

Ana Rita Sokolonski Antón

PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



Atividade de Extratos de Própolis e de
Nanopartículas de Prata sobre *Candida* spp.
Isoladas de Casos de Estomatite Protética

Salvador
2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

ANA RITA SOKOLONSKI ANTÓN

**ATIVIDADE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS E DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA SOBRE *CANDIDA* spp. ISOLADAS
DE CASOS DE ESTOMATITE PROTÉTICA**

**Salvador
2019**

ANA RITA SOKOLONSKI ANTÓN

**ATIVIDADE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS E DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA SOBRE *CANDIDA* spp. ISOLADAS
DE CASOS DE ESTOMATITE PROTÉTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Processos Interativos dos órgãos e Sistemas do Instituto
de Ciências da Saúde da Universidade Federal da
Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de
Doutor em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas

Orientador: Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo.

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

**Salvador
2019**

Ficha Catalográfica:

Antón, Ana Rita Sokolonski
Atividade de Extratos de Própolis e de Nanopartículas de Prata sobre *Candida* spp.
Isoladas de Casos de Estomatite Protética. / [Manuscrito]. Ana Rita Sokolonski Antón.
Salvador, 2019.
165 f.:il.

Orientador: Prof Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde.
Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador,
2019.

1.Propólis. 2. Nanopartículas. 3. *Candida* spp. I. Araújo, Roberto Paulo Correia de. II.
Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de pós-
Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.III.Título

CDD -

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças para concluir o que parecia impossível.

A minha família pela compreensão e apoio em minhas ausências.

A meu orientador, Prof Roberto Paulo Correia de Araújo, por toda confiança depositada em mim, principalmente quando nem eu mesma confiava.

A meu coorientador, Prof Ricardo Wagner Dias Portela, não tenho palavras para agradecer tanta dedicação e confiança. Nesta jornada, em muitos momentos, o senhor foi o meu Farol.

A Maísa, um anjo que Deus colocou em minha vida, meu muito obrigada.

Ao Grupo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada à Saúde Animal; por toda a ajuda recebida, obrigada.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, obrigada.

SOKOLONSKI, Ana Rita. Atividade de Extratos de Própolis e de Nanopartículas de Prata sobre *Candida* spp. Isoladas de Casos de Estomatite Protética. 165 fl.; il. 2019. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

Resumo

Introdução – Pacientes portadores de próteses totais apresentam com frequência a chamada estomatite protética, com a qual se associa a *Candida albicans*, determinando a candidíase eritematosa. Nesse panorama, a multirresistência das cepas de *Candidas* spp. às drogas antifúngicas comerciais é uma realidade preocupante e que sugere o desenvolvimento de novas terapias. *Objetivos* – Avaliar a resistência e (ou) susceptibilidade de isolados bucais de *Candida* spp. associados ao uso de próteses perante extratos de própolis com e sem pré-tratamento ultrassônico, e perante nanopartículas de prata, bem como o efeito das AgNPs sobre a membrana fúngica através de microscopia eletrônica de varredura. *Metodologia* – Foram isoladas 20 linhagens de *Candida* spp. de pacientes portadores de estomatite protética, as quais foram cultivadas em meio de cultura, e então realizados testes de sensibilidade através de ensaio de microdiluição em caldo. Foram testados antifúngicos comerciais (fluconazol, cetoconazol, itraconazol, nistatina e anfotericina B), extratos de própolis com e sem pré tratamento com ultrassom, e nanopartículas de prata biogênicas. Seguidamente, foi realizada microscopia eletrônica de varredura com isolados tratados com as nanopartículas de prata. *Resultados* – A própolis vermelha pré-tratada com ultrassom apresentou efeito fungistático para todas as cepas testadas e as nanopartículas de prata apresentaram efeito fungistático em baixas concentrações e efeito fungicida para todas as cepas, exceto para *C. parapsilosis*. *Conclusões* – As nanopartículas de prata apresentaram efeito fungicida superior ao dos extratos de própolis, podendo ser empregadas em produtos para limpeza de próteses. A própolis vermelha apresentou atividade sobre linhagens de *Candida* spp. resistentes aos antifúngicos comerciais, podendo ser um tratamento acessório para a estomatite protética.

Palavras-chave: Antifúngicos. Candidíase. Nanotecnologia. Própolis

SOKOLONSKI, Ana Rita. Activity of Propolis Extracts and Silver Nanoparticles on *Candida* spp. Obtained from Prosthetic Stomatitis Cases. 165 fl.; il. 2019. Thesis (PhD) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

Abstract

Background – Patients with denture prostheses frequently present prosthetic stomatitis, with which *Candida albicans* is associated, causing erythematous candidiasis. In this scenario, the multiresistance of *Candida* spp. to commercial antifungicidal drugs is a worrying reality and points to the development of new therapies. *Objectives* – To evaluate the resistance and/or susceptibility of *Candida* spp. associated to the use of prostheses to propolis extracts with and without ultrasonic pretreatment, and to silver nanoparticles (AgNPs), as well as the effect of AgNPs on the fungal membrane through scanning electron microscopy. *Methodology* – Twenty isolates of *Candida* spp. obtained from patients with prosthetic stomatitis were obtained, cultured in culture medium and then sensitivity tests through broth microdilution assay were carried out. Commercial antifungal agents (fluconazole, ketoconazole, itraconazole, nystatin and amphotericin B), extracts of propolis with and without pre-treatment with ultrasound, and biogenic silver nanoparticles were tested. Then, silver nanoparticle-treated isolates were observed through scanning electron microscopy. *Results* – The red propolis extract pre-treated with ultrasound showed fungistatic effect for all the tested strains and the silver nanoparticles presented fungistatic effect in low concentrations and fungicidal effect for all the strains, except for *C. parapsilosis*. *Conclusions* – Silver nanoparticles had a higher fungicidal effect than propolis extracts and could be used in denture cleaning products. Red propolis presented activity on *Candida* spp. resistant to commercial antifungal agents, and may be seen as an accessory treatment for prosthetic stomatitis.

Keywords: Antifungals. Candidiasis. Nanotechnology. Propolis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Cavidade bucal de pacientes edêntulos. Em (A), Palato de aspecto normal e, em (B), palato acometido por candidíase eritrematosa derivada de estomatite protética. 20

Artigo 1

- Figure 1** Number of filed patents of propolis-based products for use in animal health, between 1992 and 2017 years. 74
- Figure 2** Number of filed patents of propolis-based products for use in animal health, according to patent expiration year. 75
- Figure 3** Number of filed patents of propolis-based products for use in animal health, according to the country where the patent was filed. 76
- Figure 4** Number of filed patents of propolis-based products for use in animal health, according to its classification code. 77
- Figure 5** Number of filed patents of propolis-based products for use in animal health, according to the registered inventor. 79
- Figure 6** Distribution of propolis-based patents for use in veterinary medicine, according to its applicants or patent detainer. 80

Artigo 2

- Figure 1** Growth inhibition curves of *Candida* spp. reference strains (2508, 2517, 3703 and 3704) and clinical isolates by (A) green propolis ethanolic extract, (B) green propolis ethanolic extract pretreated with ultrasound, (C) red propolis ethanolic extract and (D) red propolis ethanolic extract pretreated with ultrasound. Microdilution assays were performed in duplicate. Briefly, *Candida* spp. isolates were incubated with a range of propolis concentrations (8 to 0.015 mg/mL) for 48 hours. Then, the relative growth was obtained using a spectrophotometer (625 nm) and the growth inhibition rates were calculated. The results represent the mean of two independent experiments. 116
- Figure 2** Dose-response curve of *Candida* spp. incubated with (A) green propolis ethanolic extract, (B) green propolis ethanolic extract pretreated with ultrasound, (C) red propolis ethanolic extract and (D) red propolis ethanolic extract pretreated with ultrasound. Microdilution assays were performed in duplicate. Briefly, *Candida* spp. were incubated with a 117

range of propolis concentrations (8 to 0.015 mg/mL) for 48 hours. Then, the relative growth was obtained using a spectrophotometer (625 nm), and the growth inhibition rates were calculated. Graphical representations and dose-response stimulation statistics were obtained using the software Graph Pad Prism 6.

Artigo 3

Figure 1 Dose-dependency curves of *Candida* spp. isolates for (A) fluconazole, (B) nystatin, (C) amphotericin B and (D) biogenic silver nanoparticles (AgNPs). For each concentration evaluated it were used 162 data obtained for all *Candida* spp. isolates to generate the nonlinear regression curves. EC₅₀ values (effective dose for inhibits 50% of the culture growth) were 0.3389 (0.3096 to 0.3711) to fluconazole, 0.9402 (0.8815 to 1.003) for nystatin, 0.1810 (0.1710 to 0.1915) for amphotericin B and 3.214 (3.109 to 3.322) for AgNPs. Statistical analysis and graphical images generation were obtained using the Graph Pad Prism 6.0 software through nonlinear regression and dose-response inhibition tests. 130

Figure 2 Scanning electron microscopy (SEM) of *C. albicans* and *C. parapsilosis* in presence or absence of AgNP. In (A) is demonstrated *C. albicans* 2508 reference strain cultured in absence of AgNP. In (B) is showed *C. albicans* 2508 in presence of half of concentration of MIC₁₀₀ of AgNP. In (C) is demonstrated *C. parapsilosis* 310 reference strain cultured in absence of AgNP. In (D) is showed *C. parapsilosis* 310 in presence of half of concentration of MIC₁₀₀ of AgNP. White arrows indicate several plasmatic membrane pores due the AgNP antifungal action. Black arrows show the residual biomass from other fungi lysed after AgNP fungicide activity. 132

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

- Table 1** Some molecules found in different propolis types and its main associated biological activities. EE – ethanolic extract; EEP – ethanolic extract of propolis; GP – green propolis; MEP – metanolic extract of propolis; Hex-Fr – hexane fraction; RP – red propolis. 81
- Table 2** Biological activity of different propolis extracts against bacterial species of veterinary interest. AcEOt-Fr – acetate fraction; EE – ethanolic extract; EEP – ethanolic extract of propolis; Hex-Fr – hexane fraction; MeOH-Fr – methanol fraction; GP – green propolis; HE – hexanic extract; MBC – minimal bactericidal concentration; MIC – minimal inhibitory concentration; RP – red propolis. 84
- Table 3** Biological activity of different propolis extracts against fungi species of veterinary interest. AcEOt-Fr – acetate fraction; DMSO – dimethylsulfoxide; CHCl₃-Fr – chloroform fraction; EE – ethanolic extract; EEP – ethanolic extract of propolis; Hex-Fr – hexane fraction; GliE – glicolic extract; GP – green propolis; HE – hexanic extract; MFC – minimal fungicide concentration; ME – methanolic extraction; MIC – minimal inhibitory concentration; RP – red propolis. 87

Artigo 2

- Table 1** MIC₁₀₀ and MFC₁₀₀ values obtained for *Candida* spp. reference strains and clinical isolates incubated with commercial fungicides (fluconazole, ketoconazole, itraconazole, nystatin and amphotericin B). The *Candida* spp. strains and isolates were incubated with different concentrations of the fungicides, as suggested by the M27-A3 protocol from the CLSI (2008), and after an incubation period of 48 hours, the growth inhibition was obtained using optical density values provided by a spectrophotometer at 625 nm. 118
- Table 2** MIC₁₀₀ and MFC₁₀₀ values obtained for *Candida* spp. reference strains and clinical isolates incubated with different concentration of four propolis extracts. The *Candida* spp. strains and clinical isolates were incubated for 48 hours with different concentrations of four propolis extracts, and the growth inhibition was then calculated. 119

Artigo 3

Table 1 MIC and MFC values obtained for *Candida* spp. reference stains and clinical isolates through susceptibility tests using commercial fungicides and biogenic silver nanoparticles. All tests were performed following the M27-A3 protocol from the CLSI (29). MIC indicates the Minimal Inhibitory Concentration and MFC indicates the Minimal Fungicide Concentration. Breakpoints for fluconazole were obtained from the CLSI M27-S4 document³⁰ 129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
AgNP	Nanopartículas de Prata
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose (Meio de cultura)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. guilhermondii</i>	<i>Candida Guilhermondii</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. Parapsilosis</i>	<i>Candida Parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Candida spp.</i>	Candida sem identificação de espécie
CAPE	Ácido Cafeico
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG 74	Candida glabrata 74
CIM	Concetração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CP 310	Candida Parapsilosis 310
CT 319	Candida tropicalis 319
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>

MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mL	Mililitro
MOPS	Tampão 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nm	Nanômetros
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PVP	Polivinilpirrolidona
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Meio de Cultura desenvolvido pelo Roswell Park Memorial Institute
SENAI/ CIMATEC	Serviço Nacional de aprendizagem Industrial/Centro Integrado de manufatura e Tecnologia
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
XPS	Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Rx
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
1.1	INTRODUÇÃO	17
1.2	CANDIDAS	18
1.3	INFECÇÕES FÚNGICAS E SEU TRATAMENTO	19
1.4	PRÓPOLIS	21
1.5	NANOPARTÍCULAS DE PRATA	24
2	JUSTIFICATIVA	27
3	HIPÓTESE	29
4	OBJETIVOS	31
4.1	GERAL	32
4.2	ESPECÍFICOS	32
5	METODOLOGIA	33
5.1	ASPECTOS ÉTICOS	34
5.2	CEPAS FÚNGICAS	34
5.2.1	Coleta de amostras fúngicas	34
5.2.2	Identificação das cepas e dos isolados	34
5.3	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA	35
5.3.1	Metodologia de extração etanólica do extrato de própolis verde e vermelha	35
5.3.2	Obtenção de extrato de própolis verde e vermelha com pré-tratamento por ultrassom	36
5.4	SÍNTESE DAS AGNPS	36
5.4.1	Caracterização das Nanopartículas de Prata	37
5.5	ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	37
5.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	38
6	ARTIGOS	41
6.1	ARTIGO 1	42
6.2	ARTIGO 2	91
6.3	ARTIGO 3	120
7	DISCUSSÃO	140

8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	144
	REFERÊNCIAS	146
	ANEXOS	155
	PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	156
	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	162

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 INTRODUÇÃO

Pacientes portadores de próteses totais apresentam, com frequência, a chamada estomatite protética^{1,2}, com a qual se associa *Candida albicans*, determinando a candidíase eritematosa^{1,3-5}. O gênero *Candida* é formado por 163 espécies, e aproximadamente 10 são responsáveis por infecções no homem, sendo causadoras de micoses superficiais ou invasivas nos seres humanos. A espécie mais prevalente é a *C. albicans*⁶, que é mais comumente associada à estomatite protética⁷. Essa infecção fúngica é amplamente recidivante^{1,6}, mesmo após a eliminação do fator irritante.

Nesse panorama, o uso de compostos alternativos, tais como própolis e nanopartículas de prata, apresenta-se como uma opção necessária para o controle da infecção fúngica. A própolis é uma substância resinosa extraída da colmeia das abelhas, que tem composição bastante variável e é empregada na medicina popular há décadas⁸. Já as nanopartículas de prata possuem ação antimicrobiana^{9, 10} e mecanismo de ação dependente de seu método de síntese¹¹.

As propriedades da própolis incluem atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, hepatoprotetora, antiparasitária e imunomodulatória¹². No Brasil, existem 14 tipos de própolis^{13,14,15}, e as principais colorações apresentadas são a vermelha, a verde a marrom. Suas atividades antibacteriana e antifúngica são atribuídas a um grande número de compostos fenólicos presentes em sua composição, principalmente os flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres¹⁶, e sua composição depende do tipo de extração usada na obtenção da própolis e da região de produção¹⁷. De uma forma geral, a extração da própolis acontece em meio alcóolico. Entretanto, o pré-tratamento com ultrassom favorece a obtenção de compostos ativos¹⁸. O surgimento de micro-organismos multirresistentes tornou possível o uso da própolis não apenas como antibiótico e antifúngico, mas também como agente sinérgico para reduzir a dose do antibiótico ou potencializar seu efeito¹².

As nanopartículas de prata possuem ação antimicrobiana de amplo espectro e também apresentam ação cicatrizante¹⁹. Além disso, possuem um baixo custo de síntese, boa eficácia e estabilidade^{20,21}. Essas partículas podem ser obtidas a partir de metodologias que empregam boroidreto de sódio, polivinilpirrolidona (PVP) e glucose, ou por síntese dita sustentável (síntese verde) por usar substâncias biogênicas⁹.

Neste trabalho, foram testados, *in vitro*, os extratos etanólicos de dois tipos de própolis (verde e vermelha), com e sem pré-tratamento com ultrassom, e nanopartículas de

prata biogênicas em um sistema *in vitro*, para avaliação do perfil de susceptibilidade ou resistência de isolados de *Candida* spp. Esses isolados foram obtidos de pacientes com estomatite protética, e também foram testadas cepas referências do fungo, com o intuito de verificar seu poder fungicida e fungistático; em seguida, foi realizada avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) nas espécies testadas.

1.2. CANDIDAS

C. albicans é um fungo polimórfico comensal e membro do microbioma normal de humanos²². Reside, de forma inofensiva, na cavidade bucal, na pele e na genitalia da maioria das pessoas saudáveis²². A mudança do estado de comensalismo para patogenicidade relaciona-se com fatores locais e sistêmicos¹⁶, podendo causar desde infecções superficiais de pele até infecções sistêmicas, com risco de morte²². Esse organismo é uma levedura unicelular que pode existir na forma vegetativa (levedura), a qual é observada em infecções conjuntamente com a forma celular alongada (pseudohifa), ou na forma de clamidósporo¹⁶, ou ainda formando biofilmes²³.

A morfologia desse fungo é afetada por uma série de fatores, tais como o pH. Abaixo do pH 6, as células de *C. albicans* crescem na forma de levedura, e, acima de 7, crescem na forma de hifas. Outros fatores podem favorecer a formação de hifas, tais como a temperatura fisiológica e a presença de N-acetilglucosamina ou soro no meio de cultivo²². Vários fatores contribuem para a patogenicidade desse fungo, sendo que, dentre eles, estão a expressão de moléculas de adesão, a invasão de células hospedeiras, a secreção de hidrolases, a capacidade de formar biofilmes, a transição da forma de levedura para a forma de hifa, a expressão de proteínas de choque térmico, dentre outros²².

A forma hifa é mais invasiva e patogênica que a forma de levedura. Entretanto se acredita que a levedura, por ser menor, representa a forma da disseminação do patógeno²². A colonização de leveduras na cavidade bucal ocorre à custa de sua capacidade de aderência às células epiteliais⁵, fator facilitado pela produção de proteinases²⁴. Essa enzima é capaz de aumentar a patogenicidade do micro-organismo²⁴.

Dentre as espécies de *Candida* não *albicans* estão a *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis* e *C. Guilliermondii*²². Infecções de pele e unhas têm como patógeno principal a *C. parapsilosis*, enquanto que a *C. glabrata* é prevalente

em infecções sistêmicas²⁵. *C. krusei* e *C. glabrata* são resistentes aos medicamentos antifúngicos de primeira linha²⁵, e a *C. glabrata* está se tornando resistente a antifúngicos de segunda linha, tais como as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina)²⁶. Já a *C. parapsilosis* pode ainda apresentar susceptibilidade ao fluconazol²⁵.

1.3. INFECÇÕES FÚNGICAS E SEU TRATAMENTO

A candidíase, ou candidose, é uma infecção fúngica bucal oportunista, que se desenvolve na presença de uma entre várias condições predisponentes, tais como imunodeficiências²⁶, distúrbios endócrinos, gravidez, terapia com corticosteroides, xerostomia, higiene oral deficiente, dentre outras^{27, 28}. A candidíase é causada pela *C. albicans* e, com menos frequência, por outras espécies de *Candida*, tais como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis* e *C. guilliermondii*. A infecção afeta partes externas da mucosa bucal ou da pele envolvida, mas pode se estender para o trato digestivo, o trato broncopulmonar ou para outros sistemas e órgãos²⁷, geralmente associada a uma disfunção do sistema imune adaptativo²⁶. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária²⁸, as leveduras do gênero *Candida* são os maiores agentes de infecção hospitalar e representam um desafio para a sobrevivência de pacientes com doenças graves e aqueles em período pós-operatório. Hospitais norte-americanos com sistema de vigilância operante notificaram *Candida* como o quarto patógeno nosocomial mais prevalente²⁵, e a quarta causa mais comum de infecções adquiridas em hospitais²⁸, afetando mais de 250.000 indivíduos e sendo responsáveis por mais de 50.000 mortes por ano²⁶. A candidíase sistêmica apresenta mortalidade de 10 a 35%²⁵.

A candidíase pode ser classificada em aguda, crônica ou mucocutânea. Apresenta-se como placas brancas ceratóticas ou superficiais eritematosas²⁷. A patogenicidade da candidíase invasiva deve-se ao aumento da carga fúngica devido ao uso inconsistente de antifúngicos, cirurgias recentes, traumas, uso de dispositivos intravasculares e disfunção imunológica²⁶.

Em usuários de próteses bucais, é frequente a candidíase eritematosa, condição conhecida como estomatite protética, devido a uma intensa aderência do microrganismo à resina protética^{5, 7, 28, 30} (Figura 1). A candidíase eritematosa crônica é uma forma comumente observada em cerca de 65% dos pacientes idosos que utilizam prótese total superior^{2, 27, 30}. Ela se localiza sob a base da prótese total e é caracterizada por um eritema

difuso, que pode ser homogêneo ou representado por áreas e pontos avermelhados, além de apresentar variadas alterações na textura e na superfície da mucosa palatina⁵.

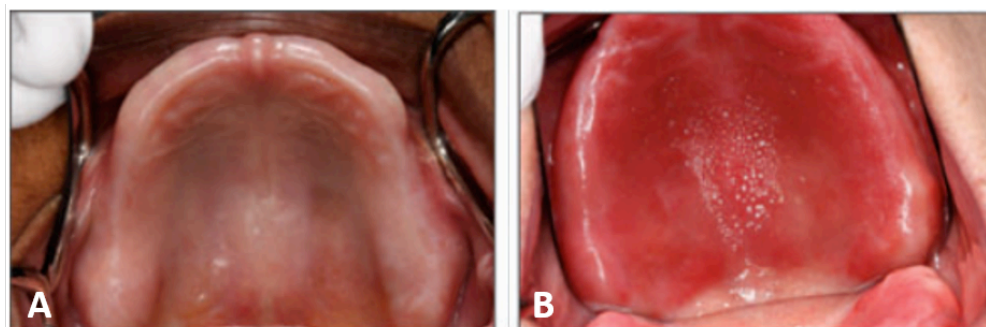


Figura 1 – Cavidade bucal de pacientes edêntulos. Em (A), Palato de aspecto normal e, em (B), palato acometido por candidíase eritematosa derivada de estomatite protética. Imagem retirada de Gendrau e Loewy (2011)³¹.

As candidíases associadas à estomatite protética não são de fácil tratamento, devido às altas taxas de recidivas^{1, 5, 6, 30, 32}, que podem ser dimensionadas em torno de 20%³², e ocorrem após a interrupção do tratamento, ainda que o trauma causado pela prótese tenha sido eliminado. Esses problemas constituem um desafio na prática odontológica atual, face à sua frequência e ao número reduzido de drogas antifúngicas disponíveis^{1, 5, 6, 29}. O tratamento da lesão consiste no uso de suspensão oral de nistatina ou creme à base de nistatina, embora o tratamento possa ser ineficiente devido ao tempo curto de contato com a lesão^{5, 27, 29}. Para evitar isso, um estudo *in vitro* com isolados de *C. albicans* usou o miconazol, verificando resistência em 17,6% dos micro-organismos analisados¹. Pacientes imunocomprometidos, ou com candidíase mucocutânea crônica, devem usar antifúngicos sistêmicos²⁷.

Paralelamente, o uso difundido e inadequado das drogas antifúngicas tem ocasionado um déficit nos resultados dos tratamentos contra candidemias. As infecções por *Candida* mais susceptíveis às drogas estão gradativamente sendo substituídas por infecções causadas por cepas mais resistentes e submetidas a seleção^{6, 29}. Dentre as espécies mais susceptíveis, estão a *C. albicans* e, entre as menos susceptíveis, estão a *C. glabrata* e *C. krusei*⁶. Alguns tipos de *Candida*, como a *C. glabrata*, estão se tornando cada vez mais resistentes aos antifúngicos de primeira e segunda linha, tais como fluconazol e equinodinas, respectivamente²⁶. Dessa maneira, a busca por terapias alternativas, tais como própolis e nanopartículas de prata, tem sido considerada para combater a resistência aos antimicrobianos^{1, 4, 30}.

