



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL
(PPGBA/DMFA/UFRPE)**

**ISOLAMENTO DE DERMATÓFITOS DE CÃES E GATOS, AVALIAÇÃO DO
PERFIL ENZIMÁTICO E DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA PRÓPOLIS
VERMELHA ISOLADA E COMBINADA COM TERBINAFINA E ITRACONAZOL**

Recife-PE
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL
(PPGBA/DMFA/UFRPE)**

MICHELLY ÉLEN LEAL MENEZES TORRES

**ISOLAMENTO DE DERMATÓFITOS DE CÃES E GATOS, AVALIAÇÃO DO
PERFIL ENZIMÁTICO E DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA PRÓPOLIS
VERMELHA ISOLADA E COMBINADA COM TERBINAFINA E ITRACONAZOL**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Biociência Animal, da Universidade
Federal Rural de Pernambuco como
requisito para obtenção do grau de
mestre.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Cynthia de Oliveira Nascimento – PNPB/DMFA/UFRPE
Co-orientador (a): Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto – DMFA/UFRPE

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Parecer da comissão examinadora da dissertação de mestrado de

MICHELLY ÉLEN LEAL MENEZES TORRES

ISOLAMENTO DE DERMATÓFITOS DE CÃES E GATOS, AVALIAÇÃO DO PERFIL
ENZIMÁTICO E DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA PRÓPOLIS VERMELHA
ISOLADA E COMBINADA COM TERBINAFINA E ITRACONAZOL

Área de concentração: Biotecnologia

Recife, 08 de agosto de 2013

Comissão examinadora, composta pelos seguintes professores:

Profª Drª Cynthia de Oliveira Nascimento

PNPD/Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

(Presidente)

Profª. Drª Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

(Membro interno)

Profª. Drª. Ana Beatriz Sotero Siqueira

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

(Membro externo)

Profª. Drª. Cristina Maria Souza-Motta

Departamento de Micologia

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

(Membro externo)

*Ao SENHOR meu DEUS, por
ser meu refúgio e fortaleza.
A toda minha família.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu DEUS, que como pai maravilhoso, onisciente e onipresente tem cuidado da minha vida desde o princípio e me mostrado que nada é por acaso e tudo tem o seu consentimento e permissão, se hoje estou aqui é pela sua misericórdia e pelo seu amor. Glórias a ti meu DEUS hoje e sempre!!!

Ao programa de pós-graduação Biociência Animal pela oportunidade oferecida.

À Prof^a Dr^a Cynthia de Oliveira Nascimento pela orientação científica, pela confiança depositada, pelo exemplo de vida e dedicação e por estar comigo em todos os momentos. Muito obrigada!!!

À Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto, pela co-orientação, confiança e por ter aberto as portas do Labetecbio – Laboratório de Tecnologia de Bioativos, sou muito grata!!!

Ao Hospital Veterinário Harmonia, nas pessoas de Maria Luiza Farias de Lima e Paola Teles Soares.

Ao Hospital Veterinário da UFRPE na pessoa da Médica Veterinária Diana Lúcia Serpa de Sousa.

À Micoteca URM da UFPE, pela identificação e depósito dos isolados obtidos nesta pesquisa, em especial à Prof^a Dr^a Cristina Maria Souza-Motta e a tecnóloga Eliane Barbosa da Silva Nogueira.

Ao CETENE pela realização da microscopia eletrônica, onde tive o apoio dos técnicos Josi e Edwin.

Às Professoras Dr^a Ana Beatriz Sotero Siqueira e Dr^a Polyana Nunes Herculano pelo apoio e valiosas colaborações.

Aos meus pais, Moaci e Margarida, por tudo que fizeram por mim com muito amor e dedicação, meus respeito e amor eterno.

Ao meu esposo Kaio Ikaro, pelo seu amor, carinho, compreensão, dedicação e por estar comigo sempre. Te amo!!!

