marrom, com a técnica da microdiluição em caldo..... **73**

Figura 10. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis*, isoladas de (**A**) peles de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (mg/mL) do extrato etanólico de própolis verde, com a técnica da microdiluição em caldo..... **74**

Figura 11. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis*, isoladas de (**A**) peles de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (mg/mL) do extrato etanólico de própolis vermelha, com a técnica da microdiluição em caldo..... **75**

Figura 12. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis*, isoladas de (**A**) peles de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (mg/mL) do extrato supercrítico de própolis vermelha, com a técnica da microdiluição em caldo..... **76**

Figura 13. Frequência relativa dos valores de (**A**) CIM (mg/mL) e (**B**) CFM (mg/mL) encontrados para os isolados de *M. pachydermatis*, frente aos extratos de própolis..... **77**

Figura 14. Curva de dose-resposta estimada para os isolados de *M. pachydermatis* para cada antifúngico testado pela técnica de microdiluição em caldo..... **81**

Figura 15. Curva de dose-resposta estimada para os isolados de *M. pachydermatis* para cada extrato de própolis testado pela técnica de microdiluição em caldo..... **82**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação do teor de umidade, sólidos totais e cinzas totais de amostras de própolis vermelha, verde e marrom coletadas em diferentes regiões do Brasil..... **48**

Tabela 2. Determinação do teor de proteína bruta, lipídios totais, fibras brutas e atividade da água (aw) de amostras de própolis vermelha, verde e marrom coletadas em diferentes regiões do Brasil..... **48**

Tabela 3. Condições e identificação dos extratos etanólicos e supercríticos de própolis brasileira..... **50**

Tabela 4. Determinação do teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/g), flavonoides (mg EQ/g), atividade antioxidante por DPPH (IC50) e ABTS (%) dos extratos de diferentes amostras de própolis brasileiras obtidas por extração etanólica (EtOH) e por SFE (SCO_2)..... **50**

Tabela 5. Caracterização fenotípica dos isolados de *M. pachydermatis*..... **60**

Tabela 6. Valores de CIM, CFM (µg/mL) e razão CFM/CIM dos antifúngicos comerciais, obtidos pela técnica da microdiluição em caldo. Cada isolado de *M. pachydermatis* foi classificado como resistente (R) ou sensível (S), de acordo com os pontos de corte estabelecidos..... **70**

Tabela 7. Classificação dos isolados de *M. pachydermatis* como resistente (R) ou sensível (S), de acordo com os pontos de corte estabelecidos, frente aos antifúngicos testados nas metodologias de difusão em ágar e microdiluição em caldo..... **71**

Tabela 8. Valores de CIM, CFM (mg/mL) e razão CFM/CIM para cada extrato de própolis, obtidos pela técnica da microdiluição em caldo..... **78**

LISTA DE SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
ATPase	Adenosina trifosfatase
BSC	Própolis marrom do estado de Santa Catarina
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
Cm	Centímetros
CO_2	Dióxido de carbono
DPPH	2,2 difenil-difenil-2-picrilhidrazil
ET-BR	Extrato etanólico própolis marrom
ET-GR	Extrato etanólico própolis verde
EtOH	Extração etanólica
ET-RED	Extrato etanólico própolis vermelha
G	Gramas
GC/MS	Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa
GPR	Propolis verde do Paraná
H	Horas
H-RNM	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
MBC	Concentração Bactericida Mínima
Mg	Miligrama
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
MRSA	*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
N_2	Gás nitrogênio
nm	Nanômetros

PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
Pz	Zona de precipitação
RAL	Própolis vermelha do estado de Alagoas
RPM	Rotações por minuto
SCO_2	Dióxido de carbono supercrítico
SC-RED	Extrato supercrítico de própolis vermelha
SFE	Extração por fluidos supercríticos
SNC	Sistema nervoso central
UFC	Unidade de formação de colônias
UV-VIS	Espectroscopia UV/visível
Vol	Volumes
µL	Microlitros

SUMÁRIO

Página

RESUMO 14
INTRODUÇÃO 16
OBJETIVOS 19
Objetivo Geral 19
Objetivos específicos 19
REVISÃO DE LITERATURA 20
1.0. Própolis 20
2.0. Tecnologia de extração com CO_2 como fluido supercrítico 27
3.0. Antifúngicos 29
3.1. Derivados poliênicos 30
3.1.1. Anfotericina B 30
3.2. Derivados azólicos 33
3.2.1. Fluconazol 34
3.2.2. Itraconazol 36
3.2.3. Cetoconazol 37
3.3. Resistência aos antifúngicos: mecanismos envolvidos 38
4.0. Malassezia pachydermatis 40
MATERIAL E MÉTODOS 48
1.0. Obtenção, processamento e caracterização das amostras de própolis 48
2.0. Obtenção dos extratos de própolis 49
2.1. Extração etanólica convencional 49
2.2. Extração com fluido supercrítico (CO_2) utilizando etanol como co-solvente 51
3.0. Micro-organismos testados 51
3.1. Cultivo 52
3.2. Caracterização fenotípica dos isolados 52
4.0. Ensaios de determinação da sensibilidade de isolados de *Malassezia pachydermatis* 54

4.1. Metodologia da difusão em ágar 54
4.2. Metodologia da microdiluição em caldo 55
5.0. Análises dos dados 57
RESULTADOS 59
DISCUSSÃO..... 84
CONCLUSÃO 95
REFERÊNCIAS 97

Perfil de susceptibilidade de *Malassezia pachydermatis* frente a antifúngicos alopáticos e extratos de própolis vermelha, verde e marrom

RESUMO

A própolis é um produto apícola produzido a partir da coleta de resinas de brotos, exsudatos e outros tecidos de plantas, com adição de secreções salivares das abelhas e cera, apresentando diversificada composição química e reconhecidas funções terapêuticas e profiláticas. A própolis brasileira é atualmente classificada em 13 tipos de acordo com suas propriedades físico-químicas, origem geográfica e origem botânica, a última determinando as colorações verde, vermelha, marrom ou amarela. A técnica mais popular para a produção de extratos de própolis é a extração etanólica por maceração, mas apesar de ser um método simples e eficaz, tem desvantagens, tais como forte sabor residual e limitações de aplicação terapêutica. A extração com fluido supercrítico é um método alternativo com alto poder de seletividade, além resultar em menos resíduos poluentes. O tratamento das micoses apresenta diversos problemas, principalmente em casos crônicos, tais como efeitos colaterais, alto custo, tempo prolongado de tratamento e seleção de cepas resistentes. *Malassezia pachydermatis* é a levedura mais isolada em casos de otite e dermatite caninas, e o número de relatos de isolados do fungo exibindo resistência primária *in vitro* a drogas de uso clínico é cada vez maior. Dentro desse contexto, o presente trabalho visa avaliar o perfil de susceptibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *M. pachydermatis* frente a extratos supercríticos e etanólicos de três tipos de própolis brasileiras (verde, vermelha e marrom) e frente a antifúngicos alopáticos comerciais. Para avaliar o perfil de susceptibilidade das leveduras utilizou-se as metodologias de difusão em ágar e microdiluição em caldo. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) variaram entre 8 e > 64 µg/mL para o fluconazol, entre 0,032 e 4 µg/mL para o cetoconazol, entre 0,125 e >16 µg/mL para o itraconazol, e entre 1 e 2 µg/mL para a anfotericina B. Todos os extratos de própolis apresentaram atividade antifúngica frente a todos os isolados de *M. pachydermatis* testados. O extrato etanólico de própolis marrom apresentou CIM ≥16 µg/mL, o etanólico verde e o etanólico vermelho e o supercrítico vermelho mostraram valores de CIM que variaram entre 4 e 8 µg/mL. Os extratos de própolis testados apresentam atividade antifúngica contra isolados de *M. pachydermatis* sensíveis e resistentes a antifúngicos alopáticos comerciais, e o presente estudo abre caminho para pesquisas que elucidem os principais compostos presentes nas própolis com atividade antifúngica e seus mecanismos de ação.

Palavras-chave: apicultura, compostos bioativos, extração supercrítica, micoses

Malassezia pachydermatis susceptibility profile against allopathic antifungals and extracts of red, green and brown propolis

ABSTRACT

Propolis is an apicultural product produced from the collection of resins of shoots, exudates and other plant tissues, with the addition of bee´s salivary secretions and wax, presenting diverse chemical composition and recognized therapeutic and prophylactic properties. Brazilian propolis is currently classified into 13 types according to its physicochemical properties, geographical origin and botanical origin, which determines the green, red, brown or yellow stainings. The most popular technique for the production of propolis extracts is the ethanolic extraction by maceration, but although it is a simple and effective method, it has some disadvantages such as a strong residual taste and limitation on its clinical use. The extraction with supercritical fluid is an alternative method with high selectivity and presents less pollutant residues. The clinical treatment of mycoses presents several problems, especially in chronic cases, such as side effects, high cost, prolonged treatment time and selection of resistant strains. *Malassezia pachydermatis* is the most frequently isolated yeast in canine otitis and dermatitis cases, and the number of scientifical reports of fungal strains exhibiting primary *in vitro* resistance to drugs of clinical use is increasing. In this context, the present work aimed to evaluate the *in vitro* susceptibility profile of clinical isolates of *M. pachydermatis* yeast against supercritical and ethanolic extracts of three types of Brazilian propolis (green, red and brown) and commercial allopathic antifungals. To evaluate the susceptibility profile of the yeasts, the agar diffusion and the microdilution in broth methodologies were used. The minimum inhibitory concentration (MIC) values ranged from 8 to >64 μg/mL for fluconazole, between 0.032 and 4 μg/mL for ketoconazole, between 0.125 and >16 μg/mL for itraconazole, and between 1 and 2 μg/mL for amphotericin B. All propolis extracts showed antifungal activity against all *M. pachydermatis* isolates herein tested. Ethanolic extract of brown propolis presented MIC ≥16 μg/mL, and green ethanolic and red ethanolic and supercritical red showed MIC values that ranged between 4 and 8 μg/mL. Propolis extracts present antifungal activity against *M. pachydermatis* isolates that were resistant to commercial antifungal drugs, and further studies may focus the isolation of active compounds from the extracts and their mechanisms of action.

Keywords: apiculture, bioactive compounds, supercritical extraction, mycosis

INTRODUÇÃO

A própolis, produto apícola balsâmico e resinoso e de composição química complexa e variável, tem-se mostrado um importante aliado de humanos, plantas e animais no controle de microrganismos indesejáveis. Com reconhecidas funções terapêuticas e profiláticas, o uso de extratos de própolis também tem alto potencial de aplicação na medicina para o tratamento de inúmeras condições, incluindo inflamações, controle da dor, infecções e neoplasias (PEREIRA *et al*, 2015; LUSTOSA *et al*, 2008).

A própolis brasileira é bastante diversificada na composição química devido à biodiversidade do país. Atualmente são classificadas em 13 tipos baseados em suas propriedades físico-químicas, como cor, textura e perfil químico, bem como em sua origem geográfica (ANDRADE *et al*, 2017; DAS NEVES *et al*, 2015; PARK *et al*, 2002; FREIRES *et al*, 2016). Podem ter coloração verde, vermelha, marrom ou amarela e sua composição química varia significativamente com o clima, a flora coletada, a espécie de abelha, condições ambientais e o período de coleta do produto. Essas diferenças podem influenciar na atividade biológica dos seus extratos (ANDRADE *et al*, 2017; MACHADO *et al*, 2016-a; PARK *et al*, 2002).

A técnica mais popular para a produção de extratos de própolis é a extração etanólica por maceração, que resulta em produto com baixo teor de cera e de compostos biologicamente ativos, devido à afinidade química do solvente com a matriz (RAMOS & MIRANDA, 2007; MACHADO *et al*, 2015). Os extratos etanólicos normalmente são obtidos por técnicas convencionais (extracão em Soxhlet e solvente maceração). Apesar de ser um método simples e eficaz, a extração com etanol tem desvantagens, tais como forte sabor residual, e limitações de aplicação em cosméticos e indústria farmacêutica (RAMOS & MIRANDA, 2007; MACHADO *et al*, 2015). Extratos alcoólicos também são inadequados para o tratamento de algumas doenças em oftalmologia, otorrinolaringologia, pediatria, ou em pacientes com intolerância ao álcool (KUBILIENE *et al*, 2015).

A extração com fluido supercrítico (EFS) pode ser um método alternativo aos problemas apresentados pela extração etanólica. A utilização de fluidos supercríticos na extração de produtos naturais, tais como o CO_2, tem um potencial considerável para

diferentes processos tecnológicos. Os fluidos supercríticos apresentam uma série de vantagens sobre os solventes líquidos comuns, pois possui propriedades físico-químicas únicas, tais como uma alta difusividade, baixa viscosidade e baixa tensão superficial. A combinação de tais características torna a metodologia adequada para a extração de componentes em matriz sólida. Além disso, como na maioria dos casos não utiliza solventes orgânicos poluentes, qualifica-se como um processo limpo, ou seja, uma tecnologia verde (BISCAIA, 2007).

As mudanças nos padrões de doenças infecciosas, com aumento de incidência de infecções fúngicas e crescentes relatos de leveduras resistentes aos antifúngicos, levou à procura por novos agentes antifúngicos, fato esse evidenciado pelo aumento do número de publicações nesta área a partir da década de 1960 (SCORZONI *et al*, 2017). Embora esse tema ainda seja incipiente em Medicina Veterinária, o aumento dos relatos de cepas fúngicas oriundas de cães exibindo resistência primária *in vitro* a drogas de uso clínico desperta atenção para o assunto (BRITO *et al*, 2007).

Nos últimos 15 anos, o estudo de fungos do gênero *Malassezia* tem ganhado destaque dentro da micologia médica, tanto humana quanto veterinária. Durante este período, oito novas espécies foram isoladas, novos métodos de identificação foram apresentados e está se buscando a padronização dos testes de sensibilidade antifúngica (PRADO *et al*, 2007; CAFARCHIA *et al*, 2015; MARÍN, 2014). A malasseziose e a dermatofitose são as micoses superficiais mais importantes na saúde dos animais de companhia e de produção (BOND, 2010). O tratamento das micoses apresenta uma problemática relacionada ao tratamento principalmente em casos crônicos, que pode ser explicada devido ao baixo número de substâncias dentro do arsenal terapêutico quando comparado com drogas antibacterianas, bem como efeitos colaterais, alto custo, tempo prolongado de tratamento e seleção de cepas resistentes (SIDRIM & ROCHA, 2010; FIANCO, 2014).

Uma série de autores vem relatando cepas resistentes de *Malassezia pachydermatis* a antifúngicos comumente adotados na clínica veterinária. A resistência ao fluconazol é mais reportada, contudo já foram isoladas cepas resistentes à anfotericina B, à nistatina e ao miconazol. Considerando este cenário, reduzir a toxicidade e interações medicamentosas, melhorar a biodisponibilidade, melhorar o espectro antifúngico e combater a resistência são esforços necessários para que se

aumente a eficácia da terapêutica antifúngica (WIEDERHOLD, 2017; SCORZONI *et al*, 2017). Há uma grande necessidade de encontrar novas abordagens para o tratamento das micoses, principalmente no campo da Medicina Veterinária. Neste cenário, a própolis vem ganhando enfoque na área científica. Devido ao amplo espectro de ação biológica da própolis, como cicatrizante, antibiótico, antifúngico, antinflamatório e imunomodulador, o seu uso terapêutico no combate de infecções de pele e de conduto auditivo tendem a obter maior sucesso, visto que em tais condições normalmente ocorrem infecções mistas e de caráter inflamatório (BANKOVA *et al*, 2014; KUBILIENE *et al*, 2015; CARDOSO *et al*, 2009).

A extração otimizada de produtos bioativos de interesse e o uso de solventes inertes que possibilitem o uso ampliado da própolis na medicina e na indústria pode promover o desenvolvimento de bioprodutos à base dessa matriz com alto valor agregado e eficácia terapêutica comprovada, com a consequente ampliação do mercado consumidor da própolis brasileira. Apesar de ser um produto valorizado no mercado, o custo do extrato de própolis para o consumidor final ainda é menor que o valor de antifúngicos comerciais. Desta maneira, o presente trabalho visa verificar a ação de antifúngicos alopáticos comerciais e de diferentes tipos de extratos de própolis, obtidos através de extração alcóolica ou supercrítica, sobre o fungo *Malassezia pachydermatis*, a espécie de levedura mais isolada na Medicina Veterinária.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o perfil de susceptibilidade *in vitro* de isolados da levedura *Malassezia pachydermatis* provenientes de casos de dermatite e otite animais frente a extratos supercríticos e etanólicos de três tipos de própolis brasileiras (verde, vermelha e marrom) e frente a antifúngicos alopáticos comerciais.

Objetivos específicos

1. Caracterizar fenotipicamente as cepas de *M. pachydermatis*;
2. Determinar a concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de isolados de *M. pachydermatis* frente a antifúngicos alopáticos comerciais e a extratos alcoólico e supercrítico das própolis vermelha, verde e marrom;
3. Comparar os resultados entre os diferentes tratamentos nos ensaios de susceptibilidade;
4. Comparar os resultados das técnicas de difusão em ágar e microdiluição em caldo na determinação da susceptibilidade aos antifúngicos;

REVISÃO DE LITERATURA

1.0. Própolis

A própolis é um produto apícola extremamente versátil utilizado pelas abelhas como material de construção e adaptação da colmeia devido às propriedades mecânicas desta substância resinosa, e como substância defensiva para embalsamar intrusos e animais mortos, garantindo menor incidência de microrganismos dentro da colmeia em relação ao meio externo (BANKOVA *et al*, 2014; SILVA-CARVALHO *et al*, 2015; FUNARI & FERRO, 2006). Trata-se de um composto complexo, resinoso, gomoso e balsâmico, produzido pelas abelhas a partir da coleta de resinas de brotos, exsudatos e outros tecidos de plantas com adição, na colmeia, de secreções salivares, cera e pólen (CORNARA *et al*, 2017; PEREIRA *et al*, 2015; LUSTOSA *et al*, 2008; CARDOSO *et al*, 2009; BANKOVA *et al*, 2014; MACHADO *et al*, 2012). A coloração da própolis varia desde o amarelado, verde pardo, castanho, marrom claro ou escuro (dependendo de origem botânica) com sabor adstringente, acre, por vezes levemente amargo, e com cheiro adocicado (MACHADO *et al*, 2016-a; PARK *et al*, 2002; BISCAIA, 2007).

Este composto natural vem sendo utilizado durante séculos pela humanidade no desenvolvimento de terapias alternativas para o tratamento de muitas doenças. Os primeiros registros da utilização da própolis pelo homem remontam ao Egito antigo e à Mesopotâmia. Os persas, gregos, romanos e incas também utilizavam própolis com fins terapêuticos. Os egípcios conheciam as propriedades antiputrefativas da própolis e a empregavam para embalsamar cadáveres. O uso de extratos de própolis na medicina popular data de 300 A.C. e há registros do seu uso por médicos gregos e romanos (PASUPULETI *et al*, 2017; SILVA-CARVALHO *et al*, 2015; PEREIRA *et al*, 2015; LUSTOSA *et al*, 2008; CARDOSO *et al*, 2009; BANKOVA *et al*, 2014; MACHADO *et al*, 2012; FUNARI & FERRO, 2006; LACERDA *et al*, 2011; RAMOS & MIRANDA, 2007). Atualmente têm sido reportados estudos da sua aplicabilidade em

afecções relacionadas à saúde bucal, ginecológica, e de pele (PASUPULETI *et al*, 2017).

A própolis é considerada uma das misturas naturais mais heterogêneas, com mais de 300 constituintes já identificados e/ou caracterizados (ANDRADE *et al*, 2017; COSTA *et al*, 2013). A análise química da própolis é muito dificultada devido ao fato de se tratar de uma mistura de produtos que varia de acordo com a flora de cada região, o período do ano e a variabilidade genética das abelhas. Ultimamente, esta análise tem se concentrado nos extratos aquosos e etanólicos pois são os mais usados nos diversos tipos de aplicações terapêuticas (MACHADO *et al*, 2012). A origem vegetal da própolis é a explicação da diversidade de perfis químicos que podem ser encontrados (CORNARA *et al*, 2017; COSTA *et al*, 2013).

De forma geral, a composição da própolis consiste de 50 a 60% de resinas e bálsamos, 30 a 40% de ceras, 5 a 10% de óleos essenciais e 5% de grãos de pólen. Os principais compostos químicos isolados são ácidos e ésteres alifáticos, aldeídos e ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, ácidos graxos, aminoácidos, esteroides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, flavonoides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenoides, lignanas, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, pró-vitamina A, além de diversos minerais, tais como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês, zinco (ANDRADE *et al*, 2017; WALLER *et al*, 2017; CORNARA *et al*, 2017; PASUPULETI *et al*, 2017; MACHADO *et al*, 2016-a; Silva-Carvalho *et al*, 2015; MACHADO *et al*, 2012; BANKOVA *et al*, 2014; CARDOSO *et al*, 2009; BISCAIA, 2007; LACERDA *et al*, 2011; MENEZES, 2005; RAMOS & MIRANDA, 2007). Doze flavonoides diferentes, como pinocembrina, acacetina, crisina, rutina, luteolina, kaempferol, apigenina, miricetina, catequina, naringenina, galangina e quercetina; dois ácidos fenólicos, ácido cafeico e ácido cinâmico; e um resveratrol têm sido relatados como compostos de interesse (PASUPULETI *et al*, 2017). Algumas enzimas oriundas das secreções glandulares de abelhas ou possivelmente do pólen, como succinil desidrogenase, adenosina trifosfatase, glicose-6- fosfatase, fosfatase ácida, α-amilase, β-amilase, α-lactamase, β-lactamase, maltase, esterase, e trans-hidrogenase também são relatadas como compostos achados nas própolis (SILVA-CARVALHO *et al*, 2015). As própolis europeias e asiáticas contêm ácidos fenólicos simples, enquanto as lignanas são os compostos principais das própolis tropicais. Os compostos voláteis da própolis são

responsáveis pelo seu aroma específico e por sua atividade biológica (CORNARA *et al*, 2017).

As atividades biológicas e farmacológicas da própolis como agente antimicrobiano, cicatrizante, analgésico, imunomodulador, antiviral, anti-inflamatório, anestésico, hepatoprotetor, antiulcerogênico, antiparasitário, antitripanossomal, anticariogênico, antiviral, anticarcinogênico, fitotóxico e antioxidante irão depender da combinação desta composição química peculiar (ANDRADE *et al*, 2017; CORNARA *et al*, 2017; PASUPULETI *et al*, 2017; SILVA-CARVALHO *et al*, 2015; CARDOSO *et al*, 2009; BANKOVA *et al*, 2014; KUBILIENE *et al*, 2015; COSTA *et al*, 2013; FUNARI & FERRO, 2006; ITO *et al*, 2001; LACERDA *et al*, 2011; MENEZES, 2005; BATISTA *et al*, 2012; POSSAMAI *et al*, 2012). Em estudo realizado em ratos Wistar por Batista *et al* (2012), foi observado que a própolis também influenciou na redução de colesterol total, triglicerídeos e glicemia.

Vários autores confirmaram a atividade antimicrobiana da própolis em bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus glutamicus*, *Micrococcus luteus Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Sarcina lutea*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium paraputiricum*. *Enterococcus faecalis)*, e bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonie*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritide*, *Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomita*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis*, *Proteus* spp. e *Shigella* spp.). Extratos alcoólicos de própolis são de relativamente baixa atividade contra bactérias Gram negativas, enquanto os óleos essenciais demonstram uma atividade considerável contra ambos os grupos bacterianos (CORNARA *et al*, 2017; NETO *et al*, 2017; TIVERON *et al*, 2016; CARDOSO *et al*, 2016; WANG *et al*, 2016; DAS NEVES *et al*, 2015; MACHADO *et al*, 2016-a; MACHADO *et al*, 2016-b; SILVA-CARVALHO *et al*, 2015; BANKOVA *et al*, 2014; JUNIOR *et al*, 2012; FARNESI *et al*, 2009; KUBILIENE *et al*, 2015, COELHO *et al*, 2007; COSTA *et al*, 2013; MOURA, 2000; CABRAL *et al*, 2012; CASTRO *et al*, 2009; BANKOVA *et al*, 1999; MENEZES, 2005; BOYANOVA *et al*, 2005; VASCONCELOS *et al*, 2014).

Propriedades antifúngicas são relatadas contra as espécies *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida guillliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Malassezia globosa*, *Malassezia slooffiae*, *Malassezia pachydermatis*, *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton menthagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Penicillium italicum* (WALLER *et al*, 2017; CORNARA *et al*, 2017; AMINIMOGHADAMFAROUJ & NEMATOLLAHI, 2017; FREIRES *et al*, 2016; HAGHDOOST *et al*, 2016; SILVA-CARVALHO *et al*, 2015; BANKOVA *et al*, 2014; KUBILIENE *et al*, 2015; CARDOSO *et al*, 2010; DOTA *et al*, 2010; CAPISTRANO *et al*, 2013; KHOSRAVI *et al*, 2013; LOTTI *et al*, 2011; SIQUEIRA *et al*, 2009; JUNIOR *et al*, 2012).

A própolis tropical mais estudada é a brasileira. A própolis brasileira foi previamente classificada por Park *et al* (2000), que descreveram doze grupos distintos de própolis. Mais tarde foi identificada a própolis vermelha do Nordeste. Atualmente, existem, portanto, 13 tipos catalogados e descritos de própolis brasileiras na literatura (PARK *et al*, 2002; SILVA *et al*, 2017). Um trabalho recente publicado por Ferreira *et al* (2017) descreve um novo tipo de própolis verde do Nordeste, estado do Rio Grande do Norte, região de caatinga, cujas análises fitoquímicas indicam a Jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) como principal fonte botânica. A própolis recém-descrita apresentou baixo teor de ceras (25% dos solutos) e alto teor de compostos fenólicos e flavonoides (aproximadamente 70% do total de compostos fenólicos), o que pode explicar a alta atividade antioxidante verificada nas amostras.

Um dos mais populares e estudados tipo de própolis é a verde, produzida principalmente nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, provenientes de um arbusto da família Asteracea, *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo). A própolis verde brasileira contém sesquiterpenos como componentes predominantes e benzofurano como composto de grande interesse devido às propriedades citotóxicas (CORNARA *et al*, 2017; PASUPULETI *et al*, 2017; COSTA *et al*, 2013). Destaca-se também a presença de compostos como os derivados prenilados e derivados do ácido cinâmico (artepelina C, ácido p-cumárico e drupanina), flavonoides, ácido benzoico, ácidos

alifáticos e ésteres, além de possuir alcanos e terpenoides (ANDRADE *et al*, 2017; Silva *et al*, 2017; BANKOVA *et al*, 2014; SEBRAE, 2014; PARK *et al*, 2004; BOGDANOV, 2012).

A artepelina C ou DHCA (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) é o principal componente de interesse na própolis verde brasileira, caracterizando-a como produto único e justificando sua grande procura e valorização pelo mercado japonês (CORNARA *et al*, 2017). A substância foi primeiramente isolada por Aga *et al* (1994) e apresenta destacado potencial antimicrobiano, atividade antitumoral e antioxidante (GUZMÁN, 2005). Apesar de já ter sido encontrada em amostras de própolis verde, vermelha e marrom brasileiras, a própolis verde apresentou uma maior concentração do composto (ANDRADE *et al*, 2017). Outros componentes de interesse já foram relatados, tais como o ácido caféico, o ácido ferúlico, o ácido clorogênico, a naringenina, o kaempferol, a sakurametina, a pinocembrina, a quercitina e a kaempferida (ANDRADE *et al*, 2017; MACHADO *et al*, 2016-a; MACHADO *et al*, 2016-b).

A própolis vermelha é encontrada em quase todo litoral (regiões de manguezal) e encostas de rios do Nordeste brasileiro. Possui esta denominação pois a seiva da planta “rabo de bugio” (*Dalbergia ecastophylum*), onde a própolis tem sua origem, é vermelha. Sua composição química é rica em isoflavonoides com alta atividade antimicrobiana relatada. As benzofenonas estão entre os compostos mais importantes presentes na própolis vermelha (COSTA *et al* 2013).

Oldoni (2007) concluiu que a própolis vermelha apresenta maior atividade antioxidante quando comparada a produtos sintéticos comercialmente usados como antioxidantes. Trusheva *et al* (2006) identificaram 14 compostos presentes neste tipo de própolis, seis destes nunca antes mencionados como componentes da própolis, entre eles fenóis, triterpenoides, isoflavonas e benzofenonas preniladas. Fasolo *et al* (2013) isolaram benzofenonas presentes em extratos da própolis vermelha e a fração isolada apresentou atividade antifúngica frente a espécies do gênero *Candida*.

Os compostos daidzeína, biochanina A, pinocembrina e quercetina são biomarcadores da própolis vermelha brasileira. Além desses compostos, sabe-se que a própolis vermelha de Alagoas possui substâncias químicas que não foram encontradas em outras variedades de própolis, tais como vestitol e neovestitol, C-glicosídeo,

liquiritigenina, isoliquiritigenina, luteolina, formononetina e medicarpina (ANDRADE *et al*, 2017). Entre os isoflavonoides identificados, o neovestitol mostrou atividade antimicrobiana, anticarcinogênica e antioxidante. O potencial antinflamatório do neovestitol foi relatado por Franchin *et al* (2016), em um modelo de artrite, com redução do escore clínico, do dano articular e dos níveis de IL-6. O aumento do interesse pelo extrato desta própolis brasileira, inserido no contexto do comércio internacional de alimentos, tem gerado como consequência o aumento do valor agregado do produto, que pode valer cinco vezes mais que o tipo verde. A atual produção dessa própolis ainda é considerada pequena, apenas 200 kg por ano. Possui o maior valor comercial bruto, podendo ser vendida por até R$ 600,00/kg (SECOM 2011, *apud* COSTA *et al*, 2013).

As própolis marrons mais estudadas são frequentemente coletadas nas regiões Sul e Sudeste do país (MACHADO *et al*, 2016-b; TAZAWA *et al*, 2016). A presença de compostos fenólicos como a nemerosona, lignanas específicas encontradas nas resinas das flores da espécie *Clusia rosea*, elenca o gênero *Clusia* como principal origem floral da própolis marrom brasileira. O ácido clorogênico encontrado em própolis brasileira marrom indica também a presença de gênero *Citrus* como fonte de recursos florais para sua biossíntese (HUANG *et al*, 2014). Também já foram identificados acetofenonas e diterpenos, típicos do gênero *Araucaria* (BANKOVA *et al*, 2000).