1.4. PRÓPOLIS

A própolis é uma substância muito conhecida e usada desde a antiguidade por sua ação antimicrobiana, antifúngica e anti-inflamatória. É uma substância resinosa, ou algumas vezes cerosa, coletada por abelhas a partir de diferentes exsudatos vegetais^{33,34}. Tem sido utilizada na medicina tradicional desde a antiguidade devido ao seu largo espectro de atividade biológica^{35,36}.

A composição da própolis e suas propriedades físico-químicas, atividades biológicas e utilizações terapêuticas dependem da vegetação onde as colmeias estão situadas³⁷, do clima e da variedade da rainha³⁸. De uma maneira geral, a composição da própolis inclui 50% de resinas, 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de outros compostos orgânicos³⁹. Pelo menos 200 componentes diferentes já foram identificados em amostras de própolis de origens diversas. Dentre eles, encontram-se: ácidos graxos e fenólicos, ésteres e ésteres fenólicos, flavonoides (flavonas, flavanonas, flavonóis, di-hidroflavonóis), os terpenos, b-esteróides, os aldeídos e álcoois aromáticos, os sesquiterpenos e o naftaleno^{35, 40}, e C-glicosídeos³⁶. Conseqüentemente, essa composição complexa não pode ser amplamente definida de uma maneira geral e dificulta a padronização da própolis para comercialização, uma vez que, por exemplo, a variação sazonal pode diminuir ou aumentar diferentes componentes biologicamente ativos³⁷. Contudo, essa também é a principal justificativa para a grande diversidade e quantidade de estudos com diferentes amostras desse material⁴¹.

No Brasil, existem 14 tipos de própolis^{13, 14, 15}, mas as principais colorações observadas são a vermelha, a verde e a marrom¹⁶. Na própolis verde foram identificados 11 compostos fenólicos, dentre eles ácido *p*-cumárico, ácido fenílico, ácido cafeico (CAPE), ester fenílico do ácido cafeico, kaempferol, quercetina, dentre outros derivados flavonoides¹³. O CAPE é um dos bioativos mais importantes da própolis e é considerado um biomarcador¹³. Já na própolis vermelha, 14 compostos fenólicos estão presentes, tais como os isoflavonoides medicarpina, vestitol, formononetina e isoliquiritigenina de chalcone⁴². Estudos recentes com a própolis vermelha relataram a presença da vitexina e luteolina⁴³.

Nos últimos anos, a própolis tem sido o objeto de diversos estudos que destacam suas propriedades biológicas e farmacológicas, tais como antibacteriana⁴⁴, antiviral,

cicatrizante, antioxidante⁴⁵, anticárie⁴⁶, anticancerígena³⁷ e como desinfetante intracanal¹². Além disso, a própolis ainda pode agir em sinergismo com o fluconazol e o variconazol⁴⁷. Por essas razões, ela desperta interesse nas indústrias farmacêuticas, sendo introduzida em produtos para consumo humano, tais como bebidas, alimentos e produtos de higiene oral⁴⁸. O *Staphylococcus aureus*, uma bactéria que pode ser encontrada em uma forma multirresistente, frequentemente causando infecções hospitalares, já se apresentou como susceptível a extratos etanólicos de própolis^{43, 48}. Entretanto, as concentrações inibitórias mínimas estão sujeitas a variações sazonais⁴³.

Pesquisas realizadas sobre as propriedades antibióticas da própolis têm demonstrado uma eficiente atividade contra diversos gêneros de bactérias, sendo as Gram-positivas mais sensíveis aos extratos de própolis do que as Gram-negativas⁴⁴. Alguns autores testaram 19 extratos de própolis extraídos com diferentes solventes (etanol e propileno glicol) contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e observaram que não houve diferenças entre os solventes usados. Entretanto, relataram ser o primeiro estudo a revelar atividade da própolis contra bactérias Gram-negativas, tais como *Salmonella enterica* e *Helicobacter pylori*⁴⁴. Já há relatos de que extratos etanólicos de própolis são moderadamente eficientes contra os sintomas da infecção herpética³⁶. Em um outro estudo realizado *in vitro*, concluiu-se que o extrato de própolis é capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus coagulase positiva* e *Malassezia pachydermatis* oriundas de otite canina³⁴. Achados ultraestruturais observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) sugerem que a atividade antifúngica da própolis altera a parede celular desses microorganismos³⁴, rompendo-a⁴². A análise por MEV demonstrou alterações no biofilme de *Candida* pré-formado e maduro^{42, 49} bem como a eliminação das células plantônicas de *Candida* spp.⁴⁹. Os extratos etanólicos podem ainda inibir a formação da forma de hifa de *Candida* spp.⁴⁹. O uso terapêutico da própolis ainda está sendo inicialmente explorado na literatura científica⁴¹. Apesar disso, estudos afirmam que a própolis verde brasileira tem efeito similar ao gel de miconazol no tratamento da *C. albicans* em cavidade oral⁴⁹.

Em contrapartida, a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da própolis contra *S. mutans* pode propiciar seu uso no tratamento da cárie⁵⁰. A fração purificada da própolis vermelha brasileira não tem uma forte ação inibitória em biofilmes de *S. mutans*⁴⁶, embora seu extrato etanólico iniba a produção do fator de necrose tumoral, e apesar de não impedir a produção de interleucina 10⁴⁶. Além disso, pode provocar irritação na mucosa e, por esse motivo, deve ser evitado²⁹. Os extratos de própolis verde apresentam atividade

imunomodulatória, pois aumentam a quantidade de citocinas anti-inflamatórias³⁹. Em um estudo sobre a atividade da própolis no envelhecimento celular, alguns pesquisadores verificaram que extratos de própolis verde aumentaram a função imune de ratos idosos⁵¹ e a combinação de própolis verde e vermelha apresentou efeito sinérgico contra *S. mutans* e *S. sanguinis*⁹.

O fracionamento da própolis vermelha com a técnica de extração líquido-líquido e solventes orgânicos apresentou como resultado frações acetanólica, hexânica e clorofórmica. A fração acetanólica foi a que apresentou melhor atividade antimicrobiana, com eficiência de 100% de inibição de crescimento das espécies microbianas analisadas (*Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*)⁵². Em outro fracionamento da própolis vermelha empregando a mesma técnica e usando como solventes o hexano, o diclorometano e o acetato de etila, verificou-se que a fração hexânica apresenta valores de concentração inibitória mínima semelhantes aos da nistatina e do extrato bruto contra *Candida* spp.⁴². Esse tipo de própolis, oriunda dos estados de Sergipe e Alagoas, apresentou maior potencial biológico, bem como maior teor de compostos antioxidantes, quando comparados com a própolis verde e marrom³⁹.

Os métodos tradicionais para a obtenção de extratos ou frações de própolis são a destilação a vapor (com ou sem vácuo), a extração por solvente líquido, a exemplo do etanólico, cromatografia, adsorção e processo seletivo por membranas⁵³. Entre esses, o etanol é o solvente de primeira escolha, devido à sua afinidade química com a matriz⁵⁴. Outros solventes, tais como éter etílico, água, metanol e clorofórmio também podem ser utilizados para a extração de componentes específicos da própolis, com resultados variáveis^{55, 56}. Por outro lado, a extração etanólica é a mais eficiente para a obtenção de extratos com maior teor de compostos antioxidantes e atividade biológica³⁸. Com o objetivo de aumentar a concentração de componentes bioativos dos extratos de própolis e promover a reprodutibilidade dos métodos de extração, o uso do pré-tratamento com ultrassom no processo de extração da própolis tem sido proposto⁵⁷. O uso dessa tecnologia de ultrassom na extração de polifenóis de chá preto aumentou a concentração desses componentes em aproximadamente 15%⁵⁸. O pré-tratamento com ultrassom em extratos de própolis vermelha aumentou a concentração de formononetina em 60% e tornou detectável o kaempferol¹⁸.

1.5. NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As nanopartículas de Prata (AgNPs) consistem em nanoestruturas formadas a partir de íons prata, possuindo poder antimicrobiano contra bactérias e fungos⁵⁹. Entretanto os estudos sobre os efeitos de AgNPs sobre isolados orais são escassos. Já foi relatado que as AgNPs interagem com componentes da membrana, tais como oxigênio, fósforo, nitrogênio, enxofre e com grupamentos tiol⁶⁰. A ligação com o enxofre inativa enzimas e proteínas presentes na membrana⁶¹. As bactérias respondem à prata com produção de espécies reativas de oxigênio e fragmentação celular^{60, 62}, mecanismo similar ao de reações de estresse oxidativo^{60, 62}. Há relatos de nanopartículas que possuem efeito fungistático e fungicida contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*⁶³. A literatura relata que as AgNP penetram com mais eficiência na célula do que a prata isolada, e que seu mecanismo de ação ocorre através de espécies reativas de oxigênio que agem provocando a ruptura da membrana e a transformação do DNA celular⁶⁰. As AgNPs podem agir sozinhas ou em sinergismo com a sinvastatina contra espécies tóxicas de *Aspergillus* spp. na indústria alimentícia⁶¹. A atividade sinérgica também foi encontrada na associação com o fluconazol na redução do biofilme de *C. albicans*⁶⁴.

O uso de AgNPs contra *C. albicans* pode conduzir à formação de nanopartículas menores, com 6 a 8 nm de diâmetro, que foram encontradas ao redor da célula quando analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). AgNPs com aproximadamente 10 nm de diâmetro foram encontradas na parede celular, o que sugere uma liberação dinâmica de íons prata⁶⁵, os quais induzem a diminuição de compostos orgânicos da parede celular e citoplasma. Partículas de 35 ± 10 nm também demonstraram atividade contra *C. albicans* com concentrações inibitórias mínimas (MIC) variando de 0,11 a 1,75 μ g/mL, e também contra *P. aeruginosa*, com MIC de 0,28 μ g/mL⁶⁶.

As nanopartículas de prata podem ser obtidas por síntese sustentável a partir de lignina sódica obtida do extrato de laranja (*Citrus sinensis*)⁹, ou por síntese fúngica extracelular a partir de *Fusarium oxysporum*^{9, 61, 66} ou *Aspergillus tubingensis*^{65, 67}. Na primeira modalidade, apresenta distribuição unimodal de tamanhos, morfologia esférica, diâmetros médios de $19,1 \pm 4,7$ nm e potencial zeta negativo de $-28,5 \pm 3,2$ mV⁹. Ou ainda elas podem ser obtidas através da incorporação à matriz do polímero carbopol, usando-se um método de redução química que permite o controle do tamanho das partículas⁶⁸. A síntese fúngica extracelular é a forma mais comum de obtenção de AgNP e apresenta

algumas vantagens, tais como facilidade na purificação, no processamento e no controle do tamanho das partículas e alta reprodutibilidade; contudo o processo é demorado. Já a síntese a partir de *Fusarium oxysporum* é a metodologia mais estudada e consiste na redução da prata por uma redutase dependente de nitrato e um transportador extracelular de quinona^{9,67}. A produção de nanopartículas a partir do *F. oxysporum* gerou partículas com e sem cápsula de proteínas, essa última com menor estabilidade. Essa diferenciação acontece devido a um pré-tratamento com água e álcool. As partículas pré-tratadas seriam menos citotóxicas, mais bactericidas e fungicidas⁶⁵. As proteínas envolvidas na estabilização e na formação das nanopartículas de prata compõem vias metabólicas fúngicas⁶⁸ e são conhecidas como proteínas corona⁹. Entretanto, apesar de as proteínas corona interferirem na morfologia, no tamanho e na estabilidade das nanopartículas, não houve alterações na atividade antibacteriana dependente desse parâmetro⁹. Estudos recentes demonstraram que o efeito dos AgNPs nas bactérias depende, principalmente, do tamanho das partículas. Tamanhos ultrapequenos (1-3nm) ou pequenos (3-10 nm) têm interações diretas com bactérias e micro-organismos⁶⁹. As nanopartículas de prata foram capazes de inibir a proliferação de bactérias Gram-negativas e positivas mais eficazmente que a gentamicina⁶⁵. Quando esse biomaterial é adicionado a materiais endodônticos, há aumento de rigidez, microdureza e menor porosidade, resultando em aumento da resistência total⁵⁹. Nanopartículas de quitosana, quando adicionadas a superfícies acrílicas (resinas de próteses), causam pequenas mudanças na dureza e rugosidade, embora reduzam significativamente a formação do biofilme de *Candida* spp.⁷⁰.

