

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE *IN VITRO* DA PRÓPOLIS BRASILEIRA VERDE E JATAÍ SOBRE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Sporothrix brasiliensis*

WALLER, Stefanie Bressan¹;
PETER, Cristina Mendes²;
HOFFMANN, Jéssica Fernanda³;
OSÓRIO, Luiza da Gama¹;
ZANI, João Luiz²;
MELLO, João Roberto Braga de⁴;
FARIA, Renata Osório de²;
FISCHER, Geferson².

Recebido: 25/05/2017

Aceito: 20/09/2017

¹Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária, Faculdade de Veterinária/UFPEL; ²Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária/UFPEL, ³Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas, Faculdade de Agronomia/UFPEL, ⁴Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a composição química e a atividade antifúngica da própolis Brasileira Verde (abelhas *Apis mellifera*) e Jataí (abelhas *Tetragonisca angustula*) frente ao *Sporothrix brasiliensis* provenientes de isolados clínicos de cães, gatos e humanos. Os produtos apícolas foram preparados nas formas de extratos hidroalcoólicos, e a composição química foi determinada pela cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. A atividade antifúngica sobre *S. brasiliensis* (n: 20) foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo (M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*), adaptado para o uso de produtos naturais. Os extratos apícolas foram testados nas concentrações de 50 a 1,56 mg/mL, e o itraconazol utilizado como controle antifúngico foi testado nas concentrações de 16 a 0,03 µg/mL. Os testes foram realizados em duplicatas e os resultados expressos em concentração inibitória mínima (CIM). Na análise química, foi observada um maior conteúdo fenólico total em relação ao conteúdo flavonóide total, para ambos os extratos, havendo um maior conteúdo fenólico na própolis verde. Dos seis ácidos fenólicos e nove flavonóides detectados pela cromatografia, foram quantificados rutina, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico, sendo este o último presente em altas concentrações para ambas as amostras, especialmente na própolis verde. Ao avaliar a atividade antifúngica sobre *S. brasiliensis*, nenhum dos extratos apresentou atividade inibitória nas concentrações testadas (CIM >50 mg/mL). Os isolados clínicos apresentaram sensibilidade *in vitro* ao itraconazol nas CIM >16 a 0,25 µg/mL. Entretanto, foram observadas cepas resistentes ao itraconazol.

Palavras-chave: Esporotricose. Resistência antifúngica. Itraconazol. Alternativa terapêutica. Própolis.

INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma doença infecciosa causada por fungos do complexo *Sporothrix schenckii* (MARIMON et al., 2007), sendo a espécie *Sporothrix brasiliensis* de ocorrência frequente nos surtos da doença em felinos no Brasil (MONTENEGRO et al., 2014; SANCHOTENE et al., 2015; WALLER et al., 2016a, 2016b). Essa micose acomete o homem e os animais domésticos através da inoculação traumática acidental com material vegetal contaminado (ARAÚJO et al., 2015) ou pela mordedura/arranhadura de animais doentes, principalmente por felinos domésticos, constituindo uma transmissão zoonótica de importância em saúde pública (MADRID et al., 2012; SILVA et al., 2012; XAVIER et al., 2004).

A doença é caracterizada por lesões nodulares e ulcerativas no tecido subcutâneo, porém, o envolvimento linfático e até mesmo sistêmico pode ocorrer nas formas severas da doença (BARROS et al., 2010; PAIXÃO et al., 2015). O tratamento consiste no uso de medicamentos antifúngicos, sendo o itraconazol considerado o fármaco de eleição (MADRID et al., 2012; ROSSI et al., 2013). Entretanto, o surgimento de isolados fúngicos com capacidade de resistência aos fármacos tem sido relatado (STOPIGLIA et al., 2014; WALLER et al., 2016a, 2016b), alertando para a necessidade da busca por novas moléculas antifúngicas.