Foi encontrada atividade antibacteriana do extrato etanólico de própolis marrom coletada no cerrado do Mato Grosso contra cepas de *Enterococcus faecalis* (PIMENTA *et al*, 2014). Um novo diterpeno foi isolado da própolis marrom brasileira do estado do Paraná, e sua atividade antitumoral foi avaliada *in vitro*, ocorrendo inibição do crescimento de várias linhas celulares de cancro humano (LNCaP, MCF-7, DLD-1 e A549) com potência de aproximadamente 15 vezes maior do que a dos outros diterpenos testados (TAZAWA *et al*, 2016).

A própolis marrom do Paraná teve alto potencial citotóxico comprovado, com percentual de inibição superior a 75%, em duas linhagens de células tumorais (MACHADO *et al*, 2016-b). Estudo de Weller *et al* (2017) relatou um alto valor de compostos fenólicos na própolis marrom do Rio Grande do Sul, com o ácido p-cumárico, o ácido clorogênico, o ácido felúrico e o ácido cafeico como os principais

componentes isolados. Além destes compostos, Andrade *et al* (2017) ao avaliarem a própolis marrom de Alagoas, relataram a pinocembrina, a kaempferida e o kaempferol como compostos mais abundantes.

Poucos estudos descrevem a composição química da própolis amarela, porém, Hernández *et al* (2010) relataram um estudo qualitativo e quantitativo por GC-MS de 19 amostras de própolis amarela cubana, ricas em álcoois triterpênicos, flavonoides polmetoxilados, lanosterol, β-amyrone, β-amirina, germanicol, lupeol, cicloartenol, β-mirina de etilo, 24-metileno-9,19-ciclolanostan-3 β -ol, α-acetato de amirina e acetato de lupeol. A composição química da própolis amarela brasileira demonstrou perfil químico similar à própolis cubana. A ausência de compostos fenólicos e a presença de misturas de compostos alifáticos em própolis amarelo do Mato Grosso do Sul foram determinadas por Machado *et al* (2016-b) utilizando análise de espectros de H-RMN. Além disso, quinze terpenos foram identificados por GC-MS. O extrato etanólico apresentou atividade citotóxica contra a estirpe de tumor humano OVCAR-8, mas não foi ativo contra bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas.

Desde a década de 1980, a própolis vem sendo largamente utilizada em suplementos alimentares e beberagens, como preventivo de enfermidades e em aplicações tópicas (FUNARI & FERRO, 2006). A própolis tem aplicações em produtos farmacêuticos, nutracêuticos e cosméticos, e o interesse global na sua pesquisa justifica-se por suas características de panaceia e por seu alto valor agregado. Atualmente existe um grande interesse em compostos naturais com atividades biológicas que possam substituir substâncias sintéticas utilizadas na indústria de alimentos e farmacêutica, ideia sustentada por consumidores preocupados com os efeitos negativos à saúde dos compostos sintéticos (BISCAIA, 2007; MACHADO *et al*, 2012).

O mercado mundial de própolis é muito atraente do ponto de vista financeiro, sendo o Brasil um importante fornecedor deste produto. O Brasil é atualmente o terceiro maior produtor de própolis do mundo, responsável pela produção de cerca de 10 a 15% do bioproduto, com estimativa de 50 a 150 toneladas anuais, perdendo apenas para a Rússia e a China. A produção brasileira é em grande parte destinada à exportação (cerca de 75%), tanto na forma bruta como em produtos manufaturados, e deste total 97% atende à demanda japonesa (MACHADO *et al*, 2012; COSTA *et al*, 2013). A Alemanha e a China também são importadores do bioproduto brasileiro (FERREIRA *et al*, 2017).

A própolis verde (tipo 12) do sudeste do Brasil é a mais exportada (MACHADO *et al*, 2016-b).

A produção de própolis no estado de Minas Gerais é de 29 toneladas anuais, das quais 20 toneladas são de própolis verde. A própolis produzida no Estado é considerada como a melhor do mundo no mercado japonês (MACHADO *et al*, 2012; COSTA *et al*, 2013). Segundo dados do SEBRAE (2014), 92% de toda a própolis in natura consumida no Japão é de origem brasileira, onde o extrato alcoólico da substância é vendido a US$ 110,00 o frasco. Além das propriedades farmacológicas, dois pontos se destacam na preferência japonesa pela própolis brasileira: suas características organolépticas e o menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais, quando comparada com as de outras origens (PEREIRA *et al*, 2002).

2.0. Tecnologia de extração com CO_2 como fluido supercrítico

A extração com fluido supercrítico pode ser considerada um dos métodos novos de extração mais potencialmente útil no isolamento e obtenção de compostos a partir de matrizes naturais. Teve seu início no final dos anos 70, na Alemanha, com o processo de remoção da cafeína no café. A utilização de uma tecnologia limpa, que não deixa resíduos, o trabalho com solventes não tóxicos, a não alteração das propriedades das matérias-primas e a extração de produtos de alta qualidade tornam esta tecnologia extremamente atrativa (BISCAIA, 2007).

Quando uma substância é elevada acima de seus pontos críticos de temperatura e pressão, ela passa para uma condição chamada de supercrítica. A temperatura crítica de um gás é aquela temperatura acima da qual ele não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto se eleve a pressão. A pressão crítica é definida como a pressão acima da qual o gás não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto se diminua a temperatura. É um estado intermediário em que o fluido se encontra, isto é, entre o líquido e o gasoso (HEDRICK *et al*, 1992; BISCAIA, 2007; FIANCO, 2014).

No estado supercrítico, a distinção entre as fases líquida e gasosa desaparece. Nesta condição, o fluido possui propriedades intermediárias entre um gás e um líquido e as forças de solubilização são mais intensas. A densidade de um fluido supercrítico

pode ser mudada pela variação da pressão aplicada sobre o fluido. Assim, um fluido supercrítico pode ter a densidade que oscila entre aquelas exibidas pelos gases até valores típicos dos líquidos. Como a densidade é semelhante à de um líquido, mas com o poder de difusão e penetração dos gases, a extração supercrítica oferece maior capacidade de dissolução para várias substâncias químicas. Por conta da semelhança entre a sua viscosidade e a dos gases e o fato do coeficiente de difusão ser maior que o dos líquidos, a extração das substâncias é muito facilitada (BISCAIA, 2007; FIANCO, 2014; MACHADO *et al*, 2015).

Uma das aplicações mais difundidas dos fluidos supercríticos é a extração de uma ou mais famílias de compostos a partir de uma matriz natural sólida. A seletividade do processo pode ser manipulada pela escolha do fluido extrator ou pelo controle de parâmetros de processo. A seletividade da extração também pode ser facilmente modificada pela adição de co-solventes, polares ou apolares, para melhor rendimento na extração e compostos de interesse. Um extrato obtido com tratamento supercrítico de CO_2 pode ser considerado como totalmente natural e os produtos permitidos para aplicação alimentícia possuem status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (BISCAIA, 2007; FIANCO, 2014).

You *et al* (2002) estudaram os efeitos da utilização de etanol e água como co-solventes e concluíram que a extração com CO_2 supercrítico utilizando o etanol como co-solvente aumentou a eficiência da extração, e o pré-tratamento com o CO_2 supercrítico sem etanol melhorou a extração dos flavonoides presentes na própolis brasileira. Machado *et al* (2015) detectaram maiores concentrações de artepelin C e ácido p-cumárico em metodologia de extração supercrítica com CO_2 de própolis, utilizando etanol a 1% como co-solvente.

O dióxido de carbono é o solvente mais usado no processo de extração por fluido supercrítico, pois possui baixo custo, não é tóxico, não é explosivo e está facilmente disponível com alto grau de pureza. A extração de matérias-primas naturais com dióxido de carbono supercrítico resolve questões associadas com as altas temperaturas (não há danos aos componentes lábeis, nem perda dos componentes voláteis) e com o uso de solventes orgânicos, dois dos grandes problemas encontrados nas extrações com solventes líquidos. As temperaturas empregadas são bastante baixas nesse processo e o único solvente usado, o dióxido de carbono, dissipa-se totalmente

após a descompressão ou pode ser reaproveitado no sistema, e sua remoção ao final da extração ocorre naturalmente. (MACHADO *et al*, 2015).

3.0. Antifúngicos

A busca por fármacos mais efetivos e menos tóxicos para o hospedeiro tem sido um dos grandes desafios para o desenvolvimento dos fármacos antifúngicos, devido à similaridade evolutiva dos alvos celulares entre as células eucarióticas dos fungos e dos animais (PARENTE-ROCHA *et al*, 2017; SCORZONI *et al*, 2017; TAVARES, 2014; FOY & TREPANIER, 2010; SIDRIM & ROCHA, 2010). A terapêutica fúngica até a década de 30 era pouco efetiva e inespecífica, tendo o iodeto de potássio como primeiro composto utilizado em 1903. Em 1939 surgiu a griseofulvina, seguida dos derivados poliênicos, no início da década de 50 com a nistatina, e mais tarde, em 1956, com a anfotericina B. Logo em seguida, em 1964, foi descoberta a atividade antimicótica da flucitosina (TAVARES, 2014; SIDRIM & ROCHA, 2010).

Um grande impulso ocorreu com a descoberta das propriedades antifúngicas do benzimidazol, em 1944 (TAVARES, 2014). Nas décadas de 60 e 70 os derivados azólicos, como o miconazol, clotrimazol, cetoconazol, tioconazol, dentre outros, foram disponibilizados no mercado. A partir da década de 90 os triazólicos, como fluconazol, itraconazol, voriconazol e ravuconazol foram desenvolvidos, apresentando propriedades farmacocinéticas mais favoráveis, o que tem proporcionado uma terapia antifúngica mais segura e eficaz (SIDRIM & ROCHA, 2010; TAVARES 2014). As amorolfinas e alilaminas surgiram também na década de 90, ampliando o arsenal terapêutico, em especial das micoses superficiais. Por último, já em 2001, foi aprovada a caspofungina, da classe das equinocandinas, apresentando mecanismo de ação inovador, que inibe a síntese de um polissacarídeo essencial da parede celular (SIDRIM & ROCHA, 2010). Nas últimas duas décadas, foram feitos progressos significativos no desenvolvimento de triazóis de primeira geração, de segunda geração, e das equinocandinas. O número de agentes antifúngicos disponíveis aumentou 30% desde 2000 (FOY & TREPANIER, 2010). As drogas antifúngicas comerciais têm como alvo a parede celular ou o ergosterol, icluindo os azóis, os polienos e as equinocandinas (PARENTE-ROCHA *et al*, 2017). Nesta revisão serão abordadas as drogas antifúngicas utilizadas no presente

trabalho: a anfotericina B, do grupo dos polienos e o itraconazol, o fluconazol e o cetoconazol, do grupo dos derivados azólicos.

3.1. Derivados poliênicos

Os derivados poliênicos consistem em substâncias formadas por átomos de carbono com dupla ligação, representados pela nistatina e pela anfotericina B (TAVARES, 2014). São exemplos de antibióticos com atividade antifúngica, cuja ação primária consiste na alteração da permeabilidade celular da membrana plasmática da célula fúngica (SIDRIM & ROCHA, 2010, CATALÁN & MONTEJO, 2006).

3.1.1. Anfotericina B

A anfotericina B, o primeiro antifúngico a ser aprovado pela *USA Food and Drug Administration*, foi isolada em 1955 de um actinomiceto da espécie *Streptomyces nodosus* (TAVARES, 2014; CATALÁN & MONTEJO, 2006; LUMBRERAS *et al*, 2003; SIDRIM & ROCHA, 2010). O fármaco é um macrolídeo heptaeno pertencente à classe dos polienos. Contém na extremidade hidrófoba da molécula uma cadeia lateral de micosamina, e na porção hidrófila sete grupos hidroxila, o que lhe confere característica anfipática (CATALÁN & MONTEJO, 2006; LUMBRERAS *et al*, 2003; FILIPPIN & SOUZA, 2006, NOBRE *et al*, 2002).

Desde sua descoberta, mesmo com a sua elevada toxicidade e a introdução de antifúngicos azólicos sistêmicos na década de 1980, o fármaco tem sido considerado referência no tratamento de micoses invasivas, devido ao seu espectro de ação e aos anos da experiência clínica (FOY & TREPANIER, 2010). Pode ter efeito fungicida ou fungistático, a depender da sensibilidade do fungo e da concentração alcançada no sítio da infecção (CATALÁN & MONTEJO, 2006).

Por muitos anos acreditou-se que a anfotericina B exercia sua atividade antimicótica ao formar estrutura micelial com o ergosterol presente na membrana plasmática; o centro hidrofóbico da molécula formaria um conduto transmembrana, criando poros que interfeririam na permeabilidade e função de barreira osmótica, permitindo a passagem de prótons e cátions monovalentes (BELLMANN &

SMUSZKIEWICZ, 2017; NETT & ANDES, 2015; FOY & TREPANIER, 2010; CATALÁN & MONTEJO, 2006; SIDRIM & ROCHA, 2010; LUMBRERAS *et al*, 2003, NOBRE *et al*, 2002). Hoje, sabe-se que os complexos de drogas e lipídeos extraem ergosterol da membrana, esgotando-o na célula (PARENTE-ROCHA *et al*, 2017). Peroxidação lipídica e inibição da ATPase fúngica são também mecanismos citotóxicos da anfotericina B (BELLMANN & SMUSZKIEWICZ, 2017). Sua eficácia é devido a maior afinidade pelo ergosterol, o principal esterol de membranas celulares fúngicas, em comparação com o colesterol, o principal esterol de membranas celulares de mamíferos (FOY & TREPANIER, 2010, CATALÁN & MONTEJO, 2006).

A molécula da anfotericina B é minimamente absorvida no trato gastrointestinal, sendo necessária administração intravenosa para um tratamento efetivo (FOY & TREPANIER, 2010; CATALÁN & MONTEJO, 2006). A limitação no seu uso são principalmente a irritação do endotélio vascular e a nefrotoxicidade cumulativa. A causa da nefrotoxicidade ainda não é compreendida, mas pode estar relacionada à toxicidade direta às membranas das células epiteliais e à vasoconstricção renal, que leva à redução do fluxo sanguíneo renal e consequentemente da taxa de filtração glomerular. Estudos em ratos e cães sugerem que a depleção de sódio aumenta a nefrotoxicidade associada à anfotericina B (FOY & TREPANIER, 2010).

A toxicidade inerente à formulação original da anfotericina B (uma dispersão com deoxiclato de sódio - ABD) impulsionou o desenvolvimento de 3 novas formulações: a preparação lipossomal (ABL), complexo lipídico (ABCL), e dispersão coloidal com sulfato de colesterol (NETT & ANDES, 2015; TAVARES, 2014; FOY & TREPANIER, 2010; CATALÁN & MONTEJO, 2006, MARTINÉZ, 2006, SIDRIM & ROCHA, 2010). As três preparações modificadas têm uma maior hidrofobicidade, o que provavelmente resulta em maior disponibilidade do fármaco no local da infecção e diminuição da disponibilidade para os rins (FOY & TREPANIER, 2010). O principal benefício destas preparações é a maior segurança quanto à toxicidade celular (MARTINÉZ, 2006).

A anfotericina B tem sido utilizada de forma eficaz em seres humanos para o tratamento de muitas infecções fúngicas sistêmicas, incluindo histoplasmose, blastomicose, criptococose, coccidioidomicose, paracoccidioidomicose, aspergilose e candidose (BELLMANN & SMUSZKIEWICZ, 2017; NETT & ANDES, 2015; FOY &

TREPANIER, 2010; CATALÁN & MONTEJO, 2006; MARTINÉZ, 2006; SIDRIM & ROCHA, 2010). Seu uso foi recomendado para infecções fúngicas sistêmicas semelhantes em cães e gatos (FOY & TREPANIER, 2010). Também se mostrou eficaz frente aos gêneros *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Conidiobolus*, *Basiodiobolus*, *Microsporum*, *Trichophyton* e *Sporothrix* (BELLMANN & SMUSZKIEWICZ, 2017; TAVARES, 2014; CATALÁN & MONTEJO, 2006; MARTINÉZ, 2006).

Algumas espécies de *Candida*, como *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica* e *C. tropicalis*, *Pseudalescheria boydii* e algumas cepas de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Cladosporium*, *Scedosporium* e *Phialophora* apresentam resistência clínica ou valores elevados de concentração inibitória mínima (CIM) frente a este fármaco (NETT & ANDES, 2015; TAVARES, 2014; MARTINÉZ, 2006; CATALÁN & MONTEJO, 2006). Em geral, a aquisição de resistência à anfotericina B é incomum, apesar das décadas de uso clínico (NETT & ANDES, 2015; TAVARES, 2014).

A anfotericina B continua a ser uma opção de tratamento importante na medicina veterinária, porque muitos dos medicamentos mais recentes disponíveis para os humanos são proibitivos para uso na veterinária, devido ao seu alto custo. A maioria dos relatórios veterinários descrevem o uso de anfotericina B para micoses sistêmicas, com o uso mais relatado da formulação ABLC (FOY & TREPANIER, 2010).

3.2. Derivados Azólicos

Os derivados azólicos são a classe de antifúngicos mais amplamente utilizada (ROEMER & KRYSAN, 2014). São quimioterápicos fungistáticos sintéticos que possuem um anel pentagonal imidazólico livre unido a outros anéis aromáticos, que contém dois ou três átomos de nitrogênio, dividindo os azóis em imidazóis e triazóis, respectivamente (BELLMANN & SMUSZKIEWICZ, 2017; FOY & TREPANIER, 2010; MARTINÉZ, 2006; CATALÁN & MONTEJO, 2006; LUMBRERAS *et al*, 2003). A natureza dos anéis modifica as propriedades físico-químicas, o efeito terapêutico e a toxicidade deste grupo de antifúngico (CATALÁN & MONTEJO, 2006).

Descoberto em 1949, os imidazóis foram utilizados experimentalmente em 1967 pela primeira vez e atualmente se dispõe em uso sistêmico ou tópico para o tratamento de micoses. São componentes desse grupo: miconazol, clotrimazol, cetoconazol, econazol, bifonazol, oxiconazol, sertaconazol, tioconazol e terconazol (MARTINÉZ, 2006; SIDRIM & ROCHA, 2010; NOBRE *et al*, 2002). Os imidazóis significaram uma melhora considerável no tratamento das infecções fúngicas; entretanto, a existência de limitações relacionadas com seu limitado espectro de atividade, sua escassa biodisponibilidade e a possibilidade de aparecimento de efeitos colaterais graves, restringiram seu emprego (LUMBRERAS *et al*, 2003). Desde que o cetoconazol foi disponibilizado para uso oral no início dos anos 1980, o tratamento de muitos pacientes com micoses sistêmicas foi possibilitado (FOY & TREPANIER, 2010). Na medicina humana, os imidazóis têm ficado restritos ao uso tópico, enquanto que os triazóis têm sido recomendados para tratamento sistêmico. (FOY & TREPANIER, 2010, SIDRIM & ROCHA, 2010). Destacam-se no grupo dos triazólicos o fluconazol, o itraconazol, o voriconazol, o posaconazol e o isavuconazole pelo largo espectro de ação e toxicidade reduzida (NETT & ANDES, 2015; MARTINÉZ, 2006; NOBRE *et al*, 2002).

Os azólicos se ligam a uma parte do citocromo P-450 do fungo, formando um complexo que inibe a enzima 14-α-desmetilase. O bloqueio desta enzima impede a conversão do lanosterol em ergosterol, que é um componente fundamental da membrana citoplasmática do fungo, o que produz uma alteração da permeabilidade e acumulação de esteróis aberrantes e potencialmente tóxicos na membrana. Também agem inativando enzimas do processo oxidativo dos fungos, levando à acumulação de peróxido de hidrogênio, com consequente dano celular. Muitos derivados azólicos inibem enzimas do citocromo P450 de mamíferos, que também convertem lanosterol como precursor do colesterol, aumentando a possibilidade de ocorrerem efeitos adversos e potenciais interações medicamentosas (BELLMANN & SMUSZKIEWICZ, 2017; SCORZONI *et al*, 2017; TAVARES, 2014; FOY & TREPANIER, 2010; MARTINÉZ, 2006; CARRILLO-MUÑOZ *et al*, 2013; CATALÁN & MONTEJO, 2006; SIDRIM & ROCHA, 2010; LUMBRERAS *et al*, 2003; NOBRE *et al*, 2002). Além disso, essa classe de fármaco é capaz de alterar a síntese de triglicerídeos e fosfolipídios. Em alta concentração, bloqueiam enzimas peroxidativas podendo levar à morte celular (TAVARES, 2014).

Os triazóis possuem o mesmo mecanismo de ação que os imidazóis, mas com maior espectro de ação e menos efeitos colaterais (LUMBRERAS *et al*, 2003). A metabolização dos azóis é principalmente por via hepática, sendo os efeitos colaterais mais comuns náuseas e vômitos quando utilizado por via sistêmica, além de eritema, ardência, descamação, edema, prurido, urticária e formação de vesículas no uso tópico (SIDRIM & ROCHA, 2010; NOBRE *et al*, 2002). O espectro de ação dos imidazólicos e triazólicos abrange os agentes de paracoccidioidomicose, histoplasmose, coccidioidomicose, criptococose, blastomicose e dermatomicoses. A maioria das espécies de *Candida* mostra susceptibilidade aos azólicos, notando-se que *C. krusei* e *C. glabrata* são menos susceptíveis (MARTINÉZ, 2006, SIDRIM & ROCHA, 2010).

3.2.1. Fluconazol

O fluconazol é um fármaco da primeira geração de triazóis aprovado para uso clínico em 1982 e disponível para administração oral e intravenosa (BELLMANN & SMUSZKIEWICZ, 2017, TAVARES, 2014; SIDRIM & ROCHA, 2010). O fluconazol penetra efetivamente nas barreiras hematoencefálica e ocular tanto em humanos quanto em pacientes veterinários, portanto é recomendado no tratamento de micoses sistêmicas que afetam o sistema nervoso central (SNC) ou os olhos (BELLMANN & SMUSZKIEWICZ, 2017).

Suas excelentes propriedades farmacocinéticas e sua escassa toxicidade o tornam ideal para a prevenção e o tratamento de infecções por *Candida* (*C. albicans, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. lusitaniae, C. dubliniensis*) e *Criptococcus*. (MARTINÉZ, 2006; FOY & TREPANIER, 2010; TAVARES, 2014; LUMBRERAS *et al*, 2003). Também já foi relatada ação do fluconazol contra fungos dimórficos, incluindo *Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*. A terapêutica em cães e gatos com criptococose e blastomicose tem sido bem-sucedida. *Malassezia furfur*, *Microsporum* e *Trichophyton*, envolvidos em micoses superficiais, também são relatados no espectro de ação. As concentrações inibitórias mínimas são significativamente maiores no fluconazol quando comparado com outros azóis (NETT & ANDES, 2015; MARTINÉZ, 2006;

BELLMANN & SMUSZKIEWICZ, 2017; TAVARES, 2014; LUMBRERAS *et al*, 2003).

As limitações do uso deste triazólico são referentes à sua falta de atividade contra fungos filamentosos (*Aspergillus, Fusarium, Scedosporium, Mucorales e Penicillium*), à resistência natural de algumas leveduras, como a *C. krusei*, à resistência adquirida em outras espécies de *Candida* (*C. glabrata, C. guilliermondii* e *C. rugosa*) ou *Cryptococcus. neoformans*, aos ajustes de doses necessárias em pacientes com deficiência renal e às interações com outros medicamentos (NETT & ANDES, 2015; SANTOS JR. *et al*, 2005; MARTINÉZ, 2006; LUMBRERAS *et al*, 2003).

O fluconazol praticamente não altera a biossíntese de ergosterol dos mamíferos, sendo menos tóxico e melhor absorvido que os outros azóis e é geralmente bem tolerado (NOBRE *et al*, 2002). Cães tem apresentado boa tolerância, sem aumento dos níveis de enzimas hepáticas. Contudo, o fármaco é teratogênico em animais e deve ser evitado durante a gestação (FOY & TREPANIER, 2010).

3.2.2. Itraconazol

O itraconazol é um derivado triazólico de primeira geração, disponibilizado logo após o fluconazol, e introduzido para o tratamento das micoses sistêmicas em 1992 (LUMBRERAS *et al*, 2003 SIDRIM & ROCHA, 2010, FOY & TREPANIER, 2010). O fármaco rapidamente tornou-se o tratamento oral de primeira escolha para a histoplasmose e a blastomicose (FOY & TREPANIER, 2010). Sua atividade antifúngica é mais ampla que a do fluconazol, contudo suas propriedades farmacocinéticas são menos favoráveis, sofrendo intensa biotransformação hepática (LUMBRERAS *et al*, 2003 SIDRIM & ROCHA, 2010). Os efeitos adversos relatados compreendem sintomas gastro-intestinais, efeitos hepatotóxicos e insuficiência cardíaca congestiva (BELLMANN & SMUSZKIEWICZ, 2017; SIDRIM & ROCHA, 2010).

Embora o itraconazol não penetre efetivamente nas barreiras hematoencefálica e ocular, pode atingir níveis adequados para tratar o SNC ou infecção ocular quando há

inflamação associada e comprometimento das barreiras (FOY & TREPANIER, 2010). O itraconazol apresenta boa distribuição e altas concentrações em tecidos queratinizados, como a pele, persistindo por até 4 semanas após interrupção do uso, sendo efetivo para o tratamento de micoses superficiais causadas por fungos dermatofíticos e leveduras do gênero *Malassezia*. Atualmente, o itraconazol é largamente usado na terapêutica de infecções fúngicas locais (FOY & TREPANIER, 2010; SIDRIM & ROCHA, 2010). O itraconazol atua adicionalmente contra muitas espécies do gênero *Aspergillus*, incluindo *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. terreus* e *A. niger*, sendo uma alternativa à anfotericina no tratamento de pacientes com aspergilose sistêmica (MARTINÉZ, 2006; NETT & ANDES, 2015; TAVARES, 2014; FOY & TREPANIER, 2010).

Assim como o fluconazol, o itraconazol tem uma excelente atividade *in vitro* frente a leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, inclusive algumas espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol, ainda que os valores de concentração inibitória mínima frente a *C. krusei* e *C. glabrata* relatados sejam mais altos (NETT & ANDES, 2015; MARTINÉZ, 2006; TAVARES, 2014; FOY & TREPANIER, 2010; SIDRIM & ROCHA, 2010; LUMBRERAS *et al*, 2003). O espectro de atividade também inclui fungos dimórficos, tais como *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *Coccidioides* spp, *Paracoccidioides* spp, e *Sporothrix schenckii* (NETT & ANDES, 2015; MARTINÉZ, 2006; TAVARES, 2014; FOY & TREPANIER, 2010). O itraconazol é droga de escolha no tratamento de micoses sistêmicas de cães e gatos (FOY & TREPANIER, 2010).

O triazólico não possui atividade inibitória frente ao grupo dos zigomicetos, principalmente da ordem Mucorales. As espécies do gênero *Fusarium* apresentaram pouca ou nenhuma inibição (MARTINÉZ, 2006; NETT & ANDES, 2015; LUMBRERAS *et al*, 2003).

3.2.3. Cetoconazol

O cetoconazol é um imidazol que passou a ser comercializado nos anos 80. Atualmente encontra-se disponível para administração oral e tópica, incluindo cremes, pomadas e xampus (BELLMANN & SMUSZKIEWICZ, 2017; FOY & TREPANIER, 2010). Foi o primeiro azol liberado para uso em cães (FOY & TREPANIER, 2010).

O espectro de atividade antifúngica compreende espécies dos gêneros *Candida*, *Malassezia*, e *Aspergillus*, além de *Cryptococcus immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioidis immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* e fungos dermatofíticos (BELLMANN & SMUSZKIEWICZ, 2017; MARTINÉZ, 2006; TAVARES, 2014; SIDRIM & ROCHA, 2010; FOY & TREPANIER, 2010; NOBRE *et al*, 2002). Embora o cetoconazol tem sido usado historicamente para tratar várias micoses sistêmicas, incluindo blastomicose e histoplasmose, atualmente ele perdeu seu papel na terapia antifúngica sistêmica (BELLMANN & SMUSZKIEWICZ, 2017; FOY & TREPANIER, 2010). Quando usado, deve ser combinado com anfotericina B para produzir taxas de resposta que são comparáveis ao itraconazol. Tanto em humano quanto em cães, os triazoles, como o fluconazol e o itraconazol, têm melhor eficácia do que o cetoconazol e são o tratamento recomendado tanto na blastomicose quanto na histoplasmose (FOY & TREPANIER, 2010).

Distúrbios gastrointestinais, com sintomas como vômito, diarreia, náuseas e falta de apetite têm sido relatados em cães e humanos tratados com cetoconazol (FOY & TREPANIER, 2010; SIDRIM & ROCHA, 2010). A hepatotoxicidade e as reações cutâneas, incluindo eritema e prurido, são menos frequentemente observadas e são reversíveis com a interrupção do uso do fármaco (TAVARES, 2014; FOY & TREPANIER, 2010; SIDRIM & ROCHA, 2010). A hepatotoxicidade com cetoconazol foi reproduzida em roedores e apresentou-se dose-dependente (FOY & TREPANIER, 2010).

O cetoconazol tem ação inibitória sobre a enzima citocromo P450, podendo inibir a síntese de esteroides em gônadas e adrenais (TAVARES, 2014). Em animais, inibe a produção adrenal de testosterona e deve ser evitado em indivíduos reprodutores (FOY & TREPANIER, 2010; SIDRIM & ROCHA, 2010). O risco de supressão adrenal deve ser considerado em cães tratados que estão passando por procedimentos estressantes, pois a síntese de cortisol também é inibida (FOY & TREPANIER, 2010).

3.3. Resistência aos antifúngicos: mecanismos envolvidos

Do ponto de vista clínico, a resistência a medicamentos ocorre quando o tratamento farmacológico adequado não é eficaz, causando persistência ou progressão

de uma infecção (PARENTE-ROCHA *et al*, 2017). No entanto, os mecanismos moleculares que levam à resistência antifúngica são complexos. As estratégias de sobrevivência molecular primária incluem: mutação dos alvos dos fármacos, o que reduz sua afinidade; superexpressão da proteína alvo por modificação da região promotora do gene; expressão de um sistema de efluxo; e degradação das drogas (PARENTE-ROCHA *et al*, 2017; SCORZONI *et al*, 2017; NETT & ANDES, 2015).