O crescente aumento da utilização de nanopartículas de prata expõe os seres vivos e o meio ambiente a riscos que ainda não são completamente conhecidos. Pequenos ruminantes, quando tratados com pasta de AgNP, apresentaram cicatrização duas vezes mais rápida que o grupo de controle, sem qualquer efeito colateral para os animais e com níveis mínimos de íons prata no soro dos animais tratados, não estatisticamente diferente do grupo de controle⁷¹. Genotoxicidade em cultura de células 3T3 e linfócitos humanos foi encontrada nas concentrações de 5 a 10µg/mL⁷³. Entretanto, em baixas concentrações (0,5 a 4,35 µg/mL), as AgNPs não são tóxicas aos seres humanos^{11,64,72,73}, independentemente de pré-tratamento⁷².

Neste trabalho, foi avaliado o poder antimicrobiano de extratos de dois tipos de própolis (verde e vermelha) obtidos por extração etanólica com e sem pré-tratamento com ultrassom, e de nanopartículas de prata em 20 amostras de *C. albicans* extraídas de

pacientes com estomatite protética e em cepas referência. Em seguida, foram analisadas as membranas fúngicas de *Candida* spp. tratadas com as AgNP por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), buscando encontrar possíveis lesões.

2. JUSTIFICATIVA

A infecção por *Candida albicans* presente na estomatite protética é altamente recidivante. As metodologias atuais de tratamento das candidíases eritematosas são desafiantes, face às altas taxas de recidivas que ocorrem ainda que o trauma causado pela prótese tenha sido eliminado. Assim, devido ao baixo custo e ao poder antimicrobiano e anti-inflamatório já demonstrado pela própolis e por nanopartículas de prata, é pertinente verificar a ação desses compostos sobre isolados de *Candida* spp. de origem bucal.

3. HIPÓTESE

Candida spp. é susceptível à ação de extratos de própolis vermelha e verde e de nanopartículas de prata, já que esses compostos induzem mudanças na superfície fúngica.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

Avaliar os perfis de susceptibilidade e (ou) resistência de isolados bucais de *Candida* spp. associados ao uso de próteses perante extratos de própolis, com e sem pré-tratamento ultrassônico, e nanopartículas de prata, bem como o efeito dessas nanopartículas sobre a superfície fúngica.

4.2. ESPECÍFICOS

– Determinar os perfis de susceptibilidade e resistência de diferentes cepas referência e isolados orais de *Candida* spp. frente a antifúngicos comerciais.

– Avaliar os perfis de susceptibilidade de extratos de própolis vermelha e verde, pré-tratados ou não com ultrassom em diferentes cepas referência e isolados orais de *Candida* spp.

– Avaliar os perfis de susceptibilidade a nanopartículas de prata em diferentes cepas referência e isolados orais de *Candida* spp.

– Verificar a ação fungicida dos diferentes extratos de própolis e de nanopartículas de prata nas diferentes cepas referência e isolados orais de *Candida* spp.

– Determinar os perfis de dose-resposta das cepas e isolados de *Candida* spp. frente aos antifúngicos comerciais, aos diferentes extratos de própolis vermelha e verde, pré-tratados ou não com ultrassom, e às nanopartículas de prata.

– Verificar a ação de nanopartículas de prata sobre a superfície fúngica.

5. METODOLOGIA

5.1. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto está de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS número 466 de 2012, e na Norma Operacional número 001 de 2013 do CNS, e foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde (CEP/ICS) sob o parecer de número 2.118.563.

5.2. CEPAS FÚNGICAS

Foram utilizados, neste estudo, isolados de *Candida* spp. obtidos de 20 pacientes voluntários portadores de estomatite protética, os quais concordaram em participar da pesquisa e assinaram termo de consentimento (TCLE), atendidos na clínica-escola da UNIME Salvador. Além dessas amostras, foram utilizadas cepas referência mantidas no IOC-FIOCRUZ de identificação IOC 2508 *Candida albicans* (Robin) Berkhout, IOC 2519 *Candida albicans* (Robin) Berkhout, IOC 3703 *Candida albicans* (Robin) Berkhout, IOC 3704 *Candida albicans* (Robin) Berkhout, *Candida glabrata* CG74, *Candida tropicalis* CT319, e *Candida parapsilosis* CP310.

5.2.1 Coleta de amostras fúngicas

As amostras foram coletadas por um cirurgião-dentista habilitado, com inscrição no Conselho Regional de Odontologia, através de “swabs” na área que apresentava estomatite, em 20 pacientes atendidos na clínica-escola da UNIME Salvador, e eluídos em solução salina estéril, sendo depois concentrados por centrifugação a $2.000 \times g$ por 10 minutos. O sedimento obtido foi submetido ao exame microscópico e semeadura em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose¹⁹.

5.2.2. Identificação das cepas e dos isolados

A caracterização das cepas de *Candida* spp. foi realizada através de cultivo em meio CHROMOagar, além da identificação molecular. A extração de DNA, a metodologia de PCR e de sequenciamento dos isolados foram feitas utilizando-se o kit FastDNA Spin Kit (Mp Biomedicals, Solon, OH, USA). O PCR foi feito utilizando-se os primers ITS4

(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') para amplificação da região interna transcrita completa⁷⁴, LROR (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') e LR7 (5'-TACTACCACCAAGATCT) para amplificação da região codificadora da porção maior do RNA ribossomal (nuc-lsu) (Vilgalys Mycology Lab – Duke University | Duke Mycology. 2019). As reações de PCR foram realizadas usando-se Quatro G Taq DNA Polimerase em um volume final de 50 µL, contendo 10 µl do Quatro G buffer, 3,0 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de DNTPs (10 mM), 1 µl do forward primer (10 pmol), 1 µl do reverse primer (10 pmol), 1 µl de DMSO, 1,5 µl de BSA (1 µg/µL), 5 µL de betaína (5M), 0,2 µL Taq 5U/µL), 24,8 µL de água estéril e 1 µL do DNA template. As condições programadas no termociclador foram: 2 min a 94 °C, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C, e uma extensão final de 5 min a 72 °C. A purificação dos produtos de PCR foi feita utilizando-se um protocolo de precipitação com etanol/EDTA 125 mM. O sequenciamento foi feito em um sequenciador ABI 3730 (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA). As amostras consenso foram submetidas ao Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para comparação e identificação por análise de similaridade com banco de dados de sequências nucleotídicas do GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

5.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA

5.3.1 Metodologia de extração etanólica do extrato de própolis verde e vermelha

A própolis foi extraída por metodologia etanólica convencional de baixa pressão (extração convencional) no SENAI/CIMATEC e cedida para uso neste trabalho. Os extratos etanólicos das própolis vermelha e verde foram preparados com a adição de 15 ml de etanol (80%) a 2 g de própolis. A extração ocorreu a 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, o extrato foi centrifugado a 8800 rpm, durante 11 min, a 5°C. No final da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um copo de 50 ml, e 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

ficarem completamente secos. Posteriormente, os extratos foram armazenados em tubos cobertos com folha de alumínio, em condições atmosféricas inertes para evitar a degradação do material. O material foi mantido em 4°C até a análise^{13,37}.

5.3.2 Obtenção de extrato de própolis verde e vermelha com pré-tratamento por ultrassom

Tendo como base a metodologia descrita na literatura¹⁹, 2 g de própolis foram homogeneizadas em etanol a 80% (25 mL) e colocadas em sonicador (50-60 Hz, 135 W RMS – Quimis, Brasil), por 20 minutos, a 50°C. Ao final do processo, as amostras foram mantidas ao abrigo da luz por um período de 7 dias, com agitações periódicas e manuais. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 5.000 \times g por 11 minutos, e o sobrenadante obtido foi filtrado em papel filtro e posteriormente seco a 45 °C em estufa com circulação de ar (Quimis, Q314M222, Brasil).

5.4 SÍNTESE DAS AGNPs

A biossíntese e a caracterização das AgNPs cedidas para este estudo foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, conforme protocolo descrito pelos autores⁶⁹. A produção das nanopartículas de prata foi realizada pelo método biossintético. Resumidamente, o fungo *Fusarium oxysporum* (cepa 551), procedente da coleção de culturas do Laboratório de Genética Molecular da ESALQ-USP (Piracicaba), foi cultivado em placas de petri e em meio de cultura sólido (0,5 % extrato de levedura/Neogen) com 2 % de extrato de malte (Neogen), 2% ágar (Neogen e água destilada), e mantidos a 28°C por 7 dias em shaker. Após o crescimento do fungo, à biomassa produzida foi adicionada água destilada autoclavada (0,1 g/ mL massa de fungo/volume de água) sob agitação, por 72 horas. Após filtração a vácuo (papel de filtro 9,0 cm diâmetro, 80 gm⁻² gramatura, 205 µm espessura, 14 µm de poros), foi adicionado ao filtrado do sobrenadante fúngico AgNO₃ 10⁻² mol/L, e o sistema foi mantido a 28°C sob proteção da luz. A formação das AgNPs foi acompanhada em um espectrofotômetro (Varian/Agilent Cary 50 Probe), em um intervalo de 220 a 800 nm.

5.4.1 Caracterização das Nanopartículas de Prata

A caracterização de AgNPs foi realizada através da utilização de técnicas espectroscópicas, microscópicas e espalhamento dinâmico de luz. A morfologia das AgNPs foi observada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia de Força Atômica (AFM). O diâmetro médio das nanopartículas e o índice de polidispersividade foram determinados por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS). O diâmetro das nanopartículas, medido por TEM, foi igual a $28,0 \pm 13,1$ nm. Observaram-se partículas esféricas, relativamente homogêneas e praticamente monodispersas (índice de polidispersividade igual a 0,27, medido por DLS), sendo esse resultado também obtido por AFM. Uma camada relativamente homogênea e esbranquiçada (diferente do contraste) foi encontrada ao redor das partículas; acredita-se que sejam proteínas secretadas pelo fungo, as quais estabilizam essas partículas. A carga superficial das nanopartículas também foi avaliada, sendo obtido um valor de potencial zeta negativo ($-31,7 \pm 2,8$ mV). A presença de carga na superfície da partícula, juntamente com a presença de proteínas ao redor dela, confere-lhe uma alta estabilidade, sem qualquer evidência de ocorrência de aglomeração. A composição superficial das AgNPs foi avaliada por Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X (XPS) e revelou a presença de elementos como C, O, Ag e N em maiores quantidades, e P, Cl e S em menores quantidades⁷³.

5.5. ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

A concentração inibitória mínima (CIM) consiste na concentração mínima da substância testada capaz de inibir o crescimento do micro-organismo de interesse, podendo 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 com uma suspensão padronizada do micro-organismo 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 (CFM), que é a mínima concentração de extrato que mata o micro-organismo⁷⁵.

Para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM), as seguintes concentrações foram testadas: fluconazol (0,125 a 64 $\mu\text{g/mL}$), nistatina (0,313- 16 $\mu\text{g/mL}$), itraconazol (0,0313 a 16 $\mu\text{g/mL}$), cetoconazol (0,0313 a 16 $\mu\text{g/mL}$), anfotericina B (0,0313 a 16 $\mu\text{g/mL}$), extratos de própolis verde, vermelha e marrom etanólicos (0,015 a 8 $\mu\text{g/mL}$) e AgNP (1,95 a 1000 $\mu\text{g/mL}$). Os inóculos foram preparados em solução salina estéril, com uma concentração de células entre 0,09 a 0,11 de absorbância, e mensurados por espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm. Esse procedimento criou suspensões com concentração de aproximadamente 1×10^6 a 5×10^6 células/ mL, escala n° 0,5 de McFarland. O inóculo foi diluído 1:50 em solução salina e depois 1:20 em meio de cultivo (RPMI 1640/MOPs). Microplacas estéreis de 96 poços foram usadas para a realização do teste. Em cada poço, foram inoculados 100 μL do antifúngico na concentração 2X de teste, diluídos em meio de cultivo, e 100 μL do inóculo, cuja concentração final foi então de 1×10^3 a 5×10^3 UFC / mL. Os cálculos propostos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M27-A3, foram utilizados para a obtenção da CIM e da CFM⁷⁵. O tempo de contato entre os microrganismos e as soluções antifúngicas foi de 48 horas. A inocuidade do extrato foi avaliada diluindo-o em caldo RPMI 1640. Os controles de esterilidade e viabilidade do inóculo foram realizados de acordo com o protocolo citado anteriormente. Em todos os momentos, foram testados controles negativos sem adição de inóculo e com adição do diluente, e controle negativo com o meio adicionado da respectiva concentração de própolis⁷⁵.