Dentre os produtos naturais promissores para a elaboração de fármacos antimicrobianos, estão aqueles de origem apícola, como a própolis, cujas propriedades terapêuticas foram atribuídas aos compostos flavonóides (CUSNHIE; LAMB, 2005; SONMEZ et al., 2005). Tanto a própolis Brasileira produzida por abelhas *Apis mellifera*, como a própolis verde e vermelha, apresentaram atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* (FREIRES et al., 2016; PIPPI et al., 2015), *Trichophyton* spp. (SIQUEIRA et al., 2009), *Malassezia pachydermatis* (CARDOSO et al., 2010) e *Paracoccidioides brasiliensis* (SALOMÃO et al., 2004, 2008). Por sua vez, a própolis Jataí, produzida por abelhas *Tetragonisca fiebrigi*, foi ativa contra *C. albicans* e *C. glabrata* (CAMPOS et al., 2015).

Há um estudo sobre a sensibilidade *in vitro* do *S. schenckii* ao extrato etanólico da própolis Brasileira Verde coletada no Paraná e Minas Gerais (SALOMÃO et al., 2008). Entretanto, não há literatura acerca da atividade antifúngica da própolis brasileira frente ao *S. brasiliensis*, principal agente nos surtos de esporotricose no Brasil. Assim, este estudo objetivou avaliar a

atividade anti-*Sporothrix brasiliensis* das própolis Brasileira Verde e Jataí e suas respectivas constituições químicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material apícola

Própolis verde produzida por abelhas *A. mellifera* foi adquirida comercialmente (Néctar Farmacêutica® LTDA, Siderópolis/SC, Brasil), ao passo que a própolis Jataí produzida por abelhas *Tetragonisca angustula* foi adquirida de um meliponário local (Morro Redondo/RS, Brasil).

Preparo do extrato hidroalcoólico

Os materiais foram preparados na forma de extratos hidroalcoólicos (PAULINO et al., 2002), sendo previamente congelados a -70 °C, para posterior trituração. A extração foi realizada em solução contendo álcool 96 °GL na proporção de 1:3 de própolis para álcool, sob agitação por 24 horas, a 37 °C. O solvente foi evaporado e a matéria seca resultante foi dissolvida em tampão fosfato (pH 7,2) e emulsificada (EUMULGIN® HRE-40), para obtenção da concentração de 100 mg/ml. O composto foi esterilizado em filtro hidrofílico com porosidade de 22 µm, sendo diluído com água destilada estéril até a concentração de uso.

Análise da constituição química

A composição química dos extratos de própolis foi determinada por cromatografia líquida, onde 10 µl dos extratos foram injetados em cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (Shimadzu, Prominence) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução (MicrOTOF-Q, Bruker Daltonics). Os compostos fenólicos foram separados utilizando pré-coluna C18 (2,0 × 4 mm) e coluna Luna C18 (2,0 × 150 mm, 100 Å, 3 µm) Phenomenex (Torrance, CA, USA). O espectrômetro de massas foi operado no modo ESI negativo, com voltagem do capilar em 4000 V, pressão do gás de nebulização (N₂) de 2 bar, gás de secagem em 8 L/min e temperatura da fonte de 180 °C, usando os parâmetros padrões do equipamento. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10 mM, e os espectros de massa foram processados através do *software* Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics). Para quantificação dos compostos fenólicos e flavonóides, curvas de calibração foram

preparadas, utilizando os padrões externos de ácido gálico, catequina, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido clorogênico, epitequina, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, rutina, ácido elágico, miricetina, quercetina, hesperetina, kaempferol, luteolina, apigenina, pinocembrina, crisina e galangina, nas concentrações variando de 0 a 10 µg/mL. Os compostos fenólicos presentes nas amostras foram caracterizados pela sua UV/Vis (220-800 nm), e os tempos de retenção calculados em relação aos padrões externos e os espectros de massa.

