



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

MARINA ANDREA BOSINI

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE MÉIS PRODUZIDOS POR
ABELHAS SEM FERRÃO (MELIPONINAE)**

Londrina
2014

MARINA ANDREA BOSINI

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE MÉIS PRODUZIDOS POR
ABELHAS SEM FERRÃO (MELIPONINAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Londrina
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bosini, Marina Andrea.

Potencial antifúngico de méis produzidos por abelhas sem ferrão (Meliponinae) em *Candida albicans* / Marina Andrea Bosini. - Londrina, 2014.
84 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Mel - Tese. 2. *Scaptotrigona bipunctata* - Tese. 3. *Scaptotrigona postica* - Tese. 4. Atividade antifúngica - Tese. I. Yamada Ogatta, Sueli Fumie. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

MARINA ANDREA BOSINI

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE MÉIS PRODUZIDOS POR ABELHAS
SEM FERRÃO (MELIPONINAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA



Orientadora : Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada
Ogatta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Audrey Alesandra StingenGarcia Lonni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 14 de Abril de 2014.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta, pela dedicação e sabedoria compartilhada durante o desenvolvimento deste trabalho, e principalmente por me conceder a oportunidade ao aceitar-me como orientada durante todos esses anos.

À Prof^a Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni, que atuou como uma segunda orientadora, pelo ensinamento adquirido no laboratório.

À Prof^a Dra. Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonnie ao Prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey que aceitaram fazer parte da comissão examinadora.

Ao Prof. Dr. Gerson Nakazato e ao Prof. Dr. Edison Aparecido Proni, pela oportunidade de participação no projeto das abelhas indígenas sem ferrão.

Aos "fofinhos" da hibridação subtrativa Eliandro Reis Tavares e Bárbara Gionco, por compartilhar as frustrações e alegrias envolvidas neste projeto.

À Pollyana Myrella Capela dos Santos, pelo incentivo e ajuda, pelos momentos de descontração, pelas conversas e risadas, pela amizade cultivada dentro e fora do laboratório que não esquecerei.

Ao Caibe Alves, Jussevania Pereira Santos e César Contreras, pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos demais colegas de laboratório, Caio Ferreira, Carline Longhi, Caroline Souza Azevedo, Ana Elisa Belloto, Danielle Kian, Eliane Saori Otaguiri, Mayara Pereira, Virgínia Prezzi e a todos que me ajudaram, mesmo que da mais simples maneira, obrigada, a vocês meu eterno agradecimento.

Aos meus pais, Ademir e Miraci, e meus irmãos, Márcia e André, por acreditarem em mim. Sem vocês, nada disso seria possível.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, os meus profundos agradecimentos.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido.

BOSINI, Marina Andrea. **Potencial antifúngico de méis produzidos por abelhas sem ferrão (Meliponinae) em *Candida albicans***. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

RESUMO

Candida albicans normalmente participa da microbiota humana, colonizando diversos sítios anatômicos. O estado imunológico, o ambiente da mucosa bucal do indivíduo e os fatores de virulência da levedura contribuem para o estabelecimento da candidíase orofaríngea. O crescimento dos microrganismos na forma de biofilme, definido como células aderidas em uma superfície ou interface (células sésseis), que secretam e são embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, confere vantagens em relação às células planctônicas, como maior resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aos antimicrobianos. A toxicidade, elevado custo e aparecimento de resistência são limitações dos poucos antifúngicos disponíveis para o tratamento de infecções por *Candida* spp. Como alternativa, estudos com produtos naturais têm sido conduzidos. Os méis possuem propriedades anticarcinogênicas, antivirais, antimicrobianas e cicatrizantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antifúngico de méis produzidos pelas espécies de meliponíneos *Scaptotrigona bipunctata* e *Scaptotrigona postica* em *C. albicans*. As dezesseis cepas analisadas foram sensíveis a ambos os méis, e a CIM₅₀ variou entre 10% a 40% (v/v). Os méis também foram capazes de reduzir em até 35,2% a adesão de *C. albicans* em poliestireno e em até 63% a biomassa do biofilme. Concentrações acima de 10% para ambos os méis foram capazes de reduzir significativamente a morfogênese do isolado clínico 82, e concentrações acima de 20% para o mel de *S. bipunctata* e 40% para o mel de *S. postica* reduziram a morfogênese da cepa de referência *C. albicans* ATCC MYA-2876. Os resultados indicam o potencial antifúngico dos méis obtidos das abelhas indígenas sem ferrão *S. bipunctata* e *S. postica* sobre *C. albicans*. Como vantagens os produtos naturais apresentam baixo custo e fácil acessibilidade.

Palavras chave: *Candida albicans*. Mel. Antifúngicos. Morfogênese. Adesão. Biofilme.

BOSINI, Marina Andrea. **Antifungal potential of honeys produced by stingless bees (Meliponinae) on *Candida albicans***. 2014. 84 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

ABSTRACT

Candida albicans normally participates of the human microbiota, colonizing various anatomical sites. The immune status, the environment of the oral mucosa and the virulence factors of the yeast contribute to the establishment of oropharyngeal candidiasis. The growth of the microorganisms in biofilm form, defined as cells attached to a surface or interface (sessile cells) that secrete and are embedded in a matrix of extracellular polymeric substances, gives advantages over the planktonic cells, such as increased resistance to defense mechanisms of the host and antimicrobial. Toxicity, high cost and emergence of resistance are limitations of the few antifungal agents available for the treatment of infections by *Candida* spp. Alternatively, studies with natural products have been conducted. Honeys have anticarcinogenic, antiviral, antimicrobial and healing properties. The aim of this study was to evaluate the antifungal potential of honeys produced by species of stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* and *Scaptotrigona postica* in *C. albicans*. The sixteen strains analyzed were susceptible to both honey and MIC₅₀ ranged from 10% to 40% (v/v). Honeys were also able to reduce in 35.2% the adhesion of *C. albicans* to polystyrene and in 63% the biofilm biomass. Concentrations above 10% for both honeys were able to significantly reduce the morphogenesis of the clinical isolate 82, and concentrations above 20% for *S. bipunctata* honey and 40% for *S. postica* honey reduced the morphogenesis of *C. albicans* ATCC MYA-2876 reference strain. The results indicate the antifungal potential of honeys obtained from indigenous stingless bees *S. bipunctata* and *S. postica* in *C. albicans*. As advantages, the natural products present low cost and easy accessibility.

Keywords: *Candida albicans*. Honey. Antifungals. Morphogenesis. Adhesion. Biofilm.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	ASPECTOS GERAIS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>CANDIDA</i>	11
2.2	CANDIDÍASE OROFARÍNGEA	12
2.3	ANTIFÚNGICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DAS CANDIDÍASES E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	13
2.4	FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>CANDIDA SP.</i>	16
2.2	PRODUTOS NATURAIS COM EFEITO ANTIMICROBIANO – MÉIS	22
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	ARTIGO 1: POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE MÉIS PRODUZIDOS POR ABELHAS INDÍGENAS SEM FERRÃO BRASILEIRAS <i>SCAPTOTRIGONA BIPUNCTATA</i> E <i>SCAPTOTRIGONA POSTICA</i> (MELIPONINAE, APIDAE, HYMENOPTERA) EM <i>CANDIDA ALBICANS</i>	34
4.2	ARTIGO 2: MEL, UM AGENTE NATURAL ALTERNATIVO PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR DIFERENTES MICRORGANISMOS?	55
5	CONCLUSÃO	71
6	REFERÊNCIAS	72
7	ANEXOS	82
	ANEXO A - Parecer de aprovação do uso de isolados clínicos originários da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Londrina.....	82
	ANEXO B - Parecer de aprovação do uso de isolados clínicos originários da cavidade bucal pelo Comitê de Ética da Faculdade Uningá.....	83
	ANEXO C - Autorização de acesso aos méis de <i>Scaptotrigona bipunctata</i> e <i>Scaptotrigona postica</i> para fins científicos	84

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* agrupa espécies classificadas como oportunistas, e patogênicas ao homem ou animais (KIRK et al., 2008). Participantes da microbiota normal em indivíduos saudáveis, *Candida* spp. “aproveitam” um desequilíbrio no estado imunológico do indivíduo para transitar do estado comensal para o patogênico, causando uma série de infecções (PFALLER et al., 2007).

No mundo, as espécies de *Candida* mais comumente isoladas de infecções são em ordem decrescente: *Candida albicans* (63,8%), *Candida glabrata* (11,6%), *Candida tropicalis* (7,7%), *Candida parapsilosis* (6,3%) e *Candida krusei* (2,5%), entretanto esta frequência varia conforme a região geográfica. A Ásia, Europa e África acompanham a distribuição das espécies, citada anteriormente, e uma maior frequência de *C. albicans* (64,4% a 67,9%) em relação a média global é observada nessas regiões. Na América *C. albicans* (48,9% a 51,8%) é isolada em menor frequência, sendo que na América do Norte são mais frequentes *C. glabrata* (21,1%) e *C. parapsilosis* (13,6%) em relação a outras regiões (PFALLER et al., 2010). No Brasil, *C. tropicalis* (13,9% a 24,3%) e *C. parapsilosis* (20% a 23,8%) seguem como espécies mais comuns de candidíases após *C. albicans* (34,4% a 42,5%) (JÚNIOR et al., 2011; MATTA et al., 2007; NUCCI; COLOMBO, 2007).

Espécies do gênero *Candida* apresentam uma série de fatores que contribuem para a patogênese da infecção como: a produção de hemolisinas, secreção de enzimas hidrolíticas, hidrofobicidade da superfície celular, produção de hifas e biofilme (GOW et al., 2012; HAZEN et al., 1991; LIU; FILLER, 2011; ZHU; FILLER, 2010). O biofilme é a forma de organização predominante entre os microrganismos, sendo caracterizado por células sésseis que estão aderidas a um substrato, interface ou umas às outras e embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares. As células participantes do biofilme possuem alterações fisiológicas em relação às células planctônicas como, taxa de crescimento, metabolismo e transcrição gênica alterados (RAMAGE et al., 2012). A presença de biofilmes está associado a altas taxas de mortalidade em infecções sistêmicas por *Candida* spp. Isto pode estar associado ao fenótipo de resistência das células sésseis à maioria dos antifúngicos tradicionais, como fluconazol, anfotericina B, voriconazol e nistatina, e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (BIZERRA et al., 2008; CHANDRA et al., 2001; FIORI et al., 2011; KATRAGKOU et al., 2008; MARTINS et al., 2011; NETT et al., 2010; TUMBARELLO et al., 2012).

Atualmente tem se observado um aumento na frequência de isolados resistentes aos azóis, além de relatos de cepas resistentes a outros antifúngicos (HULL et al., 2012; JIANG et al., 2013; MANN et al., 2009; PFALLER et al., 2011). Uma das possíveis causas é o tratamento profilático ou a longo prazo, comum em pacientes imunossuprimidos, que aumenta o risco de colonização por cepas dose-dependentes ou resistentes ao fluconazol (MANN et al., 2009; NOËL, 2012). A alta toxicidade, via de administração e elevado custo são outras limitações dos poucos antifúngicos atualmente disponíveis (GROVER, 2010; HULL et al., 2012; RAO, 2012).

Como alternativa a essas limitações, estudos com produtos naturais têm sido conduzidos, devido ao seu baixo custo e fácil acessibilidade. O mel possui atividade antimicrobiana em uma série de patógenos, e já foram relatados efeitos antibacteriano, antifúngico, antiviral e nematicida de diferentes méis originários de diversas regiões ao redor do mundo (GOERDT et al., 2013; LIU et al., 2013; MAGHSOUDI et al., 2011; SAJID; AZIM, 2012; SHAHZAD; COHRS, 2012; SIMON et al., 2009; WEN et al., 2012). O efeito antimicrobiano dos méis pode ser atribuído a uma série de fatores, como: alta osmolaridade, baixo pH, produção de peróxido de hidrogênio e outros compostos como os flavonoides e ácidos fenólicos (AURONGZEB; AZIM, 2011).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *CANDIDA*

Atualmente cerca de 100.000 diferentes espécies de fungos são descritas na literatura enquanto estimativas sugerem a existência de 3,5 a 5,1 milhões de fungos não identificados (KIRK et al., 2008; O'BRIEN et al., 2005). Os fungos representam uma diversidade de organismos eucariotos, heterotróficos, unicelulares ou filamentosos, ou multicelulares que se nutrem por absorção (SIDRIM; ROCHA, 2004). A maioria dos fungos apresenta forma filamentosa, sendo constituído por hifas, septadas ou não que têm a função de nutrição e reprodução. As leveduras são fungos unicelulares, de forma ovalada ou arredondada. Diferentemente de fungos filamentosos, a identificação fenotípica das leveduras não é baseada somente no aspecto microscópico ou caracterização das colônias, é necessário também a realização de testes bioquímicos e/ou moleculares (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Entre as diferentes espécies de fungos microscópicos existentes, poucas são patogênicas para o homem e outros mamíferos. Leveduras do gênero *Candida* participam como comensais da microbiota humana em diversos sítios anatômicos como pele, trato respiratório, conjuntiva, ouvido externo, trato gastrointestinal e urinário, cavidade bucal e vaginal em indivíduos saudáveis (AKPAN; MORGAN, 2002; MERENSTEIN et al., 2013; SIDRIM; ROCHA, 2004). No entanto, em pacientes imunossuprimidos ocorre a transição entre o estado comensal para o estado patogênico da levedura, acarretando infecções cutâneas, vulvovaginais, orofaríngeas, urinárias e sistêmicas (PFALLER et al., 2007).

Pfaller et al. (2010), ao analisarem 256.882 isolados provenientes de infecções por *Candida* spp., relataram a seguinte distribuição global de espécies: *C. albicans* (65,3%), *C. glabrata* (11,3%), *C. tropicalis* (7,2%), *C. parapsilosis* (6,0%) e *C. krusei* (2,4%). Entretanto a frequência das espécies pode mudar conforme a localização geográfica. No continente americano, a incidência de *C. albicans* é menor que no resto do mundo, sendo de 48,9% na América do Norte e 51,8% na América Latina. Na América Latina e algumas regiões da Ásia, *C. tropicalis* é a segunda espécie mais frequente.

2.2 CANDIDÍASE OROFARÍNGEA

Espécies do gênero *Candida* estão presentes na microbiota bucal de 30% a 50% dos indivíduos saudáveis, sendo que *C. albicans* é a espécie mais comum. Porém a colonização por outras espécies como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* já foram relatadas (DEORUKHKAR; KATIYAR; SAINI, 2012; LI et al., 2013; RAO, 2012).

O estado imunológico do indivíduo, o ambiente da mucosa bucal e os fatores de virulência da levedura contribuem para a transição entre o estado comensal e patogênico das espécies de *Candida* (LIU; FILLER, 2011). Os fatores de risco para o desenvolvimento de candidíase orofaríngea são: xerostomia, imunossupressão, deficiências nutricionais, alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro que podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância e envelhecimento, uso de próteses dentais, dieta rica em carboidratos, câncer bucal, desordens endócrinas, tabagismo, uso prolongado de antibióticos de amplo espectro, uso de esteroides, diabetes (AKPAN; MORGAN, 2002; GIANNINI; SHETTY, 2011; RAO, 2012).

A candidíase orofaríngea pode se manifestar de diversas formas como: candidíase pseudomembranosa, eritematosa aguda, eritematosa crônica e hiperplásica. A candidíase pseudomembranosa é caracterizada por placas esbranquiçadas na superfície labial, palato, língua, mucosa bucal e assoalho da boca. As placas são constituídas por células epiteliais descamadas, fibrinas e hifas (SILVERMAN; LUANGJARMEKORN; GREENSPAN, 1984). A candidíase eritematosa é caracterizada pela presença de lesões vermelhas dolorosas na língua, mucosa bucal e palato. A forma aguda ocorre pela redução de bactérias na microbiota bucal devido ao uso de antibióticos de amplo espectro, o que facilita o crescimento de *Candida* spp. Já a forma crônica tem como fator de risco principal o uso de próteses dentárias. Neste caso, as lesões vermelhas se encontram nas superfícies que entram em contato com a prótese (WILLIANS et al., 2011). A candidíase hiperplásica é comum em fumantes e nas regiões lesionadas podem desenvolver carcinomas de células escamosas (SITHEEQUE; SAMARANAYAKE, 2003).

A escolha do tratamento adequado para a candidíase orofaríngea depende da severidade da infecção e se esta se encontra no estado agudo ou crônico. A infecção em

estágios iniciais envolve a administração tópica de nistatina, anfotericina B ou azóis, enquanto em uma infecção severa é recomendado a administração intravenosa de determinados azóis como o fluconazol, cetoconazol, miconazol e itraconazol (GIANNINI; SHETTY, 2011).

2.3 ANTIFÚNGICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DAS CANDIDÍASES E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

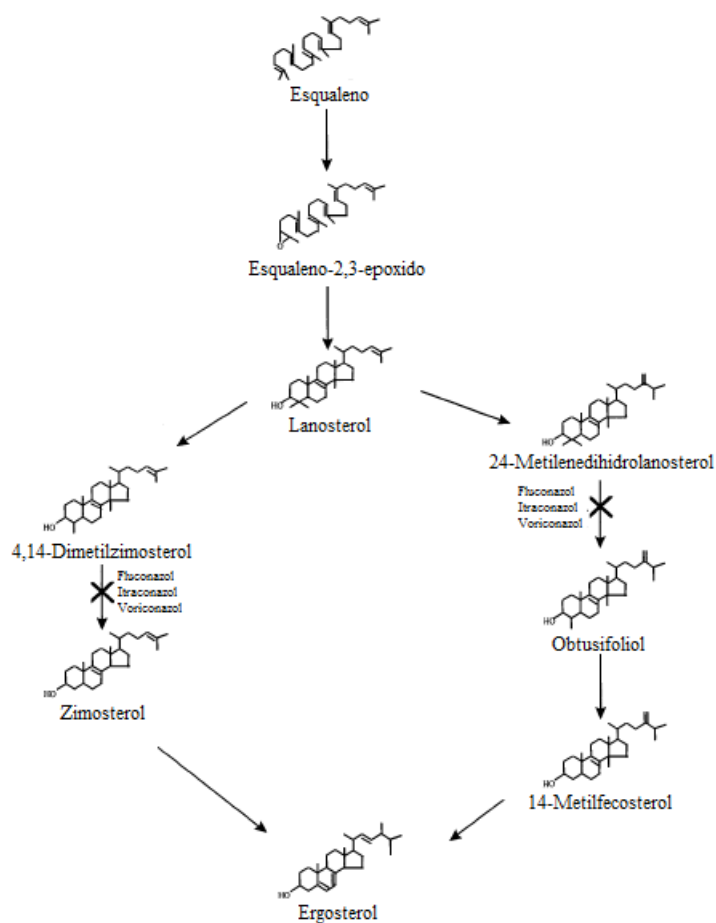
Os principais fármacos utilizados para o tratamento de candidíases se distribuem em quatro classes de acordo com a estrutura molecular e mecanismo de ação: azóis, poliênicos, flucitocina e equinocandinas. O fluconazol, como descrito anteriormente, é o antifúngico de escolha para o tratamento das candidíases. Seu maior efeito é a inibição da proteína ERG11p ou 14 α -esterol demetilase, que atua na biossíntese do ergosterol, o principal esterol da membrana plasmática do fungo (figura 1). Alguns azóis também podem agir em outras etapas do metabolismo deste componente da membrana plasmática de *Candida* spp. (ODDS; BROWN; GOW, 2003). Os azóis apresentam efeito fungistático e agem como inibidores competitivos de oxigênio no sítio catalítico da enzima, impedindo a oxidação do substrato lanosterol e, conseqüentemente, levando a uma deficiência na produção de ergosterol e um acúmulo de esteróis metilados, como lanosterol, 4,14-dimetilzimosterol e 24-metilenedihidrolanosterol, tóxicos para a levedura (GHANNOUM; RICE, 1999; TURI; LOPER, 1992). A diminuição do ergosterol na membrana plasmática altera sua fluidez e permeabilidade, assim como o correto funcionamento das proteínas de membrana plasmática, a compartimentalização de membrana, a endocitose e fusão de vacúolos (NOËL, 2012; ODDS; BROWN; GOW, 2003).

O uso de azóis é contra-indicado para indivíduos com doenças hepáticas e renais, uma vez que o tratamento o longo prazo está relacionado à toxicidade hepática (GIANNINI; SHETTY, 2011; RAO, 2012; WANG et al., 2010).

O tratamento profilático ou a longo prazo, comum em pacientes imunossuprimidos, aumenta o risco de colonização por cepas dose-dependentes ou resistentes ao fluconazol (BRION; UKO; GOLDMAN, 2007; MANN et al., 2009). Mann et al. (2009) investigaram o efeito do tratamento profilático com fluconazol, posoconazol e itraconazol em pacientes imunossuprimidos. Os três azóis foram capazes de diminuir progressivamente o número de

pacientes colonizados por *C. albicans* durante o tratamento, porém houve um aumento na frequência de colonização por *C. glabrata* e *C. krusei* com o uso de posaconazol e itraconazol, e fluconazol, respectivamente. No final do tratamento, aproximadamente 20% dos isolados apresentaram sensibilidade reduzida a pelo menos um dos azóis utilizados no experimento. A profilaxia com fluconazol resultou em isolados resistentes aos três azóis.

Figura 1 -Via da biossíntese do ergosterol e etapas nas quais os antifúngicos exercem atividade inibitória



Fonte: GHANNOUM e RICE, 1999.