5.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As cepas fúngicas, antes e após exposição às AgNP, foram analisadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura, para verificação de possíveis alterações morfológicas. O preparo das amostras foi realizado Laboratório de Química Biológica do Instituto de Química da Unicamp, seguindo-se a metodologia anteriormente descrita⁶⁹. Para tanto, foram usadas culturas fúngicas com e sem tratamento com as AgNP e em condição subótimas (metade da MIC₁₀₀). Tais culturas foram depositadas em uma membrana com poros de 0,45 μm , 25 mm PTFE (Millipore[®]), fixadas com glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio (PBS) 20 mM em pH 7,2. Seguidamente, a membrana foi lavada duas vezes com PBS pH7,4. A membrana foi embebida em tetróxido de ósmio 0,9% por 1 hora e lavada 2 vezes em água destilada. Em seguida, iniciou-se o processo de

desidratação com a imersão da membrana em etanol 30% por 20 minutos, 50% por 20 minutos; 70% por 16 horas; 90% durante 20 minutos e três vezes em etanol P.A. por 20 minutos. A secagem foi realizada em um Secador de Ponto Crítico (CPD) (Balzers[®] CPD-0.30), realizada a marcação com ouro (Sputter Coater SCD-050), e, finalmente, as análises foram feitas em um microscópio eletrônico de varredura (Jeol[®] JSM 5800LV)⁶⁹.

Os artigos a seguir apresentados se originaram de protocolo experimental que inclui:

1. revista literária;
2. obtenção de amostras;
3. preparo do inóculo fúngico;
4. microdiluição em caldo;
5. Microscopia Eletrônica de Varredura.

ARTIGO 1: Propolis: Types, composition, biological activities and veterinary products patent prospecting (submetido ao Journal of the Science of Food and Agriculture, fator de Impacto JCR 2,603, Qualis A2 Comitê Interdisciplinar)

ARTIGO 2: Antifungal Activity of Ultrasound-Pretreated Brazilian Red and Green Propolis Extracts Against Oral Isolates of *Candida* spp. (submetido ao Journal of Apicultural Research, fator de impacto JCR 1,015, Qualis B1 Comitê Interdisciplinar)

ARTIGO 3: Activity of biogenic silver nanoparticles on *Candida* spp. oral isolates (a ser submetido ao Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, fator de impacto JCR 6,5, Qualis A1 Comitê Interdisciplinar)

6. ARTIGOS

6.1 ARTIGO 1

Periódico: The Journal of the Science of Food and Agriculture

Ano de Submissão: 2019

Propolis: Types, composition, biological activities and veterinary products patent prospecting

**Laerte M. Santos¹, Ana Rita Sokolonski², Maísa Santos da Fonseca², Kathleen R. Deegan³, Roberto P. C. Araújo², Marcelo A. Umsza-Guez⁴, Ricardo D. Portela¹,
Bruna A. S. Machado^{5*}**

¹ Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil, 40110-100

² Programa de Pós-graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil, 40110-100

³ Serviço de Animais Silvestres, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil, 40170-110

⁴ Departamento de Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil, 40110-100

⁵ Instituto de Tecnologia em Saúde, Faculdade de Tecnologia, SENAI/CIMATEC, Salvador, BA, Brazil, 41650-010

Running title: Propolis use in veterinary products

***Corresponding Author:** Ph.D. Bruna A. S. Machado.

Abstract

The use of natural products, such as propolis, is considered as a promising alternative conventional antibiotic therapy. Propolis are resinous substances composed by a mixture of different plants parts and molecules secreted by bees (*Apis mellifera* L.). Chemically, propolis is defined as a complex matrix containing biological active molecules with antibacterial, antifungal, antiviral, antiparasitic, hepatoprotective and immunomodulatory activities already described. Propolis is widely employed in cosmetic formulations and pharmaceutical products, being one of the most used natural products. However, such effects and the strength of these biological activities depends on the chemical profile and composition of each propolis type. This composition is associated to the local flora diversity, place and period of collection, as well as the bee's genetic background. In this context, the objective of this review is to investigate biological, chemical and microbiological properties of propolis. Besides this, a technological prospection on patents of products designed to be used in animal health were performed. Our investigation showed that the literature has diverse studies dedicated to compare and describe the composition and therapeutic properties of propolis. In addition, these studies demonstrate the biological potential use of propolis in human and veterinary medicine, showing the applications of propolis extracts in different formulations. However, there is a low number of propolis-based veterinary products with registered patent. Thus, the development of products based on propolis extracts is a promising market to be exploited.

Keywords: *Apis mellifera*, Antimicrobial Drugs, Propolis, Intellectual Property, Patent Prospection, Phytotherapeutics

1. INTRODUCTION

The global market of products derived from plants is estimated in US\$ 83 billion per year and it is a field in large expansion¹. World Health Organization (1) also estimates that 70 and 95 % of the population of development countries use natural products as a therapeutic alternative. The development of new products from natural origin is encouraged, since only 15 % of approximately 300,000 plants species around the world had its pharmacological potential evaluated². Considering that the majority of the commercial medical compounds available in market are derived from plants species, researches in this area show an enormous potential in the discovery of new compounds with biological properties³.

Propolis is defined as a balsamic and resinous beekeeping product with a complex and variable chemical composition, and considered a matrix with high biotechnological potential. This potential is associated to its biological properties, showing to be able to control pathogenic and opportunistic microorganisms^{4,5}. Diverse studies have showed different biological properties of propolis extracts like as an antioxidant⁶, antimicrobial⁷, antiviral⁸, antiparasitic⁹, antitumor¹⁰, immunomodulatory¹¹, anti-inflammatory¹² and hepatoprotective agent¹³.

Brazilian propolis is highly valued in the international market and due to its beneficial effects on health is increasingly gaining commercial importance^{14,15}. Several researchers have already investigated the chemical and molecular composition and biological properties of different kinds of propolis. In this context, this review identifies recent studies about the use, biotechnological potential and benefits of propolis in

veterinary medicine, and appoints the main potential markets and the technological evolution of propolis-based products by a prospective study in patent databases.

2. METODOLOGICAL ASPECTS

Information gather was performed in scientific papers and patents data bank. The scientific papers and patents related to propolis and veterinary medicine were selected and its information were organized in text and tables format. Patents were separated by the following criteria: application area, application date and country of origin. These criteria permitted the mapping of the evolution of annual protection of products containing propolis on its formulation as well as countries that has such documents on its official patent offices.

2.1 Research in data bank for scientific reports

Scientific report searches were performed in the following data banks: Science Direct, Wiley Online Library, Plos One and Scielo (Scientific Eletronic Library Online) using a keyword combination covering the proposed theme of this review. Papers that had descriptions of biological properties and chemical composition of propolis extracts or that demonstrated some potential application of the compound in veterinary medicine products were included in this review.

2.2 Research in data bank for patents data

The search for protected technology and patent documents of products containing propolis on its formulation was performed using Thomson Innovation[©] tool, through the ‘Smart Search-Topic’ option. The keywords used to filter documents in the data banks

were: propolis, animals, formulations, veterinary, cytotoxic, antimicrobial, activity, antioxidant, pharmaceutical, therapeutic and medicine. Thomson Innovation[®] data base comprises a compilation of patent documents collection from all over the world. The search was limited to the presence of the listed keywords in the titles and/or abstracts of the documents in the selected data bases.

Graphical images were obtained using the Thomson Innovation[®] platform. Data gathering was performed in September 2018. World Intellectual Property Organization (WIPO) determinates that patent applications, in general, are published 18 months after filing date. Thus, patents accessed in this study had documents submitted 18 months before September 2018.

The analysis of the patent documents was performed separating documents by year of deposit, inventors and applicants, country of origin and Patent Cooperation Treaty code (PCT). PCT is part of the International Patent System and helps applicants to get international protection to its inventions¹⁶. In this review, the term “patent document” includes both submitted and granted patents. The analysis procedure about protected technology and therapeutic products of veterinary interest containing propolis on its composition was performed by reading each document found in the search. The relevant information on each document was extracted and discussed in this review.

3. PROPOLIS

3.1 Definition and historic use of propolis

Propolis is a resinous substance, sometimes with a waxy aspect, produced by bees (*Apis mellifera*) using different plants exudates¹⁷. Enzymes and salivary secretions from bees are added to plants exudates, and this complex compound is used by bees to protect

them against other insects, pathogenic and opportunist microorganisms, and to repair hives¹⁸. In general, propolis composition consist of 50 to 60 % resins and balsams, 30 to 40 % wax, 5 to 10 % essential oils, and 5 % pollen, microelements and vitamins^{19,20}. The word propolis is originated from Greek (“pro” - ‘in front’ or ‘in the entrance’, and “polis” - ‘community’ or ‘city’), in a reference to the main function of propolis in hives protection^{21,22}.

For centuries, humanity have noted the production of propolis by bees and learned to use this resinous substance²³. Egyptians, Greeks and Romans reported the biological properties of propolis in lesions healing and corpses embalming²⁴. Aristotle, Pliny and Galen described some medicinal properties of propolis and its use as antiseptic and healing agent in several lesions treatment. At the Medieval period, propolis was used mainly by Arabians physicians. New World civilizations, as Incas, had used propolis as an antipyretic. Since the 18th century, London pharmacopeia list propolis as an official drug. Between the 17th and 20th centuries, propolis became very popular in Europe due its antibacterial activity. At the Second World War, propolis was used as an antimicrobial anti-inflammatory agent²⁵⁻²⁷.

This resinous matrix is actually used in cosmetic, food and pharmaceutical products formulations, being one of the more known and used natural products^{28,29}. Propolis can be found in capsules, mouthwash, lotions, throat pastilles, powder and also in products wax-free to improve manipulation and use³⁰.

Recently, considering the veterinary medicine field, propolis have been used in many different applications, such as a cicatrizing promoter in horses³¹ and dogs³², to improve protein metabolism in dairy cows’ rumen³³, to inhibit the growth of buffalo rumen’s ciliate protozoas^{34,35}, to increase milk quality of cows as a food supplementation^{36,37} and to protect mammary bovine epithelial cells against pathogens³⁸.

3.2 Propolis Types

In Brazil, 14 types of propolis are described, classified according to its botanic origin, physical-chemical properties and geographic localization. All 14 Brazilian propolis are distributed in three regions: five propolis are found at the South region, one at the Southeast region, and eight at the Northeast region³⁹⁻⁴¹.

Green propolis has its mainly botanic source on *Baccharis dracunculifolia* DC, popularly known as “wild rosemary”, from the Asteraceae family. This plant is native from Brazil and is found mainly in southeast region. Teixeira et al. (42) described that *Apis mellifera* Africanized bees are capable to fragment and manipulate sprout and leaves of wild rosemary, obtaining as a final product a green resinous substance.

Brown propolis is found in several Brazilian and Cuban regions^{19,43-46}. Its botanic source is highly variable, being originated from *Luehea* sp., *Piptadenia falcata*, *Tabebuia* sp. (ipês), *Tabebuia caraiba*, *Vernonia* sp. and *Cecropia pachystachya*⁴⁷.

Red propolis was recently discovered in Brazil Northeast, being also reported in Cuba^{48,49}, Mexico⁵⁰, China⁵¹ and Venezuela⁵². *Apis mellifera* bees collect red resinous exudates at the surface and the branch orifice of *Dalbergia ecastophyllum*. Red propolis collected by *A. mellifera* is found in bee hives localized in evergreen and woody shrubs near from the sea shore and river banks in Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco and Paraíba Brazilian States⁴⁰.

Another coloured propolis kind, yellow propolis, was found in Brazil^{19,39}. Cuesta-Rubio et al. (53) classified the Cuban yellow propolis according to its secondary metabolites.

3.3 Chemical Composition

As propolis is a complex mixture of different molecules, its chemical analysis is difficult. In addition, the composition of this resinous substance vary within the flora of each region, period of year when the collection is made, and also depends on the bee's genetic background, which results in a marked diversity in different propolis chemical profiles^{28,54}. Recent researches on propolis are focused in aqueous and ethanolic extracts, since they are widely applied on therapeutic applications⁵⁵. In general, propolis composition includes 55 % resins and balsams, 30 % wax, 10 % pollen and secondary metabolites^{56,57}. Propolis are considered one of the most heterogeneous natural substances, being that it were already identified and/or characterized more than 300 molecules on its composition²⁸. From these 300 components, it can be listed the presence of fatty and phenolic acids, esters, phenolic esters, flavonoids (flavones, flavanones, flavonols, dihydroflavonols), terpenes, β -steroids, aromatic aldehydes and alcohols, sesquiterpenes and naphthalene^{22,24,58}.