Nos últimos dez anos, a resistência aos azóis tem sido estudada extensivamente. Quatro mecanismos principais são descritos: efluxo, mediado por bombas de efluxo que, em geral, causam resistência cruzada entre os vários azóis; mutação do gene ERG11, causando a produção da enzima lanosterol demetilase modificada com diminuição da afinidade pelos azóis e consequente menor captura da droga pelo fungo; superexpressão do gene ERG11, resultando em aumento da concentração da enzima lanosterol 14a-demethylase; e alterações na composição da parede celular (BELLMANN & SMUSZKIEWICZ, 2017; PARENTE-ROCHA *et al*, 2017; SCORZONI *et al*, 2017; WIEDERHOLD, 2017; NETT & ANDES, 2015; TAVARES, 2014; SANTOS JR *et al*, 2005; MARTINÉZ, 2006).

A resistência ao fluconazol é mais comum em espécies de *Candida* não-*albicans* (WIEDERHOLD, 2017). A resistência primária ao fluconazol é bem conhecido nas espécies *Candida krusei* e *C. glabrata* (SANTOS JR *et al*, 2005). A taxa de resistência extrínseca aos triazólicos vem aumentando, particularmente para *C. glabrata*. Durante a última década, a frequência de resistência ao fluconazol para esta espécie aumentou de 9% para 14% (NETT & ANDES, 2015). A exposição prolongada dos pacientes ao fluconazol aumenta os casos de resistência clínica em espécies de *Candida* (SCORZONI *et al*, 2017). A resistência cruzada ao voriconazol é frequente (NETT & ANDES, 2015).

A redução do acúmulo intracelular dos azóis em *Candida* spp é consequência da superexpressão de transportadores de membrana que agem como bombas de efluxo multidrogas. Duas principais classes de transportadores estão envolvidos: os que hidrolisam ATP e as que utilizam energia do gradiente eletroquímico de prótons para excretar as drogas (SCORZONI *et al*, 2017).

A resistência em *Aspergillus fumigatus* após exposição a fármacos azóis é provavelmente o resultado de mutação, que leva à superexpressão da proteína alvo do

fármaco (PARENTE-ROCHA *et al*, 2017). Isso geralmente repercute em resistência a todos os azóis (NETT & ANDES, 2015). Em *Cryptococcus neoformans*, a exposição de camundongos infectados a uma baixa dose de fluconazol aumenta o valor da concentração inibitória mínima das colônias recuperadas de animais. Além disso, aumenta a melanização e o tamanho da cápsula, que são fatores de virulência clássicos neste fungo. A exposição prévia aos antifúngicos induzem diferentes mecanismos de resistência, em diferentes espécies de fungos (PARENTE-ROCHA *et al*, 2017).

A resistência adquirida à anfotericina B é um fenômeno raro, mesmo com seus 50 anos de uso na prática clínica (PARENTE-ROCHA *et al*, 2017). Em isolados de material clínico, a resistência tem sido observada em cepas de *Candida krusei*, *C. parakrusei*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae*, espécies de *Fusarium*, e em *Cryptococcus neoformans*. Os mutantes resistentes apresentam, em geral, alterações na composição dos esteróis das membranas, com diminuição ou ausência do ergosterol, ou a formação de esteróis modificados, com menor afinidade pelos polienos (PARENTE-ROCHA *et al*, 2017; WIEDERHOLD, 2017; TAVARES, 2014). Uma nova espécie que vem emergindo, a *C. auris*, pode apresentar múltipla resistência às classes de antifúngicos disponíveis (WIEDERHOLD, 2017).

Em *Candida tropicalis* e *Candida lusitaniae,* o baixo teor de ergosterol na membrana está associado a uma susceptibilidade reduzida à anfotericina B (PARENTE-ROCHA *et al*, 2017; FILIPPIN & SOUZA, 2006). A ausência de ergosterol na membrana reduz efetivamente a atividade lítica do antifúngico, evidenciando que a presença de ergosterol é essencial na sua atuação (FILIPPIN & SOUZA, 2006).

É também admitido que a resistência seja devido à maior produção de catalase pelo fungo, o que impediria a ação oxidativa da anfotericina B (TAVARES, 2014). Como a anfotericina B aumenta o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células fúngicas, o *C. tropicalis* resistente à anfotericina B produz menos ROS e altera a atividade mitocondrial (PARENTE-ROCHA *et al*, 2017).

Cepas de algumas espécies de *Aspergillus* são comumente resistentes, mesmo sem apresentar alteração no teor de ergosterol. Um dos mecanismos propostos para a resistência ao *A. terreus* ao fármaco é o bloqueio de uma via de sinalização, o que inibe a formação de aquaporinas (SCORZONI *et al*, 2017).

Existem evidências de que o uso prévio dos antifúngicos azólicos pode induzir resistência temporária em isolados de *C. albicans* (TAVARES, 2014). Apesar de ser pouco reportada, a resistência cruzada entre azóis e polienos pode ocorrer devido à perda de função do gene ERG3, que resulta em baixos teores de ergosterol, protegendo leveduras contra os efeitos tóxicos da anfotericina B (SCORZONI *et al*, 2017; SANTOS JR *et al*, 2005).

4.0. *Malassezia pachydermatis*

O gênero *Malassezia* pertence ao reino Eumycota, divisão Basidiomycota, classe Malasseziomycetes, e compreende espécies de leveduras lipodependentes e lipofílicas, atualmente classificadas em 14 espécies (VELEGRAKI *et al*, 2015; PRADO *et al*, 2007; MATOUSEK & CAMPBELL, 2002). O uso da análise genômica no início da década de 90 levou a uma classificação mais clara das leveduras do gênero *Malassezia*, que até então só contava com duas espécies descritas, *M. furfur* e *M. pachydermatis*. Inicialmente, com base na diferença na porcentagem de guanina e citosina no DNA, mais cinco espécies foram identificadas: *M. sympodialis, M. globosa, M. obtusa, M. restricta* e *M. slooffiae*. A partir de estudos moleculares, seis novas espécies foram incluídas: *M. dermatis, M. japonica, M. yamatoensis, M. nana, M. equina* e *M. caprae*. (VELEGRAKI *et al*, 2015; PRADO *et al*, 2007; OUTERBRIDGE, 2006; SIDRIM & ROCHA, 2010; GUILLOT & BOND, 1999).

Malassezia pachydermatis é um organismo comensal que foi isolado da pele, canais de ouvido, sacos anais, vagina, ânus e superfícies mucosas de cães e gatos (OUTERBRIDGE, 2006; MATOUSEK & CAMPBELL, 2002). A levedura foi descrita pela primeira vez em 1925, parasitando a pele de um rinoceronte indiano (*Rhinoceros unicornis*) com dermatite esfoliativa generalizada, e estudos na Suécia na década de 1950 destacaram o papel desta espécie na otite externa canina (BOND, 2010). Atualmente é associada com quadros de otite externa e diferentes tipos de dermatite em animais domésticos, sendo mais comum nos cães do que nos gatos (VELEGRAKI *et al*, 2015; CARBAÑES, 2014; OUTERBRIDGE, 2006; BOND, 2010; MATOUSEK & CAMPBELL, 2002; CRESPO *et al*, 2002). Em cães e gatos, já foi descrito na literatura

o isolamento das espécies *M. pachydermatis, M. furfur, M. sympodialis, M. globosa* e *M. nana* de diferentes sítios anatômicos, em animais sadios ou apresentando alguma patologia (PRADO *et al*, 2007).

Alterações no microclima cutâneo superficial ou defesas do hospedeiro podem permitir a este microrganismo normalmente comensal tornar-se um patógeno significativo (CRESPO *et al*, 2002). Os fatores envolvidos na transição do comensalismo para o parasitismo em cães não são totalmente elucidados. Embora *M. pachydermatis* seja um habitante normal da mucosa e pele canina saudável, cães com malasseziose podem ter 100 a 10.000 vezes a densidade populacional de leveduras na pele em comparação com cães saudáveis (BOND, 2010). Os processos envolvidos na colonização e infecção incluem a aderência ao estrato córneo, a secreção de hidrolisases, incluindo lipases, fosfolipases, aspartil proteases e esfingomielinases ácidas, esterases, bem como respostas imunes inatas e adaptativas do hospedeiro (BOND, 2010; MATOUSEK & CAMPBELL, 2002). Existe a produção de enzimas esterase, lipase, ácido fosfatase, lipoxigenase, protease e fosfolipase, as quais são reconhecidas como fatores de virulência (VELEGRAKI *et al*, 2015; MATOUSEK & CAMPBELL, 2002).

A proenzima zimogênica da parede celular de levedura pode ativar o sistema do complemento, provocando danos à integridade dos queratinócitos, concorrendo em espongiose epidérmica, inflamação e prurido. A expressão de fosfolipase em *M. pachydermatis* é modificada pelo opióide endógeno endodina, que por sua vez é mediada por receptores de que estão presentes na parede celular. Esses receptores parecem afetar o fenótipo (comensal ou patogênico) desta espécie sob a ação de agonistas apropriados ou antagonistas (VELEGRAKI *et al*, 2015).

A infecção se desenvolve quando há reação de hipersensibilidade à *Malassezia* no hospedeiro ou quando há um crescimento excessivo sobre a superfície cutânea. (PRADO *et al*, 2007; QUINN *et al*., 2005; OUTERBRIDGE, 2006). Existem fatores predisponentes que alteram o microambiente da pele ou o sistema imunológico do hospedeiro, facilitando a infecção. Destacam-se como fatores predisponentes: o aumento da umidade cutânea, a quantidade ou composição dos lipídios superficiais na pele, mudanças hormonais, doenças metabólicas, distúrbios de cornificação, distúrbios nutricionais, dermatite alérgica e/ou ectoparasitária, e o uso prolongado de antibióticos

associado ao tratamento com glicocorticoides (VELEGRAKI *et al*, 2015; CARBAÑES, 2014; BOND, 2010; OUTERBRIDGE, 2006; MATOUSEK & CAMPBELL, 2002; CRESPO *et al*, 2002).

O fato desta levedura ser lipofílica influencia na sua distribuição pelo corpo do animal, sendo mais abundante em regiões úmidas e em locais onde a presença de glândulas sebáceas representa uma fonte de material lipídico. Algumas raças foram relatadas com aparentemente mais predispostas à infecção, entre elas Chihuahua, Poodle, Shetland, Sheepdog, Collie, Pastor Alemão, Maltês, Lhasa Apso, Cocker Spaniel, Basset, West Highland White Terrier, Dachshund, Shih-Tzu, Setter Inglês, entre outros. Esta predisposição racial pode estar relacionada a uma deficiência na resposta de linfócito T ao fungo (GUILLOT & BOND, 1999; SCOTT *et al*, 1996; BOND, 2010; OUTERBRIDGE, 2006; MATOUSEK & CAMPBELL, 2002).

A dermatite canina por *Malassezia* é caracterizada clinicamente por lesões eritematosas, alopécicas, muitas vezes associadas a exsudação gordurosa, especialmente em dobras de pele e áreas interdigitais (Bond, 2010; OUTERBRIDGE, 2006). Embora as lesões cutâneas possam ser localizadas, regiões múltiplas são geralmente afetadas, especialmente os membros, ventre, orelhas, face, pescoço ventral, axila e região inguinal (OUTERBRIDGE, 2006; MEDLEAU & HNILICA, 2003; QUINN *et al*, 2005). As lesões tendem a ocorrer mais frequentemente e com maior gravidade nas pregas de pele. Geralmente o animal apresenta-se com odor corporal desagradável, rançoso e seborreico, pele espessada e áspera com aglutinação de pelos. (MEDLEAU & HNILICA, 2003; QUINN *et al*, 2005).

Em casos crônicos, a alopecia traumática é acompanhada de hiperpigmentação, liquenização e halo eritematoso (BOND, 2010; OUTERBRIDGE, 2006). As lesões podem ser pruriginosas, como resultado da reação de hipersensibilidade a produtos excretados pela levedura (OUTERBRIDGE, 2006). Outro achado comum nos casos de dermatite por *Malassezia* é a ocorrência simultânea de otite externa em cães (SCOTT *et al*, 2001). Em gatos, a dermatite por *M. pachydermatis* ocorre com menor frequência que em cães, porém as lesões são semelhantes. Nos casos ocasionais de dermatite localizada ou generalizada descritos em gatos, as lesões encontradas foram dermatite esfoliativa, eritema exsudado gorduroso e graus variados de prurido (PRADO *et al*, 2007).

Aizawa *et al* (2001) estudaram as características moleculares de 110 amostras de *M. pachydermatis* isoladas de casos clínicos de cães e gatos. Esta investigação revelou a existência de quatro tipos geneticamente distintos: A (84,6%), B (11,8%), C (0,9%) e D (2,7%). A *M. pachydermatis* tipo A (predominante) foi isolada de lesões de várias doenças (otite externa, pioderma, dermatite atópica, alergia à picada de pulgas e seborréia), enquanto aquelas do tipo B, C e D foram isoladas majoritariamente de otites externas.

A otite externa é uma afecção do epitélio do conduto auditivo multifatorial mais comum em cães, acometendo entre 21,7 a 42% da população. A produção excessiva e a retenção de cera, consequências da hipersecreção de glândulas ceruminosas, combinadas com atividade de enzimas proteolíticas de *M. pachydermatis*, contribuem para alterações inflamatórias (QUINN *et al*, 2005). As otites associadas a *Malassezia* spp. geralmente são pruriginosas, determinando eritema do conduto auditivo externo, otalgia e acúmulo de secreção ceruminosa castanha a marrom, com odor acético característico e graus variados de prurido (LEITE *et al*, 2003; BOND, 2010). A estenose é comum em casos crônicos e pode haver infecção bacteriana simultânea ou progressão para otite média (BOND, 2010).

Os fatores envolvidos no desenvolvimento da otite externa podem ser classificados como primários, predisponentes e perpetuantes. Os fatores primários são os que são capazes de iniciar a inflamação, dentre eles atopia, corpos estranhos, e infestações pelo ácaro das orelhas. Fatores predisponentes são os que tornam o ouvido mais suscetível à inflamação, mas que, por si só, não causam otite. Destacam-se predisposições anatômicas, maceração e umidade excessiva. Fatores perpetuantes são os responsáveis pela continuação da resposta inflamatória, tais como infecções bacterianas e com outros fungos (NASCENTE *et al*, 2010; QUINN *et al*, 2005).

A presença de *M. pachydermatis* em ouvidos de cães saudáveis tem sido relatada numa proporção que varia de 45 a 50% dos animais (KUMAR *et al*, 2002; CRESPO *et al*, 2002). Girão *et al* (2006) descrevem o isolamento desta levedura em um número significativamente maior de ouvidos de cães acometidos por otite externa, quando comparado com ouvidos sadios, o que pode implicar o seu papel patogênico nesta enfermidade. Em gatos acometidos por otite externa já foram isoladas as espécies *M. pachydermatis, M. furfur, M. globosa, M. sympodialis e M. nana*. Apesar da *M.*

pachydermatis poder estar envolvida em casos de otite externa em gatos, ela não ocorre com a mesma frequência que em cães (PRADO *et al*, 2007).

Os microrganismos mais frequentemente isolados de cães com otite externa são *Staphylococcus intermedius* e *Malassezia pachydermatis*. Em estudo realizado por Oliveira *et al* (2008) com 50 cães com otite externa bilateral na cidade de Fortaleza (CE), foram isolados em 54,8% das amostras a associação entre *S. intermedius e M. pachydermatis*. Ambos os microrganismos pertencem à flora microbiana normal da área auricular. Contudo, quando ocorre explosão populacional, eles se tornam patogênicos (CARDOSO *et al*, 2009). Apesar do desconhecimento do verdadeiro papel de levedura *Malassezia* em ambientes ótico e epitelial de cães sadios e doentes, sabe-se que a sua superpopulação impede a resolução de um quadro já instalado de inflamação, independentemente da causa (SIDRIM & ROCHA, 2010; FIANCO, 2014).

Prevalência inferior foi relatada em estudo realizado no período de um ano por Kamaljyoti *et al* (2017) ao avaliarem 115 cães com otite, dos quais 19,1% apresentaram positividade para *Malassezia*. Adultos entre 1 e 3 anos foram a faixa etária mais acometida. Na estação chuvosa, a prevalência foi significativamente maior que nos outros períodos do ano (63%). A ocorrência da otite foi maior na raça Labrador (45,5%), seguido da raça Beagle (18,1%). Dos animais acometidos, 77,3% possuíam orelhas pendulares.

Cafarchia *et al* (2005) também avaliaram a ocorrência, os fatores de risco e as espécies de *Malassezia* em condutos auditivos de cães e gatos sadios ou com otite externa, e do total de isolamentos obtidos, 97,6% foram identificados como *M. pachydermatis* e 2,4% como *M. globosa*. O isolamento foi mais frequente nos animais com até 5 anos de idade, acometendo 72,9% e 40% dos cães e gatos com otite, e 57,3% e 28% dos cães e gatos sadios, respectivamente. Verificou-se também que a incidência de otite em cães foi maior naqueles com orelhas pendulares, quando comparados aos que tinham orelhas eretas, o que sugere um fator predisponente (CAFARCHIA *et al*, 2005).

Em estudo realizado por Nascente *et al* (2010), com 168 cães com otite externa encaminhados aos Hospitais Veterinários das Universidades Federais do Rio Grande do Sul e de Pelotas, a *M. pachydermatis* foi isolada em 82,7% dos casos, a maior prevalência encontrada nos estudos consultados. Neste estudo, verificou-se também que

não houve diferença em relação ao sexo e idade dos animais. Houve um total de 139 (82,7%) animais com orelha pendular e 29 (17,3%) com orelha ereta, reforçando os achados de Kamaljyoti *et al* (2017) e Cafarchia *et al* (2005).

Em investigação realizada em Fortaleza, estado do Ceará, buscou-se o isolamento da *M. pachydermatis* a partir de amostras colhidas de condutos auditivos sadios ou enfermos de cães. Nos exames citológicos, a presença de *Malassezia* foi observada em 63,7% das amostras de otite, e em 21,43% dos condutos auditivos sadios de cães com otite unilateral. Quanto às raças caninas mais acometidas, observou-se que a raça Poodle foi a de maior ocorrência, seguida de cães sem raça definida e os das raças Cocker spaniel, Pastor alemão, Yorkshire terrier e Rottweiler. A maioria dos cães portadores de *Malassezia* tinham entre um a três anos de idade (GIRÃO *et al*, 2006).

Baptista *et al* (2010) estudaram amostras de ouvido externo de 30 cães atendidos na rotina de uma clínica na Zona Oeste do Rio de Janeiro, no período de agosto a setembro de 2008. Como resultado, observaram que 49 (81,67%) amostras apresentavam pelo menos um sinal clínico de otite e, do grupo doente, 16 (26,67%) eram positivas para *Malassezia sp*.

O diagnóstico de malasseziose é baseado em sinais clínicos, presença de números elevados de leveduras no exame direto e resposta clínica à terapia antifúngica (BOND, 2010). Como nos seres humanos, as técnicas de microscopia direta incluem a impressão de amostras em lâminas de vidro e/ou fitas adesivas. As culturas são realizadas inoculando espécimes coletados por *swab* diretamente em placas de Petri contendo meio de cultura suplementado com lipídios. A presença de dez ou mais células de levedura em cinco campos com uma ampliação de 400x de amostras de orelha de cães indica otite, enquanto a presença de cinco células ou mais de amostras de pele sugere dermatite. No caso da cultura fúngica, mais de 70 unidades formadoras de colônias por amostra podem ser indicativas de infecção (VELEGRAKI *et al*, 2015)

As espécies de *Malassezia* podem ser identificadas fenotipicamente pelas suas características morfológicas e bioquímicas. Em relação às características morfológicas, consideram-se aspectos macroscópicos da colônia e microscópicos da levedura. Geralmente, as colônias aparecem entre o segundo e o quarto dia de incubação, a uma temperatura entre 35 e 37 ºC. Dentre os diversos meios de cultura descritos para o isolamento das espécies lipodependentes, o ágar Sabouraud dextrose, com

cicloheximida e óleo de oliva, e o meio ágar Dixon são os mais utilizados (PRADO *et al*, 2007; SIDRIM & ROCHA, 2010).

As colônias de *Malassezia* spp. são de textura cremosa, de cor creme a marrom-clara, topografia convexa, superfície lisa ou levemente rugosa, de diâmetro variável de acordo com o tempo de incubação. *Malassezia pachydermatis* é a única espécie do gênero a crescer em meio ágar Sabouraud dextrose sem suplementação lipídica. Apresenta assimilação positiva aos Tween 40 e 60, fraca ou positiva ao Tween 80 e pode ou não assimilar o Tween 20. As reações de esculina e catalase podem ser positivas ou negativas e cresce em 37 e 40 °C. A reação de urease é positiva, porém algumas cepas apresentam reação negativa (SIDIM & ROCHA, 2004; GUILLOT & BOND, 1999; CARBAÑES, 2014).

As malassezioses em animais são frequentemente tratadas com derivados azólicos tópicos e/ou sistêmicos geralmente combinados com antibióticos e glicocorticoides, em casos de otite externa com presença de bactérias (Velegraki *et al*, 2015). Os azóis sistêmicos mais usados são o cetoconazol, o itraconazol e o fluconazol. Esses medicamentos podem ser administrados oralmente, junto à refeição (KAMALJYOTI *et al*, 2017; MATOUSEK & CAMPBELL, 2002). Apesar do avanço das abordagens terapêuticas, a otite externa canina, na maioria dos casos, é reincidente por conta da complexidade do comportamento dos agentes etiológicos (OLIVEIRA *et al*, 2008). O surgimento de *M. pachydermatis* resistentes aos azóis, bem como o número crescente de infecções em animais, enfatiza a importância dos testes de susceptibilidade como guia para o tratamento antifúngico adequado (VELEGRAKI *et al*, 2015; SIDRIM & ROCHA, 2010; FIANCO, 2014; PRADO *et al*, 2007).

Apesar da importância da *M. pachydermatis* como agente etiológico de dermatomicoses na clínica veterinária, dos inconvenientes da terapêutica com os antifúngicos alopáticos e da emergência do fenômeno de resistência aos azóis, ainda são escassos os trabalhos que explorem o potencial terapêutico de extratos das própolis tipificadas brasileiras contra a levedura lipofílica (CARDOSO *et al*, 2010; LILLENBAUM & BARBOSA, 1994).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Obtenção, processamento e caracterização das amostras de própolis

A obtenção, processamento e caracterização das amostras de própolis brasileira do presente estudo foram descritas por Machado *et al* (2016-a). As amostras de própolis vermelha (RAL) foram originadas do estado de Alagoas, enquanto que as amostras de própolis marrom (BSC) e verde (GPR) originárias dos estados de Santa Catarina e Paraná, respectivamente. Aproximadamente 700-1000g de amostras de própolis foram doadas pela empresa Apis Nativa Produtos Naturais (Prodapys-Santa Catarina-Brasil), no período de julho a setembro de 2013.

As amostras de própolis foram trituradas em um moedor (Cadence-Brasil) e posteriormente peneiradas (malha 60) para obter uma granulometria adequada (aproximadamente 0,250 mm), aumentando assim a área superficial, e homogeneizada para iniciar os processos de extração. Os teores de umidade, proteína, conteúdo de cinzas, lipídios totais, conteúdo mineral e a quantificação da atividade da água das amostras utilizadas são descritos nas **Tabelas 1 e 2.**

Tabela 1 - Determinação do teor de umidade, sólidos totais e cinzas totais de amostras de própolis vermelha, verde e marrom coletadas em diferentes regiões do Brasil.

Amostras	Umidade (%)	Sólidos Totais (%)	Cinzas Totais (%)
RAL	7.03±0.42	92.97±0.42	0.96±0.03
GPR	7.13±0.12	92.87±0.12	3.15±0.03
BSC	7.07±0.10	92.93±0.10	1.73±0.19

Fonte: Adaptado de MACHADO *et al* (2016-a)

Tabela 2 - Determinação do teor de proteína bruta, lipídios totais, fibras brutas e atividade da água (aw) de amostras de própolis vermelha, verde e marrom coletadas em diferentes regiões do Brasil.

Amostras	Proteína (%)	Lipídios (%)	Aw (%)	Fibra (%)
RAL	2.30±0.05	66.33±0.01	0.689±0.01	7.66±0.90
GPR	9.98±0.83	48.72±1.29	0.688±0.02	20.89±1.39
BSC	3.90±0.49	74.31±5.69	0.657±0.02	7.29±0.30

Fonte: Adaptado de MACHADO *et al* (2016-a)

2. Obtenção dos extratos de própolis

As condições de extração e identificação dos extratos estão descritas na **Tabela 3.** Na **Tabela 4** são apresentados os resultados da composição química dos extratos de própolis vermelha, verde e marrom utilizados neste estudo.

2.1. Extração etanólica convencional

Foram adicionados 15 mL de etanol (80%) em 2 g de própolis. A extração ocorreu em uma temperatura de 70 °C durante 30 minutos sob agitação constante em uma incubadora Shaker (MA 420 / MARCONI-Brasil), com rotação de 710 rpm. Em seguida, centrifugou-se o extrato (Centrifuga SIGMA 2-16 KL) a 8800 rpm durante 11 min a 5 °C. No final da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um recipiente de 50 mL e foram adicionados 10 mL de etanol (80%) ao resíduo do tubo, onde a centrifugação foi repetida. Os sobrenadantes foram homogeneizados e mantidos a 50 ° C até estarem completamente secos. Em seguida, os extratos foram armazenados em tubos cobertos com folha de alumínio em condições atmosféricas inertes (N_2), a fim de evitar a degradação do material.

Tabela 3. Condições e identificação dos extratos etanólicos e supercríticos de própolis brasileira.

Amostra	Método de extração	Condições	Origem geográfica	Tipo
RAL – SC	Supercrítica	40°C, 300 bar	Alagoas	Vermelha
RAL – ET	Convencional	70°C, Pressão ambiente	Alagoas	Vermelha
GPR – ET	Convencional	70°C, Pressão ambiente	Paraná	Verde
BSC – ET	Convencional	70°C, Pressão ambiente	Santa Catarina	Marrom

Fonte: Adaptado de MACHADO *et al*, (2016-a)

Tabela 4 - Determinação do teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/g), flavonoides (mg EQ / g), atividade antioxidante por DPPH (IC50) e ABTS (%) dos extratos de diferentes amostras de própolis brasileiras obtidas por extração etanólica (EtOH) e por SFE (SCO_2).

Amostras	Compostos fenólicos totais (mg EAG / g)	Flavonoides (mg EQ/g)	DPPH (IC50)	ABTS (%) (Trolox 1 $mg.ml^{-1}$)
RAL – SC	157.16±0.01	40.65±0.01	183.11±0.31	82.80±3.50
RAL – ET	198.77±0.01	58.19±0.01	44.29±0.29	98.20±1.30
GPR – ET	179.52±0.01	39.90±0.01	157.39±0.26	89.90±1.80
BSC – ET	117.03±0.01	27.97±0.01	163.00±0.31l	89.80±1.20

Fonte: Adaptado de MACHADO *et al*, (2016-a)

2.2 Extração com fluido supercrítico (CO_2) utilizando etanol como co-solvente

As extrações foram realizadas na unidade de Extração Supercrítica (equipamento Supercritical Fluids SFT-110) do SENAI CIMATEC, equipada com bomba para dióxido de carbono líquido, rotâmetro, cilindro de CO_2 (99% de pureza), totalímetro e uma célula de extração de 100 mL. O processo tem início quando o CO_2 sai do cilindro em direção à bomba, onde o solvente líquido é comprimido para dentro da célula de extração até a pressão programada no experimento. A célula de extração está acoplada dentro do forno, onde se controla a temperatura de operação. O solvente fluido ao percolar a matéria-prima da própolis extrai os compostos solúveis e, quando atinge a válvula de expansão (micrométrica), tem sua pressão reduzida até pressão ambiente, voltando à fase gasosa. Os compostos solúveis no solvente fluido precipitam no frasco coletor e o solvente na fase gasosa passa por um rotâmetro e depois por um totalímetro, onde tem sua vazão quantificada. As condições básicas para o processo de extração supercrítica foram: 40°C, 300 bar, S/F de 110 (massa de $CO_{2\ [solvente]}$/massa de própolis $_{[soluto]}$), 1% de co-solvente (etanol m/m), fluxo de CO_2 de 6 g/min e tempo total de extração de aproximadamente 2 h 30 min (MACHADO *et al*, 2015).

O preparo do leito de extração seguiu a seguinte metodologia: em uma das extremidades da célula de extração fechada, deposita-se uma camada de lã de vidro em sua base, acrescentando-se aos poucos a matéria-prima moída, empacotando-a com o auxílio de um bastão cilíndrico, para evitar a formação de caminhos preferenciais e, posteriormente, deposita-se outra camada de lã de vidro por cima da matéria-prima e fecha-se a célula. Caso a matéria-prima não seja suficiente para ocupar todo o volume da célula, essa é preenchida com pérolas de vidro de 2 mm de diâmetro (MACHADO *et al*, 2015).

3.0. Microrganismos testados

Fizeram parte deste estudo 12 isolados de *Malassezia pachydermatis* provenientes de cães com otite (03), cães com dermatite fúngica (06), e de *Didelphis*

silvestres (03) da coleção fúngica do Laboratório de Micoses (HOSPMEV-UFBA). A condição clínica de otite e dermatite caninas foram determinadas por médicos veterinários do HOSPMEV devidamente registrados no CRMV-BA. As cepas oriundas de sariguês fizeram parte de um estudo de fungos isolados de animais silvestres no estado da Bahia, e os animais estudados não apresentavam patologia aparente, como atestado por médicos veterinários com experiência em medicina veterinária de animais silvestres. Como referência, foi utilizada uma cepa da espécie com seu genoma sequenciado (BH3), gentilmente cedida pela Profa. Patrícia Cisalpino, do Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.1. Cultivo

Os isolados de *M. pachydermatis* foram cultivados em meio líquido e/ou meio sólido, como descrito a seguir:

- Meio líquido: tubos de ensaio com caldo Sabouraud dextrose acrescidos de 0,5% de azeite de oliva extra virgem e 0,5% de Tween 80.
- Meio sólido: tubos de ensaio e placas de Petri contendo Ágar Sabouraud dextrose com cicloheximida suplementados com 0,5% de azeite de oliva extra virgem e 0,5% de Tween 80.

Apesar de não serem caracteristicamente lipodependentes, já foi relatada a lipodependência na espécie (MACHADO, 2010, SIDRIM & ROCHA, 2010). As placas e tubos foram incubados em estufa bacteriológica entre 34-37 °C, por no mínimo, 72 h.