Atividade anti-Sporothrix brasiliensis

Para o teste de suscetibilidade antifúngica, foram utilizados 19 isolados clínicos de *S. brasiliensis*, sendo oriundos de gatos (n: 9) e cães (n: 9) com esporotricose dos municípios de Pelotas e Rio Grande/RS, Brasil, e um isolado de humano (n: 1), além de uma cepa-padrão de *S. brasiliensis* (IPEC 16919 – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro/RJ, Brasil). A identificação fúngica através da análise molecular foi realizada pelo Laboratório de Micologia Médica e Molecular, Universidade Federal de São Paulo (São Paulo/SP, Brasil), por meio da técnica do Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (*PCR-restriction fragment length polymorphism* - RFLP) (RODRIGUES et al., 2014a). Os isolados fúngicos utilizados eram provenientes da micoteca do Centro de Pesquisa e Diagnóstico em Micologia Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (Pelotas/RS, Brasil), e eram identificados como s120, s121, s122, s123, s124, s125, s127, s143 e s144 (para isolados felinos) e s10, s53, s74, s89, s101, s104, s114, s126 e s152 (para isolados caninos).

Para a avaliação da suscetibilidade antifúngica, foi realizada a técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) com adaptações, e os resultados expressos em concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações fungicidas mínimas (CFM). Os inóculos fúngicos foram preparados a partir de colônias jovens filamentosas cultivadas em ágar batata-dextrose durante 7 dias a 35 °C e ajustados em espectrofotômetro (Spectrum Instruments Co., Xangai, China) na transmitância de 80 a 82% ao comprimento de onda fixado a 530 nm. As suspensões foram diluídas em meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium, Sigma, Steinhilf, Alemanha), suplementado com glicose a 2% e MOPS [ácido 3-(N-morfolino)-propano

sulfônico] (1:50, v/v). As própolis foram testadas nas concentrações entre 50 a 1,56 mg/mL, e suas diluições foram realizadas seriadamente em RPMI-1640 suplementado sobre microplacas de 96 poços. Para o controle negativo, 200 µL de RPMI-1640 suplementado foi adicionado sobre um poço, ao passo que, para o controle positivo, 100 µL de RPMI-1640 suplementado e 100 µL dos inóculos foram adicionados. Como controle antifúngico, itraconazol (Sporanox®, Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda., lote TLL 089, São José dos Campos/SP) foi preparado em dimetil-sulfóxido (DMSO), conforme as diretrizes do CLSI, e testados nas concentrações de 16 a 0,03 µg/mL. As microplacas foram incubadas a 27 °C por 72 horas para leitura dos valores da CIM, e todos os experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos duas vezes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através das análises qualitativas e quantitativas dos extratos da própolis Brasileira Verde e Jataí (Tabela 1), um maior conteúdo fenólico total em relação ao flavonóide total para ambas as amostras foi observado, o qual é típico nas amostras de própolis amarela, verde, marrom e vermelha do Brasil (MACHADO et al., 2016). Ainda, os conteúdos fenólicos e flavonóides totais foram superiores na própolis Verde em comparação à Jataí, estando em concordância com a literatura (PEREIRA et al., 2002). Considera-se que outros compostos, além de ácidos fenólicos e flavonóides podem estar presentes, pois amostras de própolis produzidas por abelhas *T. fiebrigi* apresentaram altas quantidades de ácido kaurenóico, retinol, colesterol, tocoferol, cinamil cafeína, entre outros (CAMPOS et al., 2015), podendo estar presentes na amostra Jataí estudada.

Tabela 1 - Caracterização química das própolis Brasileiras Verde e Jataí e respectivos conteúdos fenólico e flavonóide totais em mg/g (média \pm SD).

Compostos químicos	Tempo de retenção (minutos)	Própolis	
		Verde (%)	Jataí (%)
<i>Ácidos fenólicos</i>			
Ácido gálico	5.41	n.d.	n.d.
Ácido 4-hidroxibenzóico	11.17	+	+
Ácido siríngico	12.45	n.d.	n.d.
Ácido vanílico	12.12	n.d.	n.d.
Ácido caféico	12.05	0.61	+
Ácido clorogênico	11.27	0.96	0.26
Ácido <i>p</i> -cumárico	13.67	52.09	6.6
Ácido ferúlico	14.01	0.64	0.09
Ácido elágico	15.21	+	+
<i>Flavonóides</i>			
Catequina	10.25	n.d.	n.d.
Hesperetina	17.33	+	+
Pinocembrina	19.49	+	+
Apigenina	18.24	+	+
Crisina	20.12	+	+
Luteolina	17.30	+	+
Epicatequina	11.74	n.d.	n.d.
Galangina	20.53	+	+
Kaempferol	18.00	+	+
Miricetina	15.52	n.d.	n.d.
Quercetina	16.89	+	+
Rutina	14.64	3.71	0.65
Conteúdo fenólico total ^a		41.84 \pm 5.39	3.93 \pm 0.54
Conteúdo flavonóide total ^b		11.40 \pm 1.49	2.05 \pm 0.53

^a mg de ácido gálico/grama de extrato; ^b mg de epicatequina/grama de extrato; + detectado; n.d. - não detectado.