O tratamento inadequado, como a administração de dosagens sub-inibitórias ou o uso de fluconazol para espécies naturalmente resistentes contribui para a seleção de isolados resistentes (NOËL, 2012). Algumas espécies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. rugosa* podem apresentar naturalmente sensibilidade reduzida ao fluconazol (PFALLER et

al., 2010). A resistência aos azóis pode estar associada a expressão aumentada de bombas de efluxo codificadas pelos genes *MDR* e *CDR*, levando a uma diminuição da concentração do antifúngico intracelularmente. Este mecanismo de resistência foi observado em *C. albicans* (codificado pelos genes *MDR1*, *CDR1* e *CDR2*), *C. glabrata* (genes *CgCDR1* e *CgCDR2*) e *C. dubliniensis* (genes *CdMDR1* e *CdCDR1*). Enquanto a expressão aumentada de bombas de efluxo codificadas pelo gene *MDR* confere resistência somente ao fluconazol, aquelas codificadas pelos genes *CDR* parecem afetar todos os azóis (PFALLER, 2012). Outro mecanismo de resistência envolve mutações pontuais no gene *ERG11*, que acaba codificando uma enzima com afinidade reduzida ou incapacidade de ligação aos azóis (PFALLER, 2012).

A anfotericina B e nistatina pertencem a classe dos poliênicos, e agem alterando a permeabilidade da membrana celular. Estes antifúngicos se ligam a esteróis da membrana fúngica, criando canais que permitem a saída de íons monovalentes e resultando em lise celular. Apesar da maior afinidade pelo ergosterol, estes fármacos podem se ligar a outros esteróis, como o colesterol que compõe a membrana de células de mamíferos, sendo altamente tóxicos (HULL et al., 2012; ODDS; BROWN; GOW, 2003). A formulação tradicional da anfotericina B está relacionada a toxicidade renal, o que pode causar a descontinuidade do tratamento (WANG et al., 2010). Novas formulações da anfotericina B como a suspensão coloidal, complexo lipídico e anfotericina B lipossomal apresentam capacidade reduzida de causarem nefrotoxicidade, porém acarretam em um aumento da toxicidade hepática, sendo observadas desde alterações na função a casos fulminantes e fatais de insuficiência do órgão (WANG et al., 2010).

A sensibilidade reduzida a anfotericina B por *Candida* spp. é incomum, porém, já foi relatada em *C. albicans* e *C. glabrata*, e está relacionada a alterações na composição dos esteróis da membrana fúngica, como consequência de mutações nos genes *ERG* que codificam uma série de enzimas da biossíntese do ergosterol (HULL et al., 2012).

O tratamento com nistatina, um antifúngico produzido a partir da bactéria *Streptomyces noursei*, é feito somente por via tópica, devido a sua alta toxicidade (RAO, 2012). Estudos envolvendo cepas mutantes de *S. noursei* têm sido realizados com o objetivo de produzir análogos da nistatina com menor toxicidade e maior atividade antifúngica (BRAUTASET et al., 2011).

A flucitocina é transportada ativamente por permeases da membrana celular fúngica e convertida em metabólitos tóxicos, que agem se incorporando ao RNA e inibindo a síntese

proteica ou inibindo a enzima timidilato sintase, que conseqüentemente inibe a síntese de DNA e divisão celular. A flucitocina geralmente é utilizada em associação com outros fármacos, como a anfotericina B, pois seu uso como único medicamento é limitado devido a frequente aquisição de resistência e existência de cepas intrinsecamente resistentes (ODDS; BROWN; GOW, 2003; VERMES; GUCHELAR; DANKERT, 2000).

As equinocandinas pertencem a mais nova classe de antifúngicos disponíveis comercialmente e agem por inibição enzimática, impedindo a síntese de β -1,3-glucano, um componente da parede celular de *Candida* spp. Estes fármacos têm sido utilizados para o tratamento de candidíase orofaríngea, esofágica e invasiva (DERESINSKI; STEVENS, 2003; GROVER, 2010). Como vantagens, possuem baixa toxicidade e são efetivos tanto em células planctônicas como sésseis (DERESINSKI; STEVENS, 2003; GROVER, 2010). Casos de resistência às equinocandinas são incomuns, mas um estudo recente reportou o isolamento de *C. glabrata* resistente a estes antifúngicos (PFALLER et al., 2011). O uso deste fármaco é limitado, pois sua administração ocorre somente por via endovenosa, além do alto custo em relação as outras classes de antifúngicos (GROVER, 2010).

2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA DE CANDIDA SP.

As espécies de *Candida* possuem uma série de fatores que contribuem para a sobrevivência e persistência da levedura no hospedeiro, pois facilitam a adesão, invasão, dano celular e evasão da resposta imune do hospedeiro (ZHU; FILLER, 2010). Embora não sejam fatores de virulência "clássicos", a expressão dos seguintes fatores está associada à patogenicidade de *Candida* spp.: enzimas hidrolíticas extracelulares, hemolisinas, adesinas, hidrofobicidade da superfície celular, formação de hifas e biofilme (GOW et al., 2012; HAZEN et al., 1991; LIU; FILLER, 2011; ZHU; FILLER, 2010).

Estudo de Jayatilake et al. (2006), comparando espécies do gênero *Candida*, mostrou que *C. albicans* era a espécie mais invasiva em epitélio humano reconstituído, em comparação com *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Arendrup, Horn e Frimodt-Moller (2002) ao avaliar a patogenicidade de *Candida* spp. em modelo murino, organizaram as espécies em grupos conforme sua virulência. *C. albicans* e *C. tropicalis* foram

as espécies mais virulentas, seguidas pelo grupo de *C. glabrata*, *C. kefyr* e *C. lusitaniae*, sendo que o grupo menos virulento incluía *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*.

O primeiro evento na colonização ou infecção por *Candida* spp. é a adesão do organismo às células epiteliais presentes na mucosa do hospedeiro, processo dependente de interações da parede celular da levedura e a superfície das células epiteliais. Estas interações podem ser específicas, mediadas por adesinas, ou inespecíficas como aquelas mediadas pela hidrofobicidade da superfície celular (HSC) da levedura (CHAFFIN, 2008). O contato com as células do hospedeiro estimula a transição para a forma de hifas, naquelas leveduras que apresentam essa característica, como *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*. Estas estruturas invadem o tecido epitelial, durante o processo infeccioso, por dois mecanismos distintos: a endocitose induzida, pelas células epiteliais, e a penetração ativa do fungo. A proteína Als3 (*agglutinin-like sequence 3*) é uma das invasinas que induz rearranjos no citoesqueleto da célula hospedeira desencadeando o processo de endocitose (PHAN et al., 2007). Na penetração ativa, ocorre uma combinação de força física exercida pela hifa, secreção de enzimas hidrolíticas e outros fatores ainda desconhecidos que conduzem ao rompimento da membrana celular do hospedeiro (WACHTLER et al., 2011). Na penetração ativa a invasão acarreta dano celular, podendo evoluir para infecções sistêmicas. Este processo ativo desencadeia uma resposta inflamatória que atrai neutrófilos e macrófagos para a região afetada, que podem eliminar o fungo (BRUNKE; HUBE, 2013; JACOBSEN et al., 2012; ZHU; FILLER, 2010). As pseudohifas teriam papel similar no processo infeccioso em espécies incapazes de formar hifas verdadeiras, como *C. krusei* e *C. parapsilosis* (GÁCSEK et al., 2007a SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 1994). O processo de invasão em espécies não dimórficas, como *C. glabrata*, ainda não está claro, mas acredita-se que ocorra por endocitose induzida (BRUNKE; HUBE, 2013).

As Saps (*Secreted aspartyl proteinases*) pertencem a família das aspartil proteases e possuem dois resíduos de ácido aspártico, associados ao processo hidrolítico e resíduos conservados de cisteína, implicados na manutenção da estrutura tridimensional destas proteínas. Dez SAPs foram identificadas em *C. albicans* (SAP1-10), oito em *C. dubliniensis* (SAPCD1-SAPCD4; SAPCD7-SAPCD10), quatro em *C. tropicalis* (SAPT1-SAPT4) e três em *C. parapsilosis* (SAPP1-SAPP3) (MONOD et al. 1994; PICHOVÁ et al. 2001; ZAUGG et al. 2001). As enzimas hidrolíticas, Saps, fosfolipases e lipases, estão associadas a adesão, invasão e dano tecidual no hospedeiro durante a infecção por *Candida* spp. (SILVA et al.,

2012). As Saps facilitam a colonização e infecção pois são capazes de degradar proteínas estruturais e de defesa, e danificar membranas mucosas do hospedeiro (PICHOVÁ et al., 2001; SILVA et al., 2012).

A atividade de fosfolipases já foi relatada em *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* (GHANNOUM, 2000). Estas enzimas causam dano celular ao hidrolisar fosfolipídeos presentes na membrana do hospedeiro, expondo receptores que facilitam a aderência da levedura (GHANNOUM, 2000; SILVA et al., 2012). Ibrahim et al. (1995) ao utilizar modelo murino, mostraram que isolados de *C. albicans* coletados de infecções sanguíneas causaram mortalidade aumentada em relação a isolados colonizadores da cavidade bucal. O único fator de virulência que teve correlação positiva com a mortalidade foi a atividade de fosfolipases. As lipases, responsáveis pela hidrólise de triacilgliceróis, são encontradas em algumas espécies, como *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Em *C. albicans*, mutantes para o gene *CaLIP8* apresentaram virulência diminuída em um modelo murino de candidemia, indicando sua participação na patogênese da infecção (GÁCSEK et al., 2007b; IBRAHIM et al., 1995; SILVA et al., 2012).

A produção de hemolisinas permite a sobrevivência e persistência de diversos microrganismos no hospedeiro através da liberação de ferro pela lise de eritrócitos. Embora autores relatem atividade hemolítica para algumas espécies de *Candida*, pouco se sabe sobre os genes relacionados a tal característica ou seu real papel na virulência desta levedura (SILVA et al., 2012).

A morfogênese também tem sido associada à virulência de determinadas espécies. *C. albicans* é um fungo polimórfico, capaz de transitar entre várias formas como leveduriforme, pseudohifas (acarretada pela não separação de blastoconídeos após o brotamento) ou hifas verdadeiras. Estudos mostram que cepas mutantes de *C. albicans* incapazes de alterar sua forma são menos virulentas que o fenótipo selvagem (LO et al., 1997; ZHENG; WANG, 2004). Vários fatores, além da adesão na superfície do hospedeiro, são capazes de influenciar a formação de hifas como: temperatura, presença ou ausência de nutrientes, acidez, hipóxia, densidade celular, células embebidas pela matriz polimérica extracelular durante a formação do biofilme, inibição do reparo ou replicação do DNA e produção de espécies reativas de oxigênio (GOW et al., 2012). A produção de adesinas como ALS3, ALS1 e HWP1 pelas hifas promovem forte adesão às células epiteliais e endoteliais do hospedeiro. As hifas também produzem enzimas hidrolíticas como as SAPs 4 e 6 que facilitam a invasão, além de aumentar

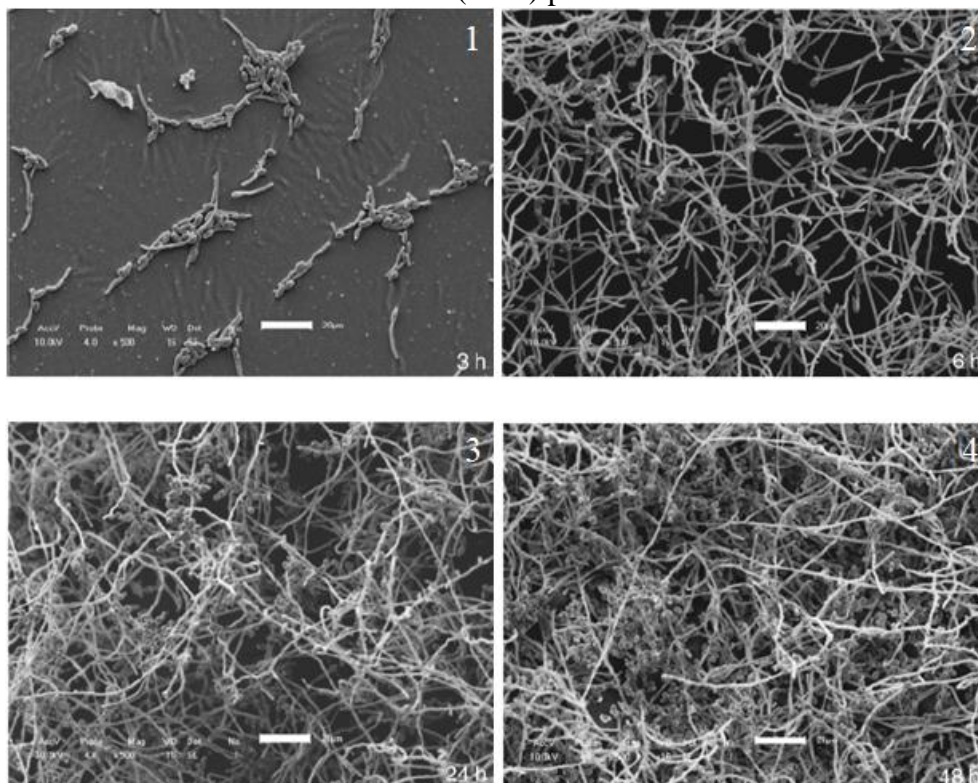
o dano tecidual causado pela extensão da hifa durante o processo de penetração ativa (WACHTLER et al., 2011). A produção de hifas também é uma forma de evasão da resposta imune inata. Leveduras fagocitadas por macrófagos podem formar hifas que perfuram a célula de defesa e garantem a sobrevivência do patógeno. Além disso, as hifas são capazes de produzir a enzima superóxido dismutase, neutralizando as espécies reativas de oxigênio produzidas pelos fagócitos (MARTCHENKO et al., 2004).

A adesão da levedura a uma superfície pode também conduzir à formação de biofilmes. O biofilme microbiano (figura 2) é uma forma de organização dos microrganismos definido como células aderidas em uma superfície ou interface (células sésseis), que secretam e são embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (RAMAGE; MARTINEZ; LOPEZ-RIBOT, 2006). A maioria dos estudos na microbiologia envolve células planctônicas (que apresentam crescimento livre). No entanto estimativas apontam que cerca de 80% dos microrganismos do ambiente participem de biofilmes, inclusive em processos infecciosos (DONLAN; COSTERTON, 2002; RAMAGE; MARTINEZ; LOPEZ-RIBOT, 2006). A formação do biofilme de *Candida* sp. pode ser dividida em várias etapas (figura 3). Inicialmente um filme condicionante é depositado na superfície, permitindo a adesão do microrganismo. Moléculas sinalizadoras, produzidas pelos microrganismos aderidos, são difundidas no ambiente, processo denominado *quorum sensing*. Uma determinada concentração de moléculas indica uma alta densidade celular, e a expressão gênica dos microrganismos é alterada, ativando genes necessários para a formação do biofilme. Na próxima etapa ocorre a produção e secreção da matriz polimérica extracelular que envolve microcolônias resultantes da multiplicação das células aderidas. O biofilme maduro é uma estrutura complexa, e contém canais em seu interior que possibilitam a propagação de nutrientes para todas as células (CHANDRA; MUKHERJEE; GHANNOUM, 2011; FOX; NOBILE, 2012; PADERA, 2006).

As células do biofilme possuem vantagens em relação às células planctônicas, como maior resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aos antimicrobianos. A maioria dos antifúngicos utilizados atualmente para o tratamento de candidíases apresenta pouco ou nenhum efeito sobre biofilmes maduros de *Candida* spp. Já foram relatados resistência ao fluconazol (BIZERRA et al., 2008; FIORI et al., 2011; MARTINS et al., 2011; NETT et al., 2010) anfotericina B (BIZERRA et al., 2008; FIORI et al., 2011; MARTINS et al., 2011), voriconazol (FIORI et al., 2011; KATRAGKOU et al., 2008) e nistatina (CHANDRA et al.,

2001). Entretanto, formulações lipídicas da anfotericina B e equinocandinas apresentam atividade antifúngica em biofilmes de *C. albicans* (FIORI et al., 2011; RAMAGE et al., 2013).

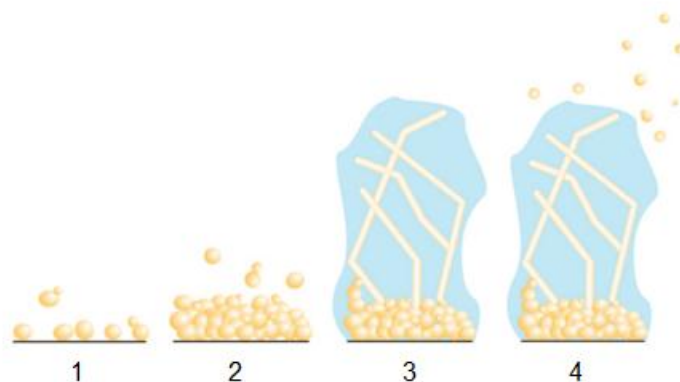
Figura 2 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do biofilme de *C. tropicalis* em catéter de PVC em diversos períodos de tempo. Nas primeiras 3 horas (1) observa-se microcolônias de leveduras aderidas à superfície. No desenvolvimento do biofilme (2), assim como no biofilme maduro de 24 e 48 horas (3 e 4) predominam formas filamentosas.



Fonte: BIZERRA et al., 2008.

A sensibilidade reduzida das células sésseis aos antifúngicos parece estar relacionada com o desenvolvimento temporal do biofilme. Um estudo de Chandra et al. (2001) com biofilmes de *C. albicans* formados em silicone mostrou que a resistência do biofilme a diversos antifúngicos aumentou proporcionalmente ao tempo de formação do biofilme. Para biofilmes com 72 horas de formação, as concentrações inibitórias mínimas de anfotericina B, fluconazol e nistatina foram de até 128 vezes superiores quando comparados com biofilmes nos estágios iniciais do desenvolvimento. Além disso, estudos mostram que antifúngicos com pouco efeito sobre biofilmes maduros, são capazes de prevenir o início da formação do biofilme (VALENTÍN et al., 2012).

Figura 3 - Etapas da formação do biofilme por *C. albicans*. Adesão das células planctônicas à superfície/interface (1), com posterior proliferação e adesão entre as leveduras (2). O biofilme maduro (3) é composto por uma camada de hifas e uma camada basal de blastoconídeos, envoltos por matriz polimérica extracelular. Após a maturação ocorre a dispersão (4) de leveduras do biofilme que irão colonizar outras superfícies.



Fonte: FOX e NOBILE, 2012.

A matriz polimérica extracelular é composta por carboidratos, como β -1,3 glucana, proteínas, hexosamina, fósforo, ácido urônico e DNA extracelular e pode funcionar como uma barreira, dificultando a penetração e difusão dos agentes antimicrobianos e anticorpos (PADERA, 2006; RAMAGE et al., 2012). Neste sentido, Nett et al. (2010) estudaram o papel da β -1,3 glucana sintase sobre a resistência do biofilme ao fluconazol, utilizando mutantes heterozigotos para o gene *FKSI*. As células planctônicas das cepas, mutante (*FKSI/fks1Δ*) e selvagem, foram sensíveis ao fluconazol. No entanto, o biofilme da cepa selvagem foi resistente ao fluconazol em concentrações até 1000 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o tratamento da cepa mutante com 250 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol causou uma drástica redução do biofilme. Os autores sugerem que a glucana agiria sequestrando o fluconazol na matriz polimérica extracelular e impedindo sua internalização celular.

A presença de DNA exógeno na matriz do biofilme também reduz sua sensibilidade aos antimicrobianos, embora não se saiba o papel exato desta molécula na resistência. Martins et al. (2011) mostraram que a adição de DNA se associada a anfotericina B e equinocandinas aumentou a sensibilidade do biofilme a estes antifúngicos, porém este efeito não foi observado com o fluconazol. Este autor sugere que o DNA exógeno é um componente estrutural de biofilmes maduros de *C. albicans*, contribuindo para sua estabilidade, mas não

seria essencial para a adesão inicial de células planctônicas à superfície ou para fases iniciais da formação do biofilme, como ocorre em algumas espécies bacterianas. Os mecanismos propostos para a liberação de DNA exógeno seriam lise celular, excreção de vesículas contendo o DNA, e este processo estaria relacionado ao *quorum sensing* (MARTINS et al., 2010).

Análises de modelos animais com candidíase orofaríngea mostraram que nestes casos o biofilme é mais complexo. Essa comunidade é formada pela levedura em associação com bactérias da microbiota, além de sua matriz conter componentes do hospedeiro como células de defesa, e queratina proveniente de células epiteliais (DONGARI-BAGTZOGLOU et al., 2009). As interações entre fungos e bactérias influenciam na sobrevivência e proliferação das espécies participantes do biofilme e tanto relações agonistas, como maior resistência aos antimicrobianos, como antagonistas podem ocorrer (GANGULY; MITCHELL, 2011).

Candida spp. também tem a capacidade de formar biofilme em superfícies abióticas como, próteses cardíacas, lentes de contato, stents, shunts e vários tipos de cateteres. A maioria das infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) por *Candida* spp. está associada a formação de biofilmes em dispositivos médicos, frequentemente evoluindo para candidemia com altas taxas de mortalidade (RAMAGE; MARTINEZ; LOPEZ-RIBOT, 2006; TUMBARELLO et al., 2012; ZAOUTIS et al., 2005). As infecções relacionadas a biofilmes em dispositivos médicos requerem tratamento prolongado com antifúngicos, ou até mesmo a retirada do dispositivo para o controle da infecção (RAMAGE; MARTINEZ; LOPEZ-RIBOT, 2006).