3.2. Caracterização fenotípica dos isolados

O teste da urease detecta a presença ou ausência da enzima urease produzida pelo fungo. O meio uréia de Christensen, quando em contato com a enzima urease, produzida por algumas espécies de fungos, é hidrolisado com liberação de amônia,

acarretando mudanças de pH, e mudança de coloração do indicador para róseo intenso. Neste teste, fragmentos da colônia foram semeados no meio sólido e líquido, em tubo de ensaio incubado em estufa, (37 °C) durante 72 h e 24 h, respectivamente. O resultado foi considerado positivo quando houve mudança do meio de amarelo para róseo, e considerado negativo quando o meio se manteve amarelo (SIDRIM & ROCHA, 2010).

Na hidrólise da esculina, a atividade β-glicosidase foi verificada utilizando-se tubos contendo ágar esculina. As leveduras foram semeadas, com auxílio de *swab* estéril, em tubos de ensaio contendo ágar esculina inclinado. O material foi incubado por 05 dias a 32°C em estufa bacteriológica. O desdobramento de esculina em esculetina e glicose, pela ação da enzima β-glicosidase, é verificado pelo escurecimento do meio (SIDRIM & ROCHA, 2010).

Para a prova da catalase, adicionou-se peróxido de hidrogênio 10 vol. sobre a cultura em lâmina. A reação positiva consiste na formação de bolhas de ar (SIDRIM & ROCHA, 2010).

Com relação à prova da lipodependência, as leveduras foram semeadas em tubos contendo ágar Sabouraud dextrose inclinado, com auxílio de *swab* estéril. Se não houver crescimento das leveduras, é comprovada a lipodependência (SIDRIM & ROCHA, 2010).

A atividade fosfolipásica foi detectada segundo a metodologia descrita por Price *et al* (1982). As suspensões de *M. pachydermatis*, foram inoculadas (5 μL) em 3 pontos equidistantes, em uma placa de 150 mm contendo ágar gema de ovo (peptona - 1%; dextrose - 2%; NaCl - 5,73%; $CaCl_2$ - 0,05%; ágar bacteriológico - 2% e gema de ovo - 4%). Ajustou-se o pH para 6,3. Os resultados foram lidos após 10 dias de incubação, medindo o halo formado em torno da colônia que foi considerado como indicativo da produção da enzima fosfolipase. Os resultados da atividade enzimática foram expressos como razão (Pz) do diâmetro da colônia e o somatório do diâmetro da zona de atividade enzimática com o diâmetro da colônia. Os resultados negativos foram considerados aqueles em que o valor de Pz foi igual a 1; resultados positivos com atividade fraca aqueles em que $Pz < 1$ e $\geq 0,64$, e resultados positivos com atividade muito elevada aqueles em que $Pz < 0,64$.

Para constatar a presença da enzima colagenase, as suspensões de leveduras (5 μL) foram inoculadas em 3 pontos equidistantes, em uma placa de 150 mm contendo

ágar (2%) e gelatina (1%). O resultado foi considerado positivo quando houve crescimento do isolado testado, e negativo quando não houve crescimento (SIQUEIRA, 2008).

Para verificar a presença da enzima lipase, as suspensões de leveduras (5 μL) foram inoculadas em 3 pontos equidistantes, em uma placa de 150 mm contendo ágar bacteriológico (2%), peptona (1%), NaCl (0,5%), $CaCl_2$ (0,01%) e Tween 20 (1%). O pH foi ajustado para 5,5. O teste foi interpretado como positivo, quando houve formação da zona de precipitação ao redor da colônia. Os resultados da atividade enzimática foram expressos como razão (Pz) do diâmetro da colônia e o somatório do diâmetro da zona de atividade enzimática com o diâmetro da colônia. Os resultados negativos foram considerados aqueles em que o valor de Pz foi igual a 1; resultados positivos aqueles em que Pz < 1 (MUHSIN *et al*, 1997).

A atividade proteásica foi verificada semeando as suspensões de leveduras (5 μL) em 3 pontos equidistantes, em uma placa de 150 mm contendo ágar bacteriológico (2%) e leite desnatado (10%). Os resultados da atividade enzimática foram expressos como razão (Pz) do diâmetro da colônia e o somatório do diâmetro da zona de atividade enzimática com o diâmetro da colônia. Os resultados negativos foram considerados quando Pz foi igual a 1; resultados positivos com atividade muito baixa quando Pz < 1 e ≥ 0,9 com atividade baixa quando Pz ≤ 0,8 e ≥ 0,89, com atividade elevada aqueles em que Pz ≤ 0,79 e ≥ 0,7, e atividade muito elevada aqueles em que Pz ≤ 0,69 (SIQUEIRA, 2008). Todos os testes foram incubados durante 10 dias, a 32 °C e realizados em triplicata. Os resultados foram expressos pela média dos valores obtidos nos testes.

4.0. Ensaios de determinação da sensibilidade de isolados de *Malassezia pachydermatis*

4.1. Metodologia adaptada da difusão em ágar

O método de difusão em ágar é um método qualitativo, amplamente utilizado na triagem dos extratos dos quais se deseja determinar a atividade antimicrobiana. Através deste método pode-se verificar se o extrato testado é capaz de inibir ou não o crescimento do microrganismo de interesse. As vantagens deste método são a pequena

quantidade das amostras usadas e a economia na utilização de apenas uma placa de Petri para testar diversas concentrações (BISCAIA, 2007).

As culturas fúngicas das cepas isoladas de casos clínicos e a cepa referência foram inicialmente incubadas a 34 °C por 18 horas e então diluídas em caldo de cultivo na concentração final de 1 da escala McFarland (3×10^8 UFC/mL). A pureza das cepas foi comprovada em ágar Sabouraud. As placas contendo ágar Müller Hinton suplementado com 2% de dextrose foram previamente perfuradas assepticamente com perfurador de seis orifícios de 6mm de diâmetro cada. A suspensão foi semeada com auxílio de *swab* estéril em três direções diferentes, cobrindo toda extensão da placa. Aguardou-se 05 minutos para que o inóculo fosse completamente absorvido pelo ágar. Os furos foram preenchidos com 20 µL de cada diluição das drogas. As placas foram incubadas a 36 °C por 72 h e então medidos os diâmetros de halo de inibição para cada concentração testada.

As concentrações utilizadas para os antifúngicos seguem as concentrações recomendadas comercialmente e o descrito pelo CLSI M27-A2 (2002), e foram as seguintes: cetoconazol (1,0 a 16,0 µg/mL); itraconazol e anfotericina B (0,5 a 8,0 µg/mL); fluconazol (4,0 a 64,0 µg/mL). As drogas foram diluídas de acordo com a metodologia descrita no protocolo do CLSI M27-A2 (2002). O sexto orifício foi preenchido com o controle do diluente. Os testes foram executados em duplicata.

Os extratos de própolis foram diluídos em Tween 80 a 1%. O Tween 80 foi escolhido como solvente devido ao seu alto poder de solubilização dos extratos supercríticos, seu caráter biológico inerte e atóxico, seu amplo uso em produtos cosméticos e alimentícios, além de ser um produto lipídico que pode utilizado pela *Malassezia pachydermatis* como suplemento nutricional, não interferindo na sua inibição (FISPQ-EMBRAPA Nº: 209; SIDIM & ROCHA, 2010). Foram testadas as concentrações no intervalo de 1,0 a 16,0 mg/mL. O diluente foi também testado, como controle negativo.

4.2. Metodologia da microdiluição em caldo

A concentração mínima inibitória (CMI) consiste na concentração mínima da substância testada capaz de inibir o microrganismo de interesse e pode ser determinada

através de três técnicas: diluição em caldo, diluição em ágar e microdiluição em caldo de cultivo. A técnica de microdiluição em caldo de cultivo utiliza diferentes concentrações do extrato em uma série de orifícios em placas de microdiluição contendo uma suspensão padronizada do microrganismo a ser testado. A partir das diluições do extrato que não apresentam crescimento, pode-se repicar para placa de ágar e verificar a concentração fungicida mínima, que é a concentração de extrato que não só inibe o crescimento, mas também inativa o microrganismo (BISCAIA, 2007). O caldo Sabouraud dextrose acrescido com 1% de Tween 80 foi eleito como melhor meio para realização do teste, de acordo com trabalhos mais recentes de padronização da técnica para o gênero *Malassezia* (CAFARCHIA *et al*, 2015).

Para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM), as seguintes concentrações dos antifúngicos foram testadas: fluconazol - 0,125 a 64 µg/mL; cetoconazol, itraconazol e anfotericina B - 0,0313 a 16 µg/mL. Os inóculos foram preparados em solução salina com uma concentração de células entre 0,180 e 0,220 nm de absorbância mensurados por espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm. Este procedimento cria suspensões com concentração de aproximadamente 3,0 x 10^8 UFC / mL. O inóculo foi então diluído 1:20 em meio de cultivo. Foram utilizadas microplacas de 96 poços estéreis para a realização do teste. O meio de cultivo utilizado para foi o caldo Sabouraud dextrose acrescido de 1% de Tween 80. Em cada poço foi inoculado 100 µL do antifúngico na concentração 2X de teste, diluído em meio de cultivo, e 100 µL do inóculo, cuja concentração final foi de 7,5 x 10^6. Os cálculos propostos pelo CLSI M27-A2 (2002) foram utilizados para se obter a CIM e a CFM. O tempo entre em contato entre os microrganismos e extrato de própolis foi de 72 h. A inocuidade do extrato foi avaliada diluindo-a em caldo de Müller-Hinton. Os controles de esterilidade e viabilidade do inóculo foram realizados de acordo com o protocolo citado.

Para comprovar os resultados da leitura realizada pelo espectrofotômetro, uma alíquota de 10% do volume total dos poços (20 µL) correspondentes à concentração fungicida mínima e seu sucessor foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose. Após 72 h de incubação em estufa bacteriológica a 35°C, foi observado o crescimento ou não de colônias de *M. pachydermatis*, determinando então a concentração que inviabiliza completamente o inóculo exposto ao teste.

Em todos os momentos foram testados controles negativos sem adição de inóculo e com adição do diluente, e controle negativo do meio adicionado da respectiva concentração de própolis. A leitura dos testes foi feita em espectrofotômetro adaptado para leitura de placa de 96 poços placas (Thermo Scientific), no comprimento de onda de 625 nm. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Os extratos de própolis foram diluídos em Tween 80 a 1%. Os testes foram realizados com as concentrações no intervalo de 0,313 a 16,0 mg/mL. Foram incluídos no teste o controle do meio de cultivo e das diluições das própolis.

6.0. Análises dos dados

Os diâmetros de inibição de crescimento fúngico nos testes de difusão em ágar foram expressos como o valor médio da duplicata.

Nos testes de microdiluição em caldo, o percentual de crescimento foi calculado como a média do aumento relativo da densidade óptica/turbidez, com relação ao controle negativo de cada concentração testada. O controle positivo de cada isolado, contendo apenas meio de cultivo e inóculo, foi considerado como parâmetro de turbidez máxima, para calcular o crescimento de cada isolado nos poços-teste. Em suma, o percentual de inibição foi calculado pela seguinte fórmula geral:

$$1- \left(\frac{\frac{PTx - PCTx}{PCTx}}{\frac{CPx - Cn}{Cn}} \right) = \% \text{ de inibição}$$

Onde:

PTx= Densidade óptica do poço teste para cada concentração dos tratamentos em determinado isolado X.

PCTx= Densidade óptica do poço controle negativo para cada concentração dos tratamentos (meio de cultura + concentração do tratamento em teste) em determinado isolado X.

CPx= Densidade óptica do poço controle positivo (meio de cultura + inóculo) em determinado isolado X. Representa o parâmetro de 100 de crescimento para cada isolado.

Cn= Densidade óptica do poço controle negativo (meio de cultura).

A Concentração Inibitória Mínima foi considerada como concentração do fármaco capaz de inibir em 90% o crescimento da levedura. A Concentração Fungicida Mínima foi determinada como concentração do fármaco que eliminou completamente as leveduras inoculadas no teste.

O pacote “drc”, intitulado “Analysis of Dose-Response Curves” programado para a Plataforma *R* foi utilizado para estimar a curva de inibição representativa para cada tratamento testado, pois este modelo estatístico de regressão descreve uma função paramétrica que representa a média das respostas observadas. O drc é considerado um pacote flexível e versátil para análises não lineares de dose-resposta em geral (RITZ *et al*, 2015). O modelo de regressão log-logístico de 4 parâmetros foi escolhido por se tratar de um conjunto de dados com $n \leq 20$. Foi estimada a concentração de cada tratamento que inibe 50% do crescimento dos isolados para os conjuntos de dados que se encaixaram neste modelo de regressão.

RESULTADOS

Foram caracterizados os perfis bioquímicos de todas as cepas de *Malassezia pachydermatis* eleitas para o presente estudo, por meio das provas da lipodependência, urease, hidrólise da esculina e catalase (**Tabela 5**). Todos os isolados foram positivos à prova da urease e apenas um dos isolados apresentou resultado negativo na prova da catalase e outro na prova da beta-glicosidase. Apenas o isolado de referência apresentou-se lipodependentes.

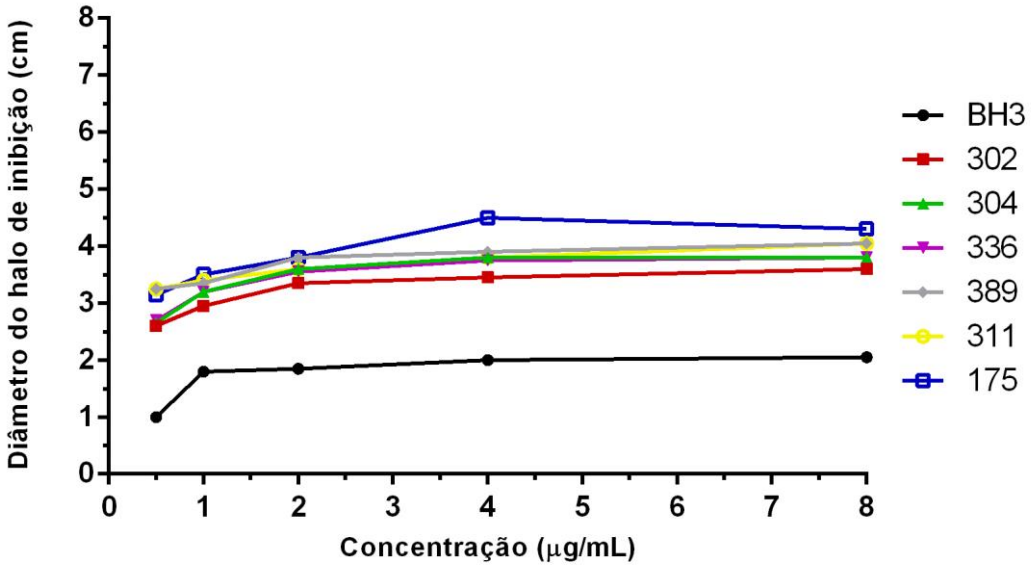
Todos os isolados foram capazes de expressar a enzima colagenase e apresentaram atividade extracelular muito elevada da enzima protease, expressa em valores muitos baixos de zona de precipitação, sempre menores ou iguais a 0,44 (**Tabela 5**). A maioria dos isolados (12/13) apresentaram alta taxa de atividade lipásica e fosfolipásica, com formação de intenso halo de precipitado. Mesmo os isolados provenientes de *Didelphis* de vida livre, sem sintomatologia, apresentaram alta atividade extracelular dessas enzimas.

Os valores dos diâmetros (em centímetros) para as cinco concentrações seriadas testadas de cada antifúngico utilizando a técnica da difusão em ágar estão representadas nos gráficos ilustrados nas **Figuras 1 a 3**. Foi considerado sensível o isolado que apresentasse halo de inibição maior que 1,0 cm, nas concentrações adotadas como ponto de corte, para cada antifúngico. O fluconazol não foi capaz de formar halo de inibição, frente a todos os isolados. Com relação aos diâmetros de halo formado para cada concentração de fármaco testada, halos maiores foram encontrados para o cetoconazol, e uma grande variação entre as respostas dos isolados foi encontrada para o itraconazol e cetoconazol. A anfotericina B apresentou atividade uniforme entre os isolados (principalmente os de pele de cão com dermatite), com a menor variação de tamanho de halo encontrada, tanto entre os isolados quanto entre as diferentes concentrações testadas.

Tabela 5. Caracterização fenotípica dos isolados de *M. pachydermatis* incluídos neste estudo.

Isolado	SÍTIO DE ISOLAMENTO	LIPO-DEPENDÊNCIA	UREASE	β-GLICOSIDASE	CATALASE	COLAGENASE	LIPASE	PROTEASE	FOSFOLIPASE
175	PELE CAO	NEG	**Fraco-Positivo**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	muito elevada	muito elevada
302	PELE CÃO	NEG	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	muito elevada	muito elevada
304	PELE CÃO	NEG	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	muito elevada	muito elevada
311	PELE CÃO	NEG	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	muito elevada	muito elevada
336	PELE CÃO	NEG	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	muito elevada	muito elevada
389	PELE CÃO	NEG	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	muito elevada	muito elevada
523	OUVIDO CÃO	NEG	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	muito elevada	muito elevada
476	OUVIDO CÃO	NEG	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	muito elevada	NEG
487	OUVIDO CÃO	NEG	**Fraco-Positivo**	**POS**	**POS**	**POS**	NEG	muito elevada	muito elevada
240	OUVIDO SARIGUÊ	NEG	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	muito elevada	muito elevada
262	OUVIDO SARIGUÊ	NEG	**POS**	**POS**	NEG	**POS**	**POS**	muito elevada	muito elevada
241	OUVIDO SARIGUÊ	NEG	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	muito elevada	muito elevada
BH3		**POS**	**POS**	NEG	**POS**	**POS**	**POS**	muito elevada	muito elevada

A



B

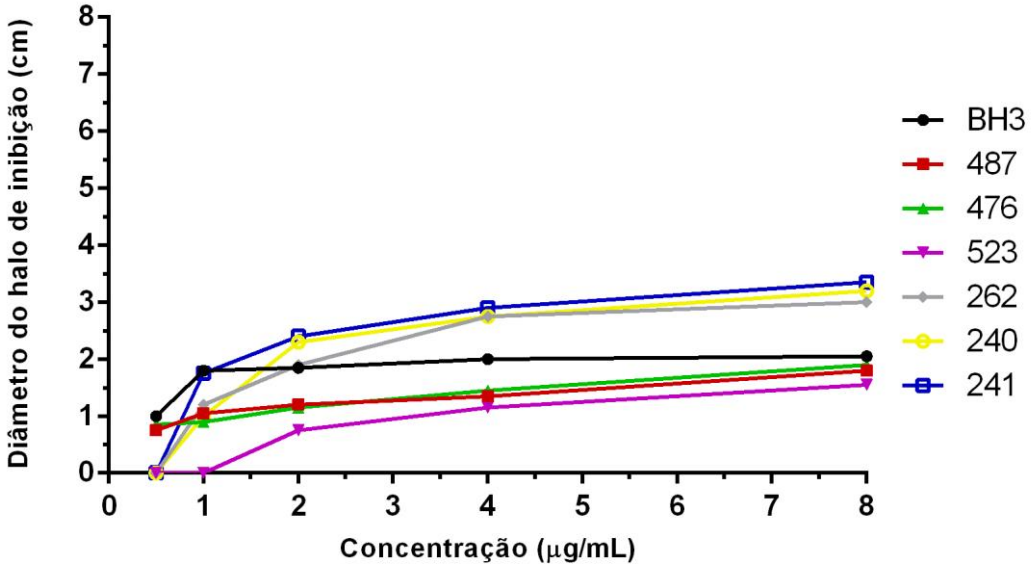
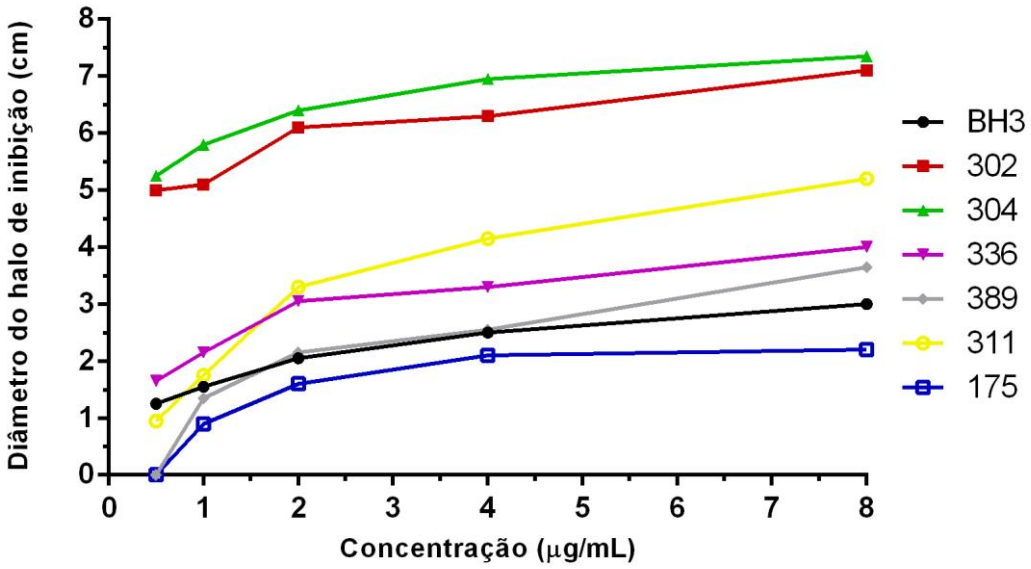


Figura 1. Diâmetros (em centímetros) dos halos de inibição de *M. pachydermatis* isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomáticos, e cepa de referência, para cada concentração testada da anfotericina B, pela técnica da difusão em ágar.

A



B

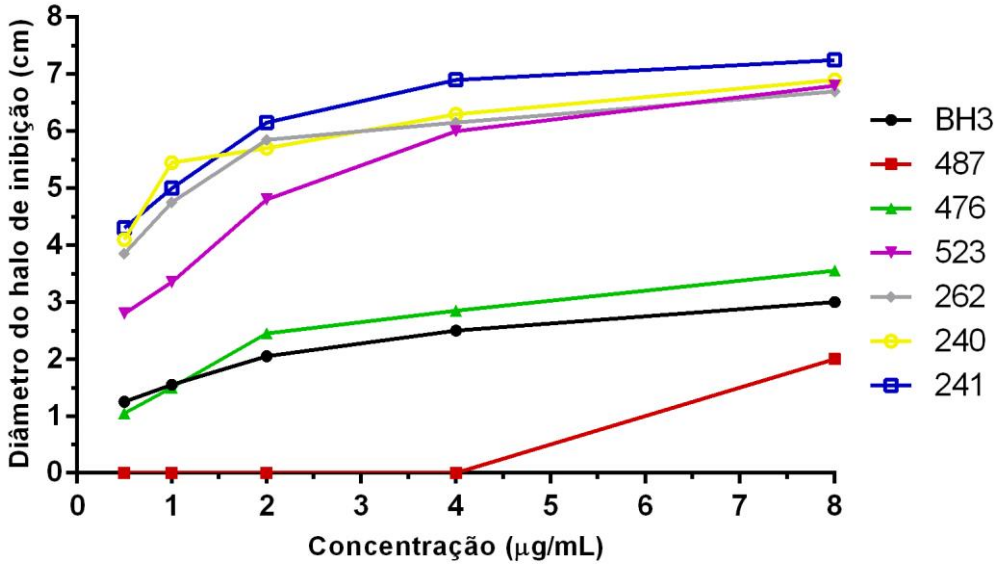
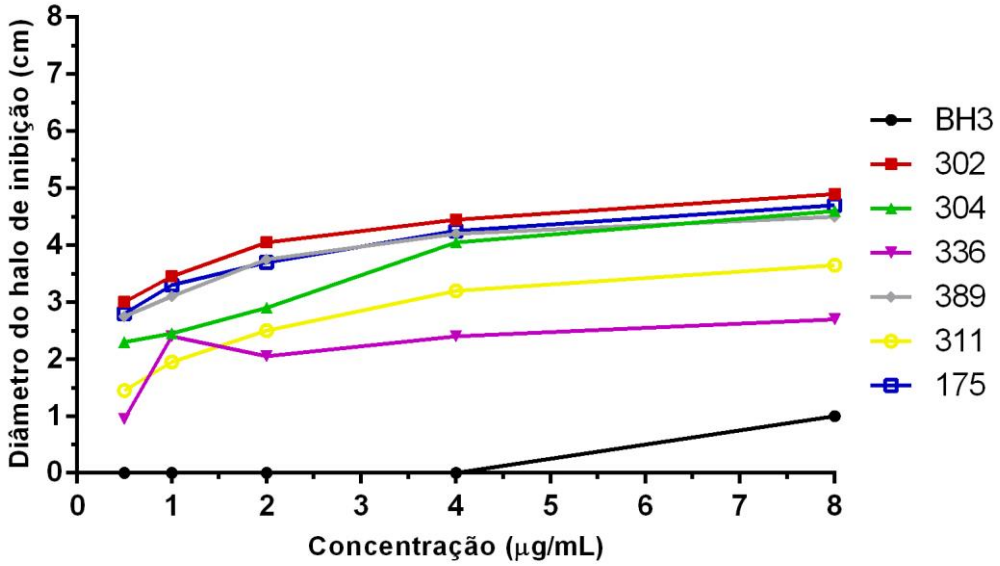


Figura 2. Diâmetros (em centímetros) dos halos de inibição de *M. pachydermatis* isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomáticos, e cepa de referência, para cada concentração testada do cetoconazol, pela técnica da difusão em ágar.

A



B

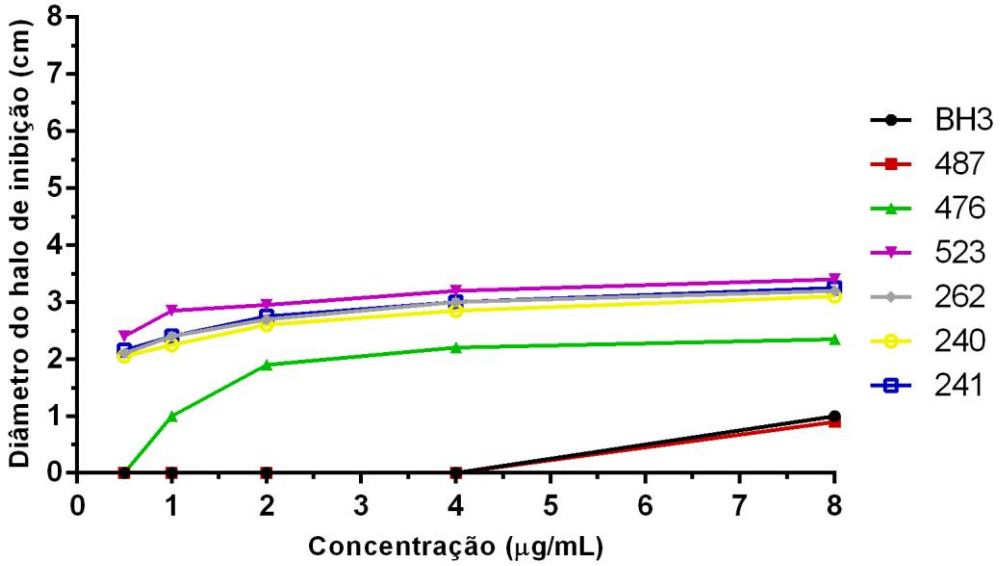


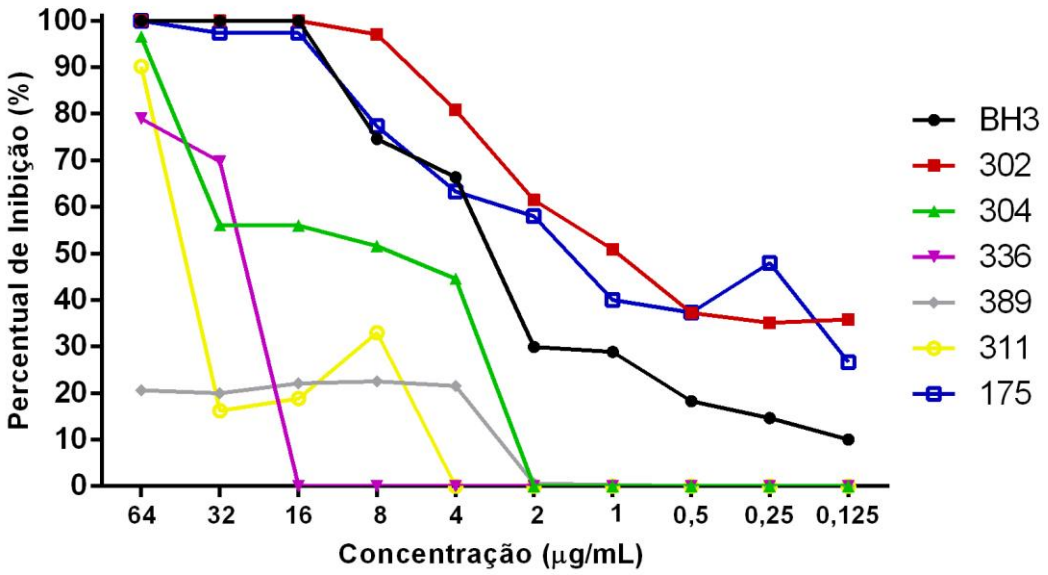
Figura 3. Diâmetros (em centímetros) dos halos de inibição de *M. pachydermatis* isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomáticos, e cepa de referência, para cada concentração testada do itraconazol, pela técnica da difusão em ágar.

Os percentuais de inibição encontrados para cada concentração seriada dos quatro antifúngicos testados com a técnica da microdiluição em caldo, estão representados nos gráficos de linhas das **Figuras 4 a 7**. Os pontos de corte para a classificação dos isolados em sensíveis ou resistentes para cada antifúngico foram fundamentados nos trabalhos de Weiler *et al* (2013) para o cetoconazol (0,5 µg/mL) e para o itraconazol (0,25 µg/mL), no trabalho de Álvarez-Pérez *et al* (2014) para a anfotericina B (1,0 µg/mL) e no trabalho de Cafarchia e *et al* (2015) para o fluconazol (32 µg/mL). Foram escolhidos os maiores pontos de corte relatados na literatura consultada, devido aos altos valores de concentração inibitória mínima encontrados para os isolados de *M. pachydermatis* testados no presente trabalho.