A composição química entre as própolis foi similar no que tange a avaliação qualitativa, mesmo que produzidas por diferentes espécies de abelhas, o que pode decorrer da planta utilizada para a produção apícola. Sawaya et al. (2004) descreveram que essa similaridade química ocorre porque a principal planta utilizada pelas abelhas *T. angustula* para a produção da própolis Jataí – a *Schinus terebinthifolius* ou “aroeira-vermelha” – está amplamente presente no território brasileiro e, por esse motivo, também é utilizada pelas abelhas *A. mellifera* para a produção de outras própolis, como a verde. Dos compostos

avaliados, foram quantificados o flavonóide rutina e os ácidos clorogênico, ferúlico e cafeico em ambas as própolis, além do ácido *p*-cumárico, que também foi majoritário na própolis coletada na Polônia (SOCHA et al., 2015), e cuja atividade antioxidante tem sido relevante.

O ácido *p*-cumárico tem sido descrito como potencial antifúngico de forma isolada ou em combinação com os ácidos cafeico e dihidrocinânico, induzindo a uma atividade imunomoduladora em monócitos humanos sobre *C. albicans* (CARDOSO et al., 2017). Além disso, a degradação da parede celular fúngica pelo ácido cafeico e seus derivados já foi demonstrada como mecanismo de ação da atividade antifúngica desses compostos (MA et al., 2010), bem como a ruptura da membrana plasmática (SUNG; LEE, 2010). Esse complexo químico tem sido atribuído à atividade antifúngica das própolis Brasileira Verde e Jataí contra *Candida* spp. (CAPISTRANO et al., 2013; SALOMÃO et al., 2008) e *Trichophyton* spp. (NGATU et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2009).

Em *S. schenckii*, os extratos das própolis Brasileira Verde e da própolis Búlgara (SALOMÃO et al., 2008) foram ativos em concentrações seriadas de 16 a 2 mg/mL, promovendo a inibição do crescimento fúngico entre 15 a 25 mm. Embora o estudo tenha atribuído essa atividade à composição majoritária do ácido *p*-cumárico, o mesmo não foi observado sobre os isolados clínicos de *S. brasiliensis* no nosso estudo (Figura 1), pois não foi observada atividade inibitória nas concentrações testadas das própolis verde e Jataí (CIM>50 mg/mL), mesmo na presença do ácido *p*-cumárico em ambas as amostras.

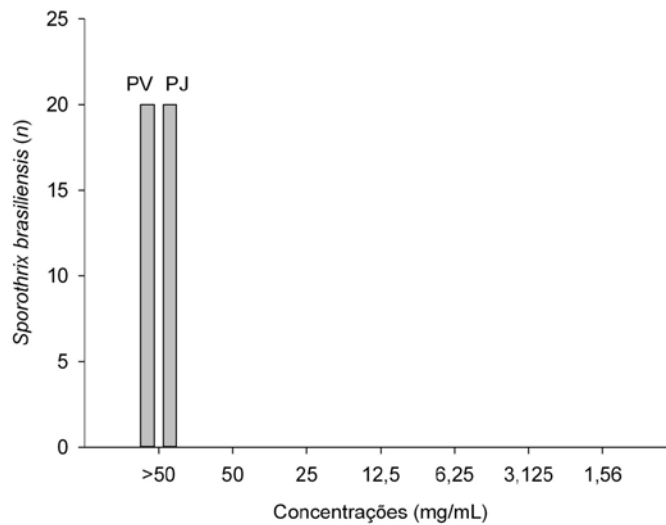


Figura 1 - Resultado da atividade *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos da própolis Brasileira Verde (PV) e Jataí (PJ) sobre *Sporothrix brasiliensis* de origem felina, canina e humana, além da cepa-padrão humana (n: 20), demonstrando a ausência de atividade antifúngica nas concentrações testadas de 50 a 1,56 mg/mL (CIM: >50 mg/mL).