2.5 PRODUTOS NATURAIS COM EFEITO ANTIMICROBIANO - MÉIS

A toxicidade, via de administração, elevado custo e aparecimento de resistência são limitações dos poucos antifúngicos atualmente disponíveis. Como alternativa estudos com produtos naturais têm sido conduzidos (ADWAN et al., 2012; SARDI et al., 2013; TRAMMEL et al., 2012).

O mel já era utilizado por civilizações antigas, como os assírios, gregos, romanos e egípcios para o tratamento de tosse, inflamações, diarreias e outras doenças intestinais. Em

algumas regiões da Ásia e África o mel ainda é utilizado na medicina popular para o tratamento de feridas, exantema causado por sarampo, úlceras gástricas e dor de ouvido (MOLAN, 2009). Estudos científicos mostram que os méis possuem propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, antivirais, antimicrobianas, cicatrizantes e nematocidas (GOERDT et al., 2013; LIU et al., 2013; MAGHSOUDI et al., 2011; SAJID; AZIM, 2012; SHAHZAD; COHRS, 2012; SIMON et al., 2009; WEN et al., 2012).

O mel é produzido principalmente pelas abelhas pertencentes a sub-família *Meliponinae* e ao gênero *Apis*. O néctar e pólen são processados na colmeia através de reações enzimáticas e de evaporação para originar o produto final e podem ser coletados de uma ou várias espécies de planta. A composição do mel varia de acordo com a origem botânica, regiões fitogeográficas, as estações do ano e a espécie da abelha, porém os principais componentes independem do tipo de mel (DEMERA; ANGERT, 2004; JEFFREY; ECHAZARRETA, 1996; LIU et al., 2013; PIMENTEL et al., 2013). Aproximadamente 95% dos sólidos do mel são carboidratos, sendo que os principais são a frutose e glicose, porém outros açúcares como sucrose, maltose, isomaltose e açúcares complexos também estão presentes. Outras substâncias presentes em menor quantidade no mel incluem: minerais, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonoides e enzimas. A quantidade de água nos méis varia de 15% a 21% (v/v) (AURONGZEB; AZIM, 2011; FERREIRA et al., 2009; JEFFREY; ECHAZARRETA, 1996).

O efeito inibitório do mel foi extensivamente avaliado em três espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas também podem ser encontrados relatos dos efeitos desta substância em uma grande variedade de microrganismos (Tabela 1), incluindo fungos resistentes aos antifúngicos tradicionais.

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana de méis em diferentes espécies de microrganismos

Microrganismo	Méis	Referência
Bactérias Gram-positivas		
<i>Actinomyces viscosus</i>	Mel manuka	BADET; QUERO, 2010
<i>Bacillus</i> spp.	Cinco méis brutos da península arábica	AL-WAILI et al., 2013

	Dezessete méis comerciais de diferentes regiões do mundo	ALMAINAT; WAINWRIGHT; AL'ABRIK, 2012
	Mel de urze	FEÁS et al., 2013
<i>Corynebacterium</i> spp.	Dois méis brutos nativos da Austrália e méis comerciais: dourado, australiano, langanese, pak e Capilano	SHEIK, 1995
<i>Enterococcus</i> spp.	Mel langaneza	AL MASAUDI; AL BUREIKAN, 2012
	Medihoney™	GEORGE; CUTTING, 2007; GOERDT et al., 2013
<i>Kocuria rhizophila</i>	Mel bruto de <i>Trigona carbonaria</i> , capilano e Medihoney™	BOORN et al., 2009
	Cinco méis brutos da península arábica	AL-WAILI et al., 2013
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Mel manuka	BADET; QUERO, 2010
<i>Listeria monocytogenes</i>	Mel bruto de <i>T. carbonaria</i> , capilano e Medihoney™	BOORNet al., 2009
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Dois méis brutos nativos da Austrália e méis comerciais: dourado, langanese, pak, marhaba ehamdard	SHEIKH, 1995
<i>Staphylococcus</i> spp.	Mel bruto de <i>T. carbonaria</i> , capilano e Medihoney™	BOORN et al., 2009
	Cinco méis brutos da península arábica	AL-WAILI et al., 2013
	Mel de urze	FEÁS et al., 2013
	Seis méis brutos nativos de Taiwan	LIU et al., 2013;
<i>Streptococcus</i> spp.	Nove méis brutos e comerciais da Argentina	BASUALDO et al., 2007
	Mel manuka	BADET; QUERO, 2010
Bactérias Gram-negativas		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Medihoney™	GEORGE; CUTTING, 2007
	Mel bruto de <i>T. carbonaria</i> , capilano e Medihoney™	BOORN et al., 2009
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Dois méis brutos nativos da Austrália e méis comerciais: dourado,australiano,langanese, pak e Capilano	SHEIKH, 1995

<i>Alcaligenes faecalis</i>	Mel de lavanda, de viperina roxa, de eucalipto, rewa-rewa, manuka e Medihoney™	LUSBY; COOMBES; WILKINSON, 2005
<i>Citrobacter</i> spp.	Mel de lavanda, de viperina roxa, de eucalipto, rewa-rewa, manuka e Medihoney™	LUSBY; COOMBES; WILKINSON, 2005
	Mel bruto de <i>T. carbonaria</i> , capilano e Medihoney™	BOORN et al., 2009 LIU et al., 2013
	Seis méis brutos nativos de Taiwan	
<i>Enterobacter</i> spp.	Medihoney™	GEORGE; CUTTING, 2007
	Mel bruto de <i>T. carbonaria</i> , capilano e Medihoney™	BOORN et al., 2009
	Cinco méis brutos da península arábica	AL-WAILI et al., 2013
<i>Escherichia coli</i>	Oito méis brutos de abelhas indígenas brasileiras	BORSATO et al., 2013
	Mel de urze	FEÁS et al., 2013
	Mel branco, vermelho e tamza mar	GETANEH et al., 2013
	Seis méis brutos nativos de Taiwan	LIU et al., 2013
	Méis brutos das abelhas indígenas brasileiras <i>Melipona subnitida</i> e <i>Melipona compressipes manaosensis</i> , mel de eucalipto e mel comercial	PIMENTEL et al., 2013
<i>Helicobacter pylori</i>	Mel manuka	AL SOMA et al., 1994
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cinco méis brutos da península arábica	AL-WAILI et al., 2013
	Seis méis brutos nativos de Taiwan	LIU et al., 2013
	Méis brutos das abelhas indígenas brasileiras <i>M. subnitida</i> e <i>M. compressipes manaosensis</i> , mel de eucalipto e mel comercial	PIMENTEL et al., 2013
<i>Proteus vulgaris</i>	Dois méis brutos nativos da Austrália e méis comerciais: dourado, langanese e pak	SHEIKH, 1995 PIMENTEL et al., 2013
	Méis brutos das abelhas indígenas brasileiras <i>M. subnitida</i> e <i>M. compressipes manaosensis</i> , mel de eucalipto e mel comercial	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cinco méis brutos da península arábica	AL-WAILI et al., 2013
	Mel de urze	FEÁS et al., 2013
	Mel branco, vermelho e tamza mar	GETANEH et al., 2013
	Medihoney™	GOERDT et al., 2013
<i>Salmonella</i> spp.	Mel de lavanda, de viperina roxa, de eucalipto,	LUSBY; COOMBES;

	rewa-rewa, manuka e Medihoney™	WILKINSON, 2005
	Cinco méis brutos da península arábica	AL-WAILI et al., 2013
	Seis méis brutos nativos de Taiwan	LIU et al., 2013
	Méis brutos das abelhas indígenas brasileiras <i>M. subnitida</i> e <i>M. compressipes manaosensis</i> , mel de eucalipto e mel comercial	PIMENTEL et al., 2013
<i>Serratia marcescens</i>	Mel bruto de <i>T. carbonaria</i> , capilano e Medihoney™	BOORN et al., 2009
	Dezessete méis comerciais de diferentes regiões do mundo	ALMAINAT; WAINWRIGHT; AL'ABRIK, 2012
	Cinco méis brutos da península arábica	AL-WAILI et al., 2013
<i>Shigella</i> spp.	Dois méis brutos nativos da Austrália e méis comerciais: australiano, dourado, langanese, pak, capilano, marhaba e hamdard	SHEIKH, 1995 BOORN et al., 2009
	Mel bruto de <i>T. carbonaria</i> , capilano e Medihoney™	PIMENTEL et al., 2013
	Méis brutos das abelhas indígenas brasileiras <i>M. subnitida</i> e <i>M. compressipes manaosensis</i> , mel de eucalipto e mel comercial	
<i>Vibrio</i> spp.	Dois méis brutos nativos da Austrália e méis comerciais: australiano, dourado, langanese, pak, capilano, marhaba e hamdard	SHEIKH, 1995
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Mel bruto de <i>T. carbonaria</i> , capilano e Medihoney™	BOORN et al., 2009
Bactérias resistentes	Ácido-álcool	
<i>Mycobacterium phlei</i>	Mel de lavanda, de viperina roxa, de eucalipto, rewa-rewa, manuka e Medihoney™	LUSBY; COOMBES; WILKINSON, 2005
Fungos		
<i>Allescheria boydii</i>	Mel Capilano	SHEIKH, 1995
<i>Aspergillus</i> spp.	Mel de citrus, jujube, de laranja e multifloral	MOUSSA et al., 2011
	Quatro méis comerciais da Nigéria	ANYANWU, 2012
	Cinco méis brutos da península arábica	AL-WAILI et al., 2013
<i>Candida</i> spp.	Mel manuka, jarrah e Medihoney™	IRISH et al., 2006

	Mel bruto da Turquia	KOÇ et al., 2011
	Cinco méis brutos da península arábica	AL-WAILI et al., 2013
	Oito méis brutos de abelhas indígenas brasileiras	BORSATO et al., 2013
	Mel de urze	FEÁS et al., 2013
	Medihoney™	GOERDT et al., 2013;
	Dezessete méis brutos do Irã	KHOSRAVI et al., 2008; KHOSRAVI-DARANI, 2013
<i>Microsporium</i> spp.	Mel australiano e capilano	SHEIKH, 1995
	Quatro méis comerciais da Nigéria	ANYANWU, 2012
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Quatro méis comerciais da Nigéria	ANYANWU, 2012
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Seis méis brutos nativos da Argélia	MOUSSA et al., 2012b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cinco méis brutos da Costa Rica	DEMERA; ANGERT, 2004
	Quatro méis comerciais da Nigéria	ANYANWU, 2012
<i>Tinea</i> spp.	Mel de acácia	NGATU, 2011
<i>Trichosporon</i> spp.	Mel bruto da Turquia	KOÇ et al., 2011
<i>Tricophyton</i> spp.	Mel bruto nativo da Austrália e méis comerciais: australiano, langanese e capilano	SHEIKH, 1995
Vírus		
Varicela-Zoster	Mel de trevo e manuka	SHAHZAD; COHRS, 2012

Fonte: o próprio autor

Vários estudos mostram que os méis capilano, langaneza, Medihoney™, assim como méis não processados produzidos pelas abelhas *Trigona carbonaria*, *Apis mellifera* e *Apis mellipodae* apresentam efeito antibacteriano tanto em *S. aureus* sensível (MSSA) quanto *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* sensível (VSE) quanto resistente (VRE) à vancomicina (AL MASAUDI; AL BUREIKAN, 2012; BOORN et al., 2009; GETANEH et al., 2013; GOERDT et al., 2013). George e Cutting (2007) avaliaram o efeito do Medihoney™, mel comercial voltado para uso hospitalar, em *E. coli*, *K. pneumoniae*,

Enterobacter cloacae e *P. aeruginosa* produtoras de β -lactamases de espectro estendido, *A. baumannii* multirresistente, *S. aureus* com perfis variados de resistência antimicrobiana, incluindo MRSA, e VRE. A CIM para todos os isolados testados variou de 4% a 14% (v/v), sendo que não houve diferença significativa entre isolados sensíveis e resistentes da mesma espécie. Mulu et al. (2010) compararam o efeito do mel multifloral da Etiópia em isolados de *Candida* spp. sensíveis, dose-dependentes e resistentes ao fluconazol. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) variou de 35% a 40% (v/v).

Para o gênero *Candida* são descritos efeitos inibitórios de méis para as seguintes espécies: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. famata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. reukaufii*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis* (AL-WAILI et al., 2013; CAVANAGH; BEAZLEY; OSTAPOWICZ, 1970; FEÁS et al., 2013; KHOSRAVI et al., 2008; KHOSRAVI-DARANI, 2013). *C. dubliniensis* apresentou maior sensibilidade aos méis de abelhas nativas do Irã (KHOSRAVI et al., 2008) e manuka, MedihoneyTM e mel jarrah (IRISH et al., 2006). *C. krusei* é frequentemente relatada entre as espécies mais sensíveis ao mel (ESTEVINHO; AFONSO; FÉAS, 2011; FEÁS et al., 2013). *C. glabrata* foi a espécie mais resistente aos méis testados (BOORN et al., 2009; IRISH et al., 2006).

Em diferentes estudos, a CIM do mel de diferentes espécies de abelhas para *Candida* spp. variou de 6,75% a 100% (v/v), fato que pode ser explicado não somente por diferenças na composição do mel, mas também por diferenças nas metodologias utilizadas que incluem: diluição em ágar, difusão em ágar (disco difusão ou difusão em poço), espectrofotometria, diluição em caldo (macro ou microdiluição). Embora os métodos de diluição ou difusão em ágar sejam bastante empregados, estudos que comparam efeito do mel usando diversas metodologias, mostram que a diluição em caldo é mais sensível (AL MASAUDI; AL BUREIKAN, 2010; ANYANWU, 2012; PATTON et al., 2006; PIMENTEL et al., 2013). Al Masaudi e Al Bureikan (2010) avaliaram o efeito de sete méis naturais e comerciais empregando duas metodologias. A inibição do crescimento de diversos fungos e bactérias ocorreu a partir de 10% (v/v) empregando-se a metodologia de macrodiluição em caldo e somente a partir de 50% empregando a metodologia de difusão em poços. Segundo Pimentel et al. (2013), a maior sensibilidade dos fungos aos méis, associada a metodologia de diluição em caldo em relação as metodologias de diluição/difusão em ágar pode ser explicada pela presença de substâncias no mel que não se difundem apropriadamente no ágar, devido a

diferenças na polaridade destas moléculas e do meio solidificado. No meio líquido, entretanto, moléculas polares e apolares possuem boa mobilidade.

A terapia antimicrobiana tradicional visa fármacos com o potencial de matar ou inibir o crescimento do microrganismo no hospedeiro, entretanto tem se discutido novos fármacos cujo alvo seja a inibição de fatores de virulência (JACOBSEN et al., 2012; WATANABE et al., 2012). A ação dos méis não se limita à inibição do crescimento. Candiracci, Citterio e Piatti (2012) mostraram que o extrato de mel multifloral italiano rico em flavonoides foi capaz de impedir a formação de tubo germinativo e hifas em *C. albicans*, além de diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio, que podem desempenhar um papel na patogenicidade desta espécie.

O efeito inibitório de méis na adesão em superfícies bióticas e abióticas ou em diferentes etapas do biofilme já foi relatado nos seguintes microrganismos: *Enterobacter cloacae*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Proteus mirabilis*, *A. viscosus*, *C. albicans*, *E. coli*, *L. rhamnosus*, *P. aeruginosa* e *Streptococcus* spp. (ANSARI et al., 2013; BADET; QUERO, 2011; LEE et al., 2011; LOK, 2013; MADDOCKS et al., 2012; MAJTAN et al., 2013; OKHIRIA et al., 2009). Badet e Quero (2011) mostraram que o mel manuka em concentrações de 0,01% (p/v), foi capaz de inibir a formação do biofilme de várias espécies bacterianas participantes da microbiota bucal, além de inibir a aderência de estreptococos em superfície abiótica. Lee et al. (2011) mostraram que o mel de acácia e o mel de trevo foram capazes de reduzir a formação do biofilme em 95% em *E. coli* na concentração de 0,5% (v/v), assim como inibir a adesão desta espécie em uma linhagem de células de adenocarcinoma de cólon (HT-29). Segundo Ansari et al. (2013) o mel jujube a partir de concentrações de 10% (p/v) foi capaz de reduzir a atividade metabólica do biofilme em estágios iniciais de formação, assim como romper biofilmes maduros de *C. albicans*.

O efeito antimicrobiano dos méis é atribuído a uma série de fatores como: pH, higroscopicidade, produção de peróxido de hidrogênio, efeito osmótico, flavonoides, ácidos orgânicos, entre outros (AURONGZEB; AZIM, 2011).

Os açúcares presentes no mel interagem fortemente com a água, deixando poucas moléculas de água disponíveis para o microrganismo. A água livre é mensurada como atividade da água (a_w) e em méis não diluídos este valor se encontra na faixa de 0,479 a 0,557, valores abaixo de 0,6 não permitem a proliferação de nenhum tipo de microrganismo. Grande

parte das bactérias é inibida se a a_w se encontra abaixo da faixa de 0,94 a 0,99, o que corresponderia a mel diluído em concentrações de 2% a 12% (v/v), no entanto algumas bactérias como *S. aureus* ($a_w = 0,86$) são mais resistentes. Para leveduras e fungos filamentosos a atividade da água mínima para permitir seu crescimento está entre 0,61 e 0,90, porém varia muito conforme a espécie. Os fungos *Trichothecium roseum* ($a_w = 0,90$), *Saccharomyces cerevisiae* ($a_w = 0,90$) e *Candida* spp. ($a_w = 0,88$) são os mais sensíveis a falta de água livre enquanto *Saccharomyces rouxii* ($a_w = 0,62$) e *Monascus bisporus* ($a_w = 0,62$) os mais resistentes (AURONGZEB; AZIM, 2011; BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2007; MOLAN, 2009).

Durante a coleta do néctar, as abelhas secretam através da glândula hipofaríngea a enzima glucose oxidase, responsável pela produção de duas substâncias importantes para a atividade antimicrobiana dos méis: o ácido glucônico e o peróxido de hidrogênio. O ácido glucônico é a principal substância que confere acidez ao mel. O pH do mel varia entre 3,2 e 4,5, sendo que a acidez contribui parcialmente para o efeito inibitório deste produto natural (MOLAN, 2009).

O peróxido de hidrogênio é atribuído por muitos autores como a principal substância responsável pelo efeito antimicrobiano dos méis (AURONGZEB; AZIM, 2011; MOLAN, 2009). Sua quantidade em determinado tipo de mel é influenciada por vários fatores como os níveis da enzima catalase, quantidade de água, luz e temperatura. A enzima catalase no mel é originária do pólen floral e decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, logo a quantidade de peróxido no mel é o resultado do equilíbrio entre a taxa de formação pela glucose oxidase e a taxa de decomposição pela catalase. A atividade da enzima glucose oxidase é dependente da quantidade de água, sendo que esta encontra-se praticamente inativa no mel puro. No entanto em diluições do mel entre 30 e 50% a atividade da enzima é ótima, acarretando na produção de altas quantidades de peróxido de hidrogênio. Alguns íons metálicos e o ácido ascórbico podem reagir com o peróxido de hidrogênio causando sua degradação (AURONGZEB; AZIM, 2011). Além disso, o aquecimento ou a exposição a luz desnaturam a enzima glucose oxidase, acarretando em uma menor produção de peróxido de hidrogênio (MOLAN, 2009). Chen et al. (2012) avaliaram o efeito do processamento do mel, através de aquecimento e filtração, sobre a atividade antimicrobiana. Em treze amostras das dezessete utilizadas no estudo, o processamento do mel diminuiu ou não alterou o efeito antifúngico em *C. albicans*. Neste estudo houve alta correlação entre a quantidade de

peróxido de hidrogênio no mel e a atividade antimicrobiana. O aquecimento levou a uma diminuição, em variados graus, da concentração de peróxido de hidrogênio nas amostras. Porém, segundo os autores, a produção desta substância não é o único responsável pelo efeito dos méis, uma vez que amostras que não continham peróxido de hidrogênio, assim como o mel artificial, foram capazes de inibir o crescimento da levedura. Feás et al. (2013) também avaliaram o efeito do peróxido de hidrogênio sobre a atividade antimicrobiana do mel de urze para microrganismos. Após tratamento do mel com catalase, houve uma diminuição da inibição, sendo que a CIM média aumentou 2,23% e 4,65% para bactérias e leveduras, respectivamente.

Alguns méis possuem fatores adicionais, além dos citados acima, que contribuem para sua atividade antimicrobiana. A lisozima está presente em alguns méis, em maior quantidade quando este é recém coletado da colmeia (MOLAN, 2009). Flavonoides como a pinocembrina, apigenina, naringenina, rutina, kaempferol, quercetina, galangina, tectochrysin e chrysin foram detectados em méis de várias regiões do mundo (MAJTAN et al., 2013; MOLAN, 2009; PIMENTEL et al., 2013; SABATIER et al., 1992). Ácidos fenólicos como o ácido siríngico, metil-siringato e ácido 3,4,5 trimetóxi-benzoico, além de metilglioxal foram isolados do mel manuka (*Leptospermum scoparium*), e o 1,4 dihidroxibenzeno do mel de viperina (ADAMS et al., 2008; MOLAN et al., 1989).