Green and red propolis are the most studied types of propolis and present some differences on its chemical profiles. In green propolis, it were identified 11 phenolic compounds, such as p-coumaric acid, phenilic acid, caffeic acid, kaempferol, quercetin, artepillin C^{8,59,60}. Beside this, green propolis contain sesquiterpenes as its predominant components and a compound with high interest due its cytotoxic properties, benzofuran²⁸. Artepillin C or 3,5-diprenil-4-hydroxicinamic (DHCA) is the main component of interest in Brazilian green propolis. This substance was firstly isolated by Aga et al. (61) and presents antimicrobial, anticancer and antioxidant activities⁶². In red propolis, fourteen phenolic compounds are described, such as isoflavanoids, medicarpin, vestitol, formononetin, isoliquiritigenin⁶³ and benzophenones^{64,65}. Recent studies with red propolis reported the presence of vitexin and luteolin in its composition⁶⁶.

Brown propolis presents several phenolic compounds, such as nemerosone, a polyisoprenylated benzophenone found in the resin of *Clusia rosea* flowers. Another compound found in brown propolis, chlorogenic acid, indicates the use of *Citrus* plants in brown propolis production⁵⁸. Acetophenones and diterpenes also were identified in brown propolis, being found in the *Araucaria* genus²¹.

Regarding yellow propolis, few studies assessing its chemical composition were performed. Márquez-Hernández et al. (67) reported that Cuban yellow propolis are rich in triterpenic alcohols, polymethylated flavonoids, lanosterol, β -amyrone, β -amyrin, germanicol, lupeol, cycloartenol, 24-methylene-9, 19-cyclolanostan-3 β -ol, amyirin α -acetate and lupeol acetate, through a qualitative and quantitative study performed using GC-MS and 19 different samples. Brazilian yellow propolis demonstrate a chemical profile similar to Cuban yellow propolis^{19,68}. A description of the main molecules found in different types of propolis and its respective biological activities for are in **Table 1**.

4.0 BIOLOGICAL ACTIVITIES

4.1 Antibacterial Properties

The antimicrobial activity of propolis is largely studied in the scientific literature, being characterized by its bactericide and bacteriostatic effects in many bacterial species, including those presenting resistance to conventional antimicrobial drugs. In **Table 2** several studies are listed which reported the susceptibility or resistance of Gram-negative and Gram-positive bacteria to different propolis extracts. Propolis extracts were obtained using different solvents, such as ethanol, methanol, and acetates. It is noteworthy to say that many of them were obtained using eco-friendly technologies, such as the supercritical fluid extraction.

4.2 Antifungal Activities

The propolis use as an alternative therapy against fungi is being considered as an alternative, since there is a low number of available commercial antifungal drugs, there is an increase in the resistance and dose-dependence presented by many clinical isolates (a most common finding when considering the azoles class), and there is a significant high cost associated to the long treatment and adverse effects of commercial antifungal drugs^{83,84}. **Table 3** presents information on antifungal activity (fungicide or fungistatic) of different propolis extracts in different fungi species frequently isolated in the veterinary clinical routine, such as *Malassezia pachydermatis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Microsporum canis* and other. These studies used different types of propolis extraction solvents, such as ethanolic^{63,7}, DMSO⁸⁴, propylene glycol⁸⁵ and methanol⁸⁶.

4.3 Wound healing and anti-inflammatory activities

The inflammatory process is complex and present different mechanisms at its acute or chronic phase. Artepillin C is the main component of Brazilian green propolis and showed anti-inflammatory effects in the acute phase by the decrease of prostaglandin E levels and in the synthesis of NF- κ B-mediated nitric oxide in mice⁵⁹ and in microglial cells⁹⁴. Other inflammatory parameters as macrophage and neutrophil recruitment and TNF production were inhibited after a 4-days treatment with a green propolis extract rich in caffeic acid esters, originated from the Brazilian South region⁹⁵. An increase in the macrocytic efficiency was observed in mice experimentally infected with *Leishmania amazonensis* after a 30 days-treatment using Brazilian propolis and a nitric oxide donor⁹⁶.

Artepillin C was described regulating inflamossomes and proteic complexes associated to the activation of the innate immune system-mediated inflammatory process by a IL-1 β decrease in mice macrophages¹². IL-1 β reduction also was present in microglial cells after a treatment with green propolis ethanolic extracts⁹⁴. Tanaka et al. (97) suggested that the daily ingestion of propolis ethanolic extract by mice can regulate the production of pro-inflammatory cytokines.

Red propolis has in its composition a compound named neovestitol, which is able to inhibit neutrophil migration, leukocyte adhesion and ICAM-1 expression during the inflammatory acute phase⁹⁸. However, at the chronic phase, no changes at IL-17-producing TCD4+ cells counts were seen; indeed, in the same study, neovestiol reduced arthritis clinical symptoms after a 10 mg/Kg daily administration. In other hand, a study with mice showed that the treatment with an ethanolic extract rich in Artepillin C was able to reduce IL-17 producing lymphocytes in the chronic inflammatory phase⁹⁷. The evaluation of the wound healing process showed better results for green propolis than for red propolis, suggesting that, besides red propolis has a higher flavonoid contend, this was not sufficient to induce a rapid and successful wound healing, and that green propolis may have compounds that are highly active in this process⁹⁹.

4.4 Antitumor Activity

The propolis' antitumor activity is widely studied. Three propolis types are known to have different anticancer compounds: caffeic acid phenethyl ester (CAPE), present in propolis from Europe, Extreme Orient and New Zealand; artepillin C, from green Brazilian propolis¹⁰⁰, and benzophenone, found in red Brazilian propolis^{64,100}.

Angiogenesis is a limiting factor in tumor development and the use of a rich-caffeic acid green propolis showed angiostatic effects against retinopathy in a murine model¹⁰¹.

The angiogenesis suppression by the blocking of the PAK1 enzyme signalization promoted by Artepillin C was already described¹⁰². In chicken embryos, angiogenesis inhibition was also observed⁹⁵ and vasculogenesis regulation was observed after the treatment with aqueous and hydro alcoholic propolis extracts¹⁰⁴. The proliferation of human cancer cells was inhibited by the regulation of cyclins D1 and B1, cyclin-dependent kinase (CDK) and p21 enzyme expression¹⁰⁴.

Prostate cancer cells resistant to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), when treated with a combination of TRAIL and Artepillin C, presented an increase in apoptosis and in the antineoplastic activity, when compared to TRAIL and Artepillin C separately used¹⁰⁵. Other combined treatment study using propolis and temozolomide (TMZ) presented a synergic anti-proliferative effect against glioblastoma human cells lines¹⁰⁶. Artepillin C and whole green propolis extract completely inhibited the growth of human neurofibromatosis-associated tumor xenografts in mice¹⁰⁰. Cucurbitacin I, a compound also found in bitter melon, shows a better potential to inhibit PAK1 and melanogenesis than Okinawa propolis¹⁰². Ethanolic extracts of red propolis also were able to exert cytotoxic effect in different tumoral lines^{107,108} and to induce apoptosis by caspase activation¹⁰⁷.

Propolis therapy have been considered as a safety alternative treatment. No toxic effects of green propolis ethanolic extracts, such as mutagenic activity^{109,110}, histopathological changes in a long-time use¹⁰⁹ and genotoxic potential^{24,110} were observed until now.

5 TECHNOLOGICAL PROSPECTION

The global interest in propolis research is related to its biological properties, being widely associated to the already described propolis phenolic compounds. Propolis is

commonly used in human and animal medicine, cosmetic production and food preservation, being a high earned value product. Toreti et al. (111) reviewed prospected general products that use propolis on its formulation, and observed a high number of scientific reports (3,800 publications) when compared to the number of patents documents (2,884 filed patents). These authors also observed that the number of filed patents had a considerable increase after 2000 decade. This prospection study analyzed 533 patents documents of products containing propolis on its formulation with a potential use in veterinary medicine (**Figure 1**). Our results showed that the first patent with this characteristic was filed in 1992 and, in 2011, the number of patents filing reached a peak. In addition, in 2001, 2002, 2012 and 2014, a significantly number of patents filing occurred. However, an irregularity in the filing of patents for veterinary use can be noted, a situation not observed in in patents filed for propolis-based products for human medicine¹¹². This situation can be explained by a more intense focus by the researchers and companies on human health. In this way, the veterinary medicine field is an area open to be exploited regarding propolis application.

Figure 2 presents the year of expiration of patents documents according to the protection period of each country. Of 533 patents documents, it was not able to determine the expiration year of 160 through our search methodology, mainly because of the unavailability of data. However, of 473 patent document records accessed, 2015, 2017 and 2022 are the years with more loses of exclusivity rights. Loss of products rights exclusivity generate disadvantages to patent filing companies, such as productivity decline in research and development, increase in commercialization costs and gain decrease. However, loss of exclusivity stimulates the price reduction of drugs and the innovation at the development of new products¹¹³.

The number of patent documents classified by the country or international organization of filing was also evaluated (**Figure 3**). These results showed that China possess the majority of patents filings, with 198 patents, representing 37% of all the filed patents analyzed. Propolis consumption around the world is estimated to be 700 to 800 tons per year, and China is considered the major global propolis producer, followed by Russia and Brazil¹¹⁴. This high propolis production, associated to the authorization of propolis use in human medicine and its inclusion in the Chinese Pharmacopeia¹¹⁵ probably contributed to this Chinese preponderance in patents filing of products having propolis in its constitution.

The second place is represented by the USA, with 101 patents (19%). However, the study performed by Toreti et al. (111) found that China, Russia and Japan are the three countries with the highest number of patents documents for propolis products (not specific for veterinary products). A study observed that this American high number of propolis-based products can be related to the high value and optimal commercial condition of the biopharmaceutical companies from the USA¹¹⁶. Thus, the presence of the USA between the main patent filing countries could be explained by the innovation-related success of many American pharmaceutical companies, since a high number of filed patents were from wealthy companies¹¹⁶. Other important factor is the crescent pet market at the USA, since, according to the American Pet Products Manufacturers Association¹¹⁷, 68% of American residences have a pet, a condition that results in approximately 89,7 millions of cats and 94,8 millions of dogs at this country.

Brazil is one of the most preminent propolis producers in the world, mainly of green and red propolis, being green propolis a product very well considered at the Japanese market³⁹. However, Brazil was not included in the list of the countries with the highest numbers of patent filing for products based on propolis (**Figure 3**). This low number of

Brazilian patents could be explained by that absence of a law that regulate innovation, a situation that lasted until 2004. In this year, it was promulgated a law that established the basis for technical innovation at the country (Lei de Inovação, 10.973/04), and, only after this, the Brazilian Research Centers created Technological Innovation Nucleus at the Brazilian universities and research centers. It is expected that this innovation law, in a long-term, can increase the association between universities, research centers and companies for the development of new products, also focusing in the increase in the number of patents filing.

An analysis comparing the number of patents documents and its classification code showed that the majority of the patents documents were registered in the A61K35/644 subclass, which includes medicinal preparations containing material or products constituted of bee wax, propolis, royal jelly and honey (**Figure 4**). The second place is represented by patents documents registered in the classification code A61P31/04, which contains products with specific therapeutic activity against bacterial agents. A61K35/64 and A61k66/00 codes describe medicinal preparations containing insect products or materials (for example, from bees, wasp or fleas) and medicinal preparations with undetermined constitution containing algae, lichen, fungi or plant material or its derivate products, respectively. The antimicrobial action is the main biological activity of propolis that is included in the animal health research area, including antibiotic¹¹⁸, antifungal⁶³ and antiparasitic⁷⁰ activities.

Mark Olshenitsky and Genadi Buchman, Israelian inventors, are the main inventors of the majority of patents documents involving propolis (**Figure 5**), and they are associated to 'The Bio Balance Corporation' and 'MG Novobiotec LTDA' companies. Many of these inventions comprises probiotic compositions prepared from extracts derived from plants and its therapeutic uses, as well as industrial processes and equipment upon which these

compositions are used. Two Chinese inventors, Qing-Fu Zhou and Wen-Li Liu, detain the second place regarding the number of filed patents containing propolis on its composition and with application in veterinary medicine. These Chinese researchers develop medicines or preparations from Chinese medicinal compounds based on plants to treat production animals, such as swine, cattle, fowl and fish. The independent inventor Xu Rongxiang possess patents, with status of pendent or filed, in the United States Patent and Trademark Office (US-PTO) that comprises repair of physiologic tissues and functional organ regeneration by stem-cells cultivation and therapeutic formulations to the diabetic ulcer treatment.