Em relação ao controle antifúngico, os isolados clínicos de *S. brasiliensis* apresentaram uma variação na sensibilidade *in vitro* ao itraconazol, cujos valores da CIM variaram de 0,03 a maior que 16 µg/mL para os isolados de caninos e felinos. Por sua vez, o isolado clínico humano testado foi sensível na CIM de 16 µg/mL, ao passo que a cepa-padrão humana foi a 1 µg/mL (Figura 2). Os resultados demonstraram a ocorrência de resistência ao itraconazol *in vitro*, seguindo o ponto de corte sugerido pelo documento M38-A2 (CLSI, 2008), o qual designou a sensibilidade ao itraconazol para os isolados de *Sporothrix* spp. com valores de CIM inferiores a 4 µg/mL, e a resistência para os que apresentaram valores de CIM maiores ou iguais a 4 µg/mL. Do total de 20 *S. brasiliensis* testados, 75% (15/20) foram resistentes *in vitro* ao itraconazol, alertando para a dificuldade no controle antifúngico, já observadas em casos de esporotricose animal e humana no Brasil (BORBA-SANTOS et al., 2015; RODRIGUES et al., 2014b; WALLER et al., 2016a, 2016b), o que torna necessária a busca por novas moléculas antifúngicas ativas.

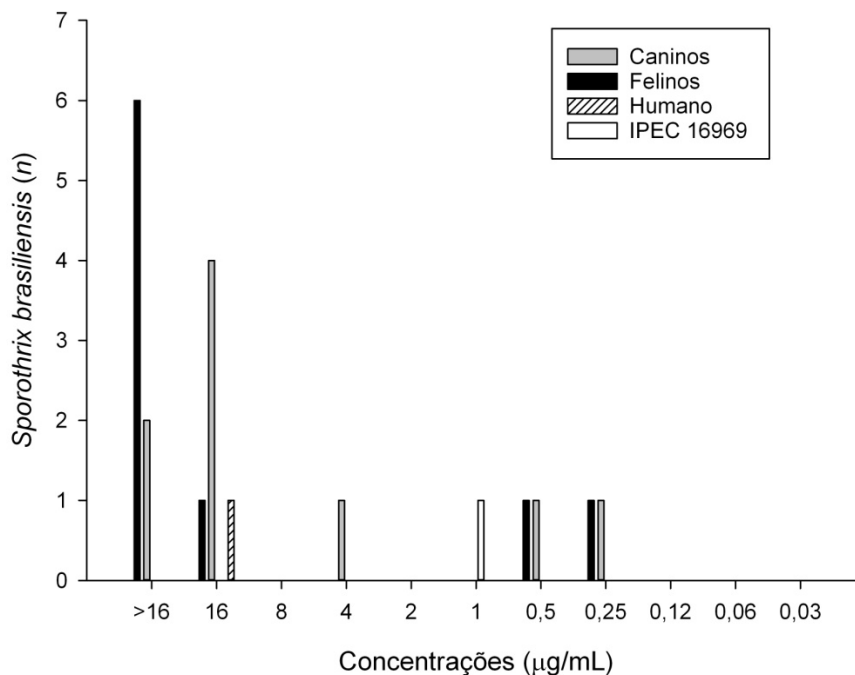


Figura 2 - Resultado da atividade in vitro do itraconazol sobre *Sporothrix brasiliensis* de origem felina (n: 9), canina (n: 9) e humana (n: 1), além da cepa-padrão humana (n: 1), indicando atividade antifúngica nas concentrações inibitórias mínimas de >16 a 0,25 µg/mL.