O sinergismo do mel com diversas substâncias também pode ser um aliado no tratamento de infecções. Al Masaudi e Al Bureikan (2012) mostraram que a mistura de extrato de cebola e mel comercial originário da Alemanha, teve efeito sinérgico em cinco espécies de bactérias e *C. albicans*. Khosravi-Darani et al. (2013) mostraram que três variedades de méis provenientes do Irã, possuíam atividade em *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*. Houve efeito inibitório aditivo para todas as espécies quando o mel foi misturado com pequenas concentrações de diversas substâncias como: extrato de menta, extrato de gengibre, extrato de Zataria e amido de gengibre, sendo que, a exceção do mel, nenhum destes compostos teve efeito inibitório sozinho. Al-Waili et al. (2012) mostraram que o mel e própolis em combinação possuem efeito sinérgico para *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*. Alguns estudos avaliaram o efeito aditivo da suplementação de uma variedade de méis com amido em fungos (BOUKRAA; BENBAREK; MOUSSA, 2008; MOUSSA et al., 2011, 2012a). Moussa et al., (2012b) analisaram quatro méis algerianos com CIM média de 38% a 42% (v/v) para *C. albicans*, sendo que a adição de amido reduziu de 14% a 16% a CIM dos

mesmos. Segundo o autor, o efeito pode ser explicado pela presença da enzima amilase no mel, que degradaria as cadeias do amido produzindo dextrina e maltose e aumentando o efeito osmótico do mel.

Atualmente o mel tem sido uma alternativa para o tratamento de feridas, queimaduras, escaras, úlceras, entre outros, que não respondem ao tratamento convencional com antissépticos e antibióticos. Estudo de Maghsoudi et al. (2011) com 100 pacientes que sofreram queimaduras mostrou que a aplicação tópica de mel multifloral puro foi mais eficiente que o acetato de manefide no controle infeccioso, além de mais rápido no processo de atenuação da inflamação aguda, epitelização e cicatrização das queimaduras. No grupo tratado com mel após 21 dias todos os pacientes haviam sido curados, enquanto o grupo tratado com acetato de manefide 26% ainda apresentavam feridas e destes, metade apresentava culturas das feridas positivas para crescimento bacteriano. Ngatu et al. (2011) mostraram que a aplicação tópica com mel de Acácia e o extrato de propólis verde foram capazes de amenizar sintomas de *Tinea capitis* e *Tinea versicolor*, como descamação, prurido, eritemas e formação de pápulas ou pústulas. O MedihoneyTM, mel coletado da planta *Leptospermum* spp., tem benefícios relatados no tratamento de doenças crônicas da superfície ocular, feridas infeccionadas, prevenção de inflamações como mucosite e gengivite, comuns em pacientes submetidos a quimioterapia e tratamento das lesões ocasionadas por herpes genital e labial (Simon et al., 2009). Abdelmonem, Rasheed e Mohamed (2012) compararam uma mistura de iogurte e mel com o antifúngico tioconazol para o tratamento de candidíase vulvovaginal. Após sete dias de tratamento, a mistura mel/iogurte foi mais eficiente que o azólico para eliminação de sintomas como corrimento, coceira e vermelhidão vulvo-vaginal. Além disso, a taxa de cura clínica para o grupo tratado com esta mistura foi maior (82,7%) em relação ao grupo tratado com tioconazol (72,3%).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi verificar o potencial antifúngico dos méis produzidos pelas abelhas indígenas sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata* e *Scaptotrigona postica* em *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinação do perfil de sensibilidade de células planctônicas de *Candida* spp. aos méis, antes e após a adição da enzima catalase.
- Determinação do efeito sinérgico entre as combinações dos méis e entre a combinação de cada mel com o fluconazol.
- Avaliação do efeito dos méis sobre a morfogênese, adesão e biofilme de *C. albicans*.
- Avaliação do efeito hemolítico dos méis em eritrócitos humanos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão deste trabalho foram apresentados na forma de dois artigos científicos.

4.1 ARTIGO1: POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE MÉIS PRODUZIDOS POR ABELHAS INDÍGENAS SEM FERRÃO BRASILEIRAS *SCAPTOTRIGONA BIPUNCTATA* E *SCAPTOTRIGONA POSTICA* (MELIPONINAE, APIDAE, HYMENOPTERA) EM *CANDIDA ALBICANS*

Marina Andrea Bosini, Sueli Fumie Yamada-Ogatta*

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

* Correspondência: Sueli Fumie Yamada-Ogatta, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia. Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380. CEP 86057-970. Tel: +55-43-3371-5503; fax: +55-43-3371-4788. e-mail:ogatta@uel.br

RESUMO

Candida albicans é um fungo oportunista que normalmente participa da microbiota humana, colonizando diversos sítios anatômicos. O estado imunológico e o ambiente da mucosa bucal do indivíduo, e os fatores de virulência da levedura como adesão, produção de biofilme e transição para a forma de hifas, contribuem para o estabelecimento da candidíase orofaríngea. A toxicidade, via de administração, elevado custo e aparecimento de resistência são limitações dos poucos antifúngicos disponíveis para o tratamento de candidíases. Como alternativa, estudos com produtos naturais têm sido conduzidos. Os méis possuem propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, antivirais, antimicrobianas, cicatrizantes e nematocidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos méis das espécies de meliponíneos *Scaptotrigona bipunctata* e *Scaptotrigona postica* sobre o crescimento e expressão de fatores de virulência de células planctônicas de *C. albicans*. Também foi avaliada a atividade hemolítica em eritrócitos humanos. Os dezesseis isolados analisados foram sensíveis a ambos os méis, e a CIM₅₀ variou entre 10% a 40% (v/v). O tratamento dos méis com catalase aumentou a CIM média em 12,5% para o mel de *S. bipunctata* e 7,5% para o mel de *S. postica*, sugerindo que o peróxido de hidrogênio é parcialmente responsável pelo efeito antifúngico dos méis. Não houve efeito sinérgico entre os méis, ou a combinação de cada mel com o fluconazol. O mel de *S. bipunctata* reduziu a adesão em poliestireno em até 26,4% e a biomassa do biofilme em 62,6% das leveduras. O mel de *S. postica* reduziu a adesão em poliestireno em 35,2% e a biomassa em 63%. Ambos os méis a partir da concentração de 20% reduziram de forma significativa à morfogênese do isolado clínico 82 e da cepa de referência ATCC MYA-2876. Nenhum dos méis apresentou efeito hemolítico nas concentrações testadas neste estudo. A microscopia revelou morte das leveduras após três horas de tratamento com o mel de *S. bipunctata* e seis horas de tratamento com o mel de *S. postica*. Em conjunto os resultados indicam o potencial antifúngico dos méis analisados.

Palavras chave: *C. albicans*; produtos naturais; mel; Meliponinae; antifúngicos

INTRODUÇÃO

O prognóstico das candidíases tem sido dificultado pela eficácia reduzida dos poucos fármacos comercialmente disponíveis tanto para células planctônicas (HORN et al., 2009; PASQUALE et al., 2008; PFALLER et al., 2010; TORTORANO et al., 2012) quanto biofilmes (BIZERRA et al., 2008; CHANDRA et al., 2001a, b; HAWSER; DOUGLAS, 1995; JAIN et al., 2007; KATRAGKOU et al., 2008; KUHN et al., 2002; MELO; COLOMBO; ARTHINGTON-SKAGGS, 2011; RAMAGE et al., 2001a, b). Assim, o desenvolvimento de novas substâncias com atividade antifúngica sem toxicidade para células de mamíferos e de baixo custo tem sido um desafio para pesquisadores e para a indústria farmacêutica.

Fontes naturais têm sido uma das alternativas na busca por componentes mais efetivos e menos tóxicos para o tratamento de candidíases. O uso do mel na medicina popular para o tratamento de infecções microbianas e cicatrização de feridas é uma prática comum desde a antiguidade. O mel e seus derivados são alimentos funcionais que contribuem para a manutenção da saúde, reduzindo o risco de doenças (ROSS, 2000). De fato, uma série de efeitos biológicos tem sido associados ao mel como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e prebiótica (VIUDA-MARTOS et al., 2008). O efeito inibitório do mel, no crescimento de diferentes microrganismos inclusive aqueles que são resistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis, renovou o interesse de muitos pesquisadores para a aplicação clínica deste alimento. Assim, diversos autores tem mostrado o potencial antimicrobiano de diferentes tipos de méis em bactérias (BOORN et al., 2009; IRISH; BLAIR; CARTER, 2011; KWAKMAN; ZAAT, 2012; RIGHI et al., 2011;), vírus (ZEINA; OTHMAN; AL-ASSAD, 1996), protozoários (FREITAS et al., 2006) e fungos (DOTA et al., 2011; KOÇ et al., 2011).

As abelhas sem ferrão (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera) são nativas de áreas tropicais e subtropicais do mundo como América Latina, África, Ásia e Austrália (PEDRO; CAMARGO, 1991). Meliponinae é o mais rico e abundante táxon de abelhas encontrado na mata Atlântica (abrangendo da Paraíba a Santa Catarina) no Brasil (GONÇALVES; BRANDÃO, 2008). Particularmente, 19 espécies de 12 gêneros de abelhas sem ferrão nativas pertencentes a subfamília Meliponinae foram encontradas na cidade de Londrina e municípios vizinhos [Norte do estado do Paraná, Brasil (PRONI, 2000)].

Atividade antibacteriana do mel obtido da abelha sem ferrão nativa da Austrália *Trigona carbonaria* foi descrito na literatura (BOORN et al., 2009; IRISH; BLAIR;

CARTER, 2011), indicando seu potencial antimicrobiano. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antifúngico do mel produzido pelas abelhas sem ferrão nativas do Brasil *Scaptotrigona bipunctata* e *Scaptotrigona postica* (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera) sobre *Candida albicans*. O efeito sobre a adesão, morfogênese e biofilme também foi analisado.

MATERIAIS E MÉTODOS

MICROORGANISMOS

Um total de 14 isolados de *Candida albicans* coletados da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos ($n=9$), e indivíduos saudáveis ($n=5$) foram selecionados a partir da coleção do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. A identificação das espécies dos isolados bucais foi realizada por métodos micológicos e moleculares padronizados (KURTZMAN; FELL, 1998). As cepas de referência *C. albicans* ATCC 26790 e ATCC MYA-2876 (gentilmente cedidas pela FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) também foram incluídas em determinados ensaios. Todos os isolados de *Candida* e cepas de referência foram previamente cultivadas à 37 °C por 24 horas em caldo Sabouraud Dextrose (SD) (Himedia, Índia). As leveduras foram centrifugadas, lavadas duas vezes em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7.4 contendo 0,15 M NaCl (PBS) e a densidade celular ajustada segundo a escala 0,5 de McFarland para 1 a 5×10^6 UFC/mL em PBS antes dos experimentos. Os isolados e as cepas foram mantidos em SD ágar e subcultivadas mensalmente. As leveduras também foram mantidas a -80 °C. O protocolo do estudo estava de acordo com as normas do Comitê de Ética envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEP/UEL no. 036/10).

MEL

Méis puros de *Scaptotrigona bipunctata* e *Scaptotrigona postica* foram coletados em Mauá da Serra, Paraná, Brasil. Os méis de ambas as abelhas sem ferrão foram previamente

esterilizados por filtração (0.22 µm, Millipore, São Paulo, Brasil), diluídos em meio RPMI 1640 (Invitrogen, Brazil) tamponado com MOPS pH 7.0 como soluções volume/volume (v/v) e adicionados assepticamente ao meio de crescimento em concentrações determinadas. Os méis foram mantidos a 4 °C no escuro.

PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA

A concentração inibitória mínima (CIM) dos méis e do fluconazol (Sigma Chemical Co., Brasil) para todos os isolados e cepas de referência foi determinado pela técnica de microdiluição em caldo para leveduras de acordo com as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Os méis (40 - 0,08% v/v) e fluconazol (128 - 0.25 µg/mL) foram diluídos seriadamente (1:2) em meio RPMI 1640. O controle de qualidade *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi incluído em cada experimento. Dois poços de cada placa serviram como controles de esterilidade e crescimento. A CIM foi definida como inibição visual do crescimento de 50% das leveduras (CIM₅₀) após incubação de 24 horas em comparação as células planctônicas sem tratamento. Os critérios interpretativos para a susceptibilidade ao fluconazol foram aqueles publicados pelo CLSI (2008). Para avaliar se a atividade antifúngica do mel é dependente da presença de peróxido de hidrogênio, alíquotas de 1 mL de cada mel foram tratados por 2 horas com 2700 U/mL de catalase (Sigma Chemical Co., Brasil). A determinação do perfil de sensibilidade ao méis tratados ou não com catalase foi realizada para os isolados clínicos E, O e 82 e para a cepa de referência ATCC 26790. A avaliação do sinergismo entre as combinações mel de *S. bipunctata*/fluconazol, mel de *S. postica*/fluconazol e mel de *S. bipunctata*/mel de *S. postica* foi realizada para o isolado clínico 82, segundo Cantón et al. (2005) utilizando-se a metodologia de microdiluição em caldo “checkerboard”. A Concentração Inibitória Fracionária (FICI) foi definida como a soma da CIM de cada substância quando utilizada em combinação dividida pela CIM da substância sozinha. Efeitos sinérgicos e antagônicos foram definidos como FICI ≤ 0,5 e ≥ 4, respectivamente.

EFEITO DOS MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO NA ADESÃO EM SUPERFÍCIE ABIÓTICA

Para determinar o efeito dos méis na adesão de *C. albicans* em poliestireno foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato (Techno Plastic Products, Switzerland).

Alíquotas contendo 1×10^6 leveduras foram adicionados em cada poço das placas que continham méis em diferentes concentrações (40% - 10% v/v). Após 2 horas de incubação à 37 °C o meio foi aspirado e cada poço foi lavado três vezes com PBS. Foi realizada a leitura da biomassa das células aderentes segundo Borges, Silva e Teixeira (2012). Duzentos microlitros de metanol foram adicionados em cada poço para a fixação das leveduras nas placas. Após 15 minutos o metanol foi retirado e as placas secas à temperatura ambiente. 100 µL de cristal violeta a 2% foram adicionados em cada poço e após incubação por 5 minutos as placas foram lavadas três vezes com 200 µL de água destilada. Foram adicionados 160 µL de ácido acético glacial a 33% e realizada a leitura do sobrenadante à 595 nm.

EFEITO DOS MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO NO BIOFILME

Para determinar o efeito inibitório em células sésseis, biofilmes foram formados em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (Techno Plastic Products, Switzerland) segundo Pierce et al. (2008). Uma suspensão (100 µL) em meio RPMI 1640 com 1×10^5 leveduras foi colocada em cada poço das placas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. O meio foi aspirado e cada poço foi lavado três vezes com PBS. Uma alíquota de 100 µL de meio RPMI 1640 contendo diferentes concentrações dos méis (40% - 10% v/v) foram adicionadas e as placas incubadas por mais 24 horas a 37 °C. O experimento incluiu poços de controle de esterilidade e crescimento. A leitura da biomassa dos biofilmes foi realizada conforme descrito anteriormente.

EFEITO DOS MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO NA MORFOGÊNESE

O efeito dos méis na morfogênese do isolado clínico 82 e da cepa de referência ATCC MYA-2976 foi determinado de acordo com Candiracci, Citterio e Piatti (2012) com modificações. 100 µL de uma suspensão leveduriforme (1×10^6 UFC/mL) foram adicionados ao meio RPMI 1640 contendo diferentes concentrações de méis (40 - 10% v/v). Após 2-3 horas de incubação a 37 °C, as células foram observadas. Duzentas células foram contadas em microscópio de luz (Olympus) e a porcentagem de germinação (tubos germinativos, hifas e pseudo-hifas) foi calculada.

EFEITO HEMOLÍTICO DOS MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO EM ERITRÓCITOS HUMANOS

Para este experimento, realizado segundo Izumi et al. (2012), o sangue foi obtido voluntariamente de um doador humano saudável, desfibrinado e lavado com PBS para o isolamento de eritrócitos. Os eritrócitos foram diluídos a 3% em PBS juntamente com os méis em concentrações que variaram de 20% a 2,5% v/v e incubados por 3 horas à 37 °C. Após o período de incubação, a leitura do sobrenadante foi realizada a 550 nm. Triton X-100 à 1% foi utilizado como controle positivo, para calcular a porcentagem de hemólise, e eritrócitos diluídos em PBS foram utilizados como controle negativo. A concentração capaz de causar hemólise em 50% dos eritrócitos (CC₅₀) foi determinada por regressão linear.

MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A microscopia com o kit LIVE/DEAD® Yeast Viability (Molecular Probes, USA) foi realizada para avaliar a viabilidade das células planctônicas de *C. albicans*. Alíquotas do isolado clínico 82 (1×10^5 UFC/mL) foram tratadas com 4 x CIM₅₀ dos méis por 3 e 6 horas, lavadas com PBS e incubadas com os corantes fluorescentes FUN-1 e Calcofluor White (Molecular Probes, USA), segundo instruções do fabricante. A viabilidade celular foi analisada em microscópio de fluorescência (LEICA DM2500), utilizando-se os filtros de fluoresceína para o corante FUN-1 e DAPI para o corante Calcofluor White.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados pelo programa GraphPad Prism 5.0, utilizando-se os testes t de Student e correlação de Pearson. Foram consideradas estatisticamente significativas, diferenças entre as médias no nível de significância de 95% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

PERFIL DE SENSIBILIDADE DAS CÉLULAS PLANCTÔNICAS AOS MÉIS E FLUCONAZOL

A CIM₅₀ dos méis variou de 10% a 40% para ambos os méis e de 0,5 µg/mL a 128 µg/mL para o fluconazol (Tabela 1). Os isolados E e 122, originários da cavidade bucal de indivíduos saudáveis foram resistentes ao fluconazol, segundo as diretrizes do CLSI, e suas CIM₅₀ foram de 64 µg/mL e 128 µg/mL, respectivamente. Para avaliar se a atividade antifúngica do mel é dependente da presença de peróxido de hidrogênio nos méis de *S. bipunctata* e *S. postica*, comparamos o perfil de sensibilidade de quatro isolados para os méis com ou sem tratamento prévio com a enzima catalase. Nos méis tratados com catalase a CIM média para os méis de *S. bipunctata* (25%) e *S. postica* (25%) foi maior que a CIM média dos méis não tratados (12,5% para o mel de *S. bipunctata*; 17,5% para o mel de *S. postica*).

EFEITO DOS MÉIS NA ADESÃO DE *C. ALBICANS* EM SUPERFÍCIE ABIÓTICA

Após duas horas, a adesão produzida pelos isolados não tratados variou de 0,084 a 0,186 (média = 0,125 ± 0,035). A presença dos méis diminuiu a adesão de *C. albicans* em poliestireno em todas as concentrações testadas (Figura 1), sendo que para o mel de *S. bipunctata* a redução média da adesão foi de até 26,4% ($p = 0,0012$) e para o mel de *S. postica* até de 35,2% ($p = 0,0008$) em relação ao controle.

EFEITO DOS MÉIS EM BIOFILMES MADUROS DE *C. ALBICANS*

A biomassa produzida pelos biofilmes maduros não tratados (Figura 2) dos isolados e cepas de referência variou de 0,300 a 3,533 (média = 1,263 ± 0,915) e houve correlação positiva com a adesão em poliestireno ($p = 0,0021$). A redução média da biomassa ocorreu em todas as concentrações testadas para ambos os méis, e foi de até 62,6% para o mel de *S.*

bipunctata e de até 63% para o mel de *S. postica*, entretanto foi considerada significativa somente para o tratamento com mel de *S. postica* em concentração de 40%. A $SCIM_{50}$ média calculada por regressão linear foi de 33,06% para o mel de *S. bipunctata* e 29,96% para o mel de *S. postica*.

EFEITO DOS MÉIS NA MORFOGÊNESE DE *C. ALBICANS*

Para o isolado clínico 82 e a cepa de referência ATCC MYA-2876 a porcentagem de formas germinativas após incubação em meio RPMI 1640 foi de $86,16\% \pm 4,69$ e $82,23\% \pm 25,72$, respectivamente (Figura 3). No isolado clínico houve redução significativa na morfogênese após tratamento com ambos os méis em todas as concentrações testadas. Para a cepa ATCC MYA-2876 a redução na morfogênese foi significativa após o tratamento com o mel de *S. bipunctata* nas concentrações de 20% e 40% ou tratamento com o mel de *S. postica* na concentração de 40%.

EFEITO HEMOLÍTICO DOS MÉIS EM ERITRÓCITOS HUMANOS

O tratamento com ambos os méis não resultou em hemólise superior a 50% em todas as concentrações testadas (Figura 4). A CC_{50} obtida através de regressão linear foi de 39,28% para o mel de *S. bipunctata* e 54,14% para o mel de *S. postica*.

MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A viabilidade celular de *C. albicans* foi verificada utilizando-se o kit LIVE/DEAD[®]. O corante fluorescente, FUN-1 é convertido em estruturas intravacuolares vermelhas, em células metabolicamente ativas (Figura 5A), enquanto células mortas emitem fluorescência verde difusa (Figura 5C, 5D e 5F). Já o corante Calcofluor White (Figura 5B) é um marcador de parede celular do fungo. O tratamento com o mel de *S. bipunctata* (Figura 5C e 5D) resultou

em morte celular após três horas, enquanto o tratamento com o mel de *S. postica* (Figura 5E e 5F), resultou em morte celular após seis horas de tratamento.