À minha filhinha Bianka, tão linda e carinhosa com a mamãe, nos momentos de tristeza ela dizia: to aqui mamãe. Isso pra mim é tudo. Sua alegria, sua inocência e o brilho dos seus olhos me incentivam todos os dias, te amo filha!!!

À minha irmã Mirtes, pelo carinho e força em todos os momentos. Um carinho especial aos meus sobrinhos Washington e Gustavo, titia ama muito!!!

Aos meus sogros, Edson e Diana, pelo apoio e ajuda, principalmente cuidando da minha filha quando precisei.

Aos amigos que fiz durante o mestrado: Ana Paula, Juanize, Meire, Thiago, Amanda, Mitaliene, Milena, Diego, Márcia, Késsia, Ellen, Anna Carolina, Hilda Michelly e a todos que fazem parte do LABTECBIO.

A UFRPE e a CAPES pelo suporte financeiro e institucional para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

Agradecimento pela vitória (Sl 118)

Rendei graças ao SENHOR, porque ele é bom, porque a sua misericórdia dura para sempre.

Diga, pois, Israel: Sim, a sua misericórdia dura para sempre.

Diga, pois, a casa de Arão: Sim, a sua misericórdia dura para sempre.

Digam, pois, os que temem ao SENHOR: Sim, a sua misericórdia dura para sempre. Em meio à tribulação, invoquei o SENHOR, e o SENHOR me ouviu e me deu folga.

O SENHOR está comigo; não temerei. Que me poderá fazer o homem?

O SENHOR está comigo entre os que me ajudam; por isso, verei cumprido o meu desejo nos que me odeiam.

Melhor é buscar refúgio no SENHOR do que confiar no homem.

Melhor é buscar refúgio no SENHOR do que confiar em príncipes.

Todas as nações me cercaram, mas em nome do SENHOR as destruí.

Cercaram-me, cercaram-me de todos os lados; mas em nome do SENHOR as destruí.

Como abelhas me cercaram, porém como fogo em espinhos foram queimadas; em nome do SENHOR as destruí.

13 Empurraram-me violentamente para me fazer cair, porém o SENHOR me amparou.

O SENHOR é a minha força e o meu cântico, porque ele me salvou.

Nas tendas dos justos há voz de júbilo e de salvação; a destra do SENHOR faz proezas.

A destra do SENHOR se eleva, a destra do SENHOR faz proezas.

Não morrerei; antes, viverei e contarei as obras do SENHOR.

O SENHOR me castigou severamente, mas não me entregou à morte.

Abri-me as portas da justiça; entrarei por elas e renderei graças ao SENHOR.

Esta é a porta do SENHOR; por ela entrarão os justos.

Render-te-ei graças porque me acudiste e foste a minha salvação.

A pedra que os construtores rejeitaram, essa veio a ser a principal pedra, angular; isto procede do SENHOR e é maravilhoso aos nossos olhos.

Este é o dia que o SENHOR fez; regozijemo-nos e alegremo-nos nele.

Oh! Salva-nos, SENHOR, nós te pedimos; oh! SENHOR, concede-nos prosperidade!

Bendito o que vem em nome do SENHOR. A vós outros da Casa do SENHOR, nós vos abençoamos.

O SENHOR é Deus, ele é a nossa luz; adornai a festa com ramos até às pontas do altar.

Tu és o meu Deus, render-te-ei graças; tu és o meu Deus, quero exaltar-te.

Rendei graças ao SENHOR, porque ele é bom, porque a sua misericórdia dura para sempre.