Figure 6 represents the distribution of all analyzed patents according to applicants or patent owner. The Chinese Corporation Qingdao Lvman Biological Engineering Company is the main detainer of filed patent documents of products based on propolis and for use at veterinary medicine. This company was formed in 2001 and its main business comprises development, exploitation and commercialization of veterinary pharmaceutical products and pet food. Actually, Qingdao Lvman Biological Engineering Company develop products to application of propolis in pet foods and pharmaceutical products¹¹⁹.

Bio Balance Corporation, an American company, subsidiary from Enterologics Inc., supplies research services and development of biological medicines¹²⁰. This company possess intellectual property of probiotics that can be used to develop drugs for the treatment of gastrointestinal diseases, of services on receptor-ligands 3D pharmacophores recognition and activation, and of molecular modeling for the construction of 3D molecule models that includes biophysical properties of molecules, electrostatic potentials of receptors and protein modeling. The Chinese inventor Xu Rongxiang is one of the main applicants, followed by the Hayashibara Biochemical Laboratories company, specialized in

the research of functional carbohydrates and dyes¹²¹. Products discovered or developed are used in food processing and in pharmaceutical and cosmetic industry.

REFERENCES

- 1 World Health Organization. *The World Traditional Medicines Situation 2011, Traditional medicines: Global Situation, Issues and Challenges*. [Online]. Geneva, World Health Organization (2011). Available: <http://digicollection.org/hss/documents/s18063en/s18063en.pdf>. [29 August 2018]
- 2 De Luca V, Salim V, Atsumi SM and Yu F, Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making. *Science* **336**:1658–1661 (2012).
- 3 Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Brasília, Anvisa (2011).
- 4 Pereira DS, Freitas CIA, Freitas MO, Maracajá PB, Silva JBA, Silva RA et al., Histórico e principais usos da própolis apícola. *Revista ACSA* **11**:01-21 (2015).
- 5 Lustosa SR, Galindo AB, Nunes ICC, Randau KP and Neto PJR, Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Ver bras farmacogn* **18**:447-454 (2008).
- 6 Zhao L, Pu L, Wei J, Li J, Wu J, Xin Z, Gao W and Guo C, Brazilian green propolis improves antioxidant function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Environ Res Public Health* **13**:498 (2016).
- 7 Massaro CF, Simpson JB, Powell D and Brooks P, Chemical composition and antimicrobial activity of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) propolis from subtropical eastern Australia. *Naturwissenschaften* **102**:68 (2015).

- 8 Bankova V, Galabov AS, Antonova D, Vilhelmova N and Di Perri B, Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. *Phytomedicine* **21**:1432-1438 (2014).
- 9 da Silva SS, Mizokami SS, Fanti JR, Miranda MM, Kawakami NY, Teixeira FH, et al., Propolis reduces *Leishmania amazonensis*-induced inflammation in the liver of BALB/c mice. *Parasitol Res* **115**:1557-1566 (2016).
- 10 Chan GC, Cheung KW and Sze DM, The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin Rev Allergy Immunol* **44**:262-273 (2013).
- 11 Gao W, Wu J, Wei J, Pu L, Guo C, Yang J, et al., Brazilian green propolis improves immune function in aged mice. *J Clin Biochem Nutr* **55**:7-10 (2014).
- 12 Hori JI, Zamboni DS, Carrão DB, Goldman G and Berretta AA, The inhibition of inflammasome by Brazilian propolis (EPP-AF). *Evid Based Complement Alternat Med* 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/418508>
- 13 Babatunde IR, Abdulbasit A, Oladayo MI, Olasile OI, Olamide FR and Gbolahan BW, Hepatoprotective and Pancreatoprotective Properties of the Ethanolic Extract of Nigerian Propolis. *J Intercult Ethnopharmacol* **4**:102–108 (2015).
- 14 Salatino A, Fernandes-Silva CC, Righi AA and Salatino MLF, Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat Prod Rep* **28**:925-936 (2011).
- 15 Machado BAS, Pereira CG, Nunes SB, Padilha FF and Umsza-Guez MA, Supercritical Fluid Extraction Using CO₂: Main Applications and Future Perspectives. *Sep Sci Technol* **48**:2741-2760 (2013).
- 16 World Intellectual Property Organization. *PCT – The Patent Cooperation Treaty*. [Online]. Geneva, World Intellectual Property Organization (2018). Available: <https://www.wipo.int/pct/en/> [September 02nd 2018]

- 17 Chen YW, Ye SR, Ting C and Yu YH, Antibacterial activity of propolins from Taiwanese green propolis. *J Food Drug Anal* **26**:761-768 (2018).
- 18 Rufatto LC, Santos DAS, Marinho F, Henriques JAP, Ely MR and Moura S, Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pac J Trop Biomed* **7**:591-598 (2017).
- 19 Machado BAS, Dantas-Silva RP, Barreto GA, Costa SS, Silva DF, Brandão HN 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* **11**: e0145954 (2016).
- 20 Mouhoubi-Tafinine Z, Ouchemoukh S and Tamendjari A, Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Ind Crops Prod* **88**:85-90 (2016).
- 21 Bankova VS, De Castro SL and Marcucci MC, Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie* **31**:3–15 (2000).
- 22 Marcucci MC, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP et al., Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* **74**:105-12 (2001).
- 23 Oryan A, Alemzadeh E and Moshiri A, Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomed Pharmacother* **98**:469-483 (2018).
- 24 Sforcin JM, Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol* **113**:1–14 (2007).
- 25 Ghisalberti EL, Propolis: a review. *Bee World* **60**:59-84 (1979).
- 26 Castaldo S and Capasso F, Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* **73**: S1-6 (2002).

- 27 Franchin M, Freires IA, Lazarini JG, Nani BD, Cunha MG, Colón DF et al., The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chem* **153**:49-55 (2018).
- 28 Costa AS, Machado BAS, Umsza-Guez MA, Cirqueira MG, Nunes SB and Padilha, FF, Survey of studies with propolis produced in the state of Bahia, Brazil. *Sitientibus Ser Ci Biol* **13**:1-7 (2013).
- 29 Machado BAS and Padilha FFO, O processo de proteção das Indicações Geográficas no Brasil, in: *Desenvolvimento e perspectivas da propriedade intelectual no Brasil*, ed. by Santos FL. Cruz das Almas: Editora UFRB, pp. 105-120 (2014).
- 30 Wagh VD, Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Adv Pharmacol Sci* 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/308249>
- 31 Ribeiro G, Silva MAG, Martins CB, Borges VP and Lacerda-Neto JC, Associação fitoterápica no tratamento de feridas cutâneas induzidas em equinos. *Arq Bras Med Vet Zootec* **65**:1427-1433 (2013).
- 32 Abu-Seida AM, Effect of Propolis on Experimental Cutaneous Wound Healing in Dogs. *Veterinary Medicine International* 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/672643>
- 33 De Aguiar SC, Zeoula LM, do Prado OPP, Peres LP, Arcuri PB and Forano E, Characterization of rumen bacterial strains isolated from enrichments of rumen content in the presence of propolis. *World J Microbiol Biotechnol* **30**:2917–2926 (2014).
- 34 Rísoli TB, Rodrigues, IL, Martins-Neto RG, Kazama R, Prado OPP, Zeoula LM et al., Ruminant ciliate protozoa of cattle and buffalo fed on diet supplemented with monensin or extracts from propolis. *Pesq agrope bras* **44**:92-97 (2009).
- 35 de Paula EM, Samensari RB, Machado E, Pereira LM, Maia FJ, Yoshimura EH et al., Effects of phenolic compounds on ruminal protozoa population, ruminal fermentation, and digestion in water buffaloes. *Livest Sci* **185**:136-141 (2016).

- 36 Aguiar SC, Cottica SM, Boeing JS, Samensari RB, Santos GT, Visentainer JV et al., Effect of feeding phenolic compounds from propolis extracts to dairy cows on milk production, milk fatty acid composition, and the antioxidant capacity of milk. *Anim Feed Sci Technol* **193**:148-154 (2014).
- 37 Santos NW, Yoshimura EH, Machado E, Matumoto-Pintro, PT, Montanher PF, Visentainer JV et al., Antioxidant effects of a propolis extract and vitamin E in blood and milk of dairy cows fed diet containing flaxseed oil. *Livest Sci* **191**:132-138 (2016).
- 38 Wang K, Jin XL, Shen XG, Sun LP, Wu LM, Wei JQ et al., Effects of Chinese Propolis in Protecting Bovine Mammary Epithelial Cells against Mastitis Pathogens-Induced Cell Damage. *Mediators Inflamm* 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8028291>
- 39 Park YK, Alencar SM and Aguiar CL, Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *J Agric Food Chem* **50**:2502-2506 (2002).
- 40 Dausch A, Moraes CS, Fort P and Park YK, Brazilian Red Propolis – Chemical Composition and Botanical Origin. *Evid Based Complement Alternat Med* **5**:435-441 (2008).
- 41 Ferreira JM, Fernandes-Silva CC, Salantino A and Negri G, Message D, New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. *J Sci Food Agric* **97**:3552-3558 (2017).
- 42 Teixeira EW, Negri G, Meira RM, Message D, Salatino A, Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. *Evid Based Complement Alternat Med* **2**:85-92 (2005).
- 43 Waller SB, Peter CM, Hoffmann JF, Picoli T, Osório LD, Chaves F et al., Chemical and cytotoxic analyses of brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its *in vitro*

- activity against itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis*. *Microb Pathog* **105**:117-121 (2017).
- 44 Fernandes FH, Guterres ZR, Violante IMP, Lopes TFS, Garcez WS and Garcez FR, Evaluation of mutagenic and antimicrobial properties of brown propolis essential oil from the Brazilian Cerrado biome. *Toxicology Reports* **2**:1482–1488 (2015).
- 45 Popolo A, Piccinelli LA, Morello S, Cuesta-Rubio O, Sorrentino R, Rastrelli L et al., Antiproliferative activity of brown Cuban propolis extract on human breast cancer cells. *Nat Prod Commun* **4**:1711–1716 (2009).
- 46 Sawaya ACHF, Cunha IBS, Marcucci MC, Aidar DS, Silva ECA, Carvalho CAL et al., Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis of native Brazilian stingless bees. *Apidologie* **38**:93–103 (2007).
- 47 Gomes MFF, Ítavo CCBF, Leal CRB, Ítavo LCV and Lunas RC, Atividade antibacteriana *in vitro* da propolis marrom. *Pesqui Vet Bras* **36**:279–282 (2016).
- 48 Campo-Fernández MC, Cuesta-Rubio O, Rosado-Perez A, Porto RMO, Márquez-Hernández I, Piccinelli AL et al., GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. *J Agric Food Chem* **56**:9927–9932 (2008).
- 49 Piccinelli AL, Lotti C, Campone L, Cuesta-Rubio O, Campo-Fernandez M and Rastrelli L, Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography à Photodiode Array Detection / Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* **59**:6484–6491 (2011).
- 50 Lotti C, Campo-Fernandez M, Piccinelli AL, Cuesta-Rubio O, Márquez-Hernández I and Rastrelli L, Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *J Agric Food Chem* **58**:2209–2213 (2010).

- 51 Izuta H, Shimazawa M, Tsuruma K, Araki Y, Mishima S and Hara H, Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Complement Altern Med* **9**:45 (2009).
- 52 Trusheva B, Popova M, Naydenski H, Tsvetkova, Rodriguez JG and Bankova V, New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapia* **75**:683–689 (2004).
- 53 Cuesta-Rubio O, Piccinelli AL, Fernandez MC, Hernández IM, Rosado A and Rastrelli L, Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: The brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *J Agric Food Chem* **55**:7502–7509 (2007).
- 54 Quiroga EN, Sampietro DA, Soberón JR, Sgariglia MA and Vattuone MA, Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *J Appl Microbiol* **101**:103–110 (2006).
- 55 Machado BAS, Cruz LS, Nunes SB, Umsza-Guez MA and Padilha FF, Estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes depositados no Brasil. *Revista GEINTEC* **2**:221-235 (2012).
- 56 Matsuno T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. *Z Naturforsch C* **50**:93-97 (1995).
- 57 Miyataka H, Nishiki M, Matsumoto H, Fujimot T, Matsuka M and Satoh T, Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol Pharm Bull* **20**:496-501 (1997).
- 58 Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ and Hu FL, Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules* **19**:19610-19632 (2014).