Os valores de CIM, CFM, a razão CFM/CIM e a classificação da sensibilidade de cada isolado para os antifúngicos testados pela técnica da microdiluição estão expressos na **Tabela 6**. As frequências relativas dos valores de CIM e CFM obtidos nos testes de microdiluição em caldo para cada antifúngico estão representados na **Figura 8.** Todas as cepas testadas pelo método da difusão em ágar não formaram halo de inibição nas concentrações seriadas do fluconazol testadas (64; 32; 16; 8 e 4 µg/mL). Contudo, a avaliação dos isolados pela técnica da microdiluição em caldo apresenta resultados discordantes para o mesmo ponto de corte utilizado, com 53,84% (7/13) dos isolados sensíveis, apresentando CIM ≤ 32 µg/mL (**Tabela 6**). Os valores de CIM e CFM para o fluconazol foram respectivamente maiores ou iguais a 8 e maiores ou iguais a 16, respectivamente (**Tabela 6**).

A **Tabela 7** mostra um alto percentual de discordância entre as metodologias testadas para classificação de sensibilidade dos isolados de *M. pachydermatis* frente aos antifúngicos, principalmente para a anfotericina B e fluconazol, que apresentam 53,85% dos resultados divergentes, seguido do itraconazol (23,07%) e do cetoconazol (15,39%), levando a concluir que a técnica da difusão em ágar não foi eficaz na determinação da sensibilidade dos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

A



B

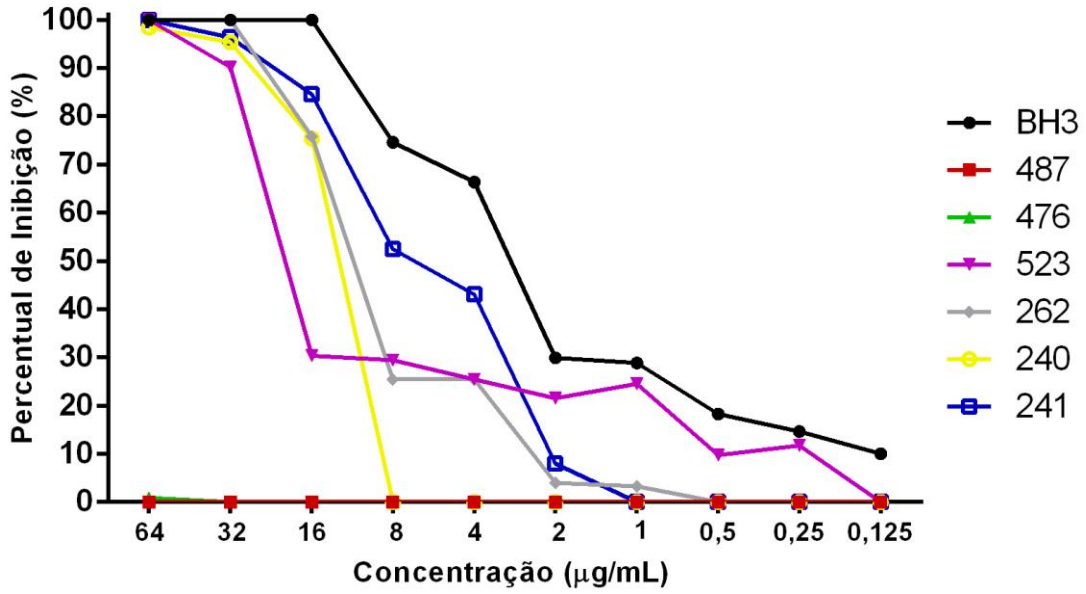
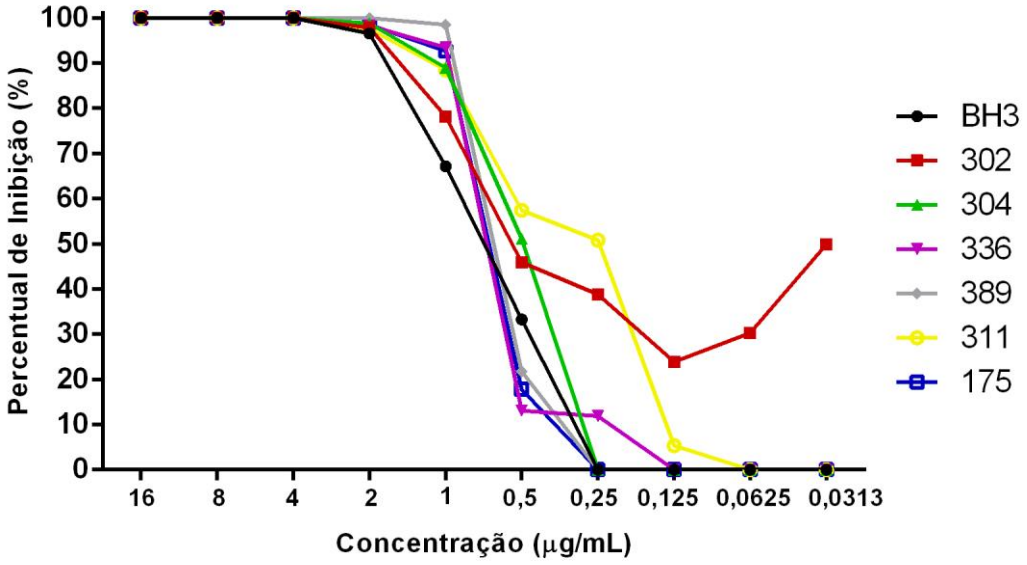


Figura 4. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis*, isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (µg/mL) do fluconazol, com a técnica da microdiluição em caldo.

A



B

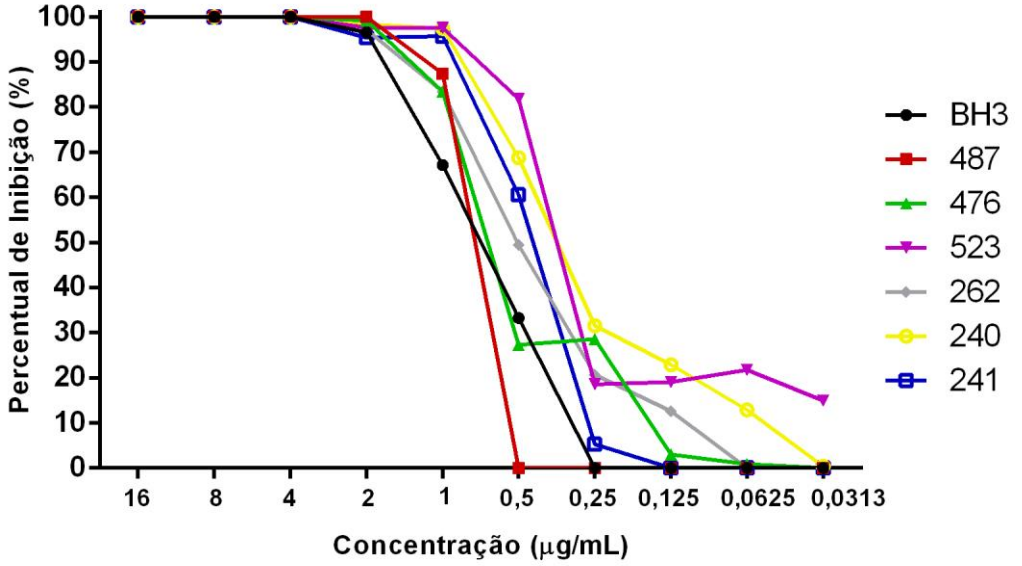
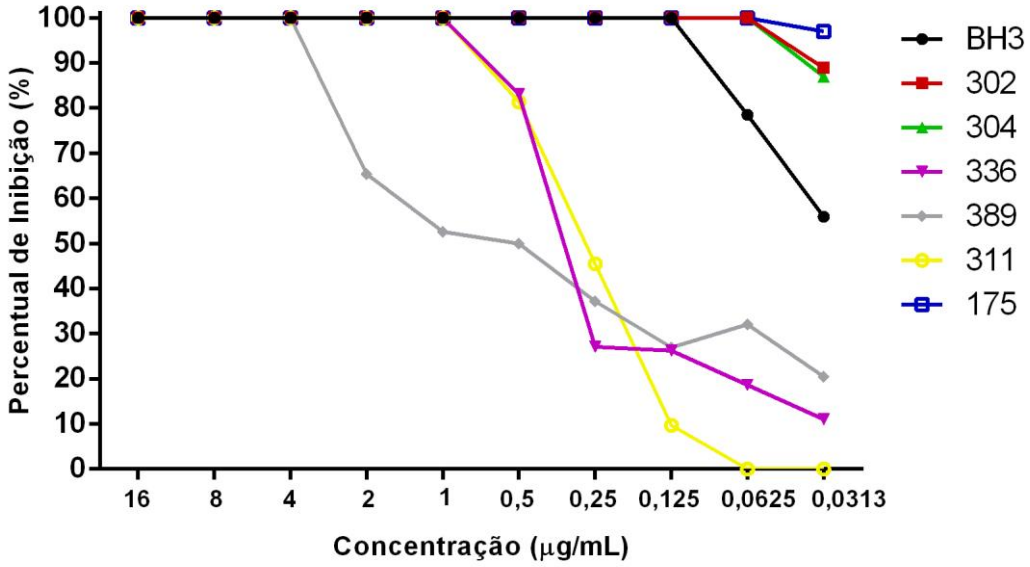


Figura 5. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis*, isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (µg/mL) da anfotericina B, com a técnica da microdiluição em caldo.

A



B

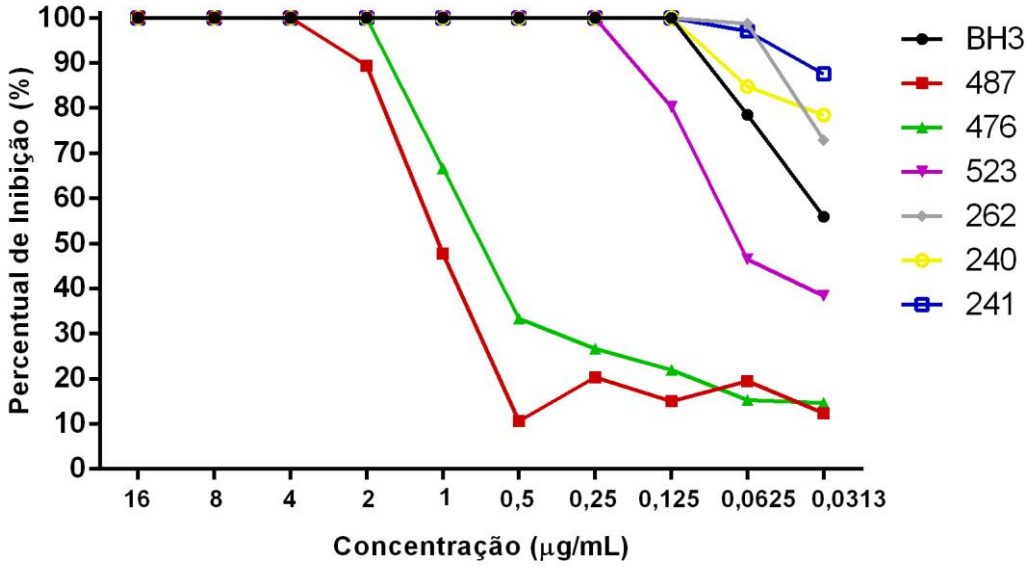
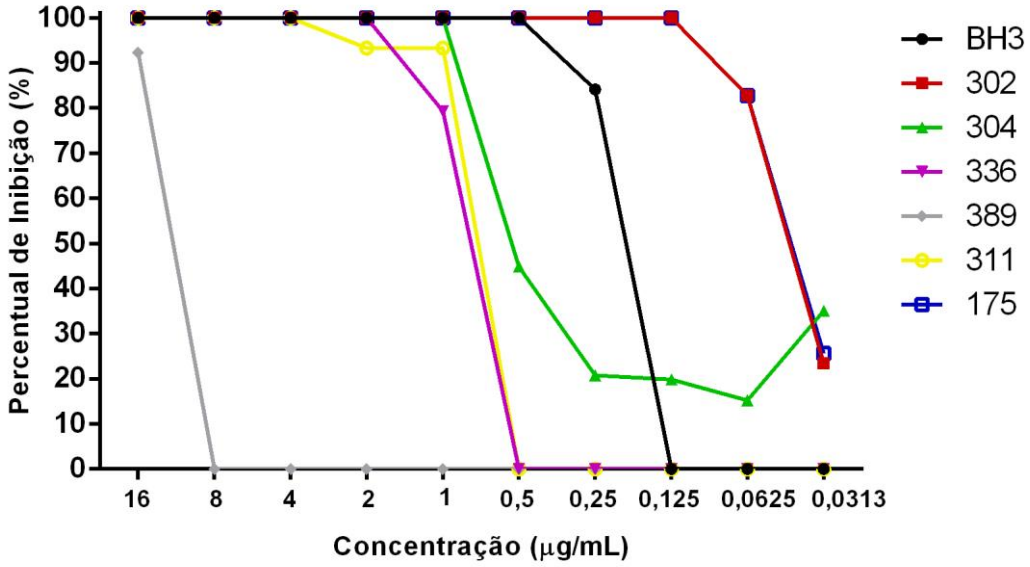


Figura 6. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis*, isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (µg/mL) do cetoconazol, com a técnica da microdiluição em caldo.

A



B

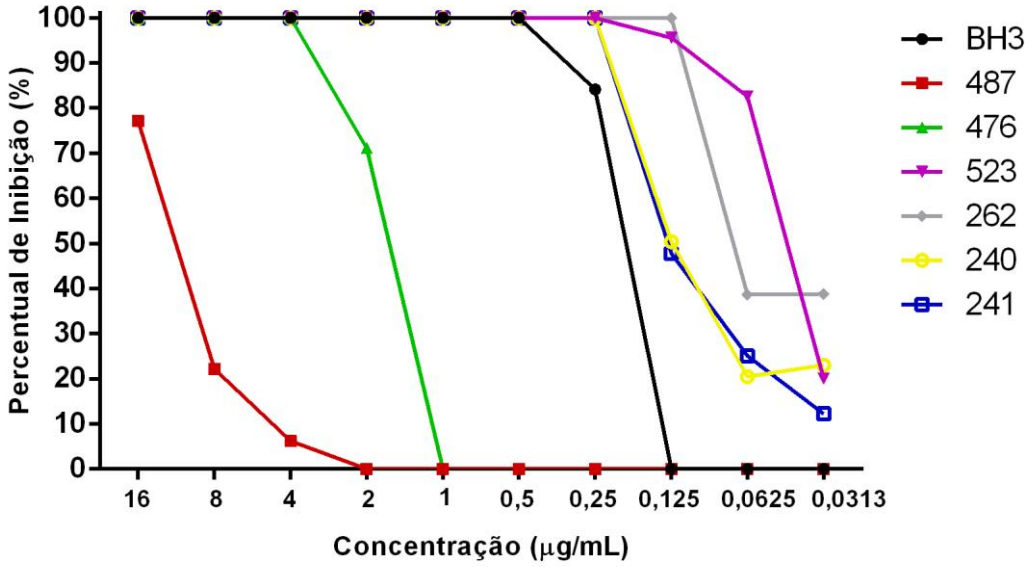
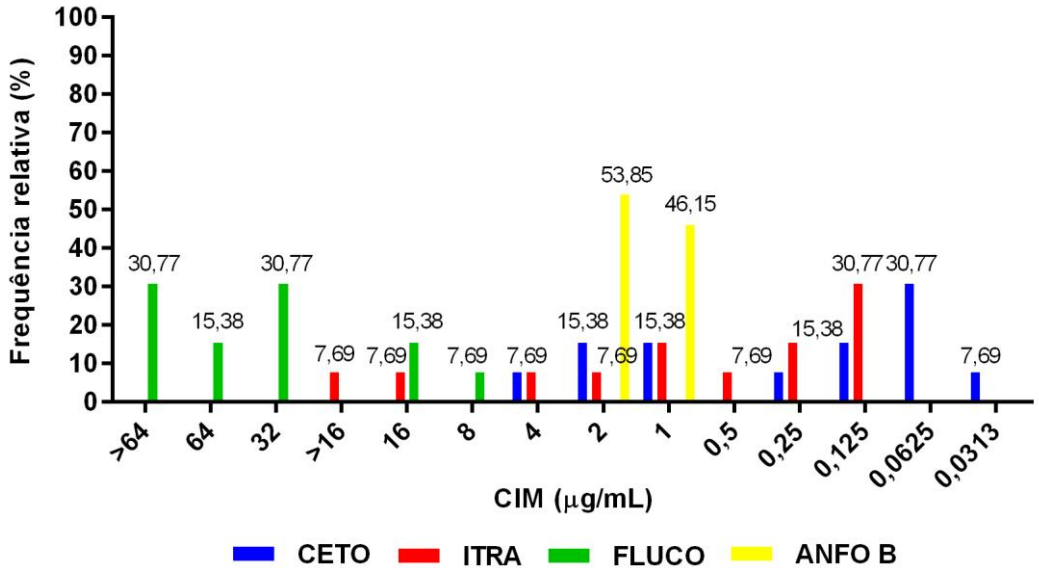


Figura 7. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis*, isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (µg/mL) do itraconazol, com a técnica da microdiluição em caldo.

A



B

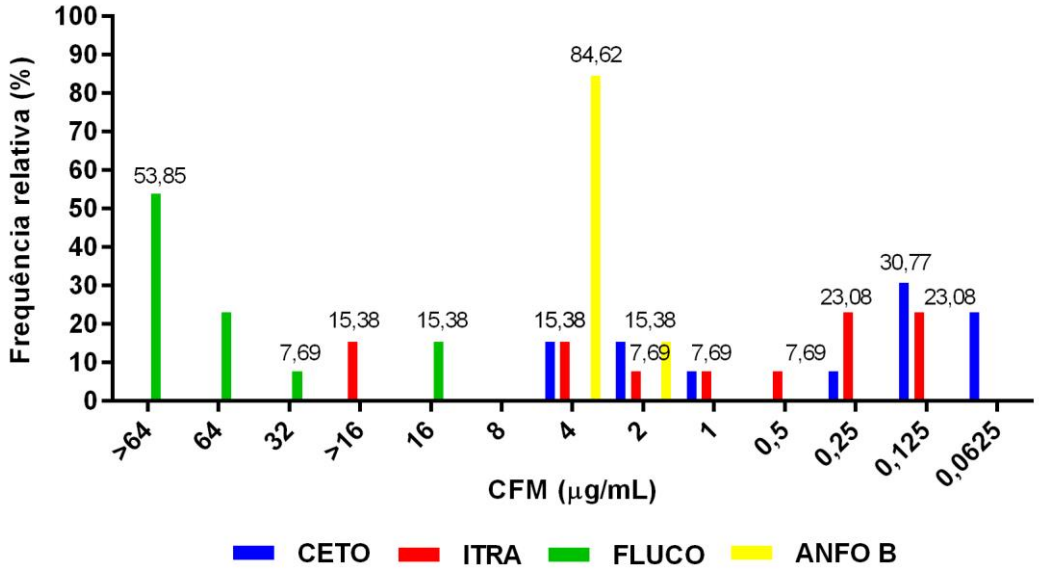


Figura 8. Frequência relativa dos valores de **(A)** CIM (ug/mL) e **(B)** de CFM (µg/mL) encontrados para os isolados de *M. pachydermatis*, frente aos antifúngicos alopáticos comerciais.

Tabela 6. Valores de CIM, CFM (µg/mL) e razão CFM/CIM dos antifúngicos comerciais, obtidos pela técnica da microdiluição em caldo. Cada isolado de *M. pachydermatis* foi classificado como resistente (R) ou sensível (S), de acordo com os pontos de corte estabelecidos.

ISOLADO	FLUCONAZOL				CETOCONAZOL				ITRACONAZOL				ANFOTERICINA B			
	CIM	CFM	CFM/ CIM	Resposta	CIM	CFM	CFM/ CIM	Resposta	CIM	CFM	CFM/ CIM	Resposta	CIM	CFM	CFM/ CIM	Resposta
BH3	16	16	1	S	0,125	0,125	1	S	0,5	0,5	1	**R**	2	4	2	**R**
302	8	16	2	S	0,0625	0,0625	1	S	0,125	0,125	1	S	2	4	2	**R**
304	64	>64	-	**R**	0,0625	0,0625	1	S	1	1	1	**R**	2	4	2	**R**
336	>64	>64	-	**R**	1	1	1	**R**	2	2	1	**R**	1	4	4	S
389	>64	>64	-	**R**	4	4	1	**R**	16	>16	-	**R**	1	2	2	S
311	64	>64	-	**R**	1	2	2	**R**	1	4	4	**R**	2	4	2	**R**
175	16	64	4	S	0,032	0,0625	2	S	0,125	0,125	1	S	1	4	4	S
487	>64	>64	-	**R**	2	4	2	**R**	>16	>16	-	**R**	2	2	1	**R**
476	>64	>64	-	**R**	2	2	1	**R**	4	4	1	**R**	2	4	2	**R**
523	32	64	2	S	0,25	0,25	1	S	0,125	0,25	2	S	1	4	4	S
262	32	32	1	S	0,0625	0,125	2	S	0,125	0,125	1	S	2	4	2	**R**
240	32	>64	-	S	0,125	0,125	1	S	0,25	0,25	1	S	1	4	4	S
241	32	64	2	S	0,0625	0,125	2	S	0,25	0,25	1	S	1	4	4	S

Tabela 7. Classificação dos isolados de *M. pachydermatis* como resistentes (R) ou sensíveis (S), de acordo com os pontos de corte estabelecidos, frente aos antifúngicos testados nas metodologias de difusão em ágar e microdiluição em caldo.

ISOLADO	FLUCONAZOL		CETOCONAZOL		ITRACONAZOL		ANFOTERICINA B	
	Microdiluição	Difusão	Microdiluição	Difusão	Microdiluição	Difusão	Microdiluição	Difusão
BH3	**S**	**R**	S	S	R	R	**R**	**S**
302	**S**	**R**	S	S	S	S	**R**	**S**
304	R	R	S	S	**R**	**S**	**R**	**S**
336	R	R	**R**	**S**	R	R	S	S
389	R	R	R	R	**R**	**S**	S	S
311	R	R	R	R	**R**	**S**	**R**	**S**
175	**S**	**R**	**S**	**R**	S	S	S	S
487	R	R	R	R	R	R	R	R
476	R	R	R	R	R	R	R	R
523	**S**	**R**	S	S	S	S	**S**	**R**
262	**S**	**R**	S	S	S	S	**R**	**S**
240	**S**	**R**	S	S	S	S	**S**	**R**
241	**S**	**R**	S	S	S	S	S	S

Considerando os pontos de corte adotados, 46,15% dos isolados foram considerados resistentes ao fluconazol, 38,46% ao cetoconazol, 53,85% ao itraconazol e à anfotericina B, de acordo com os resultados encontrados para a metodologia da microdiluição em caldo. Resistencia múltipla aos azóis foi observada em quatro dos 13 isolados (30,77%), dois de pele e dois de ouvido de cães com sintomatologias clínicas, que apresentaram resistência a todos os azóis testados (**Tabela 6**).

A resposta dos isolados ao itraconazol e ao cetoconazol foi a mais variável entre os antifúngicos testados e respostas mais uniformes foram encontradas para a anfotericina B (**Figuras 4 a 7**). A mesma observação pode ser feita ao analisar os resultados da técnica da difusão em ágar. A resposta ao fluconazol também foi bastante variável, com os isolados de dermatite canina mostrando uma resposta menos uniforme ao fluconazol que os isolados de ouvido coletados de *Didelphis* sem otite **(Figura 4).**

As concentrações inibitórias mínimas para a anfotericina B variaram entre 1 e 2 µg/mL (**Tabela 6**) com 53,85% dos isolados apresentando CIM igual a 2µg/mL (**Figura 8**), sendo classificados como resistentes ao fármaco. Os valores de CFM variaram entre 2 e 4 µg/mL (**Tabela 6**), com 84,62% dos isolados com CFM igual a 4 µg/mL (**Figura**

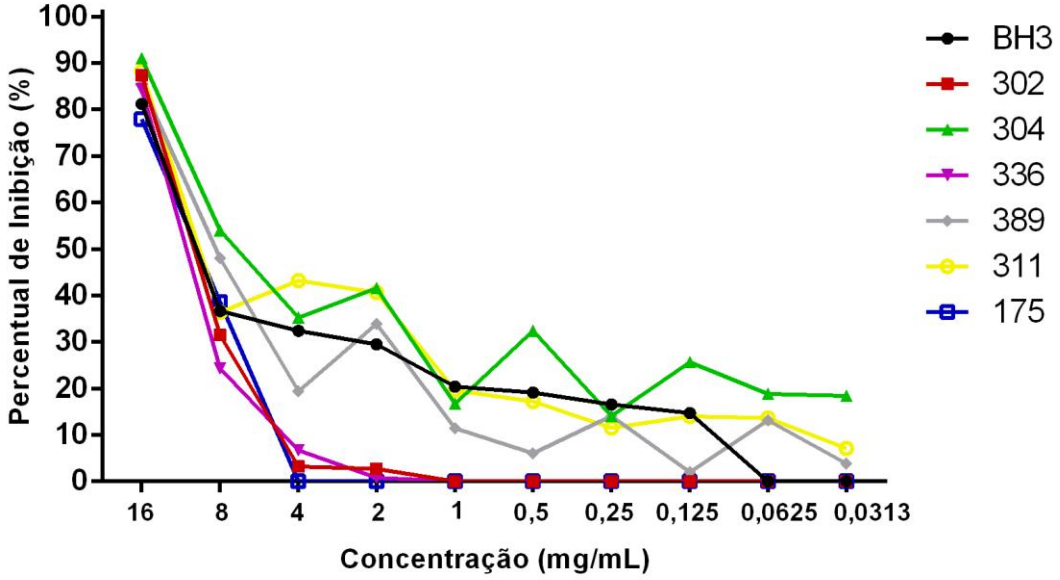
8). Os valores de CIM e CFM para o itraconazol e para o cetoconazol no presente estudo apresentaram grande variação **(Figura 8).** Para o itraconazol foram determinados valores maiores ou iguais a 0,125 µg/mL para ambos, CIM e CFM, e percentual alto (53,85%) de isolados classificados como resistentes (**Tabela 6**). Para o cetoconazol, os valores de CIM variaram de 0,032 e 4 µg/mL e de CFM entre 0,0625 e 4 µg/mL, com percentual menor de resistentes (38,46%) (**Tabela 6**).

A razão CFM/CIM pode ser calculada para determinar se um determinado fármaco ou extrato testado tem ação fungicida, quando o valor da razão for menor do que 4, ou fungistática, quando o valor da razão é maior ou igual a 4 (FREIRES *et al*, 2016). De acordo com esta classificação, o cetoconazol apresentou atividade fungicida para 100% dos isolados, seguido pelo itraconazol (76,92%), anfotericina B (61,54%) e fluconazol (38,46%). Não foi possível determinar a relação entre os parâmetros em dois isolados no teste com itraconazol (15,38%) e em sete isolados com o fluconazol (53,85%), devido a valores de CIM e CFM maiores do que a maior concentração recomendadas para o teste de microdiluição em caldo com cada fármaco (**Tabela 6**).

Não houve formação de halo de inibição em todos os testes procedidos com o extrato supercrítico de própolis vermelha na metodologia da difusão em ágar nos diferentes solventes e concentrações, ao passo que, o mesmo extrato mostrou atividade antifúngica contra as cepas de *M. pachydermatis*, na metodologia da microdiluição em caldo (**Figuras 9 a 12**). O resultado sugere que a difusão em ágar não é uma técnica eficaz para o teste de susceptibilidade à própolis, talvez pelo seu caráter resinoso impedir ou dificultar a migração dos compostos bioativos da própolis em meio sólido.

O ensaio de microdiluição em caldo demonstrou ser uma metodologia efetiva para estudos de sensibilidade com diferentes extratos de própolis, o que não foi verificado pela difusão em ágar. Todos os extratos de própolis apresentaram atividade antifúngica frente aos isolados testados de *M. pachydermatis*, inclusive os que apresentaram resistência aos antifúngicos testados. A relação entre os percentuais de inibição e as concentrações de cada extrato testado utilizando a metodologia da microdiluição em caldo estão representadas nos gráficos das **Figuras 9 a 12**. Os valores de CIM, CFM bem como a relação entre eles, para os quatro tipos de extratos de própolis brasileira testados estão exibidos na **Tabela 8**.

A



B

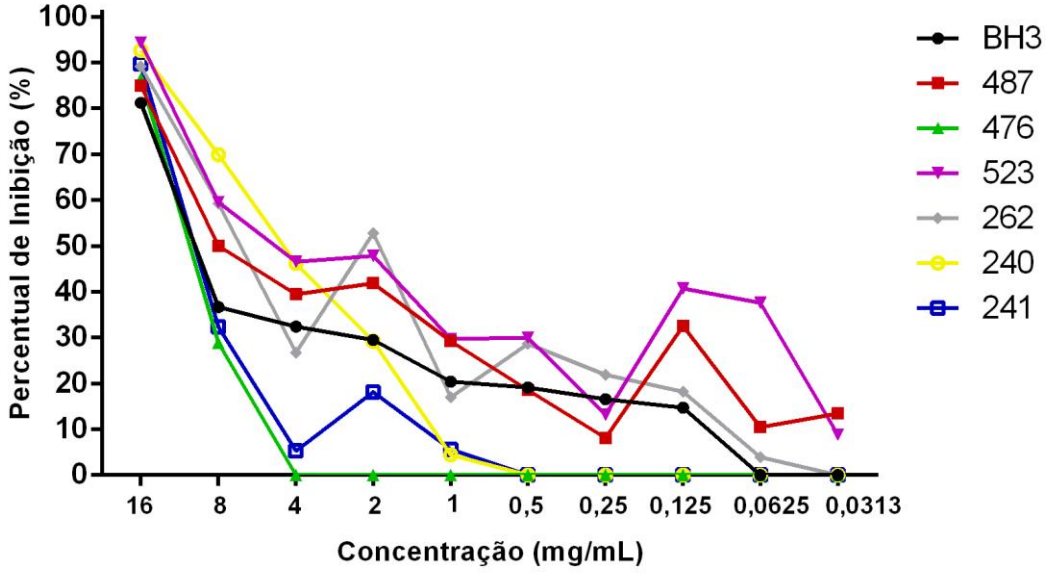
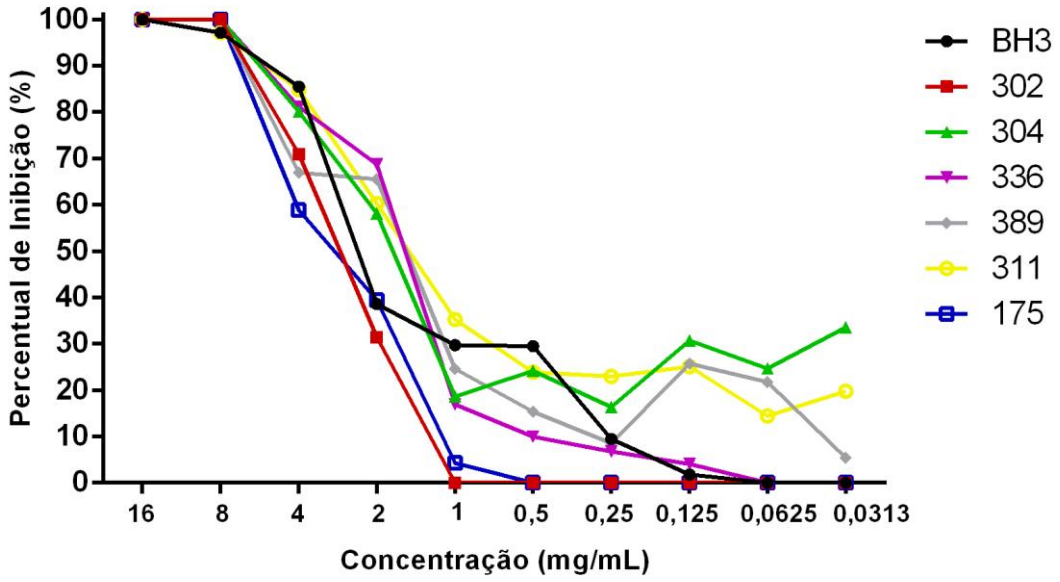


Figura 9. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis,* isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (mg/mL) do extrato etanólico de própolis marrom, com a técnica da microdiluição em caldo.