RESUMO

Os dermatófitos são fungos que possuem a habilidade de degradar a queratina e por isso são causadores de micoses superficiais em homens e animais. Pertencem aos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. As espécies que geralmente causam dermatofitose em cães e gatos são *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*, contudo *M. canis* é a espécie mais frequentemente isolada. Os dermatófitos produzem diversas enzimas que são essenciais para o processo infeccioso, tais como proteases, lipases, fosfolipases, entre outras. Para o tratamento da dermatofitose em cães e gatos são utilizados medicamentos de uso tópico e sistêmico, no entanto, a terapia nem sempre é eficiente o que estimula o crescimento de estirpes resistentes e a continuidade do processo infeccioso. A própolis vermelha, sendo um produto natural com inúmeras propriedades biológicas, surge como possível alternativa terapêutica no tratamento de dermatofitoses em cães e gatos. O objetivo deste trabalho foi isolar dermatófitos de cães e gatos, avaliar o perfil enzimático destes dermatófitos e a susceptibilidade destes isolados a própolis vermelha do Brasil isolada e combinada com terbinafina e itraconazol. A coleta das amostras (pelos e escamas epidérmicas) foi realizada no Hospital Veterinário Harmonia e no Hospital Veterinário da UFRPE. O perfil enzimático foi avaliado qualitativamente para a atividade de urease, protease, lipase, fosfolipase e colagenase utilizando-se meios sólidos com diferentes substratos específicos para cada enzima. A atividade antifúngica da própolis vermelha e dos antifúngicos comerciais itraconazol e terbinafina foi realizada conforme o documento M38-A (CLSI, 2002). A frequência de dermatófitos foi 7,55%. A espécie mais isolada foi *M. canis* (87,5%), seguida de *M. gypseum* (12,5%). Todos os dermatófitos foram positivos nos testes de urease, lipase, fosfolipase e colagenase. A própolis vermelha apresentou atividade fungistática entre 62,5-125 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ e atividade fungicida entre 62,5-250 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. No entanto, não apresentou efeitos na morfologia de hifas dos dermatófitos. A combinação da própolis vermelha com terbinafina foi indiferente para a maioria dos isolados exceto para *Microsporum gypseum* (31) cujo efeito foi antagonista. A interação com itraconazol apresentou efeito sinérgico para os isolados *M. canis* (02 e 15), indiferente para *M. canis* (18) e antagonista aos demais. A própolis vermelha demonstrou ter potencial antifúngico frente aos dermatófitos testados. Embora o efeito sinérgico tenha sido observado apenas para dois isolados, as combinações testadas foram relevantes pois houve diminuição do valor da CIM dos antifúngicos para a maioria dos isolados. A própolis vermelha é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de dermatofitoses em cães e gatos.

Palavras-chaves: dermatofitose, perfil enzimático, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, própolis, atividade antifúngica.

ABSTRACT

Dermatophytes are fungi that have the ability to degrade keratin and are therefore causing superficial mycoses in man and animals. Belong to the genera *Microsporum*, *Trichophyton* and *Epidermophyton*. Species that commonly cause ringworm in dogs and cats are *M. canis*, *M. gypseum* and *T. mentagrophytes*, *M. canis* is however the most frequently isolated species. Dermatophytes produce various enzymes that are essential for the infective process, such as proteases, lipases, phospholipases, among others. For the treatment of dermatophytosis in dogs and cats drugs topical and systemic use are used, however, is not always effective therapy which stimulates the growth of resistant strains and the continuity of the infectious process. The propolis, being a natural product with numerous biological properties, emerges as a possible therapeutic alternative in the treatment of dermatophytosis in dogs and cats. The aim of this work was to isolate dermatophytes from cats and dogs to evaluate the enzymatic profile of these dermatophytes and the susceptibility of these isolates propolis from Brazil isolation and in combination with terbinafine and itraconazole. The sample collection (and by epidermal scales) was held at Harmony Veterinary Hospital and the Veterinary Hospital of UFRPE. The enzymatic profile was qualitatively evaluated for the activity of urease, protease, lipase, phospholipase and collagenase using solids with different specific substrates for each enzyme means. The antifungal activity of propolis and commercial antifungal agents itraconazole and terbinafine was performed according to the document M38-A (CLSI, 2002). The frequency of dermatophytes was 7.55%. The most species was isolated *M. canis* (87.5%), followed by *M. gypseum* (12.5%). All dermatophytes were positive in tests for urease, lipase, phospholipase and collagenase. The propolis showed fungistatic activity between 62.5 to 125 µg.ml⁻¹ and fungicidal activity between 62.5 to 250 µg.ml⁻¹. However, had no effect on the morphology of hyphae of dermatophytes. The combination of propolis with terbinafine was indifferent to most isolates except for *Microsporum gypseum* (31) whose effect was antagonistic. The interaction with itraconazole showed synergistic effect for *M. canis* isolates (02 and 15), indifferent to *M. canis* (18) and antagonistic to the other. The propolis has demonstrated potential antifungal activity against the tested dermatophytes. Although the synergistic effect was observed only for two isolates tested combinations were relevant because there was a decrease in the value of MIC of antifungals for most isolates. The propolis is a promising alternative for the development of new drugs for the treatment of dermatophytosis in dogs and cats.