DISCUSSÃO

Leveduras do gênero *Candida* participam como comensais da microbiota humana em diversos sítios anatômicos, e estão presentes na microbiota bucal de 30% a 50% dos indivíduos saudáveis, sendo *C. albicans* a espécie mais comum. A candidíase orofaríngea se estabelece em indivíduos imunossuprimidos, mas também é influenciada pelo ambiente da mucosa bucal e os fatores de virulência da levedura (RAO, 2012).

O mel foi utilizado por civilizações antigas para o tratamento de tosse, inflamações, feridas, doenças intestinais e ainda está presente na medicina popular de regiões da Ásia e África. Estudos científicos mostram que os méis possuem uma série de propriedades, entre elas, atividade inibitória contra uma variedade de patógenos, como bactérias, fungos, vírus e parasitos (MOLAN, 2009; PIMENTEL et al., 2013; SAJID; AZIM, 2012; SHAHZAD; COHRS, 2012).

No presente estudo, o efeito inibitório de dois méis obtidos de abelhas indígenas sem ferrão da subfamília Meliponinae (família Apidae, ordem Hymenoptera) foi avaliado sobre *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de indivíduos saudáveis ou portadores do vírus HIV. Todos os isolados e as cepas de referência ATCC 26790 e ATCC MYA-2876 foram sensíveis aos méis produzidos por *S. bipunctata* e *S. postica*, incluindo os isolados E e 122, que apresentaram resistência ao fluconazol. Similarmente, Borsato et al. (2013) mostraram que a CIM do mel de *S. bipunctata* em um isolado de *C. albicans* foi de 12,5%. Embora seja de origem diferente, o mel multifloral da Etiópia também foi capaz de inibir o crescimento de isolados de *C. albicans* sensíveis e resistentes ao fluconazol (MULU et al., 2010).

A atividade de outros méis também foi avaliada em espécies do gênero *Candida*. Al-Waili et al. (2013), relataram efeito inibitório de méis brutos da Arábia Saudita em concentrações de 40% a 60% em *C. albicans* e *C. tropicalis*. Irish et al. (2006), mostraram efeito inibitório dos méis comerciais Jarrah, Comvita[®] e Medihoney[®], em *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata*, sendo que a CIM variou entre 15,4% a 43,1%. Koç et al. (2011),

ao avaliarem o efeito do mel monofloral de *Brassica napus L.* observou que a CIM variou entre 10% a 80% para as espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*.

O efeito antimicrobiano dos méis é atribuído a uma série de fatores, como a presença de peróxido de hidrogênio, produzido pela enzima glucose oxidase, originária das abelhas. A catalase, que decompõe o peróxido, também pode estar presente no mel, sendo originária do pólen floral. Logo o nível de peróxido presente em determinado mel é o resultado do equilíbrio entre a taxa de formação pela glucose oxidase e a taxa de decomposição pela catalase (AURONGZEB; AZIM, 2011).

Neste estudo, o tratamento prévio dos méis com catalase promoveu um aumento nos valores da CIM para os dois méis. Estes resultados sugerem que o peróxido de hidrogênio contribui parcialmente no efeito antifúngico dos méis. Chen et al. (2012) mostraram uma correlação entre a produção de peróxido de hidrogênio e atividade antifúngica entre méis brutos nativos da Austrália.

Diferentes méis apresentam sinergismo com várias substâncias como extrato de cebola, extrato de menta, extrato de gengibre, extrato de Zataria, própolis (AL MASAUDI; AL BUREIKAN, 2012; KHOSRAVI-DARANI et al., 2013; AL-WAILI et al., 2012). Entretanto em nosso estudo não foi detectado sinergismo entre os méis e o fluconazol e a mistura dos méis de *S. bipunctata* e *S. postica* nos isolados testados.

Candida spp. possuem uma série de fatores que contribuem para a sobrevivência e persistência da levedura no hospedeiro, pois facilitam a adesão, invasão, dano celular e evasão da resposta imune do hospedeiro (ZHU; FILLER, 2010). Neste trabalho avaliamos o efeito dos méis sobre a capacidade de adesão, produção de biofilme e morfogênese. O tratamento com os méis a partir da concentração de 20% (v/v) foi capaz de reduzir de forma significativa a morfogênese para ambos os isolados. Este efeito também foi observado para o extrato de mel multifloral rico em flavonoides (CANDIRACCI; CITTERIO; PIATTI, 2012). Em *C. albicans*, a transição para a forma de hifas é essencial para a virulência da espécie e tal morfologia, está associada com maior dano as células epiteliais do hospedeiro (BRUNKE; HUBE, 2013).

O tratamento com o mel de *S. bipunctata* reduziu de forma significativa a adesão de *C. albicans* em poliestireno a partir da concentração de 20% e o tratamento com o mel de *S. postica* a partir da concentração de 10%. O tratamento com os méis também reduziu a

biomassa do biofilme maduro de *C. albicans*, entretanto a redução foi considerada significativa somente para o tratamento dos biofilmes com mel de *S. postica* a 40%. Embora na literatura revisada não existam artigos apontando o efeito de méis na adesão de fungos, autores como Badet e Quero (2010) e Lee et al. (2011), relataram a redução da adesão de bactérias em superfícies bióticas e abióticas, após o tratamento com méis. Ansari et al. (2013), mostraram que o mel Jujube a partir de concentrações de 10% (p/v) inibiram o biofilme de *C. albicans* em estágios iniciais e tardios. Células organizadas na forma de biofilme apresentam maior resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aos antimicrobianos, como fluconazol, anfotericina B, voriconazol e nistatina (CHANDRA et al., 2001b; BIZERRA et al., 2008; FIORI et al., 2011).

CONCLUSÕES

Neste estudo, foi mostrada atividade antifúngica dos méis produzidos pelas abelhas indígenas sem ferrão *S. bipunctata* e *S. postica* em células planctônicas de *C. albicans* e este efeito parece ser dependente da presença de peróxido de hidrogênio. Os méis foram capazes de inibir a adesão em superfície abiótica e morfogênese. Além disso, os méis foram capazes de reduzir a biomassa do biofilme maduro. Nas concentrações testadas os méis não apresentaram atividade hemolítica. Os resultados indicam o potencial antifúngico dos méis obtidos das abelhas indígenas *S. bipunctata* e *S. postica* sobre *C. albicans*.

REFERÊNCIAS

AL MASAUDI, S. B.; AL BUREIKAN, M. O. Antimicrobial activity of onion juice (*Allium cepa*), honey, and onion-honey mixture on some sensitive and multi-resistant microorganisms. **Life Science Journal**, v. 9, n. 2, p. 775-780, maio 2012.

AL-WAILI, N. et al. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 9, p. 793-800, out. 2012.

AL-WAILI, N. et al. Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 4, p. 307-316, abr. 2013.

- ANSARI, M. J. et al. Effect of jujube honey on *Candida albicans* growth and biofilm formation. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 5, p. 352-360, jun. 2013.
- AURONGZEB, M.; AZIM, K. Antimicrobial properties of natural honey: a review of literature. **Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 44, n. 3, p. 118-124, ago. 2011.
- BADET, C.; QUERO, F. The *in vitro* effect of manuka honeys on growth and adherence of oral bacteria. **Anaerobe**, v. 17, n. 1, p. 19-22, dez. 2010.
- BIZERRA, F. C. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 3, p. 442-450, jan. 2008.
- BOORN, K. L. et al. Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 5, p. 1534-1543, ago. 2009.
- BORGES, S.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. Survival and biofilm formation by group B *streptococci* in simulated vaginal fluid at different pHs. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 3, p. 677-682, mar. 2012.
- BORSATO, D. M. et al. Atividade antimicrobiana de méis produzidos por meliponíneos nativos do Paraná (Brasil). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 57-66, jun. 2013.
- BRUNKE, S.; HUBE, B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 701-708, jan. 2013.
- CANDIRACCI, M.; CITTERIO, B.; PIATTI, E. Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 493-499, mar. 2012.
- CANTÓN, E. et al. Synergistic activities of fluconazole and voriconazole with terbinafine against four *Candida* species determined by checkerboard, time-kill, and E test methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1593-1596, abr. 2005.
- CHANDRA, J. et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. **Journal of Dental Research**, v. 80, n. 3, p. 903-908, mar. 2001a.
- CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, jun. 2001b.
- CHEN, C. et al. The effect of standart heat and filtration processing procedures on antimicrobial activity and hydrogen peroxide levels in honey. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 265, p. 1-8, jul. 2012.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARTS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts - Approved standart M27-A3.3** ed. Pennsylvania: NCLLS, 2008, 44 pgs.
- DOTA, K. F. et al. Antifungal activity of Brazilian própolis microparticles against yeast isolated from vulvovaginal candidiasis. **Evidenced Based Complementary and Alternative Medicine**, p. e1-e8, mar. 2011. doi: 10.1093/ecam/neq029.

FREITAS, S. F. et al. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine**, v. 13, n. 3, p. 170-175, fev. 2006.

FIORI, B. et al. *In vitro* activities anidulafungin and other antifungal agents against biofilms formed by clinical isolates of different *Candida* and *Aspergillus* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 3031-3035, jun. 2011.

GONÇALVES, R. B.; BRANDÃO, C. R. F. Diversidade de abelhas (Hymenoptera, Apidae) ao longo de um gradiente latitudinal na Mata Atlântica. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 4, p. 51-61, dez. 2008.

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 9, p. 2128-2131, set. 1995.

HORN, D. L. et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 12, p. 1695-1703, jun. 2009.

IRISH, J. et al. Honey has an antifungal effect against *Candida* species. **Medical Mycology**, v. 44, n. 3, p. 289-291, maio 2006.

IRISH, J.; BLAIR, S.; CARTER, D. A. The antibacterial activity of honey derived from australian flora. **PLOS One**, v. 3, n. 6, e18229, mar. 2011.

IZUMI, E. et al. Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2994-3001, abr. 2012.

JAIN, N. et al. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1697-1703, mar. 2007.

KATRAGKOU, A. et al. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 357-360, jan. 2008.

KHOSRAVI-DARANI, K. et al. Antifungal and antibacterial synergistic effects of mixture of honey and herbal extracts. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences**, v. 15, n. 8, p. 30-33, jan. 2013.

KOÇ, A. N. et al. Antifungal activity of the honeybee products against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 1, p. 128-134, jan. 2011.

KUHN, D. M. et al. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 878-888, fev. 2002.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: A taxonomic study**. 4^a ed. San Diego: Elsevier, 1998, 2077p.

KWAKMAN, P. H.; ZAAT, S. A. Antibacterial components of honey. **IUBMB Life**, v. 64, p. 48-55, jan. 2012.

LEE, J. et al. Low concentrations of honey reduce biofilm formation, quorum sensing, and virulence in *Escherichia coli* O157:H7. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 27, n. 10, p. 1095-1104, nov. 2011.

MELO, A. S.; COLOMBO, A. L.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3081-3088, set. 2007.

MOLAN, P. Honey: Antimicrobials actions and role in disease management. In: AHMAD, I.; AQIL, F. **New strategies combating bacterial infection**. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2009, p. 229-253.

MULU, A. et al. Effect of ethiopian multiflora honey on fluconazole-resistant *Candida* species isolated from the oral cavity of AIDS patients. **International Journal of STD & AIDS**, v. 21, n. 11, p. 741-745, nov. 2010.

PASQUALE, T. et al. Emergence of *Candida tropicalis* resistant to caspofungin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 219-229, jan. 2008.

PEDRO, S. R. M.; CAMARGO, J. M. F. Interactions on floral resources between the africanized honey bee *Apis mellifera* L and the native bee community (Hymenoptera: Apoidea) in a natural "cerrado" ecosystem in southeast Brazil. **Apidologie**, v. 22, n. 4, p. 397-415, maio 1991.

PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 1366-1377, fev. 2010.

PIERCE, C. G. et al. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494-1500, ago. 2008.

PIMENTEL, R. et al. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manaosensis* and commercial honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 1-13, jul. 2013.

PRONI, E. A. Biodiversidade de abelhas indígenas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) da bacia do rio Tibagi, estado do Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 3, n. 2, p. 145-150, 2000.

RAO, P. Oral candidiasis - A review. **Scholarly Journals International**, v. 2, n. 2, p. 26-30, fev. 2012.

RAMAGE, G. et al. Standardizes method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2475-2479, set. 2001a.

RAMAGE, G. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans* biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, n. 4, p. 163-170, jun. 2001b.

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363-2370, out. 2011.

ROSS, S. Functional foods: the Food and Drug Administration perspective. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1735S-1742S, jun. 2000.

ROUBIK, D. W. **Ecology and natural history of tropical bees**. New York: Press Syndicate of the University of Cambridge, 1989. 514 p.

SAJID, M.; AZIM, M. K. Characterization of the nematicidal activity of natural honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7428-7434, jul. 2012.

SHAHZAD, A.; COHRS, R. J. *In vitro* antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicinal study for potential remedy for shingles. **Translational Biomedicine**, v. 3, n. 2, p. 1-7, jul. 2012.

TORTORANO, A. M. et al. Antifungal susceptibility profiles of *Candida* isolates from a prospective survey of invasive fungal infections in Italian intensive care units. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 389-393, mar. 2012.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. R117-R124, nov. 2008.

ZEINA, B.; OTHMAN, O.; AL-ASSAD, S. Effect of honey versus thyme on *Rubella* virus survival *in vitro*. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 2, n. 3, p. 345-348, 1996.

ZHU, W.; FILLER, S. G. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 273-282, mar. 2010.

LEGENDAS

Tabela 1- Perfil de sensibilidade das células planctônicas de *Candida albicans* aos méis de *Scaptotrigona bipunctata*, *Scaptotrigona postica* e fluconazol

Figura 1- Efeito dos méis de *Scaptotrigona bipunctata* (A) e *Scaptotrigona postica* (B) na adesão de *Candida albicans* em superfície abiótica. O valor da adesão está expresso como densidade óptica a 595 nm. * $p < 0,05$

Figura 2 - Efeito dos méis de *Scaptotrigona bipunctata* (A) e *Scaptotrigona postica* (B) na produção de biomassa pelo biofilme maduro de *Candida albicans*. O valor da biomassa está expresso como densidade óptica a 595 nm. * $p < 0,05$

Figura 3 - Efeito dos méis de *Scaptotrigona bipunctata* (■) e *Scaptotrigona postica* (■) em diferentes concentrações na morfogênese da cepa de referência ATCC MYA-2856 (A) e do isolado clínico 82 (B) de *Candida albicans*. O valor está expresso como porcentagem de tubos germinativos em relação as leveduras totais.

Figura 4- Efeito hemolítico dos méis de *Scaptotrigona bipunctata* (A) e *Scaptotrigona postica* (B).

Figura 5- Microscopia de fluorescência de células planctônicas de *Candida albicans* tratados com méis. Controle não tratado corado com FUN-1 (A) e Calcofluor White (B). Efeito do tratamento com o mel de *Scaptotrigona bipunctata* após 3 horas (C) e 6 horas (D). Efeito do tratamento com o mel de *Scaptotrigona postica* após 3 horas (E) e 6 horas (F).

Amostra	<i>S. bipunctata</i>	<i>S. postica</i>	<i>Fluconazol</i>
	(%)	(%)	(µg/mL)
ATCC 26790	10	10	4
ATCC MYA-2876	20	20	1
E	20	40	64
O	10	10	0,5
12	20	20	1
18	40	20	4
21	40	20	4
27	20	40	2
29	20	10	0,5
82	10	10	0,5
122	20	40	128
134	10	10	2
167	10	10	0,5
179	10	40	8
191	10	10	1
212	20	10	1