Embora os produtos não tenham apresentado atividade antifúngica nas concentrações testadas, Waller et al. (2017) demonstraram que o extrato hidroalcoólico da própolis marrom foi ativo sobre *S. brasiliensis* resistentes ao itraconazol. Assim, supõe-se que o potencial antimicrobiano das diferentes própolis seja dependente da espécie de abelha e das plantas utilizadas para a coleta de pólen (WAGH, 2013), uma vez que as abelhas *A. mellifera* utilizam *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida por alecrim-do-campo (OLIVEIRA et al., 2014), e *Eucalyptus* sp. (FREITAS et al., 2010) para a produção das própolis verde e marrom, respectivamente. Além disso, a ausência da detecção dos ácidos vanílico e siríngico nas amostras estudadas pode ter influenciado nos resultados, pois foram detectados na própolis marrom ativa (WALLER et al., 2017) e com comprovada atividade antifúngica (MERKL et al., 2010; PANYO et al., 2016).

CONCLUSÃO

Os extratos das própolis Brasileiras Verde e Jataí apresentaram análise química similar, com alto conteúdo fenólico total em relação ao conteúdo flavonóide total. Na análise quantitativa, observou-se a composição majoritária do ácido *p*-cumárico. Na atividade antifúngica, os extratos de ambas as própolis não foram ativos sobre *S. brasiliensis* nas concentrações testadas. Em relação ao itraconazol, observou-se a presença de *S. brasiliensis* resistentes ao itraconazol.

CHEMICAL COMPOSITION AND *IN VITRO* ACTIVITY OF GREEN AND JATAÍ BRAZILIAN PROPOLIS ON CLINICAL ISOLATES OF *Sporothrix brasiliensis*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the chemical composition and antifungal activity of Green (bee *Apis mellifera*) and Jataí (bee *Tetragonisca angustula*) Brazilian propolis against *Sporothrix brasiliensis* obtained from clinical isolates of dogs, cats and humans. The products were prepared as hydroalcoholic extracts, and the chemical composition was analyzed by high efficiency liquid chromatography coupled with a mass spectrometer. The antifungal activity on *S. brasiliensis* (n: 20) was determined through the broth microdilution technique (M38-A2 document of Clinical and Laboratory Standards Institute), adapted to natural products. The extracts were tested from the concentrations of 1.56 to 50 mg/mL, and itraconazole was used as antifungal control from 0.03 to 16 µg/mL. The tests were performed in duplicate and the results were expressed in minimal inhibitory concentrations (MIC). In the chemical analysis, a higher total phenolic content in relation to total flavonoid content was observed for both extracts, with a higher phenolic content in the green propolis. Among the six phenolic acids and nine flavonoids detected by chromatography, rutin, caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid and *p*-coumaric acid were the compounds quantified, being this last compound present in high concentrations for both samples, mainly in green propolis. In the antifungal activity on *S. brasiliensis*, none of the extracts showed inhibitory activity in the tested concentrations (MIC >50 mg/mL). The clinical isolates showed *in vitro* sensibility to itraconazole in the MIC up to 16 to 0,25 µg/mL, but itraconazole-resistant isolates were observed.

Keywords: Sporotrichosis. Antifungal resistance. Itraconazole. Therapeutic alternative. Propolis.

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD *IN VITRO* DE PROPÓLEO VERDE Y JATAÍ DE BRASIL EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Sporothrix brasiliensis*

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la composición química y la actividad antifúngica de propóleos Brasileños Verde (abejas *Apis mellifera*) y Jataí (abejas *Tetragonisca angustula*) contra *Sporothrix brasiliensis* a partir de aislados clínicos de perros, gatos y seres humanos. Los productos fueron preparados en forma de extractos hidroalcohólicos y la composición química fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. La actividad antifúngica contra *S. brasiliensis* (n: 20) fue determinada por la técnica de microdilución en caldo (M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*), adaptado para el uso de productos naturales. Los extractos de propóleos fueron evaluados en concentraciones de 50 a 1,56 mg/mL y el itraconazol utilizado como un control antifúngico fue testado en concentraciones de 16 a 0,03 µg/mL. Los tests fueron realizados por duplicado y los resultados se expresaron como concentración inhibitoria mínima (CIM). En el análisis químico, un mayor contenido total fenólico en relación al contenido total de flavonoides se observó para ambos extractos, con un mayor contenido fenólico en propóleo verde. De los seis ácidos fenólicos y nueve flavonoides detectados por cromatografía, los compuestos cuantificados fueron rutin, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico. Este último compuesto estaba presente en altas concentraciones para ambas muestras, especialmente en propóleo verde. Al evaluar la actividad antifúngica contra *S. brasiliensis*, ninguno de los extractos mostraron actividad inhibitoria en las concentraciones (CIM >50 mg/mL). Los aislados clínicos mostraron susceptibilidad *in vitro* al itraconazol en las CIM > 16 a 0,25 µg/mL. Sin embargo, se observaron aislados resistentes a itraconazol.