A



B

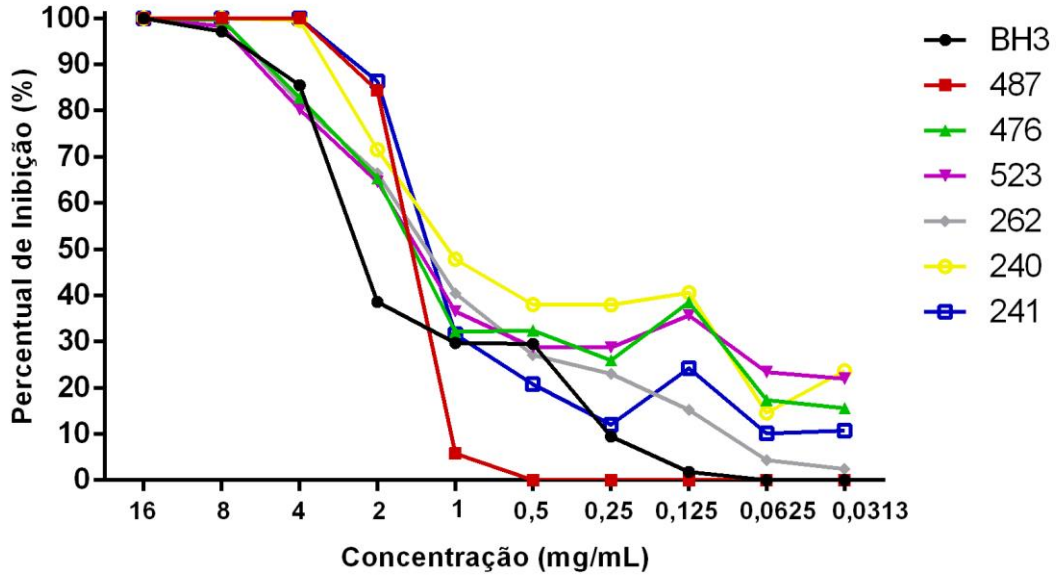
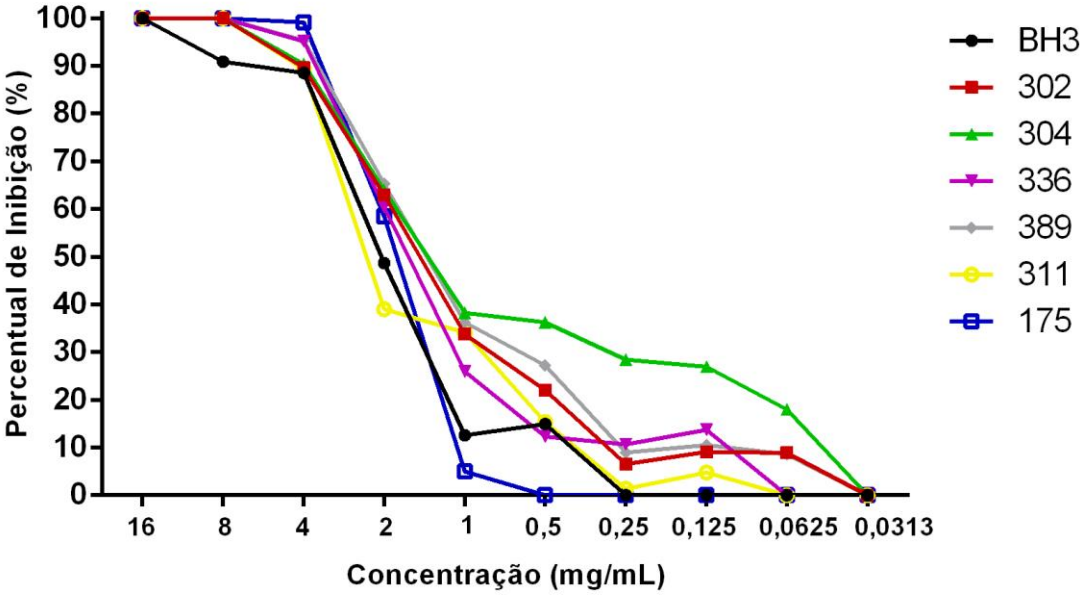


Figura 10. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis,* isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (mg/mL) do extrato etanólico da própolis verde, com a técnica da microdiluição em caldo.

A



B

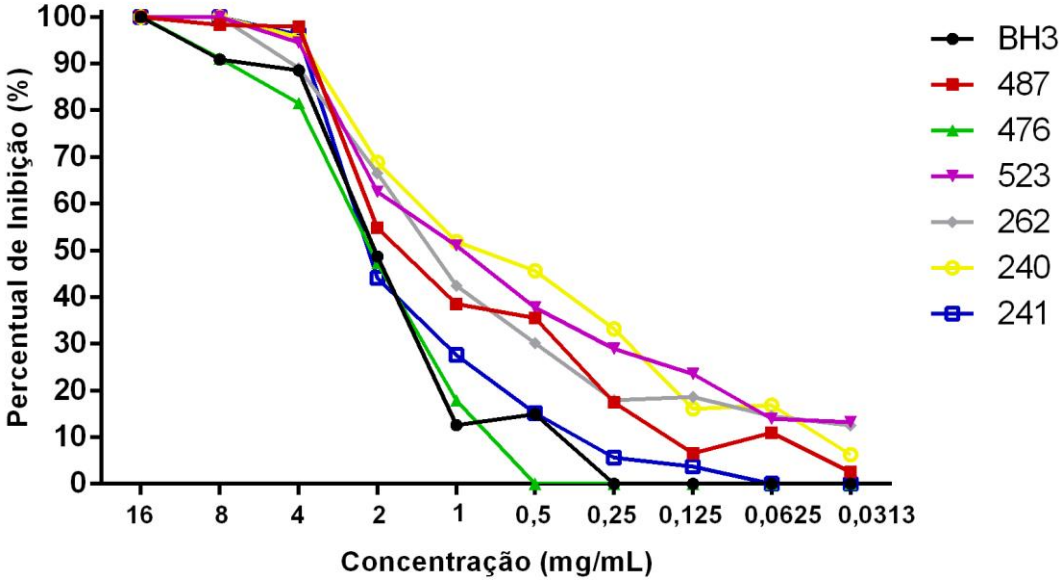
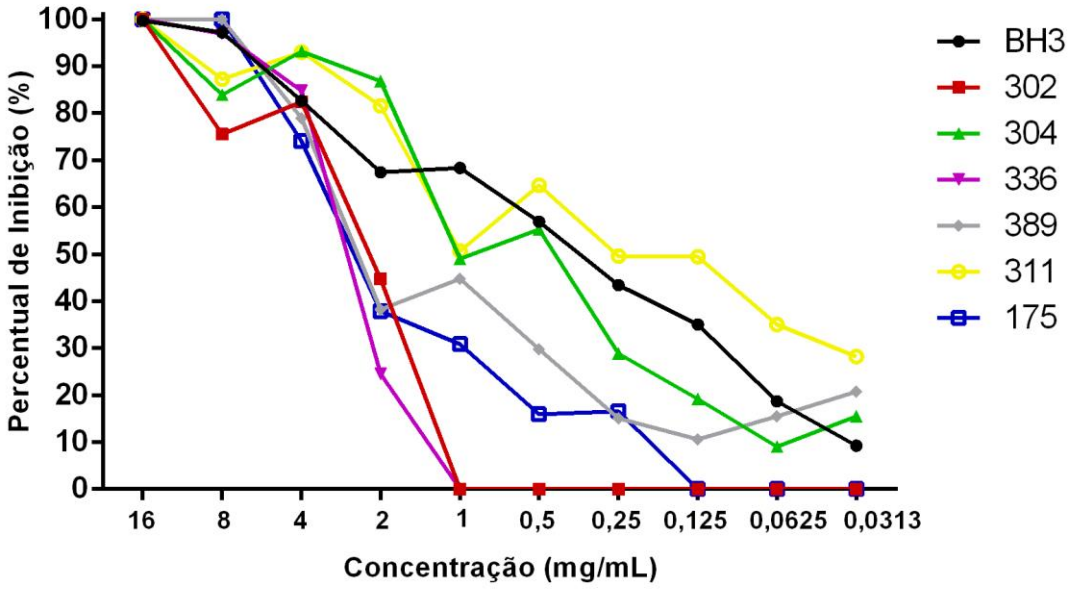


Figura 11. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis*, isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (mg/mL) do extrato etanólico de própolis vermelha, com a técnica da microdiluição em caldo.

A



B

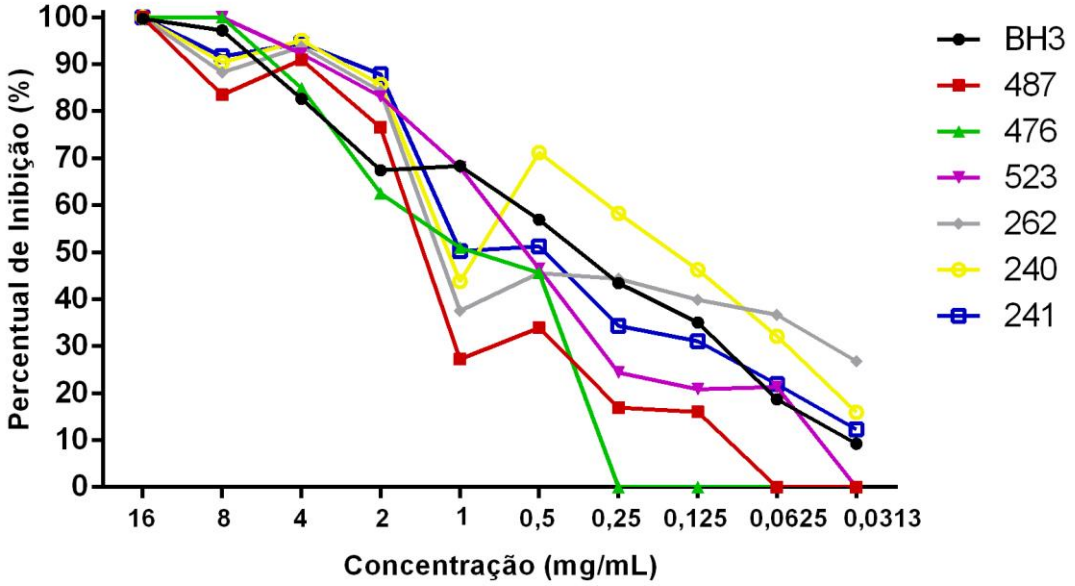
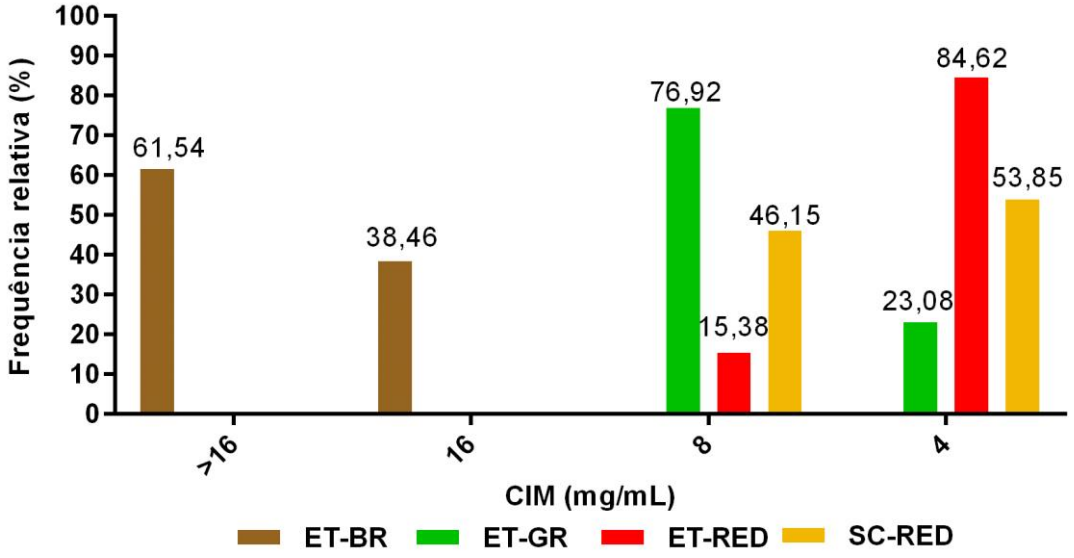


Figura 12. Percentual de inibição do crescimento de *M. pachydermatis*, isoladas de (**A**) pele de cães com dermatite e cepa de referência, e (**B**) ouvido de cães com otite e *Didelphis* assintomático, e cepa de referência, para cada concentração testada (mg/mL) do extrato supercrítico da própolis vermelha, com a técnica da microdiluição em caldo.

A



B

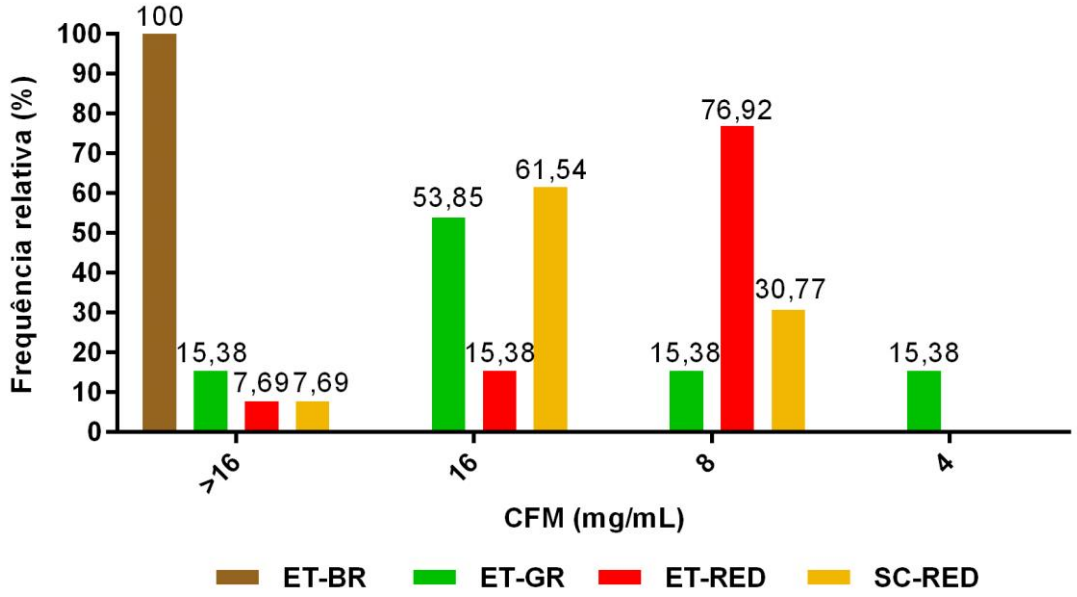


Figura 13. Frequência relativa dos valores de (**A**) CIM (mg/mL) e (**B**) CFM (mg/mL) encontrados para os isolados de *M. pachydermatis*, frente aos extratos de própolis.

Tabela 8. Valores de CIM, CFM (mg/mL) e razão CFM/CIM para cada extrato de própolis, obtidos pela técnica da microdiluição em caldo.

ISOLADO	ET-BR			ET-GR			ET-RED			SC-RED		
	CIM	CFM	CFM/CIM	CIM	CFM	CFM/CIM	CIM	CFM	CFM/CIM	CIM	CFM	CFM/CIM
BH3	>16	>16	-	8	>16	-	8	>16	-	8	>16	-
302	>16	>16	-	8	16	2	4	8	2	8	16	2
304	16	>16	-	8	16	2	4	8	2	4	16	4
336	>16	>16	-	8	8	1	4	8	2	8	16	2
389	>16	>16	-	8	>16	-	4	8	2	8	8	1
311	>16	>16	-	8	16	2	4	8	2	4	16	4
175	>16	>16	-	8	16	2	4	8	2	8	8	1
487	>16	>16	-	4	4	1	4	16	4	4	16	4
476	>16	>16	-	8	16	2	8	16	2	8	8	1
523	16	>16	-	8	16	2	4	8	2	4	8	2
262	16	>16	-	4	8	2	4	8	2	4	16	4
240	16	>16	-	4	4	1	4	8	2	4	16	4
241	16	>16	-	8	16	2	4	8	2	4	16	4

Os extratos de própolis etanólicos das própolis marrom e vermelha e o extrato supercrítico da própolis vermelha não apresentaram diferenças significativas de atividade inibitória entre os isolados dos grupos de pele e ouvido (**Figuras 9, 11 e 12**). Os isolados de ouvido de *Didelphis* apresentaram maior sensibilidade à propolis verde etanólica quando comparados com os demais isolados (**Figura 11**).

O extrato etanólico da própolis vermelha tem a maior proporção de isolados (84,62%) com o menor valor de CIM verificado para os extratos de própolis (4 mg/mL). O extrato supercrítico da própolis vermelha apresentou o segundo melhor resultado com relação à atividade inibitória, com 53,85% dos isolados exibindo CIM de valor 4 mg/mL. Com menor proporção de isolados sensíveis a esta concentração (23,08%), o extrato etanólico verde apresentou maior proporção (76,92%) de leveduras com CIM iguais a 8 mg/mL. Por último, o extrato etanólico marrom apresentou os valores mais altos de concentração inibitória (CIM > 16 mg/mL) para a maioria das leveduras testadas (61,54%). O gráfico de frequências das CIMs para cada extrato está representado na **Figura 13-A.**

Com relação à concentração mínima necessária para eliminar completamente as leveduras (CFM) há uma variação maior de resultados observados nos extratos etanólicos das própolis verde e vermelha e supercrítico da própolis vermelha. O extrato etanólico da própolis verde foi o único com efeito fungicida na concentração de 4 mg/mL, sendo efetivo para apenas 15,38% dos isolados testados. A própolis etanólica vermelha apresentou maior proporção (76,92%) de isolados sensíveis à CFM de 8 mg/mL. O extrato supercrítico de própolis vermelha foi capaz de eliminar apenas 30,77% dos isolados na concentração de 8 mg/mL e a maior proporção de isolados inibidos (61,54%) ocorreu para a concentração de 16 mg/mL. Com resultados mais altos de CFM, o extrato etanólico da própolis marrom não apresentou letalidade nem na maior concentração testada. O gráfico de frequências das CIMs para cada extrato está representado na **Figura 13-B.**

A partir das análises das razões CFM/CIM (**Tabela 8**) pode-se inferir que o extrato etanólico da própolis verde possui melhor efeito fungicida, seguido dos extratos etanólico e supercrítico da própolis vermelha.

As **Figuras 14 e 15** expressam o resultado de modelo de regressão não linear log-logistica de dose-resposta, utilizado para estimar uma função representativa do conjuntos de dados, no intuito de encontrar padrões de correlacão entre os percentuais de inibição e as concentrações testadas para os isolados em cada ensaio e poder compará-los. A distribuição de dados do tratamento com a anfotericina B foi a única dentre os antifúngicos que se ajustou ao modelo, com relações entre as variáveis mais uniformes, confirmando as observações feitas nas análises de frequência de concentração inibitória mínima para os antifúngicos **(Figura 8).** Dentre os extratos, apenas o extrato etanólico de própolis marrom não se adequou ao modelo proposto, apresentando grande variedade de distribuição dos dados. O valor de EC50 não pode ser determinado para os tratamentos que apresentaram uma grande dispersão de dados e não se adequaram ao modelo. Os extratos de própolis verde e vermelha etanólicos apresentaram curva com padrão semelhante, o que pode indicar similaridade de mecanismos de inibição relacionados aos compostos de interesse encontrados nas diferentes própolis. A decaimento da curva de dose-resposta modelada para o extrato supercrítico de própolis vermelha é menor, fato evidenciado pelos menores valores de EC50 estimados para este tratamento.

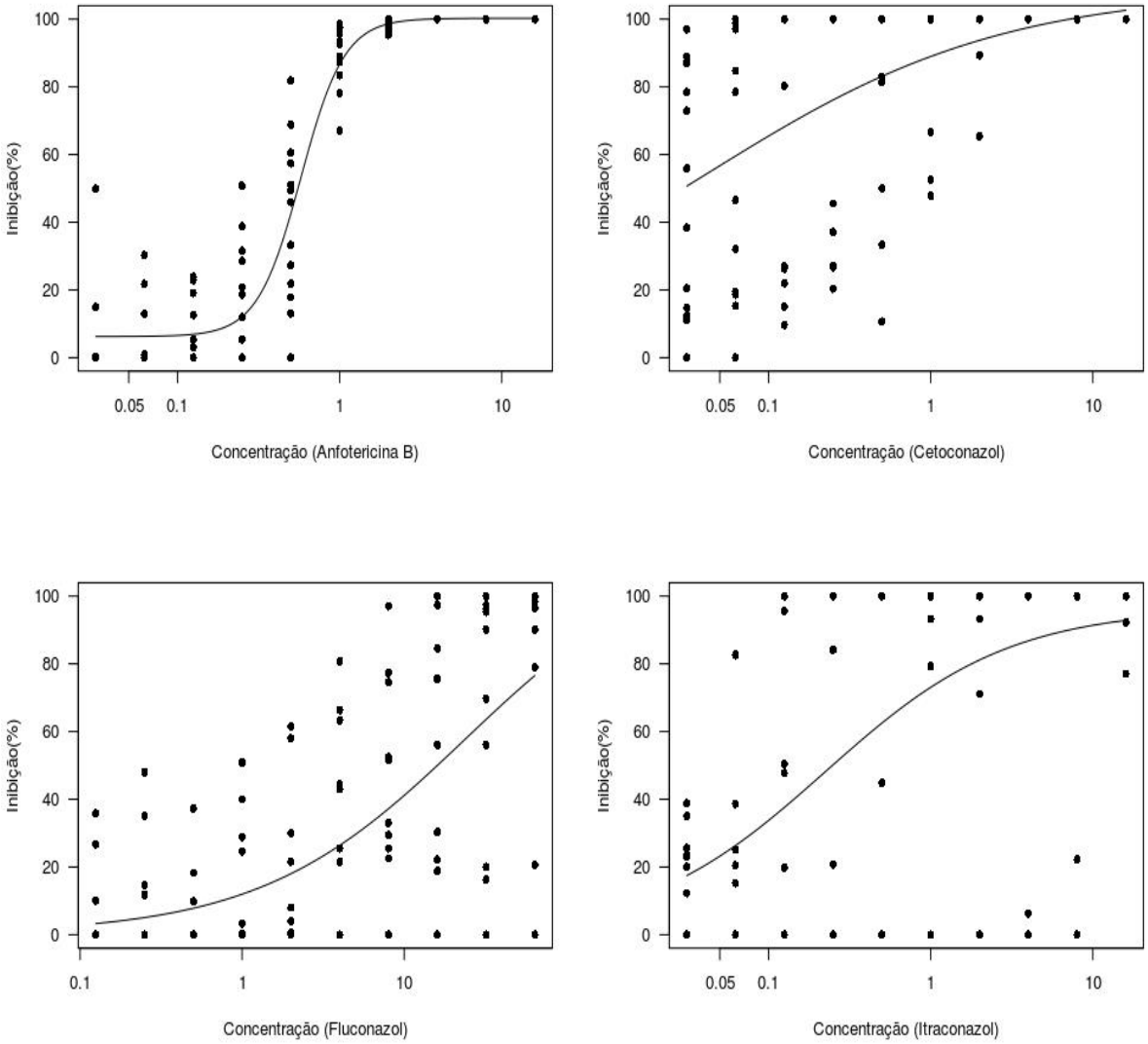


Figura 14. Curva de dose-resposta estimada para os isolados de *M. pachydermatis* para cada antifúngico testado pela técnica de microdiluição em caldo.

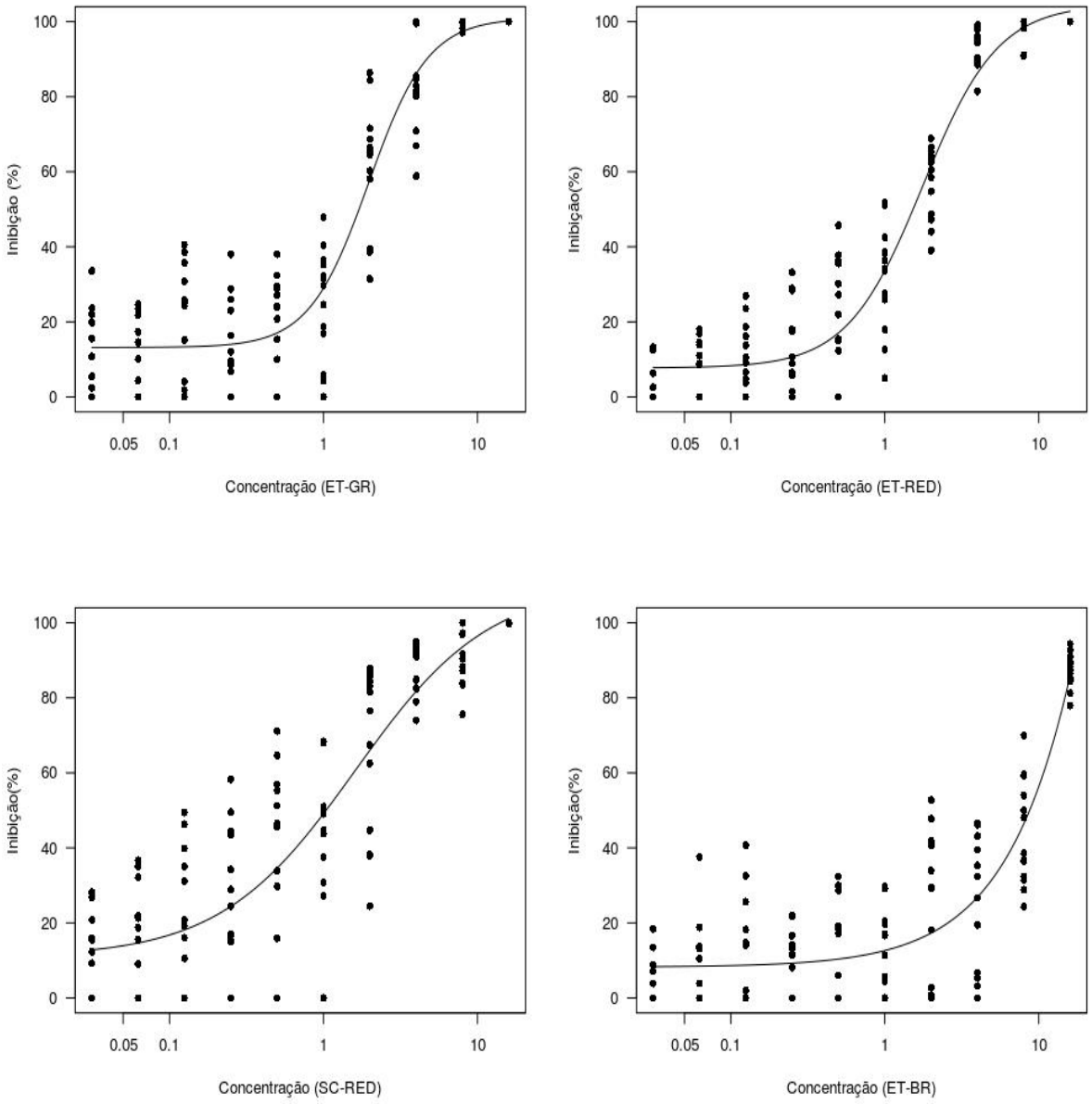


Figura 15. Curva de dose-resposta estimada para os isolados de *M. pachydermatis* para cada extrato de própolis testado pela técnica de microdiluição em caldo.

Os valores de concentração estimados que inibem 50% do crescimento dos isolados testados, segundo inferência do valor de EC_{50} pelo modelo de dose-resposta utilizado, são de 0,58 μg/mL para a anfotericina B, de 1,97 mg/mL para o extrato etanólico de própolis verde, de 1,76 mg/mL para o extrato etanólico de própolis vermelha e de 1,60 para o extrato supercrítico da própolis vermelha. O extrato supercrítico da própolis vermelha apresentou menor valor de concentração capaz de inibir em 50% o crescimento dos isolados, apesar de ter apresentado maior dispersão dos dados, quando comparado com os extratos etanólicos das própolis vermelha e verde. O menor decaimento da curva indica uma resposta menos dependente da dose.

Os resultados de inibição relatados podem ser correlacionados com o conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides e com a atividade antioxidante quantificados para cada extrato de própolis utilizado nos testes (**Tabela 4**). Os resultados inferiores de inibição para o extrato etanólico da própolis marrom podem ser explicados pela menor quantidade de compostos fenólicos e flavonoides presentes. A própolis etanólica vermelha apresentou os valores mais altos de fenóis totais e flavonoides, fato que fundamenta os melhores resultados de inibição encontrados, com maior proporção de isolados apresentando valores menores de CIM e CFM. O conteúdo de flavonoides foi similar para os extratos etanólico da própolis verde e supercrítico da própolis vermelha. Contudo, o conteúdo de compostos fenólicos totais da própolis verde foi superior, o que pode explicar os menores resultados de CIM encontrados e o melhor efeito fungicida (CFM/CIM). O menor valor de concentração capaz de inibir 50% do crescimento foi encontrado para a própolis vermelha supercrítica, o que pode indicar que os compostos de interesse presentes neste extrato tenham menor relação de dose-dependência.