Tabela 1

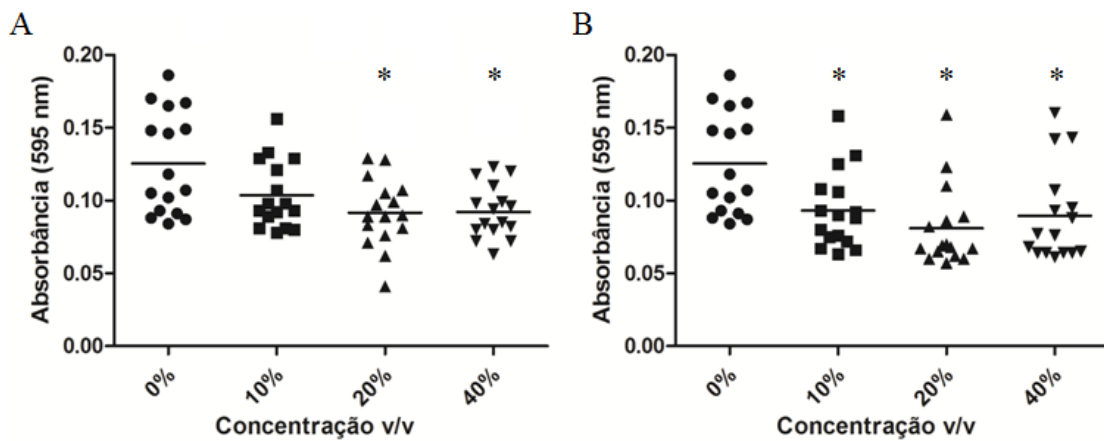


Figura 1

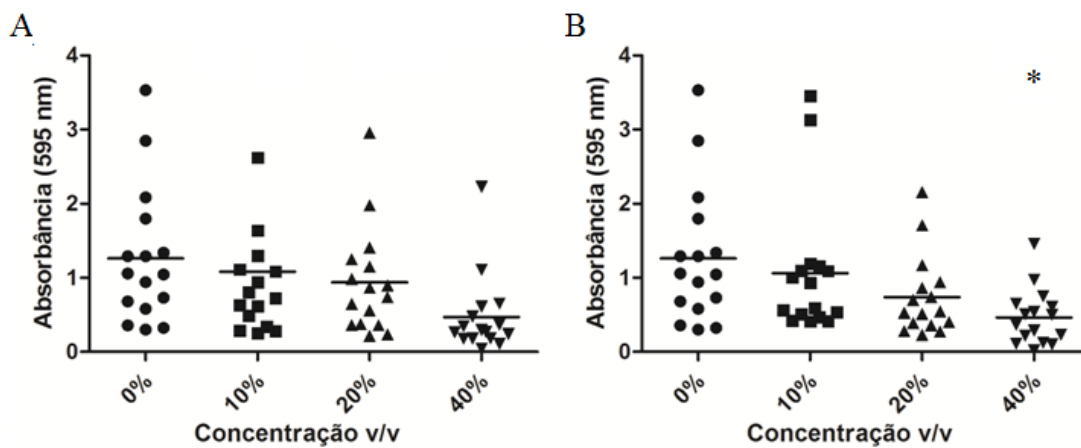


Figura 2

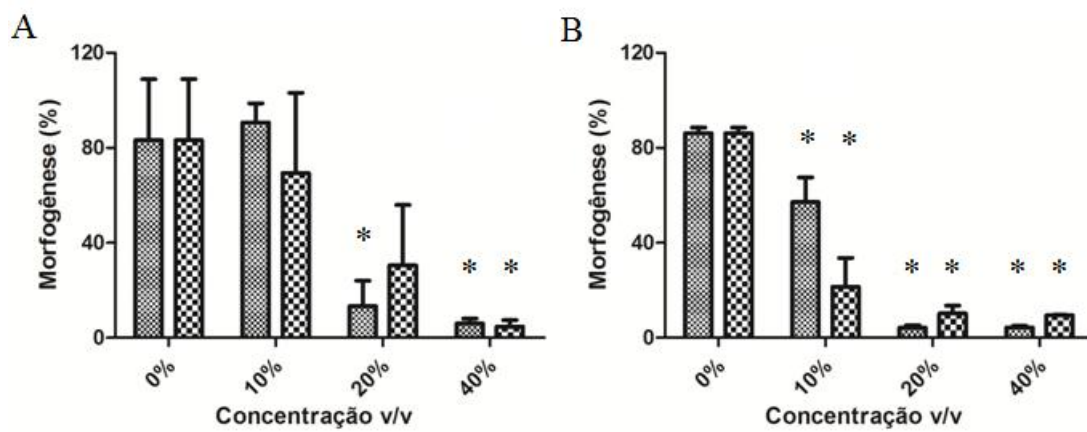


Figura 3

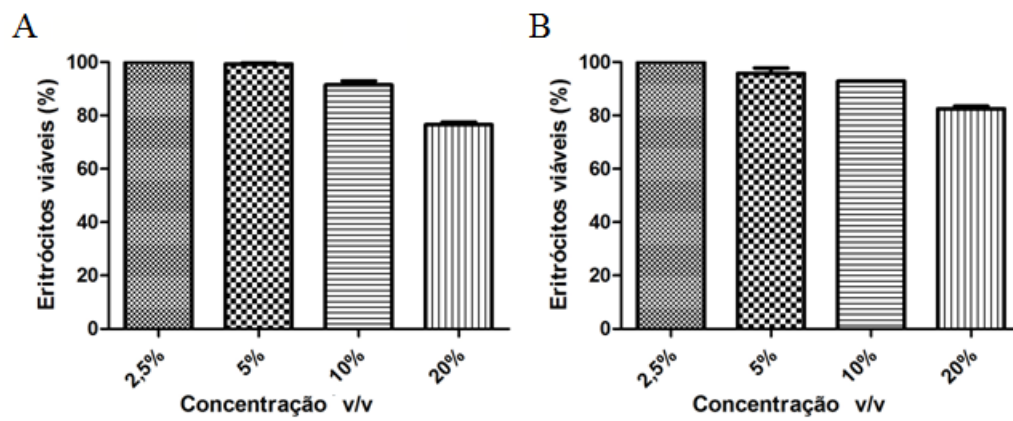


Figura 4

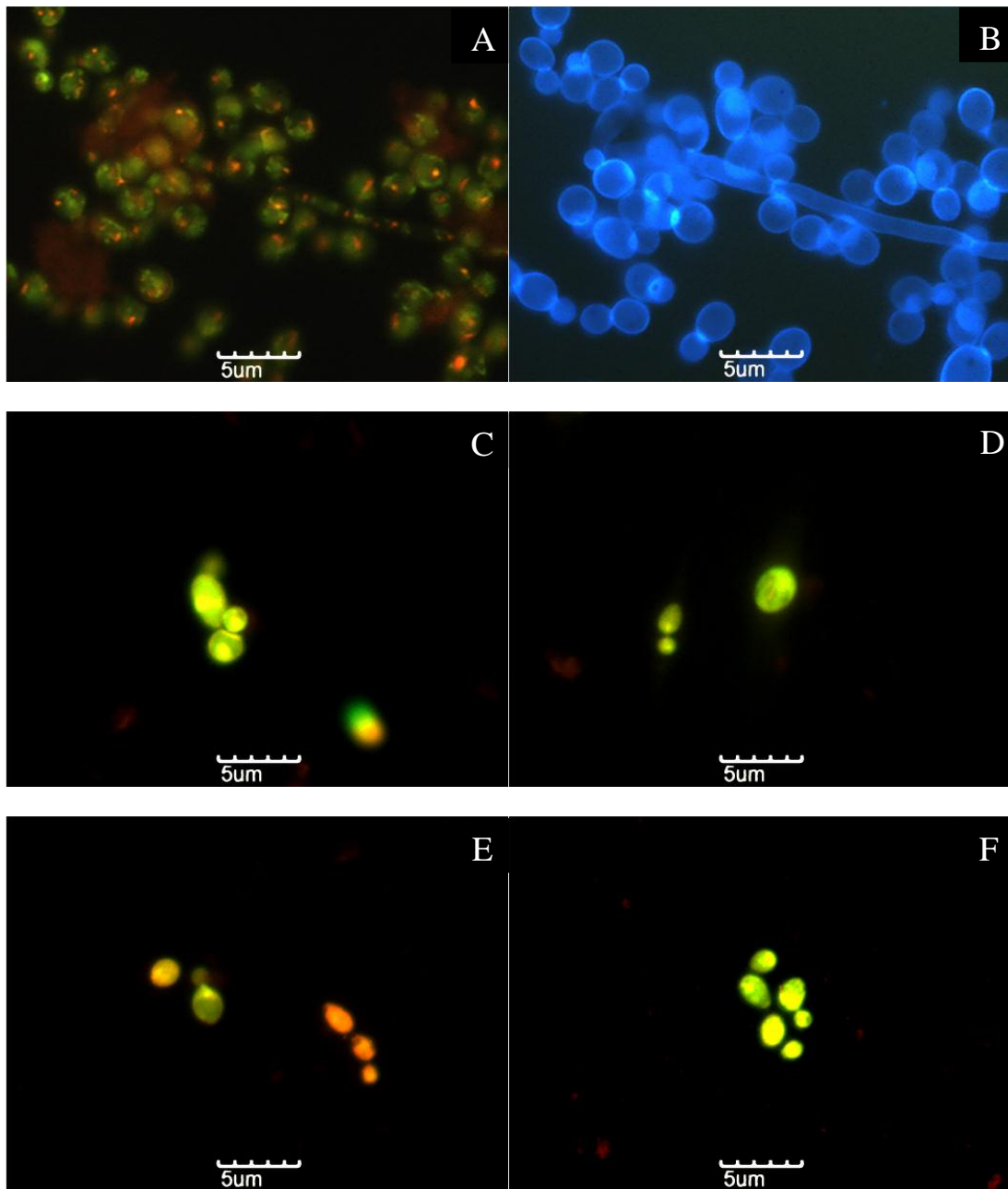


Figura 5

4.2 ARTIGO 2: MEL, UM AGENTE NATURAL ALTERNATIVO PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR DIFERENTES MICRORGANISMOS?

Marina Andrea Bosini¹, Caíbe Alves Pereira¹, Gerson Nakazato¹, Lucy Megumi Yamauchi¹, Sueli Fumie Yamada-Ogatta^{1*}

¹ Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

* Correspondência: Sueli Fumie Yamada-Ogatta, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia. Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380. CEP 86057-970. Tel: +55-43-3371-5503; fax: +55-43-3371-4788. e-mail:ogatta@uel.br

RESUMO

Na antiguidade diversas civilizações como os egípcios, assírios, chineses, gregos e romanos, usavam o mel para o tratamento de doenças. O mel ainda é usado como tratamento na medicina popular de regiões da Ásia e África. Estudos científicos relatam as propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, antivirais, antimicrobianas, cicatrizantes e nematocidas de méis. O efeito antimicrobiano é atribuído a uma série de fatores como pH, higroscopicidade, produção de peróxido de hidrogênio, efeito osmótico, flavonoides, ácidos orgânicos. A ação se estende a bactérias e fungos, inclusive aqueles resistentes a antimicrobianos atualmente disponíveis para o tratamento de infecções. O efeito inibitório em microrganismos pode ser potencializado pela combinação do mel a outros compostos como extratos de plantas, própolis e amido. Os méis também afetam fatores de virulência dos microrganismos, reduzindo sua adesão em superfícies bióticas e abióticas assim como a produção de biofilme. Atualmente, o uso do mel tem sido direcionado para o tratamento de feridas, queimaduras, escaras, úlceras, principalmente quando os microrganismos infecciosos são recalcitrantes ao tratamento convencional. O baixo custo e fácil acessibilidade fazem do mel um promissor agente antimicrobiano.

Palavras chave: Mel, atividade antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

O mel e seus derivados são alimentos funcionais que contribuem para a manutenção da saúde humana. O mel é produzido por diferentes espécies de abelhas a partir do néctar das flores, exsudatos de plantas e frutas, ou ainda de secreções de plantas ou insetos sugadores, denominados méis florais, méis extraflorais e méis de melato, respectivamente. Os méis florais são classificados em monoflorais ou multiflorais pela análise microscópica da origem e quantidade de grãos de pólen. No mel monofloral o pólen de determinada origem botânica é predominante sobre os demais, e a frequência deve ser superior a 45% do total de grãos de pólen. Já no mel multifloral não existe dominância entre grãos de pólen de diferentes origens (MOLAN, 1998).

Abelhas pertencentes às subfamílias Apinae e Meliponinae da família Apidae são reconhecidas como produtoras de mel. Apinae compreende as abelhas com ferrão, entre elas a espécie *Apis mellifera* que é nativa da Europa, Ásia e África, e foi introduzida na América do Norte no século 17 disseminando-se em todo continente americano (WINSTON, 1987). O mel produzido por esta espécie é utilizado no mundo todo e suas propriedades biológicas amplamente estudadas (JULL; WALKER; DESHPANDE, 2013). As abelhas sem ferrão pertencem à subfamília Meliponinae e são encontradas em regiões tropicais e subtropicais da Austrália, África, sudeste da Ásia e América (WILLE, 1983). Em contraste a *A. mellifera*, o mel produzido por meliponíneos é utilizado na medicina popular do norte da Austrália, América Central e do Sul, e na África (CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006).

A composição do mel pode variar de acordo com a origem fitogeográfica, fonte do néctar, as estações do ano, a espécie da abelha e as técnicas de processamento (DEMERA; ANGERT, 2004; JEFFREY; ECHAZARRETA, 1996; LIU et al., 2013; PIMENTEL et al., 2013). Aproximadamente 95% dos sólidos do mel são carboidratos, sendo que os principais são frutose e glicose, porém outros açúcares como sucrose, maltose, isomaltose e açúcares complexos também estão presentes. Outras substâncias presentes em menor quantidade no mel incluem: minerais, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonoides e enzimas. A quantidade de água nos méis pode variar entre 15% a 21% (v/v) (AURONGZEB; AZIM, 2011; FERREIRA et al., 2008; JEFFREY; ECHAZARRETA, 1996; LEE et al., 2011; WANG; LI, 2011).

O uso do mel como medicamento para uma série de enfermidades remonta a antiguidade. Diversas civilizações como os egípcios, assírios, chineses, gregos e romanos, usavam o mel, sozinho ou em combinação com plantas, para o tratamento de inflamações na garganta e amígdalas, tosse, feridas, queimaduras, úlceras, diarreia. Na medicina popular de algumas regiões, ainda é utilizado, principalmente para o tratamento de úlceras gástricas e dor de garganta (MOLAN, 2009). Estudos científicos mostram que os méis possuem propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, antivirais, antimicrobianas, cicatrizantes e nematocidas (GOERDT et al., 2013; LIU et al., 2013; MAGHSOUDI et al., 2011; SAJID; AZIM, 2012; SHAHZAD; COHRS, 2012; SIMON et al., 2009; WEN et al., 2012).

Na Tabela 1 estão sumarizados os dados obtidos em vinte e quatro artigos, publicados entre o período de 1994 a 2013 sobre o efeito de méis obtidos de abelhas pertencentes a subfamília Meliponinae e ao gênero *Apis* em diferentes espécies de microrganismos. Foram incluídos os artigos nos quais foi possível identificar a origem botânica do mel.

A atividade antimicrobiana dos méis já foi descrita em vários microrganismos, inclusive em isolados resistentes a antibacterianos de uso clínico (BOORN et al., 2009; GEORGE; CUTTING, 2007). Méis de variadas origens botânicas apresentaram efeito inibitório sobre as espécies bacterianas *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurum*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* e *Serratia marcescens*, sendo que estes isolados eram resistentes a pelo menos um antibiótico (AL-WAILI et al., 2013). Vários autores descreveram a atividade antifúngica de diferentes méis sobre células planctônicas de *Candida* spp., sendo que a maioria dos trabalhos utilizaram *Candida albicans* (AL-WAILI et al., 2011, 2012; BORSATO, 2013; CHEN et al., 2012; KHOSRAVI et al., 2008; KOÇ et al. 2011; MOUSSA et al., 2012a; MULU et al., 2010; PATTON et al., 2006; THEUNISSEN; GROBLER; GEDALIA, 2001). Alguns méis produziram efeitos similares tanto em isolados de *Candida* sensíveis, quanto resistentes ao fluconazol. Mulu et al. (2010) compararam o efeito do mel multifloral da Etiópia em isolados de *Candida* spp. sensíveis, dose-dependentes e resistentes ao fluconazol. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) variou de 35% a 40% (v/v) e não houve diferença significativa entre a CFM dos três grupos analisados. Entretanto, Getaneh et al. (2013) ao avaliarem o efeito dos méis multiflorais da Etiópia, mostraram que maiores valores de CIM foram observados para MRSA para 80% dos méis avaliados. A CIM média dos méis foi de 17% (v/v) para MSSA e 18,87% para MRSA.

Tabela 1 -Efeito inibitório de diferentes méis sobre microrganismos

Microrganismos	Origem botânica do mel	CIM	Referência
Bactérias Gram-positivas			
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Acacia tortilis</i> ; <i>Acacia</i> spp.; <i>Erica</i> sp.; <i>Leptospermum</i> sp.; <i>Zizphus spina-christi</i>	2% (v/v)	PATTON et al., 2006
		30-70 (m/v) %	AL-WAILI et al., 2013
		1,51 (v/v) %	FÉAS et al., 2013
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Leptospermum scoparium</i>	6,25	HAMMOND; DONKOR, 2013
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Leptospermum</i> sp. (Medihoney®); Multifloral	(v/v) %	
		8-16	BOORN et al., 2009
		6-8	GEORGE; CUTTING, 2007

<i>Enterococcus</i> sp. (VRE)	<i>Leptospermum</i> sp. (Medihoney®)	(v/v) % 6-8	GEORGE; CUTTING, 2007
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Acacai tortilis</i> ; <i>Acacia</i> spp.; <i>Zizphus spina-christi</i> ;	(v/v) % 30-50	AL-WAILI et al., 2013
		(v/v) % 0,78	PATTON et al., 2006
	<i>Acacai tortilis</i> ; <i>Acacia</i> spp.; <i>Acalypha</i> spp.; <i>Aglaia formosana</i> ; <i>Banara</i> spp.; <i>Banksia</i> sp.; <i>Brassica napus</i> ; <i>Bidens pilosa</i> ; <i>Citrus maxima</i> ; <i>Corymbia</i> spp.; <i>Delonix regia</i> ; <i>Dimocarpus longan</i> ;	4 1-16 30	GEORGE; CUTTING, 2007 BOORN et al., 2009 AL-WAILI et al., 2012
	<i>Dryandra sessilis</i> ; <i>Echium plantagineum</i> ; <i>Erica</i> sp.; <i>Eucalyptus</i> spp.; <i>Faramea</i> spp.; <i>Lavandula xallardii</i> ; <i>Leptospermum</i> sp.; <i>Litchi chinensis</i> ; <i>Melaleuca</i> spp.; <i>Micromyrtus ciliata</i> ; <i>Mimosa scabrella</i> ; <i>Trifolium repens</i> ; <i>Zizphus spina-christi</i> ;	10-50 (m/v) % 5	AL-WAILI et al., 2013 LUSBY; COOMBES; WILKINSON, 2005
	<i>Heterofloral</i> ; <i>Multifloral</i>	50 12-21 1,56-50 4,73	AL-WAILI et al., 2011 CHEN et al., 2012 BORSATO et al., 2013 FÉAS et al., 2013
		ZI (mm) 30,7-40,7 FE % 5-34,5	LIU et al., 2013 IRISH; BLAIR; CARTER, 2011
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Multifloral	(v/v) % 4	GEORGE; CUTTING, 2007
		2-16	BOORN et al., 2009
		(v/v) % 2-32	BOORN et al., 2009
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Aglaia formosana</i> ; <i>Citrus maxima</i> ; <i>Bidens pilosa</i> ; <i>Dimocarpus longan</i> ; <i>Litchi chinensis</i> ; <i>Heterofloral</i> ; <i>Multifloral</i>	(m/v) % 50	AL-WAILI et al., 2011
		20	MADDOCKS et al., 2012
		ZI (mm) 35,3-38	LIU et al., 2013
Bactérias Gram-negativas			
<i>Acinetobacter baumannii</i> (multi-resistente)	<i>Leptospermum</i> sp. (Medihoney®)	(v/v) % 6-8	GEORGE; CUTTING, 2007
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Echium plantagineum</i> ; <i>Eucalyptus macrorrhyncha</i> ; <i>Lavandula xallardii</i>	(m/v) % 5	LUSBY; COOMBES; WILKINSON, 2005
<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Leptospermum scoparium</i>	(v/v) % 1	LIN; MOLAN; CURSONS, 2009

<i>Citrobacter</i> spp.	<i>Aglaia formosana</i> ; <i>Citrus maxima</i> ; <i>Bidens pilosa</i> ; <i>Dimocarpus longan</i> ; <i>Echium plantagineum</i> ; <i>Eucalyptus</i> <i>macrorrhyncha</i> ; <i>Lavandula</i> <i>xallardii</i> ; Multifloral	(m/v) % 1	LUSBY; COOMBES; WILKINSON, 2005
		ZI (mm) 21,3-27	LIU et al., 2013
<i>Enterobacter cloacae</i> (ESLB)	<i>Leptospermum</i> sp. (Medihoney®)	(v/v) % 6	GEORGE; CUTTING, 2007
<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Abies alba</i> ; <i>Acacai tortilis</i> ; <i>Acacia</i> spp.; <i>Crataegus laevis</i> ; <i>Echium</i> <i>plantagineum</i> ; <i>Eucalyptus</i> <i>macrorrhyncha</i> ; <i>Lavandula</i> <i>xallardii</i> ; <i>Leptospermum</i> sp.;	(v/v) % 30-50	AL-WAILI et al., 2013
	<i>Robina pseudoacacia</i> ; <i>Zizphus</i> <i>spina-christi</i> ;	(m/v) % 5	LUSBY; COOMBES; WILKINSON, 2005
<i>Escherichia coli</i>		12,5->25	MAJTAN et al., 2013
		(v/v) % 5,6	PATTON et al., 2006
	<i>Acacai tortilis</i> ; <i>Acacia</i> spp.;	8-16	BOORN et al., 2009
	<i>Acalypha</i> spp.; <i>Aglaia formosa</i> ;	30	AL-WAILI et al., 2012
	<i>Banara</i> spp.; <i>Bidens pilosa</i> ; <i>Citrus</i> <i>maxima</i> ; <i>Delonix regia</i> ;	30-50	AL-WAILI et al., 2013
	<i>Dimocarpus longan</i> ; <i>Echium</i> <i>lantagineum</i> ; <i>Eucalyptus</i> <i>macrorrhyncha</i> ; <i>Faramea</i> spp.;	(m/v) % 1	LUSBY; COOMBES; WILKINSON, 2005
<i>Heterofloral</i> ; <i>Lavandula xallardii</i> ;	30	AL-WAILI et al., 2011	
<i>Leptospermum</i> sp.; <i>Litchi chinensis</i> ;	3,12-50	BORSATO et al., 2013	
<i>Mimosa scabrella</i> ; Multifloral;	7,6	FÉAS et al., 2013	
<i>Zizphus spina-christi</i> ;	ZI (mm) 22,3-31,7	LIU et al., 2013	
<i>Escherichia coli</i> (ESLB)	<i>Leptospermum</i> sp. (Medihoney®)	(v/v) % 6-8	GEORGE; CUTTING, 2007
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Leptospermum</i> sp.	(m/v) % 10	NDIP et al., 2007
		ZI (mm) 0-25,6	AL SOMAL et al., 1994
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acacai tortilis</i> ; <i>Acacia</i> spp.;	(v/v) % 8-16	BOORN et al., 2009
	<i>Aglaia formosa</i> ; <i>Bidens pilosa</i> ; <i>Citrus</i> <i>maxima</i> ; <i>Dimocarpus longan</i> ;	20-60	AL-WAILI et al., 2013
	<i>Echium lantagineum</i> ; <i>Eucalyptus</i> <i>macrorrhyncha</i> ; <i>Lavandula</i> <i>xallardii</i> ; <i>Litchi</i> <i>chinensis</i> ; Multifloral; <i>Zizphus</i> <i>spina-christi</i>	(m/v) % 5	LUSBY; COOMBES; WILKINSON, 2005
		ZI (mm) 15,7	LIU et al., 2013
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Leptospermum</i> sp. (Medihoney®)	(v/v) %	

(ESLB)		6-8	GEORGE; CUTTING, 2007
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Leptospermum scoparium</i>	(m/v) % 2	EICK et al., 2014
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Abies alba; Crataegus laevigata; Leptospermum sp.; Robina pseudoacacia</i>	(m/v) % 12,5-25	MAJTAN et al., 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acacia tortilis; Acacia spp.; Erica sp.; Leptospermum sp. (Medihoney®); Multifloral; Zizphus spina-christi</i>	(v/v) % 8 4-16 30-50	GEORGE; CUTTING, 2007 BOORN et al., 2009 AL-WAILI et al., 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa (ESLB)</i>	<i>Leptospermum sp. (Medihoney®)</i>	(m/v) % 11,63 (v/v) % 12-14	FÉAS et al., 2013 GEORGE; CUTTING, 2007
<i>Salmonella spp.</i>	<i>Acacia tortilis; Acacia spp.; Aglaia formosa; Bidens pilosa; Citrus maxima; Dimocarpus longan; Echium lantagineum; Eucalyptus macrorrhyncha; Lavandula xallardii; Litchi chinensis; Multifloral; Zizphus spina-christi</i>	(v/v) % 8-16 30-40 (m/v) % 1 ZI (mm) 25-28,3	BOORN et al., 2009 AL-WAILI et al., 2013 LUSBY; COOMBES; WILKINSON, 2005 LIU et al., 2013
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Acacia tortilis; Acacia spp.; Zizphus spina-christi</i>	(v/v) % 30-70	AL-WAILI et al., 2013
<i>Shigella sonnei</i>	<i>Echium lantagineum; Eucalyptus macrorrhyncha; Lavandula xallardii</i>	(m/v) % 5	LUSBY; COOMBES; WILKINSON, 2005
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Leptospermum scoparium</i>	(m/v) % 7,5-22,5	MAJTAN et al., 2013
Bactérias Ácido-álcool resistentes			
<i>Mycobacterium phlei</i>	<i>Echium plantagineum; Eucalyptus macrorrhyncha; Lavandula xallardii</i>	(m/v) % 1	LUSBY; COOMBES; WILKINSON, 2005
Fungos			
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Acacia tortilis; Acacia spp.; Zizphus spina-christi</i>	(v/v) % 30-50	AL-WAILI et al., 2013
<i>Candida spp.</i>	<i>Acacia tortilis; Acacia spp.; Acalypha spp.; Astragalus spp.; Banara spp.; Brassica napus; Crataegus momogyna; Delonix regia; Erica sp.; Eucalyptus sp.;</i>	(v/v) % 25,1 25-43 10-80	PATTON et al., 2006 KHOSRAVI et al., 2008 KOÇ et al., 2011

	Família Apiceae; Família	30	AL-WAILI et al., 2012
	Asteraceae; <i>Faramaea</i> spp.;	40-70	AL-WAILI et al., 2013
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> ; Heterofloral;	(m/v) %	
	<i>Menta longifolia</i> ; <i>Mimosa</i>	20	THEUNISSEN; GROBLER;
	<i>scabrella</i> ; <i>Myrica cordifolia</i> ;		GEDALIA, 2001
	Multifloral; <i>Zataria multiflora</i> ;	70	AL-WAILI et al., 2011
	<i>Zizphus spina-christi</i>	19-36	CHEN et al., 2012
		12,5-50	BORSATO et al., 2013
		14,33-23,33	FÉAS et al., 2013
		ZI (mm)	
		6-10	MOUSSA et al., 2012a
		(m/v) %	
<i>Cryptococcus</i>	<i>Erica</i> sp.	19,33	FÉAS et al., 2013
<i>neoformans</i>			
		ZI (mm)	
<i>Rhodotorula</i>	Família Apiaceae; <i>Eucalyptus</i> sp.;	6-20	MOUSSA et al., 2012a
<i>mucilaginosa</i>	Família Asteraceae; Multifloral		
		(v/v) %	
<i>Trichosporon</i> sp.	Multifloral	5-80	KOÇ et al., 2011

ELSB - Produtoras de β -lactamases de espectro estendido; FE – Fenol Equivalente; MRSA - *S. aureus* resistente à meticilina; VRE - *Enterococcus* resistente à vancomicina; ZI – Zona de inibição.