Palabras clave: Esporotricosis. Resistencia antimicótica. Itraconazol. Terapia alternativa. Propóleo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Dr. Zoilo Pires de Camargo (Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo/SP, Brasil) pela análise biomolecular dos isolados fúngicos.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M. L.; RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; et al. Human sporotrichosis beyond the epidemic front reveals classical transmission types in Espírito Santo, Brazil. **Mycoses**, v. 58, n. 8, p. 485-490, 2015.
- BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, T. M. P.; COLL, J. O.; et al. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 27, n. 6, p. 455-460, 2010.
- BORBA-SANTOS, L. P.; RODRIGUES, A. M.; GAGINI, T. B.; FERNANDES, G. F.; CASTRO, R.; et al. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. **Medical Mycology**, v. 53, n. 2, p. 178-188, 2015.
- CAMPOS, J. F.; DOS SANTOS, U. P.; DA ROCHA, P. D. O. S.; et al. Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). **Evidence-Based of Complementary Alternative Medicine**, v. 2015, article ID. 296186, 11p, 2015.
- CAPISTRANO, H. M.; DE ASSIS, E. M.; LEAL, R. M.; et al. Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. **Evidence-Based of Complementary Alternative Medicine**, v. 2013, article ID 947980, 6p, 2013.
- CARDOSO, E. O.; CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; et al. Phenolic compounds alone or in combination may be involved in propolis effects on human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 99-108, 2017.
- CARDOSO, R. L.; MABONI, F.; MACHADO, G.; et al. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3-4, p. 432-434, 2010.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**. Approved Standard, 3. ed. CLSI publication M38-A2, 2008.
- CUSNHIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.
- FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; PINTO, C. F. Brownish propolis from the Atlantic coastal areas in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a palynological approach. **Brazilian Journal of Botany**, v. 33, n. 2, p. 343-354, 2010.
- FREIRES, I. A.; QUEIROZ, V. C.; FURLETTI, V. F.; et al. Chemical composition and antifungal potential of brazilian propolis against *Candida* spp. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 26, n. 2, p. 122-132, 2016.

- MA, C. M.; ABE, T.; KOMIYAMA, T.; et al. Synthesis, anti-fungal and 1,3-*beta-D-glucan synthase* inhibitory activities of caffeic and quinic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 19, p. 7009–7014, 2010.
- MACHADO, C. S.; MOKOCHINSKI, J. B.; LIRA, T. O.; et al. Comparative study of chemical composition and biological activity of yellow, green, brown, and red Brazilian Propolis. **Evidence-Based of Complementary Alternative Medicine**, v. 2016, article ID 6057650, 11p, 2016.
- MADRID, I. M.; MATTEI, A. S.; FERNANDES, C. G.; et al. Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis: A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, n. 4, p. 265-273, 2012.
- MARIMON, R.; CANO, J.; GENE, J.; et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198-3206, 2007.
- MERKL, R.; HRÁDKOVÁ, I.; FILIP, V.; et al. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Phenolic Acids Alkyl Esters. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 28, n. 4, p. 275–279, 2010.
- MONTENEGRO, H.; RODRIGUES, A. M.; DIAS, M. A. G.; et al. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 269, p. 1-10, 2014.
- NGATU, N. R.; SARUTA, T.; HIROTA, R.; et al. Brazilian green propolis extracts improve *Tinea pedis interdigitalis* and *Tinea corporis*. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 18, n. 1, p. 8-9, 2012.
- OLIVEIRA, P. F.; SOUZA LIMA, I. M.; MUNARI, C. C.; et al. Comparative evaluation of antiproliferative effects of Brazilian green propolis, its main source *Baccharis dracunculifolia*, and their major constituents artemillin C and baccharin. **Planta Medica**, v. 80, n. 6, p. 490-492, 2014.
- PAIXÃO, A. G.; GALHARDO, M. C. G.; ALMEIDA-PAES, R.; et al. The difficult management of disseminated *Sporothrix brasiliensis* in a patient with advanced AIDS. **AIDS Research and Therapy**, v. 12, p. 12-16, 2015.
- PANYO, J.; MATSUNAMI, K.; PANICHAYUPAKARANANT, P. Bioassay-guided isolation and evaluation of antimicrobial compounds from *Ixora megalophylla* against some oral pathogens. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 9, p. 1522-1527, 2016.
- PAULINO, P.; SCRIMIM, F. M.; RAICHASKI, L. B.; et al. Mechanisms involved in the relaxant action of the ethanolic extract of propolis in the guinea-pig trachea *in-vitro*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p. 845-852, 2002.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