- 59 Paulino N, Abreu SRL, Uto Y, Koyama D, Nagasawa H, Hori H et al., Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *Eur J Pharmacol* **587**:296–301 (2008).
- 60 Park YK, Paredes-Guzman JF, Aguiar CL, Alencar SM and Fujiwara FY, Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *J Agric Food Chem* **52**:1100-1103 (2004).
- 61 Aga H, Shibuya T, Sugimoto T, Kurimoto M and Nakajima S, Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**:945–946 (1994).
- 62 Guzmán JFP, Avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas das própolis produzidas no Peru [dissertation]. [Campinas (BR)]: Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas UNICAMP (2005).
- 63 Freires IA, Queiroz VCPP, Furletti VF, Ikegaki M, de Alencar SM, Duarte MCT et al., Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. *J Mycol Med* **26**:122-132 (2016).
- 64 Fasolo D, Bergold AM, Von Poser G and Teixeira HF, Determination of benzophenones in lipophilic extract of Brazilian red propolis, nanotechnology-based product and porcine skin and mucosa: Analytical and bioanalytical assays. *J Pharm Biomed Anal* **124**:57-66 (2016).
- 65 Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL et al., Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* **3**:249-254 (2006).
- 66 Regueira-Neto MS, Tintino SR, Silva ARP, Costa MDS, Boligon AA, Matias EFF et al., Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food Chem Toxicol* **107**:572-580 (2017).

- 67 Márquez-Hernández I, Cuesta-Rubio O, Campo-Fernández M, Rosado-Pérez A, Porto RMO, Piccinelli AL et al., Studies on the constituents of yellow Cuban propolis: GC-MS determination of triterpenoids and flavonoids. *J Agric Food Chem* **58**:4725-4730 (2010).
- 68 da Silveira CC, Fernandes LM, Silva ML, Luz DA, Gomes AR, Monteiro MC et al., Neurobehavioral and Antioxidant Effects of Ethanolic Extract of Yellow Propolis. *Oxid Med Cell Longev* (2016). <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2906953>
- 69 Gregoris E and Stevanato R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food Chem Toxicol* **48**:76-82 (2010).
- 70 Omar R, Igoli JO, Zhang T, Gray AI, Ebiloma GU, Clements CJ et al., The chemical characterization of Nigerian propolis samples and their activity against *Trypanosoma brucei*. *Sci Rep* **7**:923 (2017).
- 71 Salomão K, Pereira PRS, Campos LC, Borba CM, Cabello PH, Marcucci MC et al., Brazilian Propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evid Based Complement Alternat Med* **5**:317-324 (2008).
- 72 da Silva LM, Frión-Herrera Y, Bartolomeu AR, Gorgulho CM and Sforcin JM, Mechanisms involved in the cytotoxic action of Brazilian propolis and caffeic acid against HEP-2 cells and modulation of P-glycoprotein activity. *J Pharm Pharmacol* **69**:1625-1633 (2017).
- 73 Shimizu K, Ashida H, Matsuura Y and Kanazawa K, Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. *Arch Biochem Biophys* **424**:181-188 (2004).
- 74 Alday-Provencio S, Diaz G, Rascon L, Quintero J, Alday E, Robles-Zepeda R et al., Sonoran propolis and some of its chemical constituents inhibit in vitro growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *Planta Med* **81**:742-747 (2015).

- 75 das Neves MVM, Silva TMS, Lima EO, Cunha EVL and Oliveira EJ, Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. *Braz J Microbiol* **47**:159-166 (2016).
- 76 Bueno-Silva B, Alencar SM, Koo H, Ikegaki M, Silva GVJD, Napimoga MH et al., Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *J Agric Food Chem* **61**:4546-4550 (2013).
- 77 Wang X, Sankarapandian K, Cheng Y, Woo SO, Kwon HW, Perumalsamy H et al., Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Complement Altern Med* **16**: 65 (2016).
- 78 Suleman T, Vuuren SV, Sandasi M and Viljoen AM, Antimicrobial activity and chemometric modelling of South Africa propolis. *J Appl Microbiol* **119**:981-990 (2015).
- 79 Farnesi AP, Aquino-Ferreira R, Jong DD, Bastos JK and Soares AEE, Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genet Mol Res* **8**:635-640 (2009).
- 80 Bispo-Junior W, Miranda EO, Alvino V, Araujo B, Silva DW and Porfirio Z, Antimicrobial activity of fractions of red propolis from Alagoas, Brazil. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina*. **33**:3-10 (2012).
- 81 de Aguiar SC, Zeoula LM, Franco SL, Peres LP, Arcuri PB and Forano E, Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria *in vitro*. *World J Microbiol Biotechnol* **29**:1951-1959 (2013).
- 82 Veiga RS, Mendonça S, Mendes PB, Paulino N, Mimica MJ, Lagareiro-Netto AA et al., Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and

- antioxidante activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *J Appl Microbiol* **122**:911-920 (2017).
- 83 Dota KFD, Consolaro MEL, Svidzinski TIE and Bruschi ML, Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. *Evid Based Complement Alternat Med* (2011).
<http://dx.doi.org/10.1093/ecam/neaq029>
- 84 Netíková L, Bogusch P and Heneberg P, Czech ethanol-free propolis extract displays inhibitory activity against a broad spectrum of bacterial and fungal pathogens. *J Food Sci* **78**:M1421-M1429 (2013).
- 85 Capistrano HM, Assis EM, Leal RM, Alvarez-Leite ME, Brener S and Bastos EMAF, Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Evid Based Complement Alternat Med* (2013).
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/947980>
- 86 Lotti C, De Castro GMM, De Sá LFR, Da Silva BAFS, Tassis AC, Piccinelli AL et al., Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Pdr5p by a natural compound extracted from Brazilian Red Propolis. *Rev bras farmacogn* **21**:901-907 (2011).
- 87 Haghdoost NS, Salehi TZ, Khosravi A and Sharifzadeh A, Antifungal activity and influence of against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of *Candida albicans*. *J Mycol Med* **26**:298-305 (2016).
- 88 Sawaya ACHF, Palma AM, Caetano FM, Marcucci MC, Silva-Cunha IB, Araujo CEP et al., Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Lett Appl Microbiol* **35**:203-207 (2002).
- 89 Pippi B, Lana AJD, Moraes RC, Güez CM, Machado M, de Oliveira LFS et al., *In vitro* evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of

- Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. *J Appl Microbiol* **118**:839-850 (2015).
- 90 Cardoso RL, Maboni F, Machado G, Alvez SH and Vargas AC, Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase* positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Vet Microbiol* **142**:432-434 (2010).
- 91 Soares MMSR and Cury AE, *In vitro* activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with tinea pedis. *Braz J Microbiol* **32**:130-134 (2001).
- 92 Koc AN, Silici S, Ayangil D, Ferahbas A and Çankaya 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* **48**:205-210 (2005).
- 93 Siqueira ABS, Gomes BS, Cambuim I, Maia R, Abreu S, Souza-Motta CM, et al., *Trichophyton* species susceptibility to green and red propolis from Brazil. *Lett Appl Microbiol* **48**:90-96 (2009).
- 94 Wu Z, Zhu A, Takayama F, Okada R, Liu Y, Harada Y et al., Brazilian green propolis suppresses the hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF- κ B activation in microglia. *Oxid Med Cell Longev* (2013).
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/906726>
- 95 Lima LDC, Andrade SP, Campos PP, Barcelos LS, Soriani FM, Moura SAL et al., Brazilian green propolis modulates inflammation, angiogenesis and fibrogenesis in intraperitoneal implant in mice. *BMC Complement Altern Med* **14**:177 (2014).
- 96 Miranda MM, Panis C, Cataneo AH, da Silva SS, Kawakami NY, Lopes LG, et al., Nitric oxide and brazilian propolis combined accelerates tissue repair by modulating

- cell migration, cytokine production and collagen deposition in experimental leishmaniasis. *Plos One* **10**:e0125101 (2015).
- 97 Tanaka M, Okamoto Y, Fuku T and Masuzawa T, Suppression of interleukin 17 production by Brazilian propolis in mice with collagen-induced arthritis. *Inflammopharmacology* **20**:19–26 (2012).
- 98 Franchin M, Colón DF, da Cunha MG, Castanheira FV, Saraiva AL, Bueno-Silva B et al., Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. *Sci Rep* **6**:36401 (2016).
- 99 Batista LL, Campesatto EA, Assis ML, Barbosa AP, Grillo LA and Dornelas CB, Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. *Rev Col Bras Cir* **39**:515-520 (2012).
- 100 Messerli SM, Ahn MR, Kunimasa K, Yanagihara M, Tatefuji T, Hashimoto K et al., Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. *Phytother Res* **23**:423–427 (2009).
- 101 Chikaraishi Y, Izuta H, Shimazawa M, Mishima S and Hara H, Angiostatic effects of Brazilian green propolis and its chemical constituents. *Mol Nutr Food Res* **54**:566–575 (2010).
- 102 Nguyen BC, Taira N, Maruta H and Tawata S. Artepillin C and other herbal PAK1-blockers: effects on hair cell proliferation and related PAK1-dependent biological function in cell culture. *Phytother Res* **30**:120–127 (2016).
- 103 Meneghelli C, Joaquim LS, Félix GL, Somensi A, Tomazzoli M, da Silva DA et al., Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: an *in vitro* and *in vivo* study. *Microvasc Res* **88**:1–11 (2013).

- 104 Li H, Kapur A, Yang JX, Srivastava S, McLeod DG, Paredes-Guzman JF et al., Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *Int J Oncol* **31**:601-606 (2007).
- 105 Szliszka E, Zydowicz G, Mizgala E and Krol W, Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Oncol* **41**:818-828 (2012).
- 106 Borges KS, Brassesco MS, Scrideli CA, Soares AE and Tone LG, Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. *Genet Mol Biol* **34**:310-314 (2011).
- 107 Begnini KR, Moura de Leon PM, Thurow H, Schultze E, Campos VF, Martins-Rodrigues F et al., Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014. doi: 10.1155/2014/639856.
- 108 Awale S, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tezuka Y and Kadota S, Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorg Med Chem* **16**:181–189 (2008).
- 109 Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, Doi K, Gi M and Wanibuchi H, Ethanol-extracted Brazilian propolis exerts protective effects on tumorigenesis in wistar hannover rats. *Plos One* **11**:e0158654 (2016).
- 110 Roberto MM, Jamal CM, Malaspina O and Marin-Morales MA, Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the *Allium cepa* test system. *Genet Mol Biol* **39**:257-269 (2016).

- 111 Toreti VC, Sato HH, Pastore GM and Park YK, Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/697390>
- 112 Suárez D, Zayas D and Guisado F, Propolis: Patents and technology trends for health applications. *J bus chem* **2**:119–125 (2005).
- 113 Song CH and Han JW, Patent cliff and strategic switch: exploring strategic design possibilities in the pharmaceutical industry. *Springerplus* **5**: 692 (2016).
- 114 Paviani LC, Dariva C, Marcucci MC and Cabral FA, Supercritical carbon dioxide selectivity to fractionate phenolic compounds from the dry ethanolic extract of propolis. *J Food Process Eng* **33**:15-27 (2010).
- 115 State Pharmacopoeia Commission of the PRC. *Pharmacopoeia of the people's Republic of China: Volume I*. People's Medical Publishing House (2005).
- 116 Saotome C, Nakaya Y and Abe S, Patent production is a prerequisite for successful exit of a biopharmaceutical company. *Drug Discov Today* **21**:406–409 (2016).
- 117 American Pet Products Manufacturers Association (USA). *APPA National Pet Owners Survey 2017-2018*. [Online]. Stamford, CT (USA): American Pet Products Manufacturers Association (USA); (2018). Available from: https://americanpetproducts.org/Uploads/MemServices/GPE2017_NPOS_Seminar.pdf [02nd April 2019]
- 118 Bryan J, Redden P and Traba C. The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. *Lett Appl Microbiol* **62**: 192–198 (2016).
- 119 Companylist. *Qingdao Lvman Bio-Engineering Co., Ltd*. [Online]. Companylist (2018). Available:

https://companylist.org/Details/10159006/China/Qingdao_Lvman_Bio_Engineering_Co_Ltd_/ [29 august 2018]

120 Bio balance. *Bio balance Corporation*. [Online]. Bio balance (2018). Available: <https://www.bio-balance.com> [29 august 2018]

121 Hayashibara. *Hayashibara company Ltd*. [Online]. Hayashibara (2018). Available: <https://www.hayashibara.co.jp/data/en/> [August 29th 2018].