O efeito antimicrobiano dos méis é atribuído a uma série de fatores como: pH, higroscopicidade, produção de peróxido de hidrogênio, efeito osmótico, flavonoides, ácidos orgânicos, entre outros (AURONGZEB; AZIM, 2011).

Os açúcares D-glicose e D-frutose presentes no mel interagem fortemente com a água, desidratando e impedindo a proliferação de microrganismos (AURONGZEB; AZIM, 2011; BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2007; MOLAN, 2009). A água livre é mensurada como atividade da água (a_w) e em méis não diluídos este valor se encontra na faixa de 0,479 a 0,557. Valores de a_w abaixo de 0,6 não permitem a proliferação de nenhum tipo de microrganismo. As bactérias são mais sensíveis que os fungos à falta de água. Grande parte das bactérias é inibida se a a_w se encontra abaixo da faixa de 0,94 a 0,99, no entanto algumas espécies como *S. aureus* ($a_w = 0,86$) são mais resistentes. Para leveduras e fungos filamentosos a atividade da água mínima para permitir seu crescimento está entre 0,61 e 0,90, porém varia conforme a espécie. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ($a_w = 0,90$) e *Candida* spp. ($a_w = 0,88$) são mais sensíveis a falta de água livre enquanto *Saccharomyces rouxii* ($a_w = 0,62$) a mais resistente (AURONGZEB; AZIM, 2011; BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2007; MOLAN, 2009).

Durante a coleta do néctar, as abelhas secretam através da glândula hipofaríngea a enzima glucose oxidase, responsável pela produção de duas substâncias importantes para a atividade antimicrobiana dos méis: o ácido glucônico e o peróxido de hidrogênio. Os níveis de peróxido de hidrogênio nos méis também são resultado de ação de outra enzima, a catalase, que decompõe o peróxido em água e oxigênio. Deste modo a quantidade de peróxido em determinado mel é o resultado do equilíbrio entre a taxa de formação pela glucose oxidase e a taxa de decomposição pela catalase. Chen et al. (2012) mostraram uma correlação positiva entre os níveis de peróxido de hidrogênio produzidos e a atividade antimicrobiana em *S. aureus* e *C. albicans*. Porém esta substância não é a única responsável pela atividade antimicrobiana, uma vez que méis que não continham peróxido de hidrogênio, assim como o mel artificial, foram capazes de inibir o crescimento da levedura.

O pH dos méis geralmente varia entre 3,2 e 4,5, e também tem efeito parcial na inibição, sendo o ácido glucônico a principal substância responsável por sua acidez (MOLAN, 2009).

Alguns méis possuem fatores adicionais, além dos citados acima, que contribuem para sua atividade antimicrobiana. A lisozima está presente em alguns méis, em maior quantidade quando este é recém coletado da colmeia (MOLAN, 2009). Flavonoides foram detectados em méis de várias regiões do mundo (MAJTAN et al., 2013; MOLAN, 2009; PIMENTEL et al., 2013; SABATIER et al., 1992). Ácidos fenólicos como o ácido siríngico, metil-siringato e ácido 3,4,5 trimetóxi-benzoico, além de metilglioxal foram isolados do mel Manuka, e o 1,4 dihidroxibenzeno do mel de viperina (MOLAN et al., 1989; ADAMS et al., 2008).

Diversos autores também relatam o sinergismo do mel com várias substâncias como extrato de cebola, extrato de menta, extrato de gengibre, extrato de Zataria, própolis (ALMASAUDI; AL BUREIKAN, 2012; AL-WAILI et al., 2012; KHOSRAVI-DARANI et al., 2013). Além disso, a suplementação do mel com amido tem efeito aditivo para a inibição de fungos (BOUKRAA; BENBAREK; MOUSSA, 2008; MOUSSA et al., 2011, 2012b). Moussa et al., (2012b) analisaram quatro méis algerianos com CIM média de 38% a 42% (v/v) para *C. albicans*, sendo que a adição de amido reduziu de 14% a 16% a CIM dos mesmos. O efeito pode ser explicado pela presença da enzima amilase no mel, que degradaria as cadeias do amido produzindo dextrina e maltose e aumentando o efeito osmótico do mel.

A terapia antimicrobiana tradicional visa fármacos com o potencial de matar ou inibir o crescimento do microrganismo no hospedeiro, entretanto tem se discutido novos fármacos cujo alvo seja a inibição de fatores de virulência (JACOBSEN et al., 2012; WATANABE et al., 2012). O efeito inibitório de méis na adesão em superfícies bióticas e abióticas ou em diferentes etapas do biofilme já foi relatado nos seguintes microrganismos: *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. mutans* e *S. pyogenes* (ANSARI et al., 2013; LEE et al., 2011; LOK, 2013; MADDOCKS et al., 2012; MAJTAN et al., 2013; OKHIRIA et al., 2009).

A incubação de *S. pyogenes* em presença do mel Manuka em concentrações de 20% (m/v) reduziu a expressão das proteínas Sof e Sfb I. Acredita-se que estas proteínas mediem a adesão da bactéria ao tecido do hospedeiro. O tratamento com o mel reduziu em 74% a adesão do patógeno a fibronectina (MADDOCKS et al., 2012). O tratamento com o mel de acácia reduziu a adesão da bactéria *E. coli* em células humanas de carcinoma de colón (HT-29) (LEE et al., 2011).

O mel Manuka foi capaz de reduzir a biomassa do biofilme maduro de *P. aeruginosa* na concentração de 40% (m/v) (OKHIRIA et al., 2009). O mel comercial Langnese foi capaz de reduzir a biomassa do biofilme em estágios iniciais, assim como o biofilme maduro de *S. mutans* a partir da concentração de 12,5%, sendo mais eficaz que o mel artificial (NASSAR; LI; GREGORY, 2012). Concentrações sub-inibitórias (10% m/v) dos méis de *Crataegus laevigata*, *Abies alba*, *Robinia pseudoacacia* e Manuka inibiram a formação do biofilme de *E. cloacae* *P. mirabilis* (MAJTAN et al., 2013). Lee et al. (2011) mostraram a expressão reduzida de genes relacionados a formação do biofilme e quorum-sensing em *E. coli* tratado com 0,5% (v/v) de mel de acácia.

O uso do mel tem sido direcionado atualmente para o tratamento de feridas, queimaduras, escaras, úlceras, principalmente quando os microrganismos infecciosos não respondem ao tratamento convencional com antissépticos e antibióticos. Estudo de Maghsoudi et al. (2011) com pacientes que sofreram queimaduras mostrou que a aplicação tópica de mel multifloral puro foi mais eficiente que o acetato de manefide no controle da infecção. Além disso, acelerou o processo de atenuação da inflamação aguda, epitelização e cicatrização das queimaduras. Ngatu et al. (2011) mostraram que a aplicação tópica do mel de acácia e o extrato de propólis verde foram capazes de amenizar sintomas de *Tinea capitis* e *Tinea versicolor*, como descamação, prurido, eritemas e formação de pápulas ou pústulas.

Abdelmonem, Rasheed e Mohamed (2012) verificaram diminuição de corrimento, coceira e vermelhidão vulvo-vaginal, além de uma taxa de cura clínica maior para um grupo tratado com mistura de mel/iogurte em relação ao grupo tratado com tioconazol. Méis de *Leptospermum* sp., cujas propriedades foram extensivamente analisadas, são utilizados atualmente na prática hospitalar e tem benefícios relatados no tratamento de doenças crônicas da superfície ocular, feridas infeccionadas, prevenção de inflamações como mucosite e gengivite, comuns em pacientes submetidos a quimioterapia e tratamento das lesões ocasionadas por herpes genital e labial (SIMON et al., 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mel foi utilizado na medicina popular durante a antiguidade para o tratamento de diversas doenças e a pesquisa científica atual corrobora suas propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogênicas e cicatrizantes. Méis de diferentes origens possuem atividade antimicrobiana contra uma série de patógenos, como bactérias, fungos, vírus e parasitas (GOERDT et al., 2013; LIU et al., 2013; MAGHSOUDI et al., 2011; MOLAN, 2009; SAJID; AZIM, 2012; SHAHZAD; COHRS, 2012; SIMON et al., 2009; WEN et al., 2012). Além da atividade inibitória sobre células planctônicas, o mel também é capaz de inibir fatores de virulência de diferentes microrganismos como a adesão em superfície biótica ou abiótica e biofilmes.

Atualmente produtos compostos pelo mel Manuka são os únicos aprovados para aplicação clínica como antimicrobiano. Este mel é produzido de *Leptospermum* sp., uma planta nativa da Nova Zelândia e Austrália, e sua atividade é atribuída principalmente ao metilglioxal (MAVRIC et al., 2008). Porém, vários tipos de meis têm sido analisados quanto ao efeito antimicrobiano em diferentes microrganismos (Tabela 1), inclusive contra aqueles que são resistentes aos fármacos disponíveis. O conhecimento dos componentes dos meis responsáveis por sua atividade antimicrobiana podem contribuir no desenvolvimento de produtos para aplicação em várias áreas da medicina.

ABDELMONEM, A. M.; RASHEED, S. M.; MOHAMED, A. S. Bee-honey and yougurt: a novel mixture for treating patients with vulvovaginal candidiasis during pregnancy. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 286,p. 109-114, fev. 2012.

ADAMS, C. J. et al. Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 4, p. 651-659, jan. 2008.

AL MASAUDI, S. B.; AL BUREIKAN, M. O. Antimicrobial activity of onion juice (*Allium cepa*), honey, and onion-honey misture on some sensitive and multi-resistant microorganisms.**Life Science Journal**, v. 9, n. 2, p. 775-780, maio 2012.

AL SOMAL, N. et al. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 84, p. 9-12, jan.1994.

AL-WAILI, N. S. et al. Effects of natural honey on polymicrobial culture of various human pathogens.**Archives of Medical Science**, DOI 10.5114/aoms.2012.28603, jun. 2011.

AL-WAILI, N. et al. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candid albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 9, p. 793-800, out. 2012.

AL-WAILI, N. et al. Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi.**Archives of Medical Research**, v. 44, n. 4, p. 307-316, abr. 2013.

ANSARI, M. J. et al. Effect of jujube honey on *Candida albicans* growth and biofilm formation. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 5, p. 352-360, jun. 2013.

AURONGZEB, M.; AZIM, K. Antimicrobial properties of natural honey: a review of literature. **Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 44, n. 3, p. 118-124, ago.2011.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.et al. **Water activity in foods: Fundamentals and applications**. Iowa: Blackwell Publishing, 2007.440 p.

BOORN, K. L. et al. Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigonicarbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 5, p. 1534-1543, ago.2009.

BOUKRAA, L.; BENBAREK, H.; MOUSSA, A. Synergistic action of starch and honey against *Candida albicans*in correlation with diastase number.**Brazilian Journal ofMicrobiology**, v. 39, n. 1, p. 40-43, jan.2008.

BORSATO, D. M. et al. Atividade antimicrobiana de méis produzidos por meliponíneos nativos do Paraná (Brasil). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 57-66, jun. 2013.

CHEN, C. et al. The effect of standart heat and filtration processing procedures on antimicrobial activity and hydrogen peroxide levels in honey. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 265, p. 1-8,jul. 2012.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; ROUBIK, D.W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.; VENTURIERI, G.C.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 275–292, fev. 2006.

DEMERA, J. H.; ANGERT, E. R. Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica. **Apidologie**, v. 35, n. 4, p. 411-417, jan. 2004.

EICK, S.; SCHÄFER, G.; KWIECINSKI, J.; ATROTT, J.; HENLE, T.; PFISTER, W. Honey - a potential agent against *Porphyromonas gingivalis*: an *in vitro* study. **BCM Oral Health**, v. 14, n. 1, p. 24, mar. 2014. doi: 10.1186/1472-6831-14-24

FEÁS, X. et al. Effect of *Erica* sp. honey against microorganisms of clinical importance: study of the factors underlying this biological activity. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4233-4246, abr. 2013.

FERREIRA, I. C. F. R.; AIRES, E.; BARREIRA, J. C. M.; ESTEVINHO, L. M. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: different contributions of the entire honey and phenolic extract. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1438-1443, jun. 2009.

GEORGE N. M.; CUTTING, K. F. Antibacterial honey (Medihoney™): *in-vitro* activity against clinical isolates of MRSA, VRE and other multiresistant gram-negative organisms including *Pseudomonas aeruginosa*. **Wounds**, v. 19, n. 9, p. 231-236, set. 2007.

GETANEH, A. et al. *In vitro* assessment of the antimicrobial effect of ethiopian multi-flora honey on the methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Current Research and Review**, v. 5, n. 11, p. 64-72, jun. 2013.

GOERDT, A. et al. Proposal for assessment of the antimicrobial efficacy of undiluted medical honey: Using a standardized phase 2/step 2 *in vitro* stainless steel disc carrier test model. **Wound Medicine**, v. 1, p. 20-24, mar. 2013.

HAMMOND, E. N.; DONKOR, E. S. Antibacterial effect of Manuka honey on *Clostridium difficile*. **BCM Research Notes**, v. 6, n. 1, p. 188, maio 2013.

IRISH, J.; BLAIR, S.; CARTER, D. A. The antibacterial activity of honey derived from australian flora. **PLOS One**, v. 3, n. 6, e18229, mar. 2011.

JACBOSEN, I. D.; WILSON, D.; WACHTLER, B.; BRUNKE, S.; NAGLIK, J. R.; HUBE, B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 1, p. 85-93, jan. 2012.

JEFFREY, A. E.; ECHAZARRETA, C. M. Medical uses of honey. **Revista Biomédica**, v. 7, p. 43-49, jan. 1996.

JULL, A. B.; WALKER, N.; DESHPANDE, S. Honey as a topical treatment for wounds. **The Cochrane Database Systematic Review**, v. 2, n. CD005083, fev. 2013.

KHOSRAVI, R. et al. Fungicidal potential of different Iranian honeys against some pathogenic *Candida* species. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 47, n. 4, p. 260-264, abr. 2008.

KHOSRAVI-DARANI, K. et al. Antifungal and antibacterial synergistic effects of mixture of honey and herbal extracts. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences**, v. 15, n. 8, p. 30-33, jan. 2013.

KOÇ, A. N.; SILICI, S.; KASAP, F.; HÖRMET-ÖZ, H. T.; MAVUS-BULDU, H.; ERCAL, B. D. Antifungal activity of the honeybee products against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 1, p. 128-134, jan. 2011.

LEE, J. et al. Low concentrations of honey reduce biofilm formation, quorum sensing, and virulence in *Escherichia coli* O157:H7. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 27, n. 10, p. 1095-1104, nov. 2011.

LIN, S. M.; MOLAN, P. C.; CURSONS, R. T. The *in vitro* susceptibility of *Campylobacter* spp. to the antibacterial effect of manuka honey. **European Journal of Microbiology & Infectious Diseases**, v. 28, n. 4, p. 339-344, abr. 2009.

LIU, J. et al. Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of honeys in Taiwan. **Food Chemistry**, v. 139, n. 4, p. 938-943, fev. 2013.

LOK, L. K. **Inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* biofilm through the use of honey**. 2013. 71 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biomedicina) - Departamento de Ciências Biomédicas, Universiti Tunku Abdul Rahman, Malásia, 2013.

LUSBY, P. E.; COOMBES, A. L.; WILKINSON, J. M. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. **Journal of Medical Research**, v. 36, n. 5, p. 464-467, mar. 2005.

MADDOCKS, S. E. et al. Manuka honey inhibits the development of *Streptococcus pyogenes* biofilms and causes reduced expression of two fibronectin binding proteins. **Microbiology**, v. 158, p. 781-790, jan. 2012.

MAGHSOUDI, H. et al. Comparison between topical honey and mafenide acetate in treatment of burn wounds. **Annals of Burns and Fire Disasters**, v. 24, n. 3, p. 132-137, set. 2011.

MAJTAN, J. et al. Anti-biofilm effects of honey against wound pathogens *Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae*. **Phytotherapy Research**, DOI: 10.1002/prt.4957, fev. 2013.

MAVRIC, E. et al. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, n. 4, p. 483-489, abr. 2008.

MOLAN, P. C. et al. Identification of components responsible for the antibacterial activity of Manuka and Viper's Bugloss honeys. In: Annual Conference of the New Zealand Institute of Chemistry, 1989, Hamilton. (**Anais**).

MOLAN, P. The limitations of the methods of identifying the floral source of honeys. **Bee World**, v. 97, p. 59-68, 1998.

MOLAN, P. Honey: Antimicrobials actions and role in disease management. In: AHMAD, I.; AQIL, F. **New strategies combating bacterial infection**. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2009, p. 229-253.

MOUSSA, A. et al. Antifungal activity of a combination of Algeria Honey and Starch of ginger against *Aspergillusniger*. **International Journal of Microbiological Research**, v. 2, n. 3, p. 263-266, 2011.

MOUSSA, A. et al. The influence of botanical origin and physico-chemical parameters on the antifungal activity of Algerian honey. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 1-5, set. 2012a.

MOUSSA, A. et al. Additive potential of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 4, p. 253-255, abr. 2012b.

MULU, A. et al. Effect of ethiopianmultiflora honey on fluconazole-resistant *Candida* species isolated from the oral cavity of AIDS patients. **International Journal of STD & AIDS**, v. 21, n. 11, p. 741-745, nov.2010.

NASSAR, H. M.; LI, M.; GREGORY, R. L. Effect of honey on *Streptococcus mutans* growth and biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 536-540, out. 2011.

NDIP, R. N. et al. *In-vitro* antimicrobial activity of selected honeys on clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **African Health Sciences**, v. 7, n. 4, p. 228-232, dez. 2007.

NGATU, N. R. et al. Antifungal efficacy of Brazilian green propolis extracts and honey on *Tineacapitis* and *Tineaversicolor*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 3, n. 4, p. 281-287, out. 2011.

OKHIRIA, O. A. et al. Honey modulates biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* in a time and dose dependent manner. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, n. 1, p. 6-10, jan. 2009.

PATTON, T. et al. Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, n. 1, p. 84-95, jan.2006.

PIMENTEL, R. et al. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Meliponacompressipesmanaosensis* and commercial honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 1-13, jul. 2013.

SABATIER, S. et al. Identification of flavonoids in sunflower honey. **Journal of food Science**, v. 57, n. 3, p. 773-774, maio 1992.

SAJID, M.; AZIM, M. K. Characterization of the nematicidal activity of natural honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7428-7434, jul. 2012.

SHAHZAD, A.; COHRS, R. J. *In vitro* antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicinal study for potential remedy for shingles. **Translational Biomedicine**, v. 3, n. 2, p. 1-7, jul. 2012.

SIMON, A. et al. Medical honey for wound care - Still the 'Latest resort'?. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 2, p. 165-173, 2009.

THEUNISSEN, F.; GROBLER, S.; GEDALIA, I. The antifungal action of three South African honeys on *Candida albicans*. **Apidologie**, v. 32, p. 371-379, maio 2001.

WATANABE, N. et al. E1210, a new broad-spectrum antifungal, suppresses *Candida albicans* hyphal growth through inhibition of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 960-971, fev. 2012.

WANG, J.; LI, Q. X. Chemical composition, characterization, and differentiation of honey botanical and geographical origins. **Advances in Food and Nutrition Research**. v. 62, p. 89-137, 2011.

WEN, C. T. et al. Gelam and Nenas honeys inhibit proliferation of HT29 colon cancer cells by inducing DNA damage and apoptosis while suppressing inflammation. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 4, p. 1605-1610, 2012.

WILLE, A. Biology of the stingless bees. **Annual Review of Entomology**, v. 28, p. 41-64, jan. 1983.

WINSTON, M. L. **The Biology of Honey Bee**. USA: Harvard University Press, 1987. 281 p.