PIPPI, B.; LANA, A. J. D.; MORAES, R. C.; et al. *In vitro* evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 839-850, 2015.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, p. 383-387, 2014a.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; PIRES, D. C.; et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC Infectious Disease**, v. 14, p. 219, 2014b.

ROSSI, C. N.; ODAGUIRI, J.; LARSSON, C. E. Retrospective assessment of the treatment of sporotrichosis in cats and dogs using itraconazole. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, p. 1112, 2013.

SALOMÃO, K.; DANTAS, A. P.; BORBA, C. M.; et al. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters of Applied Microbiology**, v. 38, p. 87-92, 2004.

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P. R. S.; CAMPOS, L. C.; et al. Brazilian Propolis: Correlation between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. **Evidence Based of Complementary Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 317-324, 2008.

SANCHOTENE, K. O.; MADRID, I. M.; KLAFKE, G. B.; et al. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v. 58, n. 11, p. 652-658, 2015.

SAWAYA, A. C. H. F.; TOMAZELA, D. M.; CUNHA, I. B. S.; et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **The Analyst**, v. 129, p. 739-744, 2004.

SILVA, D. T.; MENEZES, R. C.; GREMIÃO, I. D. F.; et al. Zoonotic sporotrichosis: biosafety procedures. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 4, p. 1067, 2012.

SIQUEIRA, A. B. S.; GOMES, B. S.; CAMBUIM, I.; et al. *Trichophyton* species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 90-96, 2009.

SOCHA, R.; GALKOWSKA, D.; BUGAJ, M.; JUSZCZAK, L. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. **Natural Products Research**, v. 29, n. 5, p. 416-422, 2015.

- SONMEZ, S.; KIRILMAZ, L.; YUCESYOY, M.; et al. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblast. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 371-376, 2005.
- STOPIGLIA, C. D. O.; MAGAGNIN, C. M.; CASTRILLON, M. R.; et al. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. **Medical Mycology**, v. 52, p. 56–64, 2014.
- SUNG, W. S.; LEE, D. G. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, p. 219–226, 2010.
- WAGH, V. D. Propolis: a wonder bees products and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, article ID 308249, 11p, 2013.
- WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; FERRAZ, V.; et al. Cytotoxicity and anti-*Sporothrix brasiliensis* activity of the *Origanum majorana* Linn. oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 896-901, 2016a.
- WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; SILVA, A. L.; et al. *In Vitro* Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to Essential Oils of *Lamiaceae* Family. *Mycopathologia*, v. 181, n. 11-12, p. 857-863, 2016b.
- WALLER, S. B.; PETER, C. M.; HOFFMANN, J. F.; et al. Chemical and cytotoxic analyses of brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its *in vitro* activity against itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 117-121, 2017.
- XAVIER, M. O.; NOBRE, M. O.; SAMPAIO JR., D. P.; et al. Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1961–1963, 2004.

Autor para correspondência:
Stefanie Bressan Waller.
Rua São Francisco da Califórnia, 90/1001, Higienópolis, Porto Alegre/RS, Brasil. CEP 90550-080.
waller.stefanie@yahoo.com.br