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados de caracterização do perfil enzimático concordam com a literatura revista, pois, como já descrito em Sidrim & Rocha (2010), as leveduras da espécie *Malassezia pachydermatis* podem apresentar resultados positivos ou negativos à prova da catalase e à hidrólise da esculina. Resultados similares foram encontrados por Nascente *et al* (2010), que relataram atividade positiva para as provas da catalase e urease em todos os isolados testaram isolados de *M. pachydermatis* (N=139). A lipodependência da cepa de referência pode ser justificada pelo estresse sofrido ao ser estocada em baixas temperaturas (-80 °C) durante período prolongado, fato também observado por Crespo *et al* (2000) e Girão (2004).

Diversos fatores de virulência têm sido descritos para a levedura *M. pachydermatis*, como a secreção de enzimas esterase, lipase, lipoxigenase, protease, fosfolipase, condroitina-sulfatase e hialuronidase (BUOMINO *et al*, 2016; ORTIS *et al*, 2013; PINI & FAGGI, 2011). Trinta cepas de *M. pachydermatis* isoladas de cães com otite externa e assintomáticos foram testadas em estudo conduzido por Coutinho (2005) e a maioria delas apresentou alta atividade das enzimas condroitina-sulfatase, hialuronidase, fosfolipase e proteinase, resultados que coincidem com os encontrados no presente estudo. A análise estatística realizada por Coutinho (2005) não evidenciou diferenças na atividade enzimática entre os grupos de isolados patogênicos e comensais, o que sugere que a produção de enzimas não deve ser um fator determinante no processo de infecção causado pela levedura. Os achados estão em concordância com o presente trabalho, visto que não houve diferença entre as atividades fosfolipásicas dos isolados de otite, dermatite e ouvido saudável de *Didelphis*.

No teste de fosfolipase, a zona de precipitação que se forma ao redor da colônia é devido à formação de um complexo entre o cálcio e os ácidos graxos liberados pela atividade da enzima sobre os fosfolipídios presentes na gema de ovo (BUOMINO *et al*, 2016). Juntachai *et al* (2009) analisaram e compararam as atividades de lipase e fosfolipase extracelular de várias espécies do gênero e detectaram que as cepas lipodependentes apresentam menor atividade fosfolipásica, fato igualmente observado neste estudo. O isolado de referência (BH3) que apresentou lipodependência apresentou

um menor valor de Zona de Precipitação (Pz) que os outros isolados, o que indica menor atividade fosfolipásica. Os mesmos autores viram que *M. globosa* mostrou a maior atividade da enzima lipase e a *M. pachydermatis* apresentou alta atividade para ambas, em concordância com a atividade descrita para a espécie neste trabalho.

Em contraste, pesquisas recentes sugerem que a atividade fosfolipásica seja um importante fator para a colonização da levedura em casos crônicos de otite canina, além de contribuírem para o desenvolvimento de lesões de pele (BUOMINO *et al*, 2016; CAFARCHIA *et al*, 2008). As fosfolipases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as ligações éster nos glicerofosfolipídios (CAFARCHIA *et al*, 2008). A atividade fosfolipásica de *M. pachydermatis* foi mais prevalente em isolados obtidos de lesões de pele (93.9%), seguido de isolados obtidos de pele canina saudável com lesões localizadas (41.4%) e com menor frequência, de pele de animais saudáveis (10.6%) (CAFARCHIA & OTRANTO, 2004). Já foi demonstrado que *M. pachydermatis* isoladas de cães com lesões de pele secretam alta quantidade de fosfolipase A2 (BUOMINO *et al*, 2016). Ortis *et al* (2013) também encontraram atividade fosfolipásica mais intensa em isolados de cães com otite. Do total de isolados avaliados (n = 95), 43,2% mostraram atividade enzimática intensa e apenas 24% não formaram precipitado, caracterizando ausência da enzima. A maioria dos isolados também apresentou atividade proteásica (81%). Supõe-se que a produção da enzima seja um importante fator na primeira fase da colonização no hospedeiro, a adesão (BUOMINO *et al*, 2016), visto que a enzima causa a liberação de ácido araquidônico, envolvido nas lesões cutâneas inflamatórias (ORTIS *et al*, 2013).

Isolados provenientes de cães com otite externa também exibiram alta atividade da enzima (Pz = 0.50 ±0.09, n = 32) comparados com os isolados de canal auditivo de animais saudáveis (Pz = 0.75 ±0.11, n = 27), segundo estudo realizado por Teramoto *et al* (2015). Os autores não detectaram diferença entre as atividades lipásicas entre os dois grupos estudados, fato observado também nos testes realizados com os isolados do presente estudo, e não houve diferença de atividade enzimática entre os genótipos determinados. Os diferentes genótipos e subgenótipos de *M. pachydermatis* determinados por Cafarchia *et al* (2008) também não apresentaram correlação com a atividade fosfolipásica, em estudo que avaliou 185 isolados de diferentes sítios anatômicos em 30 cães.

Considerando apenas os resultados da metodologia da difusão em ágar, os isolados seriam classificados como resistentes ao fluconazol, seguindo a referência do valor de ponto de corte da concentração inibitória mínima para a espécie de 32 µg/mL, sugerido por Cafarchia *et al* (2015) em estudo que utilizou 62 isolados de cães com dermatite. Contudo os resultados discordantes encontrados quando analisadas as respostas dos isolados aos antifúngicos no teste de microdiluição em caldo, considerado padrão-ouro, levam a concluir que não há uma boa correspondência entre os testes. A alta taxa de discordância apresentada na classificação dos isolados como resistentes ou sensíveis aos fármacos, ao comparar as duas metodologias de teste, também indicam que a técnica da difusão em ágar não foi eficaz na determinação da sensibilidade dos isolados de *Malassezia pachydermatis*. Contudo, por ser uma técnica barata, fácil e de rápida execução, pode ser útil na rotina do laboratório de micologia para realização de testes preliminares de rastreamento da sensibilidade a agentes antifúngicos.

A resposta aos fármacos foi bastante varável entre os isolados, exceto à anfotericina B. Carrillo-Muñoz *et al* (2013), ao testarem a resposta ao fluconazol em 76 isolados clínicos do gênero *Malassezia*, também encontraram uma grande variação na resposta. Em oposição aos achados relatados nesta pesquisa, valores relativamente baixos de CIM para o fluconazol são relatados na literatura. Isolados de *M. pachydermatis* sensíveis ao fluconazol foram reportados em trabalhos como o de Carrillo-Muñoz *et al* (2013), com valor de CIM igual a 1,2 µg/mL em seis isolados de cães com otite, e os de Brito *et al* (2009) e Figueredo *et al* (2013), que encontraram CIM igual a 8 µg/mL, em isolados de cães sem e com sintomatologia clínica, respectivamente. Apenas um dos isolados testados neste trabalho apresentou valor de CIM igual a 8 µg/mL. É importante citar que esses resultados suscitaram desconfiança de nosso grupo com relação à qualidade do fluconazol utilizado, e por isso foram realizados testes com *C. albicans*, nos quais demonstrou-se atividade do fluconazol sobre esse fungo, atestando a atividade do mesmo.

Azóis têm sido utilizados com frequência na clínica médica veterinária para tratamento de infecções fúngicas, sendo um dos antifúngicos mais utilizados do mercado (CARRILLO-MUÑOZ *et al*, 2013). Uma boa resposta clínica ao fluconazol tem sido observada em pacientes com lesões extensas; contudo, devido à ausência de

efeito fungicida para este triazol, a erradicação incompleta da população de fungos pode causar recorrência. Além disso, o tratamento prolongado e repetitivo, exigido pelas recidivas, seleciona os isolados mutantes resistentes, o que repercute na aceleração do fenômeno de aquisição de resistência dos microrganismos ao fluconazol (JESUS *et al*, 2011; SIDRIM & ROCHA, 2010). A alta taxa de resistência dos isolados clínicos aqui apresentados podem ter sido resultado deste fenômeno de seleção artificial.

Watanabe *et al* (2014) discutem que a resistência de fungos a azóis pode ser causada por inúmeros fatores genéticos: alterações na biossíntese do ergosterol; mutações na enzima alvo da droga (esterol 14α-demethylase), que reduzem a sua afinidade para os azóis; aumento da expressão do gene que codifica para a enzima ERG11; ou superexpressão de genes que codificam para proteínas transportadoras de membrana. Investigações futuras sobre sequenciamento e expressão desses genes tornam-se necessárias para compreender os mecanismos de resistência a drogas da levedura *M. pachydermatis*.

Alta frequência de isolados resistentes aos azóis foi encontrada no presente estudo, quando comparados aos achados de outros estudos com cepas de *M. pachydermatis.* Cafarchia *et al* (2012-a), ao estudarem o perfil de susceptibilidade de 62 isolados de pele de cães com (n = 32) e sem (n = 30) lesão clínica frente a alguns antifúngicos azólicos, relataram que 12,5% dos isolados de pele, do grupo com lesão clínica, mostraram resistência ao fluconazol e ao cetoconazol, e 9,4% ao itraconazol. Ainda Cafarchia *et al* (2012-b) publicaram outro estudo com cães que apresentavam lesão clínica em pele, onde encontra diferentes quantidades de isolados resistentes aos azóis, a depender do genotipo de *M. pachydermatis*. O genotipo B apresentou 16% das cepas resistentes ao fluconazol; o genotipo C apresentou 14,3% das cepas resistentes ao fluconazol e ao cetoconazol, e 7,1% resistentes ao itraconazol; e o genotipo A revelou 8,3% das cepas resistentes ao cetoconazol e ao itraconazol, e 2,8% das cepas resistentes ao fluconazol. Isso pode indicar uma correlação entre variação genética e o fenômeno da resistência. Lyskova *et al* (2007), ao estudarem 30 isolados de cães com otite média, encontrou 4,4% isolados resistentes ao fluconazol.

Valores ainda menores de cepas resistentes foram relatados por Eichenberg *et al* (2003) em estudo com isolados obtidos de cães e gatos, no qual foi encontrado 2,4% de cepas resistentes ao fluconazol e 3,7% de cepas resistentes ao cetoconazol. Casos

extremos de resistência também já foram relatados, por Al-Sweih *et al* (2014), que encontraram valores de concentração inibitória mínima para o fluconazol maiores que 256 µg/mL em levedura isolada de paciente com fungemia.

Sobre o fenômeno de aquisição de resistência da *M. pachydermatis* ao fluconazol, *in vitro*, Cafarchia *et al* (2012) observaram que 86,6% dos isolados tornaram-se resistentes durante o experimento, com valores de CIM maiores que 64 µg/mL. Os mesmos isolados apresentaram resistência ao itraconazol (CIM > 1 µg/mL), o que também corrobora a hipótese da resistência cruzada. No presente estudo, a multirresistência aos azóis também foi observada, em concordância com a referida hipótese. O estudo de Jesus *et al* (2011) também demonstraram a capacidade de adquirir resistência ao fluconazol (CIM_{90} = 128 µg/mL) quando as leveduras são submetidas a uma exposição prolongada à droga. Também foi observada a resistência cruzada a outros azóis, com valores altos de CIM_{90} = 32 µg/mL para o cetoconazol e CIM_{90} = 64 µg/mL para o itraconazol. A resistência multidroga aos azóis testados apresentada por 30,77% dos isolados testados no estudo aqui descrito pode indicar a ocorrência de resistência cruzada devido à exposição prolongada do animal a agentes antifúngicos. Estas descobertas podem ter um impacto significativo em medicina e micologia veterinária, reforçando a importância de testes de susceptibilidade de microrganismos patogênicos para definir as terapias mais eficazes, o que na prática clínica ainda não é rotina.

O valor de CIM e CFM para todos os antifúngicos foram superiores aos relatados até então na literatura para a espécie em questão. Por exemplo, para a anfotericina B, os valores de CIM encontrados (entre 1 e 2 µg/mL) são conflitantes com os encontrados por Weiler *et al* (2013), que relataram CIM_{90} = 0,5 µg/mL para a anfotericina B, em estudo com 40 animais (cães e gatos) saudáveis e 40 com otite. Na mesma tendência, Álvarez-Pérez (2014) encontrou valores de concentração inibitória mínima menores ou iguais a 0,25 µg/mL para 60 cepas isoladas de ouvido de cães com otite. Brito *et al* (2009) determinaram igual valor de CIM ao testarem 20 isolados de cães assintomáticos. Não foram encontrados estudos que relatassem a resistência de *M. pachydermatis* à anfotericina B.

O itraconazol apresentou ação inibitória bastante variável com alta frequência de isolados resistentes (53,85%) para as leveduras testadas neste trabalho. Valores menores

de CIM foram encontrados por Weiler *et al* (2013), que variaram entre 0,5 e 0,001 µg/mL, com CIM_{90} = 0,25 µg/mL. O ponto de corte epidemiológico sugerido para a *M. pachydermatis* em estudo recente (2015) publicado por Cafarchia *et al* para o itraconazol é de CIM = 0,032 µg/mL, bastante inferior aos valores encontrados no presente estudo, fato que pode ser explicado pelo fenômeno da resistência cruzada entre os azóis. O mesmo valor de CIM foi encontrado por Nijima *et al* (2011), ao avaliarem 30 isolados provenientes de cães e gatos e por Brito *et al* (2009), em estudo já citado. Carrillo-Muñoz (2013) relataram CIM igual a 0,02 µg/mL e Cafarchia *et al* (2012) encontraram valores de $MIC_{90} \leq 0,008$ µg/mL, bem abaixo do ponto de corte epidemiológico sugerido. Eichenberg *et al* (2003) encontraram valores igualmente baixos de CIM, variando entre 0,007 e 0,125 µg/mL.

Os mesmos trabalhos citados para o itraconazol encontraram os seguintes valores de concentração inibitória mínima para o cetoconazol, com bom nível de concordância entre si: $CIM_{90} \leq 0,032$ µg/mL (CAFARCHIA *et al*, 2012), CIM variando entre 0,015 e 0,25 (EICHENBERG *et al*, 2003), CIM = 0,03 µg/mL (BRITO *et al*, 2009; NIJIMA *et al*, 2011) e CIM = 0,02 µg/mL (CARRILLO-MUÑOZ *et al*, 2013). O estudo de Weiler *et al* (2013) apresentou valores um pouco mais elevados de concentração inibitória, com CIM_{90} = 0,5 µg/mL com variação entre os isolados de 0,5 a 0,01 µg/mL (WEILER *et al*, 2013).

Valores mais altos de concentração inibitória mínima para isolados de cães com dermatite atópica já foram relatados por Watanabe *et al* (2014) ao testar o perfil de sucebtibilidade de 42 isolados de cães com dermatite atópica, pela metodologia do Etest, com valores de CIM para o cetoconazol variando entre 1,6 e 5,2 µg/mL, e para o itraconazol variando entre 3 e 7,09 µg/mL, Assim como no cetoconazol, os valores de concentração inibitória para o itraconazol no presente estudo também variaram bastante entre os isolados (**Figura 8**), com CIM entre 0,032 e 4 µg/mL e CFM entre 0,0625 e 4 µg/mL (**Tabela 6**), com valores discordantes em comparação com a maioria dos estudos consultados (CAFARCHIA *et al*, 2012; EICHENBERG *et al*, 2003; BRITO *et al*, 2009; NIJIMA *et al*, 2011; CARRILLO-MUÑOZ *et al*, 2013) e mais concordante com os achados de Weiler *et al* (2013) e de Watanabe *et al* (2014).

O itraconazol e o cetoconazol têm sido reportados como agentes antifúngicos eficazes para o manejo de infecções por *Malassezia* na medicina humana e veterinária,

apesar de terem apresentado resultados de inibição inferiores no presente trabalho, com muitos isolados resistentes a um ou mais antifúngicos. Tais achados reforçam a necessidade de pesquisar o perfil de sensibilidade dos fungos para que o tratamento seja menos empírico e possua maior efetividade, diminuindo probabilidade de recidivas e exposição prolongada dos pacientes.

Considerando a baixa variedade de agentes antifúngicos no mercado, os crescentes relatos de resistência e dose-dependência dos isolados clínicos aos antifúngicos comerciais (principalmente da classe dos azólicos), o alto-custo, o tempo prolongado de tratamento e os efeitos adversos das drogas disponíveis, estudar a eficácia de novas abordagens terapêuticas com produtos naturais e seus derivados torna-se uma necessidade emergente (DOTA *et al*, 2010; NETÍKOVÁ *et al*, 2013). Na medicina veterinária, as doenças infecciosas têm exibido um nível alto de resistência aos antimicrobianos, fato observado neste estudo. Inclui-se nesse grupo de doenças a otite canina, que é altamente prevalente, reincidente, e, na maioria das vezes, ocorre devido à infecção simultânea da bactéria do gênero *Staphylococcus* com a levedura *Malassezia pachydermatis* (OLIVEIRA *et al*, 2006). O *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) é atualmente um dos grandes problemas de saúde pública devido ao alto custo e limitadas opções de tratamento disponíveis (VEIGA *et al*, 2017, COSGROVE *et al*, 2005).

Assim como no estudo apresentado neste manuscrito, alguns autores têm demonstrado a atividade antifúngica de diferentes extratos de própolis frente a micro-organismos frequentemente isolados na clínica médica veterinária. Apesar da importância da *Malassezia pachydermatis* como agente etiológico de dermatomicoses, tanto na clínica humana quanto na veterinária, ainda são escassos os trabalhos que explorem o potencial terapêutico de extratos das própolis tipificadas brasileiras contra a levedura. Foram encontrados apenas quatro trabalhos publicados que testaram *in vitro* extratos de própolis na levedura *Malassezia pachydermatis* (KHOSRAVI *et al*, 2013; LOZINA *et al*, 2006). Apenas dois deles testaram a própolis brasileira (CARDOSO *et al*, 2010; LILENBAUM & BARBOSA, 1994).

Cardoso *et al*, (2010) encontraram atividade bactericida e fungicida ao testarem extrato etanólico de própolis oriundo do Rio Grande do Sul, em isolados clínicos de cães com otite. Os autores determinaram que a concentração de 2,6 mg/mL foi capaz de

inibir 50% das estirpes *in vitro* e a MFC_{90} (concentração fungicida mínima para 90% dos isolados testados) encontrada foi de 5.3 mg/mL, resultados concordantes com os ensaios realizados para os extratos etanólico e supercrítico da própolis vermelha, pelo presente estudo. Os autores discutem que os valores altos de Concentração Bactericida Mínima (CBM) encontrados para os 34 isolados de *Staphylococcus* colagulase-positivo testados (21 mg/mL) confirmam a enorme variação do perfil de sensibilidade da espécie. Ensaios anteriores relatam valores inibitórios em *S. aureus* variando entre 117 µg/mL e 185 mg/mL, o que revela a grande variedade do composto apícola, a depender da sua origem botânica, geográfica, e da metodologia de extração (LONGHINI *et al*, 2007, CARDOSO *et al*, 2010). A ação fungistática e fungicida do extrato alcoólico de própolis contra *M. pachydermatis* foram demonstradas também por Lilenbaum & Barbosa (1994) usando o método de microdiluição em caldo. Os autores encontraram valores de CIM inferiores quando comparados aos estudos de Cardoso *et al* (2010) e aos resultados encontrados nesta pesquisa, com atividade ao longo de um intervalo de 0,8 - 2,4 mg/mL. Ambos os trabalhos não citam a cor, nem a composição do perfil químico das própolis utilizadas nos testes, o que impede uma melhor análise e correlação desses resultados.

O potencial inibitório de extratos de própolis tem sido mais estudado para as espécies de *Candida*, principalmente a *C. albicans*, com resultados de CIM inferiores aos encontrados no presente trabalho, provavelmente por ser uma levedura de outra espécie, e normalmente mais sensível aos antifúngicos. Haghdoost *et al*, (2016) avaliaram a atividade antifúngica de extrato etanólico de própolis oriundo do Irã frente a 38 isolados clínicos e um ATCC de *C. albicans* resistentes ao fluconazol e sua capacidade de inibir a formação do tubo germinativo. Os autores encontraram valores de concentração inibitória mínima (CIM) média de 360 µg/mL, variando entre 120,2 e 970,6 µg/mL e de concentração fungicida mínima (CFM) média de 1250 µg/mL, variando entre 480,8 e 3900,4 µg/mL. Freires *et al*, (2016) também avaliaram o perfil de sensibilidade de espécimes de referência do gênero *Candida* (C. *albicans, C. dubliniensis, C. glabrata, C. krusei, C. Tropicalis* e *C. parapsilosis*), frente aos extratos etanólicos e suas frações diclorometanas, acetanólicas e hexânicas das própolis brasileiras tipo 3, do Sudeste, e do tipo 13, de Alagoas e valores igualmente baixos de CIM foram encontrados, variando entre 1 e 31,25 µg/mL. O extrato etanólico da

própolis vermelha de Alagoas também foi efetiva contra *C. albicans* destacando-se a ação inibitória da fração acetanólica, com valores de CIM menores ou iguais a 50 µg/mL (JUNIOR *et al*, 2012).

Dota *et al* (2010) também comprovaram a ação fungicida do composto apícola ao investigarem o potencial antifúngico de extrato etanólico e de micropartículas de própolis produzidas pela técnica de spray-dry, originário do estado do Paraná, em 89 isolados clínicos de *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*. Mesmo os isolados que apresentaram resistência aos antifúngicos itraconazol, cetoconazol, miconazol e anfotericina B, e relação de dose-dependência para todos os azólicos, foram inibidos para ambos os testes com a própolis, com baixa variação de atividade entre os isolados, em concordância com o presente estudo, onde todos os extratos dos três tipos de própolis testados foram capazes de inibir o crescimento dos isolados de *M. pachydermatis*, com padrão de resposta de dose-dependência e resistentes aos antifúngicos.

A atividade fungicida e fungistática das própolis verde e vermelha brasileiras também já foram relatadas, para outras espécies de fungos, com valores menores de CIM e CFM encontrados, em comparação com os resultados determinados para os isolados aqui descritos. O extrato etanólico do tipo 13 mostrou atividade antifúngica contra leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (LOTTI *et al*, 2011) e contra fungos filamentosos do gênero *Trichophyton* (SIQUEIRA *et al*, 2009). O extrato etanólico da própolis verde (MG) apresentou atividade fugistática e fungicida em *T. rubrum*, *T. tonsurans* e *T. menthagrophytes* (CIM entre 64 e 1024 µg/mL e CFM entre 512 e 1024 µg/mL). Assim como relatado no presente estudo, a sensibilidade ao extrato alcooólico da própolis vermelha (PB), também foi superior à verde, em estudo descrito por Siqueira *et al* (2009). Estudos anteriores (KOC *et al*, 2005; SOARES & CURY, 2001) também encontraram atividade inibitória das própolis verde (oriundas do São Paulo e Paraná) e vermelha (oriunda da Turquia) frente às mesmas espécies de *Trichophyton*.

Em contraste com os resultados obtidos pelos testes com os extratos de própolis procedidos com a técnica de difusão em ágar no presente estudo, Netíková *et al* (2013), observou formação de halo de inibição em teste de disco-difusão com extratos de própolis, oriundas da República Tcheca, obtidos com DMSO como solvente extrator,

frente a fungos filamentosos das espécies *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum gypseum* e *Microsporum canis*, e levedura da espécie *C. al*bicans. Isso pode indicar que o Tween 80, solvente utilizado nesta técnica, impede ou dificulta a difusão dos compostos de interesse na malha do ágar.

Os compostos fenólicos da própolis são identificados como responsáveis pelas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e especialmente pela ação antifúngica (DOTA *et al*, 2010). No estudo aqui relatado, foi também observada correlação entre o conteúdo total de compostos fenólicos e a atividade antifúngica encontrada para cada tipo de extrato de própolis brasileira. O extrato etanólico da própolis marrom, que apresentou conteúdo total de compostos fenólicos e flavonoides inferior, também apresentou atividade inibitória menos pronunciada, quando comparado com os extratos das própolis vermelha e verde.

Freires *et al* (2016) atribui as propriedades antifúngicas das própolis brasileiras dos tipos 3 e 13 à presença majoritária de flavonoides. As própolis verde e vermelha analisadas neste presente estudo também apresentaram presença importante de flavonoides, contudo, o conteúdo de compostos fenólicos totais da própolis verde foi superior, o que pode explicar os menores resultados de CIM encontrados e o melhor efeito fungicida (CFM/CIM).

Os flavonoides, principalmente a pinocembrina, têm sido considerados responsáveis pelas propriedades inibitórias frente ao gênero *Candida* (CAPISTRANO *et al*, 2013; SAWAYA *et al*, 2002) e *Trichophyton* (SIQUEIRA *et al*, 2009). Das Neves *et al* (2015) identificaram a formononetina e a pinocembrina como componentes mais abundantes da própolis vermelha de Pernambuco e seus resultados sugerem que a formononetina é pelo menos parcialmente responsável pela atividade antimicrobiana da própolis vermelha brasileira, podendo também ser o composto responsável pela atividade antifúngica encontrada para o tipo vermelho de própolis no estudo aqui descrito. O menor valor de concentração capaz de inibir 50% do crescimento foi encontrado para a própolis vermelha supercrítica, o que pode indicar que os compostos de interesse presentes neste extrato tenham menor relação de dose-dependência.

Foram identificados 11 compostos fenólicos no extrato etanólico e sua fração diclorometana da própolis tipo 3: ácido p-cumárico, ácido felúrico, ácido caféico, éster fenetil do ácido caféico (CAPE), kaempferol, quercetina e alguns derivados flavonoides

(FREIRES *et al*, 2016). A análise do extrato etanólico e sua fração hexânica da própolis do tipo 13 revelou a formononetina e a medicarpina como biomarcadores químicos (FREIRES *et al*, 2016), corroborando com estudos anteriores (BANKOVA 2005; LÓPEZ *et al*, 2014). A quercetina e a medicarpina são os principais compostos eleitos como responsáveis pela alta atividade antifúngica observada das própolis tipo 3 e 13 (FREIRES *et al*, 2016). É possível que estes compostos de interesse estejam também presentes nos extratos de própolis vermelha estudados no trabalho aqui exposto.

Pippi *et al* (2015) sugere que o mecanismo de ação da própolis tipo 13 contra leveduras está relacionado com a ruptura da parede celular e não com a estrutura de ergosterol e alteração da permeabilidade da membrana plasmática, fato que pode explicar porque isolados com perfil de resistência variável aos azóis e ao derivado poliênico foram igualmente sensíveis aos extratos de própolis no presente estudo.

CONCLUSÕES

Os isolados de *M. pachydermatis* apresentaram perfis fenotípicos de atividade enzimática similares, com alta atividade enzimática extracelular observada.

Os valores de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima encontrados para os isolados de *M. pachydermatis* frente aos antifúngicos foram altos com base na literatura consultada, com alta taxa de isolados resistentes a todos os antifúngicos testados, e isolados apresentando resistência múltipla.

A técnica adaptada da difusão em ágar não foi eficaz na determinação da sensibilidade aos antifúngicos nem aos extratos de própolis.

As respostas ao antifúngicos, com exceção à anfotericina B, apresentaram grande variação entre os isolados.

O cetoconazol foi o antifúngico que apresentou melhor atividade fungicida.

Todos os extratos de própolis apresentaram atividade antifúngica frente aos isolados testados de *M. pachydermatis*, inclusive os que apresentaram resistência aos antifúngicos testados.

O extrato etanólico da própolis marrom apresentou os valores mais altos de concentração inibitória para a maioria das leveduras e não apresentou letalidade nas concentrações testadas.

O extrato etanólico da própolis vermelha tem a maior proporção de isolados com o menor valor de CIM verificado para os extratos, seguido pelo extrato supercrítico da própolis vermelha e pelo extrato etanólico verde.

O extrato etanólico da própolis vermelha apresentou maior proporção de isolados sensíveis à CFM de 8 mg/mL, seguido do extrato supercrítico de própolis vermelha.

O extrato etanólico da própolis verde possui melhor efeito fungicida, sendo o único capaz de eliminar completamente a levedura na concentração de 4 mg/mL, seguido dos extratos etanólico e supercrítico da própolis vermelha.

A anfotericina B foi o único antifúngico que se ajustou ao modelo de regressão não-linaer de dose-resposta.

Apenas o extrato etanólico de própolis marrom não se adequou ao modelo proposto, apresentando grande variedade de distribuição dos dados.

O valor de concentração estimado que inibe 50% do crescimento dos isolados testados foi menor para o extrato supercrítico da própolis vermelha, seguido dos extratos etanólicos da propolis vermelha e verde.

REFERÊNCIAS

AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis, **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,** vol. 58, n. 5, p. 945-6, 1994.

AIZAWA, T.; KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats. **Medical Mycology,** vol. 39, n. 4, p. 329-34, 2001.

AL-SWEIH, N.; AHMAD, S.; JOSEPH, L.; KHAN, S.; KHAN, Z. *Malassezia pachydermatis* fungemia in a preterm neonate resistant to fluconazole and flucytosine. **Medical Mycology, Case Reports,** vol. 5, p. 9-11, 2014.

ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; BLANCO, J. L.; PELÁEZ, T.; CUTULI, M.; GARCÍA, M. *In Vitro* Amphotericin B Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* Determined by the CLSI Broth Microdilution Method and Etest Using Lipid-Enriched Media. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 58, n. 7, p. 4203-6, 2014.

AMINIMOGHADAMFAROUJ, N.; NEMATOLLAHI, A. Propolis Diterpenes as a Remarkable Bio-Source for Drug Discovery Development: A Review. **International Journal of Molecular Sciences,** vol. 18, n. 6, p. 1290, 2017.

ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; DE OLIVEIRA, C. S.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International,** vol. 101, p. 129-38, 2017.

BANKOVA V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 100, n. 1-2, p. 114-7. 2005.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L. D.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie,** vol. 31, n. 1-2, p. 3-15, 2000.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia,** vol. 70, p. 190-3, 1999.

BANKOVA, V; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central Journal**, vol. 8, n. 28, 2014.

BAPTISTA, T. C. C.; REIS, C. R.; TEIXEIRA, D. R.; MOURA, M. Diagnóstico de *Malassezia* spp. em ouvidos de cães e sua correlação clínica. **Revista Electrónica Novo Enfoque**, vol. 9, n. 9, p. 48-55, 2010.

BATISTA, L. L. V.; CAMPESATTO, E. A.; ASSIS, M. L. B.; BARBOSA, A. P. F.; GRILLO, L. P. M.; DORNELAS, C. B. Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes,** vol. 39, n. 6, p. 515-20, 2012.