5 CONCLUSÃO

Os méis produzidos pelas abelhas indígenas sem ferrão *Scaptotrigona bipuncata* e *Scaptotrigona postica* tiveram efeito inibitório em células planctônicas de *Candida albicans* e interferiram em fatores de virulência desta espécie, reduzindo a morfogênese das leveduras, assim como a adesão em superfície abiótica e a biomassa do biofilme. Os méis não possuíram efeito sinérgico entre si ou em combinação com o fluconazol. Nas concentrações avaliadas ambos os méis não apresentaram efeito hemolítico em eritrócitos humanos. Os resultados deste estudo sugerem a presença do peróxido de hidrogênio como uma substância parcialmente responsável pelo efeito inibitório dos méis, uma vez que quando tratados com a enzima catalase, o efeito antifúngico diminuiu. A elaboração de produtos antimicrobianos a base de méis é uma possível alternativa aos antifúngicos utilizados para o tratamento de candidíases.

6 REFERÊNCIAS

- ABDELMONEM, A. M.; RASHEED, S. M.; MOHAMED, A. S. Bee-honey and yougurt: a novel mixture for treating patients with vulvovaginal candidiasis during pregnancy. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 286,p. 109-114, fev. 2012.
- ADAMS, C. J. et al. Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 4, p. 651-659, jan. 2008.
- ADWAN, G. et al. Assessment of antifungal activity of herbal and conventional toothpastes against clinical isolates of *Candida albicans*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 5, p. 375-379, maio 2012.
- AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, n. 922, p. 455-459, ago. 2002.
- AL MASAUDI, S. B.; AL BUREIKAN, M. O. Antimicrobial activity of onion juice (*Allium cepa*), honey, and onion-honey misture on some sensitive and multi-resistant microorganisms. **Life Science Journal**, v. 9, n. 2, p. 775-780, maio 2012.
- AL SOMAL, N. et al. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 84, p. 9-12, jan.1994.
- AL-WAILI, N. et al. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 9, p. 793-800, out. 2012.
- AL-WAILI, N. et al. Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 4, p. 307-316, abr. 2013.
- ALMAINAT, S.; WAINWRIGHT, M.; AL'ABRI, K. Antibacterial potential of honey from different origins: a comparison with manuka honey. **Biotechnology and Food Sciences**, v. 1, n. 5, p. 1328-1338, 2012.
- ANSARI, M. J. et al. Effect of jujube honey on *Candida albicans* growth and biofilm formation. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 5, p. 352-360, jun. 2013.
- ANYANWU, C. U. Investigation of *in vitro* antifungal activity of honey. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 18, p. 3512-3516, abr. 2012.
- ARENDRUP, M.; HORN, T.; FRIMODT-MOLLER, N. *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. **Infection**, v. 30, n. 5, p. 286-291, out. 2002.
- AURONGZEB, M.; AZIM, K. Antimicrobial properties of natural honey: a review of literature. **Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 44, n. 3, p. 118-124, ago.2011.
- BADET, C.; QUERO, F. The *in vitro* effect of manuka honeys on growth and adherence of oral bacteria. **Anaerobe**, v. 17, n. 1, p. 19-22, dez. 2010.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. et al. **Water activity in foods: Fundamentals and applications**. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. 440 p.

BASUALDO, C. et al. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 3, p. 375-381, out. 2007.

BIZERRA, F. C. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 3, p. 442-450, jan. 2008.

BOORN, K. L. et al. Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigonia carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 5, p. 1534-1543, ago. 2009.

BORSATO, D. M. et al. Atividade antimicrobiana de méis produzidos por meliponíneos nativos do Paraná (Brasil). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 57-66, jun. 2013.

BOUKRAA, L.; BENBAREK, H.; MOUSSA, A. Synergistic action of starch and honey against *Candida albicans* in correlation with diastase number. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 40-43, jan. 2008.

BRAUTASET, T. et al. New nystatin-related antifungal polyene macrolides with altered polyol region generated via biosynthetic engineering of *Streptomyces noursei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6636-6643, set. 2011.

BRION, L. P.; UKO, S.; GOLDMAN, D. L. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: Systematic review. **The Journal of Infection**, v. 54, n. 6, p. 521-529, abr. 2007.

BRUNKE, S.; HUBE, B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 701-708, jan. 2013.

CANDIRACCI, M.; CITTERIO, B.; PIATTI, E. Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 493-499, 2012.

CAVANAGH, D.; BEAZLEY, J.; OSTAPOWICZ, F. Radical operation for carcinoma of the vulva: A new approach to wound healing. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology of The British Commonwealth**, v. 77, n. 11, p. 1037-1040, jun. 1970.

CHAFFIN, W. L. F. *Candida albicans* cell wall proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 3, p. 495-544, set. 2008.

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, jun. 2001.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. *Candida* biofilms associated with CVC and medical devices. **Mycoses**, v. 55, n. 1, p. 46-57, abr. 2011.

CHEN, C. et al. The effect of standart heat and filtration processing procedures on antimicrobial activity and hydrogen peroxide levels in honey. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 265, p. 1-8, jul. 2012.

DEMERA, J. H.; ANGERT, E. R. Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica. **Apidologie**, v. 35, n. 4, p. 411-417, jan. 2004.

DEORUKHKAR, S.; KATIYAR, R.; SAINI, S. Species identification and antifungal susceptibility pattern of *Candida* isolates from oropharyngeal lesions of HIV infected patients. **National Journal of Integrated Research in Medicine**, v. 3, n. 4, p. 86-90, set. 2012.

DERESINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. **Reviews of Anti-Infective Agents**, v. 36, n. 11, p. 1445-1447, jun. 2003.

DONGARI-BAGTZOGLOU, A.; KASHLEVA, H.; DWIVEDI, P.; DIAZ, P.; VASILAKOS, J. Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. **PLOS One**, v. 4, n. 11, p. 1-9, nov. 2009.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, W. J. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, abr. 2002.

ESTEVINHO, M. L.; AFONSO, S. E. A.; FÉAS, X. Antifungal effect of lavender honey against *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Food and Science Technology**, v. 48, n. 5, p. 640-643, out. 2011.

FEÁS, X. et al. Effect of *Erica* sp. honey against microorganisms of clinical importance: study of the factors underlying this biological activity. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4233-4246, abr. 2013.

FERREIRA, I. C. F. R. et al. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: different contributions of the entire honey and phenolic extract. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1438-1443, jun. 2009.

FIORI, B. et al. *In vitro* activities of nystatin and other antifungal agents against biofilms formed by clinical isolates of different *Candida* and *Aspergillus* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 3031-3035, jun. 2011.

FOX, E. P.; NOBILE, C. J. A sticky situation: Untangling the transcriptional network controlling biofilm development in *Candida albicans*. **Transcription**, v. 3, n. 6, p. 315-322, nov. 2012.

GÁCSEK, A. et al. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p. 1336-1341, dez. 2007a.

GÁCSEK, A. et al. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 10, p. 3049-3058, out. 2007b.

GANGULY, S.; MITCHELL, A. P. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 380-385, ago. 2011.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-517, out. 1999.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 122-143, jan. 2000.

GEORGE N. M.; CUTTING, K. F. Antibacterial honey (MedihoneyTM): *in-vitro* activity against clinical isolates of MRSA, VRE and other multiresistant gram-negative organisms including *Pseudomonas aeruginosa*. **Wounds**, v. 19, n. 9, p. 231-236, set. 2007.

GETANEH, A. et al. *In vitro* assessment of the antimicrobial effect of ethiopian multi-flora honey on the methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Current Research and Review**, v. 5, n. 11, p. 64-72, jun. 2013.

GIANNINI, P. J.; SHETTY, K. V. Diagnosis and management of oral candidiasis. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 44, n. 1, p. 231-240, 2011.

GOERDT, A. et al. Proposal for assessment of the antimicrobial efficacy of undiluted medical honey: Using a standardized phase 2/step 2 *in vitro* stainless steel disc carrier test model. **Wound Medicine**, v. 1, p. 20-24, mar. 2013.

GOW, N. A. R. et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 112-122, dez. 2012.

GROVER, N. D. Echinocandins: A ray of hope in antifungal drug therapy. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 42, n. 6, p. 9-11, dez. 2010.

HAZEN, K. C. et al. Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 3, p. 907-912, mar. 1991.

HULL, C. M. et al. Two clinical isolates of *Candida glabrata* exhibiting reduced sensitivity to amphotericin B both harbor mutations in ERG2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6417-6421, dez. 2012.

IBRAHIM, A. S. et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 1993-1998, maio 1995. IRISH, J. et al. Honey has an antifungal effect against *Candida* species. **Medical Mycology**, v. 44, n. 3, p. 289-291, maio 2006.

JACBOSEN, I. D. et al. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 1, p. 85-93, jan. 2012.

JAYATILAKE, J. A. et al. Quantative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-albicans *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 35, p. 484-491, set. 2006.

JIANG, C. et al. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 778-785, abr. 2013.

JEFFREY, A. E.; ECHAZARRETA, C. M. Medical uses of honey. **Revista Biomédica**, v. 7, p. 43-49, jan. 1996.

JÚNIOR, D. P. L. et al. Species of *Candida* isolated from anatomically distinct sites in military personnel in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 675-680, jul. 2011.

- KATRAGKOU, A. et al. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 357-360, 2008.
- KHOSRAVI, R. et al. Fungicidal potential of different Iranian honeys against come pathogenic *Candida* species. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 47, n. 4, p. 260-264, abr. 2008.
- KHOSRAVI-DARANI, K. et al. Antifungal and antibacterial synergistic effects of mixture of honey and herbal extracts. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences**, v. 15, n. 8, p. 30-33, jan. 2013.
- KIRK, P. M. et al. **Dictionary of the Fungi**. 10. ed. Wallingford: CAB International, 2008.784 p.
- KOÇ, A. N. et al. Antifungal activity of the honeybee products against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 1, p. 128-134, jan. 2011.
- LEE, J. et al. Low concentrations of honey reduce biofilm formation, quorum sensing, and virulence in *Escherichia coli* O157:H7. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 27, n. 10, p. 1095-1104, nov. 2011.
- LI, X. et al. Oropharyngeal *Candida* colonization in human immunodeficiency virus infected patients. **Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica**, v. 121, n. 5, p. 375-402, maio 2013.
- LIU, Y.; FILLER, S. G. *Candida albicans* Als3, a multifuncional adhesin and invasin. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 2, p. 168-173, fev. 2011.
- LIU, J. et al. Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of honeys in Taiwan. **Food Chemistry**, v. 139, n. 4, p. 938-943, fev.2013.
- LO, H. J. et al. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. **Cell**, v. 90, n. 5, p. 939-949, set. 1997.
- LOK, L. K. **Inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* biofilm through the use of honey**.2013. 71 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biomedicina) - Departamento de Ciências Biomédicas, UniversitiTunku Abdul Rahman, Malásia, 2013.
- LUSBY, P. E.; COOMBES, A. L.; WILKINSON, J. M. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. **Journal of Medical Research**, v. 36, n. 5, p. 464-467, mar.2005.
- MADDOCKS, S. E. et al. Manuka honey inhibits the development of *Streptococcus pyogenes* biofilms and causes reduced expression of two fibronectin binding proteins. **Microbiology**, v. 158, p. 781-790, jan. 2012.
- MAGHSOUDI, H. et al. Comparision between topical honey and mafenide acetate in treatment of burn wounds. **Annals of Burns and Fire Disasters**, v. 24, n. 3, p. 132-137, set. 2011.
- MAJTAN, J. et al. Anti-biofilm effects of honey against wound pathogens *Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae*. **Phytotherapy Research**, DOI: 10.1002/prt.4957, fev. 2013.

- MANN, P. A. et al. Impact of antifungal prophylaxis on colonization and azole susceptibility of *Candida* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5026-5034, dez. 2009.
- MARTCHENKO, M. et al. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced *SOD5* gene. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 2, p. 456-457, fev.2004.
- MARTINS, M. et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**, v. 169, n. 5, p. 323-331, maio 2010.
- MARTINS, M. et al. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. **Mycoses**, v. 55, p. 80-85, jan. 2011.
- MATTA, D. A. et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 57, n. 4, p. 399-404, abr. 2007.
- MERENSTEIN, D. et al. Colonization by *Candida* species of the oral and vaginal mucosa in HIV-infected and non infected woman. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 29, n. 1, p. 30-34, out.2013.
- MOLAN, P. C. et al. Identification of components responsible for the antibacterial activity of Manuka and Viper's Bugloss honeys. In: Annual Conference of the New Zealand Institute of Chemistry, 1989, Hamilton. (**Anais**).
- MOLAN, P. Honey: Antimicrobials actions and role in disease management. In: AHMAD, I.; AQIL, F. **New strategies combating bacterial infection**. Weinheim: Wiley-Blacwell, 2009, p. 229-253.
- MONOD, M. et al. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. **Molecular Microbiology**, v. 13, p. 357-368, jul. 1994.
- MOUSSA, A. et al. Antifungal activity of a combination of Algeria Honey and Starch of ginger against *Aspergillusniger*. **International Journal of Microbiological Research**, v. 2, n. 3, p. 263-266, 2011.
- MOUSSA, A. et al. Additive potential of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 4, p. 253-255, abr. 2012a.
- MOUSSA, A. et al. The influence of botanical origin and physico-chemical parameters on the antifungal activity of Algerian honey. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 1-5, set. 2012b.
- MULU, A. et al. Effect of ethiopianmultiflora honey on fluconazole-resistant *Candida* species isolated from the oral cavity of AIDS patients. **International Journal of STD & AIDS**, v. 21, n. 11, p. 741-745, nov.2010.
- NETT, J. E. et al. Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 1, p. 1171-1175, jul. 2010.

- NGATU, N. R. et al. Antifungal efficacy of Brazilian green propolis extracts and honey on *Tineacapitisa* and *Tineaversicolor*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 3, n. 4, p. 281-287, out. 2011.
- NOËL T. The cellular and molecular defense mechanisms of the *Candida* yeasts against azole antifungal drugs. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 22, n. 2, p. 173-178, jun. 2012.
- NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 1, p. 77-82, maio 2007.
- O'BRIEN, B. L. et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5544-5550, set. 2005.
- ODDS, F. C.; BROWN, J. P. A.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **TRENDS in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272-279, out. 2003.
- OKHIRIA, O. A. et al. Honey modulates biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* in a time and dose dependent manner. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, n. 1, p. 6-10, jan. 2009.
- PADERA, R. F. Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. **Cardiovascular Pathology**, v. 15, n. 5, p. 264-270, set. 2006.
- PATTON, T. et al. Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, n. 1, p. 84-95, jan. 2006.
- PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5 year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeasts species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1735-1745, jun. 2007.
- PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 1366-1377, fev. 2010.
- PFALLER, M. A. et al. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 1, p. 65-69, jul. 2011.
- PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. 1-12, jan. 2012.
- PHAN, Q. T. et al. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. **PLOS Biology**, v. 5, n. 3, e64, mar. 2007.
- PICHOVÁ, I. et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*: inhibition with peptidomimetic inhibitors. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 9, p. 2669-2677, maio 2001.

- PIMENTEL, R. et al. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Meliponacompresipesmanaosensis* and commercial honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 1-13, jul. 2013.
- RAO, P. Oral candidiasis - A review. **Scholarly Journals International**, v. 2, n. 2, p. 26-30, fev. 2012.
- RAMAGE, G.; MARTINEZ, J. P.; LOPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 7, p. 979-986, nov. 2006.
- RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, ID 528521, out. 2012.
- RAMAGE, G. et al. Liposomal amphotericin B displays rapid dose-dependent activity against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 2369-2371, maio 2013.
- SABATIER, S. et al. Identification of flavonoids in sunflower honey. **Journal of food Science**, v. 57, n. 3, p. 773-774, maio 1992.
- SAJID, M.; AZIM, M. K. Characterization of the nematocidal activity of natural honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7428-7434, jul. 2012.
- SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 41, p. 295-310, nov. 1994.
- SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, jan. 2013.
- SHAHZAD, A.; COHRS, R. J. *In vitro* antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicinal study for potential remedy for shingles. **Translational Biomedicine**, v. 3, n. 2, p. 1-7, jul. 2012.
- SHEIKH, D. et al. Studies on the antimicrobial activity of honey. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 51-62, jan. 1995.
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. 396 p.
- SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, mar. 2012.
- SILVERMAN, S.; LUANGJARMEKORN, L.; GREENSPAN, D. Occurrence of oral candida in irradiated head and neck cancer patients. **Journal of Oral Medicine**, v. 30, p. 28-33, out. 1984.
- SIMON, A. et al. Medical honey for wound care - Still the 'Latest resort'? **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 2, p. 165-173, 2009.

SITHEEQUE, M. A.; SAMARANAYAKE, L. P. Chronic hyperplastic candidosis/candidiasis (candidal leukoplakia). **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 14, n. 4, p. 253-267, 2003.

TRAMMEL, R. A. et al. Evaluation of an extract of North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) in *Candida albicans*-infected complement-deficient mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 414-421, jan. 2012.

TUMBARELLO, M. et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. **Plos One**, v. 7, n. 3, e33705, mar. 2012.

TURI, T. G.; LOPER, J. C. Multiple regulatory elements control expression of the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* cyto-chrome P450, lanosterol 14 alpha-demethylase (ERG11). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 3, p. 2046-2056, jan. 1992.

VALENTÍN, A. et al. Voriconazole inhibits biofilm formation in different species of the genus *Candida*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 10, p. 2418-2423, out. 2012.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 171-179, ago. 2000.

WACHTLER, B. et al. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. **PLOS One**, v. 6, n. 2, fev. 2011.

WANG, J. et al. Systematic review and meta-analysis on the tolerability and hepatotoxicity of antifungals in empirical and definitive therapy for invasive fungal infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2409-2419, jun. 2010.

WATANABE, N. et al. E1210, a new broad-spectrum antifungal, suppresses *Candida albicans* hyphal growth through inhibition of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 960-971, fev. 2012.

WEN, C. T. et al. Gelam and Nenas honeys inhibit proliferation of HT29 colon cancer cells by inducing DNA damage and apoptosis while suppressing inflammation. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 4, p. 1605-1610, 2012.

WILLIAMS, D. W. et al. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. **Periodontology**, v. 55, p. 250-265, fev. 2011.

ZAOUTIS, T. E. et al. The epidemiology and attributable outcome of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 9, p. 1232-1239, nov. 2005.

ZAUGG, C. et al. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. **Infection Immunology**, v. 69, p. 405-412, jan. 2001.

ZHENG, X.; WANG, Y. Hgc1, a novel hyphae-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 8, p. 1845-1856, abr. 2004.


ZHU, W.; FILLER, S. G. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 273-282, mar. 2010.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer de aprovação do uso de isolados clínicos originários da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Londrina



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná
 Registro CONEP 268

Parecer de Aprovação Nº 036/10 CAAE Nº 0036.0.268.000-10 FOLHA DE ROSTO Nº 325267	Londrina, 18 de maio de 2010.
PESQUISADORA: SUELI FUMIE YAMADA OGATTA CCB/DEPTO DE MICROBIOLOGIA	
<p>Prezada Senhora:</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p>"CANDIDA SPP. ISOLADAS DE MUCOSA BUCAL DE PACIENTES PORTADORES DE HIV: DETERMINAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA, FORMAÇÃO DE BIOFILME E SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS"</p>	
<p>Situação do Projeto: APROVADO</p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.</p>	
<p>Atenciosamente,</p>  <p>Profª. Dra. Paula Mariza Zedu Alliprandini Vice-Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL</p>	

ANEXO B - Parecer de aprovação do uso de isolados clínicos originários da cavidade bucal
pelo Comitê de Ética da Faculdade Uningá



COMITÊ PERMANENTE DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES
HUMANOS - REGISTRADO NA CONEP EM 29/03/2011

CAAE Nº 0017.0.362.000 – 11

PARECER Nº 0017/11

Pesquisador(a) Responsável: Natália de Souza Botelho

Curso de graduação/Curso pós-graduação/Empresa: Curso de Biomedicina/Uningá

Título do Projeto: Identificação e caracterização de leveduras isoladas da mucosa oral de pacientes diabéticos

Considerações:

O presente projeto de pesquisa científica do curso de Biomedicina busca analisar amostras de saliva provenientes de pacientes diabéticos em tratamento com insulina registrados em Unidades Básicas de Saúde de Maringá – PR.

- Todos os itens proposto pelo relator foram corrigidos pelo pesquisador responsável deste projeto.

Desta forma, os membros do comitê de ética foram favoráveis à aprovação do projeto.

Situação:

APROVADO (X)

PENDENTE ()

() para registro SISNEP

() para análise e parecer CONEP

Data: / /

O pesquisador(a) deverá apresentar:


() Relatório(s) semestral (ais) em

() Relatório final para este comitê em

O protocolo foi aprovado de acordo com a resolução nº 196/96 e complementares do CNS/MS, na 0000ª reunião do CEP-INGÁ em 29/04/2011.

Maria do Rosário Martins
Prof. Ms. Maria do Rosário Martins
Coordenador CEP-INGÁ

ANEXO C - Autorização de acesso aos méis de *Scaptotrigona bipunctata* e *Scaptotrigona postica* para fins científicos

 <p>Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético</p> <p>O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.</p> <p>Brasília, 17 de Maio de 2013</p> <p>Paulo Sergio Lacerda Beirao Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 161/2010</p>	<p>Processo: 010326/2013-8 Validade: 17/05/2013 a 13/05/2016 Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA CNPJ: 786.404.890/0001-53 Pesquisador: Gerson Nakazato CPF: 176.843.348-83 RG: 21981716 - SSP / SP</p> <p><i>Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/ e informar o número do protocolo 3281781225021035 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i></p>
--	---