BELLMANN, R. & SMUSZKIEWICZ, P. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. **Infection**, vol. 45, n. 6, p. 737-79, 2017.

BISCAIA, D. **Comparação entre tecnologia supercrítica e técnicas convencionais de extração para obtenção de extratos de própolis avaliados através de suas atividades biológicas. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos.** Centro Tecnológico Programa de Pós-graduação Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

BOGDANOV, S. Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review. **Bee Product Science**, disponível em: www.bee-hexagon.net **,** 2012.

BOND, R. Superficial veterinary mycoses. **Clinics in Dermatology,** vol. 28, n. 2, p. 226-36, 2010.

BOYANOVA, L.; GERGOVA, G.; NIKOLOV, R.; D EREJIAN, S.; LAZAROVA, E.; KATSAROV, N.; MITOV, I.; KRASTEV, Z. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains *in vitro* by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. **Journal of Medical Microbiology,** vol. 54, n. 5, p. 481-3, 2005.

BRITO, E. H. S.; FONTENELE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; et al.: Phenotypic characterization and *in vitro* antifungal sensitivity of *Candida spp.* and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. **The Veterinary Journal,** vol. 174, n. 1, p.147-53, 2007.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. **The Veterinary Journal**, vol. 182, n. 2, p. 320-6, 2009.

BUOMMINO, E.; NOCERA, F. P.; PARISI, A.; RIZZO, A.; DONNARUMMA, G.; MALLARDO, K.; FIORITO, F.; BARONI, A.; DE MARTINO, L. Correlation between genetic variability and virulence factors in clinical strains of *Malassezia pachydermatis* of animal origin. **New Microbiologica**, vol. 39, n. 3, p. 216-23, 2016.

CABAÑES, F.J. *Malassezia* yeasts: how many species infect humans and animals? **PLOS Pathogens**, vol. 10, n. 2, 2014.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; ALENCAR, S. M. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,** vol. 48, n. 3, p. 557-64, 2012.

CAFARCHIA, C. & OTRANTO, D. Association between Phospholipase Production by *Malassezia pachydermatis* and Skin Lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 42, n. 10, p. 4868-9, 2004.

CAFARCHIA, C.; FIGUEREDO, L. A.; FAVUZZI, V.; SURICO, M. R.; COLAO, V.; IATTA, R.; MONTAGNA, M. T.; OTRANTO, D. Assessment of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* in various media using a CLSI protocol. **Veterinary Microbiology,** vol. 159, n. 3-4, p. 536-40, 2012.

CAFARCHIA, C.; FIGUEREDO, L. A.; IATTA, R.; COLAO, V.; MONTAGNA, M.T.; OTRANTO, D. *In vitro* evaluation of *Malassezia pachydermatis* susceptibility to azole compounds using E-test and CLSI microdilution methods. **Medical Mycology**, vol. 50, n. 8, p. 795–801, 2012-a.

CAFARCHIA, C.; FIGUEREDO, L. A.; IATTA, R.; MONTAGNA, M. T.; OTRANTO, D. *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* from dogs with and without skin lesions. **Veterinary Microbiology**, vol. 155, n. 2-4, p. 395-8, 2012-b.

CAFARCHIA, C.; GALLO, S.; CAPELLI, G.; OTRANTO, D. Occurrence and population size of *Malassezia* spp. In the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. **Mycopathologia**, vol. 160, n. 2, p. 143-9, 2005.

CAFARCHIA, C.; GASSER, R. B.; LATROFA, M. S; PARISI, A.; CAMPBELL, B.E. et al. Genetic variants of *Malassezia pachydermatis* from canine skin: body distribution and phospholipase activity. **FEMS Yeast Research**, vol. 8, n. 3, p. 451-9, 2008.

CAFARCHIA, C.; IATTA, R.; IMMEDIATO, D.; PUTTILLI, M. R.; OTRANTO, D. Azole susceptibility of *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* and tentative epidemiological cut-off values. **Medical Mycology**, vol. 57, n. 7, p. 1-6, 2015.

CAPISTRANO H. M.; DE ASSIS E. M.; LEAL R. M.; ALVAREZ-LEITE M. E.; BRENER S.; BASTOS E. M. A. F. Brazilian Green Propolis Compared to Miconazole Gel in the Treatment of *Candida*-Associated Denture Stomatitis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2013, ID. 947980, p. 6, 2013.

CARDOSO J. G.; IORIO N. L. P.; RODRIGUES L. F.; COURI M. L. B.; FARAH A.; MAIA L. C.; ANTONIO A. G. Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and *Streptococcus mutans* count in dental biofilm. **Archives of Oral Biology**, vol. 65, p. 77-81, 2016.

CARDOSO, R. L. **Atividade Antimicrobiana do Extrato de Própolis Frente a Isolados de *Staphylococcus* Coagulase Positiva e *Malassezia pachydermatis* de Otite Canina.** Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2009.

CARDOSO, R. L; MABONI, F.; MACHADO, G.; ALVES, S. H.; VARGAS, A. C. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. **Veterinary Microbiology,** vol. 142, n. 3-4, p. 432-4, 2010.

CARRILLO-MUNÕZ, A. J.; ROJAS, F.; TUR-TUR, C.; SOSA, M. L. A.; DIEZ, G. O.; ESPADA, C. M.; PAYÁ, M. J.; GIUSIANO, G. *In vitro* antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against *Malassezia* species. **Mycoses Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases**, vol. 56, n. 5, p. 571-5, 2013.

CASTRO, M. L.; VILELA, W. R.; ZAULI, R. C.; IKEGAKI, M.; REHDER, V. L. G.; FOGLIO, M. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. **BMC Complementary and Alternative Medicine,** vol. 9, n. 25, 2009.

CATALÁN, M. & MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Rev Iberoam Micol**, vol. 23, p. 39-49, 2006.

Clinical Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standards, **M27-A2. CLSI**, Wayne, PA, USA, 2002.

COELHO, L. G. V.; BASTOS, E. M. A. F.; RESENDE, C. C.; PAULA E SILVA, C. M.; SANCHES, B. S. F.; DE CASTRO, F. J.; MORETZSOHN, L. D.; VIEIRA, W. L. S.; TRINDADE, O. R. Brazilian Green Propolis on *Helicobacter pylori* Infection. A Pilot Clinical Study. **Helicobacter**, vol. 12, n. 5, p. 572-4, 2007.

CORNARA, L.; BIAGI, M.; XIAO, J.; BURLANDO, B. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 8, art. 412, 2017.

COSGROVE, S. E.; QI, Y.; KAYE, K. S.; HARBARTH, S.; KARCHMER, A. W.; CARMELI, Y. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. **Infection Control & Hospital Epidemiology,** vol. 26, n. 2, p. 166-74. 2005.

COSTA, A. S.; MACHADO, B. A. S.; UMSZA-GUEZ, M. A.; CIRQUEIRA, M. G.; NUNES, S. B.; PADILHA, F. F. Levantamento dos estudos com a própolis produzida no estado da Bahia. **Sitientibus série Ciências Biológicas,** vol. 13, n. 10, 2013.

COUTINHO, S. D. A. *Malassezia pachydermatis*: enzymes production in isolates from external ear canal of dogs with and without otitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 57, n. 2, p. 149-53, 2005.

CRESPO, M. J.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 38, n. 10, p. 3872-5, 2000.

CRESPO, M. J.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. **Medical Mycology**, vol. 40, n. 2, p. 115-21, 2002.

DAS NEVES, M. V. M.; DA SILVA, T. M. S.; LIMA, E. O.; DA CUNHA, E. V. L.; OLIVEIRA, E. J. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Brazilian Journal of Microbology**, n. 47, n. 1, p. 159-66, 2015.

DOTA K. F. D.; CONSOLARO M. E. L.; SVIDZINSKI T. I. E.; BRUSCHI M. L. Antifungal Activity of Brazilian Propolis Microparticles against Yeasts Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** vol. 2011, ID. 201953, p. 8, 2010.

EICHENBERG, M. L.; APPELT, C. E.; BERG, V.; MUSCHNER, A. C.; NOBRE, M. O.; MATTA, D.; ALVES, S. H.; Ferreiro, L. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by a new broth microdilution method. **Acta Scientiae Veterinariae**, vol. 31, n. 2, p. 75- 80, 2003.

FARNESI, A. P.; AQUINO-FERREIRA, R.; DE JONG, D.; BASTOS, J. K.; SOARES, A. E. E. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. **Genetics and Molecular Research,** vol. 8, n. 2, p. 635-40, 2009.

FASOLO, D.; PIPPI, B.; FUENTEFRIA, A. M.; VON POSER, G. L.; TEIXEIRA H. F. Investigation of antifungal potential of native Brazilian, red and green propolis - a comparative study. **Mercosur Meeting on Pharmaceutical Sciences.** Porto Alegre, RS. Novembro, 2013.

FERREIRA, J. M.; SILVA, C. C. F.; SALATINO, A.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. New propolis type fromnorth-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Society of Chemical Industry and Food Agriculture**, vol. 97, n. 11, p. 3552-8, 2017.

FIANCO, A. L. B. **Estudo sobre a atividade antifúngica e antioxidante de extratos de própolis obtidos com CO_2 supercrítico.** Dissertação de mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2014.

FIGUEREDO, L. A.; CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm. **Medical Mycology**, vol. 51, n. 8, p. 863-7, 2013.

FILIPPIN, F. B. & L. C. SOUZA. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** vol. 42, n. 2, p. 167-94, 2006.

FOY, D. S. & TREPANIER, L. A. Antifungal Treatment of Small Animal Veterinary Patients. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, vol. 40, n. 6, p. 1171-88, 2010.

FRANCHIN, M.; COLÓN, D. F.; DA CNHA, T. M.; CASTANHEIRA, F. V. S.; SARAIVA, A. L. L.; SILVA, B. B.; ALENCAR, S. M.; CUNHA, T. M.; ROSALEN, P. L. Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. **Scientific Reports**, vol. 6, n. 3640, 2016.

FREIRES, I. A.; QUEIROZ, V. C. P. P.; FURLETTI, V. F.; IKEGAKI, M.; DE ALENCAR, S. M.; DUARTE, M. C. T.; ROSALEN, P. L. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. **Journal de Mycologie Médicale,** vol. 26, n. 2, p. 122-32, 2016.

FUNARI, C. S. & FERRO, V. O. Análise de Própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, vol. 26, n. 1, p. 171-8, 2006.

GIRÃO, M. D.; PRADO, R. S N.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viability of *Malassezia pachydermatis* strains maintained in various storage mediums. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** vol. 37, n. 3. p. 229-33, 2004.

GIRÃO, M. D.; PRADO, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: a comparative analysis. **The Veterinary Journal**, vol. 172, n. 3, p. 544-8, 2006.

GUILLOT, J. & BOND, R. *Malassezia pachydermatis:* a review. **Medical Mycology**, vol. 37, n. 5, p. 295-306, 1999.

GUZMÁN, J. F. P. **Avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas das própolis produzidas no Peru**. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, Campinas, 2005.

HAGHDOOST, N. S.; SALEHI, T. Z.; KHOSRAVI, A.; SHARIFZADEH, A. Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of *Candida albicans*. **Journal de Mycologie Médicale,** vol. 26, n. 4, p. 298-305. 2016.

HEDRICK, J. L.; MULCAHEY, L. J.; TAYLOR, L. T. Fundamental Review: Supercritical Fluid Extraction. **Mikrochimica Acta,** vol**.** 108, p. 115-32, 1992.

HERNÁNDEZ, M. I.; CUESTA-RUBIO, O.; FERNÁNZES M. C.; PÉREZ A. R.; PORTO R. M. O.; PICCINELLI A. L.; RASTRELLI, L. Studies on the Constituents of Yellow Cuban Propolis: GC-MS Determination of Triterpenoids and Flavonoids. **Journal Agricultural and Food Chemistry,** vol. 58, n. 8, p. 4725-30, 2010.

HUANG, S.; CUI-PING, Z.; WANG, K.; LI, G. Q.; FU-LIANG, H. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, vol. 19, n. 12, p. 19610-32, 2014.

ITO, J.; CHANG, F. R.; WANG, H. K.; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; KILGORE, N.; LEE, K. H. Anti-aids Agents. Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Mellifore-related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis. **Journal of Natural Products**, vol. 64, n. 10, p. 1278-81, 2001.

JESUS, F. P. K.; LAUTERT, C.; ZANETTE, R. A.; MAHL, D. L.; AZEVEDO, M. I.; MACHADO, M. L. S.; *et al. In vitro* susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. **Veterinary Microbiology**, vol. 152, n. 1-2, p. 161-64, 2011.

JUNIOR, W.B.; MIRANDA, E.O.; ALVINO, V.; ARAUJO, B.; SILVA, D.W.; PORFIRIO, Z. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina**, vol. 33, n. 1, p. 3-10, 2012.

JUNTACHAI, W.; OURA, T.; MURAYAMA, S.; KAJIWARA, S. The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species. **Medical Mycology**, n. 47, n. 5, p. 477-84, 2009.

KAMALJYOTI; SHARMA, A. K.; FILIA, G.; SHARMA, S. Studies on *Malassezia* Infection in Otitis External of Dogs. **Journal of Animal Research**, vol. 7, n. 1, p. 197-200, 2017.

KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; NIKAEIN, D.; MANSOURI, P.; ERFANMANESH, A.; CHALANGARI, R.; KATALIN, M. Yeasts as Important Agents of Onychomycosis: *In Vitro* Activity of Propolis Against Yeasts Isolated from Patients with Nail Infection. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, vol. 19, n. 1, p. 57-62, 2013.

KOC, A. N.; SILICI, S.; AYANGIL, D.; FERAHBAS, A.; CÁNKAYA, S. Comparison of *in vitro* activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. **Mycoses**, vol. 48, n. 3, p. 205–10, 2005.

KUBILIENE, L.; LAUGALIENE, V.; PAVILONIS, A.; MARUSKA, A.; MAJIENE, D.; BARCAUSKAITE, K.; KUBILIUS, R.; KASPARAVICIENE, G.; SAVICKAS, A. Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine,** vol. 15, n.156, 2015.

KUMAR, A.; SINGH, K.; SHARMA, A. Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and other Organisms in Healthy and Infected Dogs Ears. **Israel Journal of Veterinary Medicine,** vol. 57, n. 4, p. 145-8, 2002.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; TAKAHASHI DE MELO, N. **Tratado de Micologia Médica**; 9ª ed. São Paulo, Sarvier, 2002.

LACERDA, R. C. C.; TIVERON, A. P.; ALENCAR, S. V. Própolis e Segurança Alimentar. **Segurança Alimentar e Nutricional**, vol. 18, n. 2, p. 99-106, 2011.

LEITE, C. A. L; ABREU, V. L. V.; COSTA, G. M. Frequência de *Malassezia pachydermatis* em otite externa de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 55, n. 01, p. 1-4, 2003.

LILENBAUM, W. & BARBOSA, A.V.; Avaliação da atividade antimicrobiana da própolis perante *Malassezia pachydermatis in vitro*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária,** vol. 16, p. 248-51, 1994.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 17, n. 3, p. 388-95, 2007.

LÓPEZ, B. G. C.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, vol. 146, p. 174-80, 2014.

LOTTI, C.; DE CASTRO, G. M. M.; DE SÁ, L. F. R.; DA SILVA, B. A. F. S.; TESSIS, A. C.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L.; FERREIRA-PEREIRA, A. Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Pdr5p by a natural compound extracted from Brazilian Red Propolis. **Brazilian Journal of Pharmacognsosy**, vol. 21, n. 5, p. 901-7, 2011.

LOZINA, L. A.; PEICHOTO, M. E.; BOEHRINGER, S. I.; KOSCINCZUK, P.; GRANERO, G. E; ACOSTA, O. C. Efficacy of Argentine propolis formulation for topical treatment of canine otitis externa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** vol. 62, n. 6, p. 1359-66, 2010.

LUMBRERAS, C.; LIZASOAIN, M.; AGUADO, J. M. Antifúngicos de uso sistémico. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica,** vol. 21, n. 7, p. 366-80, 2003.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 18, n. 3, p. 447-54, 2008.

LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with Otitis Externa. **Journal of Veterinary Medicine,** vol. 54, n. 10, p. 559-63, 2007.

MACHADO B. A. S.; SILVA, R. P. D.; BARRETO, G. A.; COSTA, S. S.; SILVA, D. F.; BRANDÃO, H. N.; *et al*. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **PLOS ONE**, vol. 11, n. 1, 2016.

MACHADO B.A.S.; BARRETO, G.A.; COSTA, A.S.; COSTA, S.S.; SILVA, R.P.D.; SILVA, D.F.; *et al*. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **PLOS ONE**, vol. 10, n. 8, 2015.

MACHADO, B. A. S.; CRUZ, L. S. C.; NUNES, S. B.; UMZA-GUEZ, M. A.; PADILHA, F. F. Estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes depositados no Brasil. **Revista GEINTEC**, Vol. 2, n. 3, p. 221-35, 2012.

MACHADO, C. S.; MOKOCHINSKI, J. B.; LIRA, T. O.; DE OLIVEIRA, F. C. E.; CARDOSO, M. V.; FERREIRA, R. G.: SAWAYA, A. C. H. F.; FERREIRA, A. G.; PESSOA, C.; RUBIO, O. C.; MONTEIRO, M. C.; CAMPOS, M. S.; TORRES, Y. R. Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. **Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2016, p. 11, 2016.

MACHADO, M. L. S. ***Malassezia* spp. na pele de cães: frequência, densidade populacional, sinais clínicos, identificação molecular e atividade fosfolipásica.** Tese (Doutorado em Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MARÍN, J. C. G. **Evaluación de la Susceptibilidad *in vitro* de Aislamientos de *Malassezia* spp. de Origen Humano y Canino Frente a Antifúngicos de Uso Clínico**. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia, 2014.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia,** vol. 32, n.5, p. 449-60, 2006.

MATOUSEK, J.L. & CAMPBELL, K.L. *Malassezia* dermatitis. **Compendium**. vol. 24, n. 3, p. 224-32, 2002.

MEDLEAU, L.; HNILICA, K. A. **Dermatologia de Pequenos Animais – Atlas Colorido e Guia Terapêutico.** São Paulo: Editora Roca, 2003. 353p.

MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos e suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto de Biologia**, vol. 72, n. 3, p. 405-11, 2005.

MOURA, F. F. **Determinação das Propriedades Físicoquímicas e Biológicas da Própolis Produzida por *Apis melífera* na Região Nordeste do Brasil.** Dissertação de mestrado em Ciências de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – São Paulo, 2000.

MUHSIN, T. M.; AUBAID, A. H.; AL-DUBOOM, A. H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses,** vol. 40, n. 11-12, p. 465-9, 1997.

NASCENTE, P. S.; COIMBRA, H. S.; MEINERZ, A. R. M.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B.; SCHUCH, L. F. D. Molecular heterogeneity of *Malassezia pachydermatis* through RAPDPCR. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, vol. 32, n. 2, p. 169-73, 2010.

NETÍKOVÁ, L.; BOGUSCH, P.; HENEBERG, P. Czech Ethanol-Free Propolis Extract Displays Inhibitory Activity against a Broad Spectrum of Bacterial and Fungal Pathoges. **Journal of Food Science**, vol. 78, n. 9, p. 1421-9, 2013.

NETO, M. S. R.; TINTINO, S. R.; DA SILVA, A. R. P.; COSTA, M. S.; BOLIGON, A. A.; MATIAS, E. F. F.; BALBINO, V. Q.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H.D.M. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology,** vol. 107, p. 572-80, 2017.

NETT, J. E. & ANDES, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infectious Disease Clinics of North America,** vol. 30, n. 1, p. 51, 2015.

NIJIMA, M.; KANO, R.; NAGATA, M.; HASEGAWA, A.; KAMATA, H. An azole-resistant isolate of *Malassezia pachydermatis*. **Veterinary Microbiology**, vol. 149, n. 1-2, p. 288-90, 2011.

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. Drogas Antifúngicas para Pequenos e Grandes Animais. **Ciência Rural** [online], vol. 32, n. 1, p. 175-84, 2002.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*.** Dissertação de Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2007.

OLIVEIRA, L. C.; BRILHANTE, A. M. S.; CUNHA, C. B.; CARVALHO, M. Perfil de isolamento microbiano em cães com otite média e externa associadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 58, n. 6, p. 1009-17, 2006.

OLIVEIRA, L. C.; LEITE, C. A. L.; BRILHANTE, R. S. N.; CARVALHO, C. B. M. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. **Canadian Veterinary Journal**, vol. 49, n. 8, p. 785-8, 2008.

ORTIZ, G.; MARTÍN, M. C.; CARRILLO-MUNÕZ, A. J.; PAYÁ, J. Producción de fosfolipasa y proteinasa en cepas de *Malassezia pachydermatis* aisladas de perros con otitis y sin otitis. **Revista Iberoamericana de Micología**, vol. 30, n. 4, p. 235-8, 2013.

OUTERBRIDGE, C. A. Mycologic disorders of the skin. **Clinical Techniques in Small Animal Practice,** vol. 21, p. 128-34, 2006.

PARENTE-ROCHA, J. A.; BAILAO, A. M.; AMARAL, A. C.; TABORDA, C. P.; PACCEZ, J. D; BORGES, C. L.; PEREIRA, M. Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. **Mediators Inflammation,** vol. 2017, ID. 9870679, 2017.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, vol. 50, n. 9, p. 2502-6, 2002.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; DE ALENCAR, S.M. Classificação das própolis Brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, São Paulo, vol. 58, n. 9, p. 2-7, 2000.

PARK, Y. K.; PAREDEZ-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, n. 5, p. 1100-3, 2004.

PASUPULETI, V. R.; SAMMUGAM, L.; RAMESH, N.; GAN, S. H. Honey, propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Bilogical Actions and Health Benefits. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2017, ID. 1259510, p. 21, 2017.

PEREIRA, A. D. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. D. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, vol. 25, n.2, p. 321-6, 2002.

PEREIRA, D. S.; FREITAS, C. I. A.; FREITAS, M. O.; MARACAJÁ, P. B.; SILVA, J. B. A.; SILVA, R. A.; SILVEIRA, D. C. **Revista Agropecuária Científica no Semiárido**, vol. 11, n. 2, p. 1-21, 2015.

PIMENTA, H. C.; VIOLANTE, I. M. P.; MUSIS, C. R.; BORGES, A. H.; ARANHA, A. M. F. *In vitro* effectiveness of Brazilian brown propolis against *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Oral Research,** vol. 29, n. 1, p. 1-6, 2015.

PINI, G. & FAGGI, E. Extracellular phospholipase activity of *Malassezia* strains isolated from individuals with and without dermatological disease. **Revista Iberoamericana de Micología,** vol. 28, n. 4, p. 179-82, 2011.

PIPPI, B.; LANA, A. J. D.; MORAES, R. C.; GÜEZ, C. M.; MACHADO, M.; OLIVEIRA, L. F. S.; VON POSER G. L.; FUENTEFRIA A. M. *In vitro* evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 118, n. 4, p. 839-50, 2015.

POSSAMAI, M. M.; HONORIO-FRANÇA, A. C.; REINAQUE, A. P. B.; FRANÇA, E. L.; SOUTO, P. C. S. Brazilian Propolis: A Natural Product That Improved the Fungicidal Activity by Blood Phagocytes. **BioMed Research International, vol. 2013,** ID. 541018, p. 9, 2012.

PRADO, M.R. **Isolamento de *Microsporum canis, Malassezia* spp. e *Candida tropicalis* em cães: um destaque para teste de sensibilidade de *Malassezia pachydermatis in vitro.*** Dissertação de doutorado, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, vol. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J. C.; LEONARD, F. C.; MAGUIRE, D. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, p. 219-38, 2005.

RAMOS, A. F. N. & MIRANDA, J. L. Propolis: A review of its anti-inlamatory and healing actions. **Journal Venomous Animals Toxins including Tropical Diseases**, vol. 13, n. 4, p. 697-710, 2007.

RIBEIRO DO PRADO, M.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Malassezia* spp. em humanos e pequenos animais: uma abordagem teórica **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, vol. 102, n. 563-4, p. 207-14, 2007.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J.C.; GERHARD, D. Dose-Response Analysis Using R. **PLoS ONE**, vol. 10, n. 12, 2015.

ROEMER, T. & KRYSAN, D.J. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine,** vol. 4, n. 5, 2014.

ROSYCHUK, R.A.W. & LUTTGEN, P. Doenças dos Ouvidos. In.: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 5ª ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, vol. 2, p. 1042, 2004.

SANTOS JR, N. D.; SOUZA, I. A. M.; BORGES, R. G.; SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, vol. 15, n. 3, p. 189-97, 2005.

SAWAYA A. C.; PALMA A. M.; CAETANO F. M.; MARCUCCI M. C.; DA SILVA CUNHA I. B.; ARAUJO C. E. P.; SHIMIZU M. T. Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida.* **Letters in Applied Microbiology**, vol. 35, n. 3, p. 203-7, 2002.

SCORZONI L.; DE PAULA E SILVA A. C.; MARCOS C. M., *et al.* Antifungal therapy: New advances in the understanding and treatment of mycosis. **Frontiers in Microbiology,** vol. 8, p. 36, 2017.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. Doenças Fúngicas da Pele. **Dermatologia de pequenos animais,** ed. Rio de Janeiro: Interlivros, vol. 5, p. 321-5, 1996.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Fungal skin diseases**. In*: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology.* 6th edn. Philadelphia: W.B. Saunders Co., p. 336-61, 2001.

SEBRAE. O mercado da propolis. **Boletim Agronegócio**. 2014.

SIDRIM, J.J. C. & ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SILVA, R. P. D.; MACHADO, B. A. S.; BARRETO, G. A.; COSTA, S. S.; ANDRADE, L. N.; AMARAL, R. G.; CARVALHO, A. A.; PADILHA, F. F.; BARBOSA, J. D. V.; UMSZA-GUEZ, M. A. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS ONE**, vol. 12, n. 3, 2017.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** vol. 2015, ID. 206439, p. 29, 2015.

SIQUEIRA, A. B. S. **Perfil Enzimático de Dermatófios e Avaliação da Atividade Antifúnfica de Própolis e Lectinas.** Tese. Doutorado em Ciências Biológica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

SIQUEIRA, A. B. S.; GOMES, B. S.; CAMBUIM, I.; MAIA, R.; ABREU, S.; SOUZA-MOTTA, C. M.; DE QUEIROZ, L. A.; PORTO, A. L. F. *Trichophyton* species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 48, n. 1, p. 90-6, 2009.

SOARES, M. M. S. R. & CURY, A. E. *In vitro* activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with *tinea pedis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 32, n. 2, p. 130-4, 2001.

TAVARES W. Drogas Antifúngicas. In. Tavares W, editor. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico.** São Paulo: Atheneu; 3ª ed., p. 551-90, 2014.

TAZAWA, S.; ARAI, Y.; HOTTA, S.; MITSUI, T.; NOZAKI, H.; ICHIHARA, K. Discovery of a Novel Diterpene in Brown Propolis from the State of Parana, Brazil. **Natural Product Communications,** vol. 11, n. 2, p. 201-5, 2016.

TERAMOTO, H.; KUMEDA, Y.; YOKOIGAWA, K.; HOSOMI, K.; KOZAKI, S.; MUKAMOTO, M.; KOHDA, T. Genotyping and characterisation of the secretory lipolytic enzymes of *Malassezia pachydermatis* isolates collected from dogs. **Veterinary Record Open**, vol. 2, n. 2, 2015.

TIVERON A. P.; ROSALEN P. L.; FRANCHIN M.; LACERDA R. C. C.; BUENO-SILVA B.; BENSO B.; DENNY C.; IKEGAKI M.; DE ALENCAR S. M. Chemical Characterization and Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Inflammatory Activities of South Brazilian Organic Propolis. **PLoS ONE**, vol. 11, n. 11, 2016.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M., BANKOVA V.; SIMONA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. R.; TSVETKOVA, I. Bioctive constituints of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** vol. 3, n. 2, p. 249-54, 2006.

VASCONCELOS, W. A.; BRAGA, N. M. A.; CHITARRA, V. R.; SANTOS, V. R.; ANDRADE, A. L.; DOMINGUES, R. Z. Bioactive Glass-Green and Red Propolis Association: Antimicrobial Activity Against Oral Pathogen Bacteria. **Natural Products Chemistry and Research**, vol. 2, n. 6, 2014.

VEIGA R. S.; DE MENDONÇA S.; MENDES P. B.; PAULINO N.; MIMICA M. J.; NETTO A. A. L.; LIRA I. S.; LÓPEZ B. G. C.; NEGRÃO V.; MARCUCCI M. C. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 122, n. 4, p. 911-20, 2017.

VELEGRAKI, A.; CAFARCHIA; C. GAITANIS, G.; IATTA, R.; BOEKHOUT, T. *Malassezia* Infections in Humans and Animals: Pathophysiology, Detection, and Treatment. **PLOS Pathogens**, vol. 11, n. 1, 2015.

WALLER, S. B.; PETER, C. M.; HOFFMANN, J. F.; PICOLI, T.; OSÓRIO, L. G; CHAVES, F.; ZANI, J. L.; DE FARIA, R. O; DE MELLO, J. R. B.; MEIRELES, M. C. A. Chemical and cytotoxic analyses of brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its *in vitro* activity against itraconazoleresistant *Sporothrix brasiliensis*. **Microbial Pathogenesis,** vol. 105, p. 117-21, 2017.

WANG, X.; SANKARAPANDIAN, K.; CHENG Y.; WOO S.O.; KWON H.W.; PERUMALSAMY H.; AHN Y. Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, vol. 16, n. 65, 2016.

WATANABE, S.; KOIKE, A.; KANO, R.; NAGATA, M.; CHEN, C.; HWANG, C.Y.; HASEGAWA, A.; KAMATA, H. *In Vitro* Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* Isolates from Canine Skin with Atopic Dermatitis to Ketoconazole and Itraconazole in East Asia. **The Journal of Veterinary Medical Science**, vol. 76, n. 4, p. 579-81, 2014.

WEILER, C. B.; JESUS, F. P. K; NARDI, G. H.; LORETO, E. S.; SANTURIO, J. M.; COUTINHO, S. D. A.; ALVES, S. H. Susceptibility variation of *Malassezia pachydermatis* to antifungal agents according to isolate source. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 44, n. 1, p. 174-8, 2013.

YOU, G. S.; LIN, S. C.; CHEN, C. R.; TSAI, W. C; CHANG, C. J.; HUANG, W. W. Supercritical Carbon Dioxide Extraction Enhances Flavonoids in Water-Soluble Propolis. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers,** vol. 33, n.3, p. 233-241, 2002.