Keywords: dermatophytosis, enzymatic profile, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, propolis, antifungal activity.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 DERMATÓFITOS.....	16
2.2 DERMATOFIToses EM CÃES E GATOS.....	20
2.2.1 Antifúngicos utilizados para tratamentos de dermatofitoses em cães e gatos.....	22
2.3 PRÓPOLIS.....	24
2.3.1 Características.....	24
2.3.2 Composição química.....	25
2.3.3 Própolis vermelha do Brasil.....	27
2.3.3.1 Fonte botânica e composição química.....	27
2.3.4 Atividades biológicas.....	29
2.3.5 Associação da própolis vermelha com drogas antifúngicas.....	32
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO I.....	41
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	43
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÃO.....	50
AGRADECIMENTOS.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

CAPÍTULO II.....	54
RESUMO.....	55
ABSTRACT.....	56
INTRODUÇÃO.....	57
MATERIAL E MÉTODOS.....	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÃO.....	68
AGRADECIMENTOS.....	68
REFERÊNCIAS.....	73

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

	Pág
Figura 1. <i>Epidermophyton floccosum</i> . (A) Cultura – filamentosa branca com reverso claro. (B) Microcultivo – apenas macroaleurias em forma de “raquete”	18
Figura 2. <i>Microsporum canis</i> . (A) Cultura – filamentosa branca com reverso amarelo gema de ovo. (B) Microcultivo – macroaleuria fusiforme, afilado nas pontas, com mais de seis septos, parede celular espessa.....	18
Figura 3. <i>Microsporum gypseum</i> . (A) Cultura – pulverulenta cor de canela. (B) Microcultivo – macroaleurias elipsoides com quatro a seis septos, parede celular delgada.....	19
Figura 4. <i>Trichophyton mentagrophytes</i> . (A) Cultura – pulverulenta branca. (B) Microcultivo – microaleurias abundantes e presença de hifas em espiral.....	19
Figura 5. Abelhas coletando exudados nas folhas de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (a) e elaborando própolis na colmeia (b e c).....	27
Figura 6. Coleta de exudados resinosos avermelhados de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> por abelhas africanizadas <i>Apis mellifera</i> . (A) exudado avermelhado a partir de um buraco em um ramo da árvore. (B) Abelha coletando os exudados avermelhados. (C) Os exudados recolhidos na perna traseira para fazer a própolis.....	29
CAPÍTULO 2	
Figura 1. Curva de inibição do crescimento dos dermatófitos isolados de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário Harmonia e Hospital Veterinário da UFRPE, em Recife-PE, em diferentes concentrações do extrato alcóolico de própolis vermelha brasileira.....	71

Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura dos isolados de *Microsporum canis* e *M. gypseum*, onde A, C, E e G são as micrografias controle sem própolis e B, D, F e H são as imagens tratadas com a concentração sub-inibitória do extrato alcoólico da própolis vermelha. *M. canis* 02 (A e B); *M. canis* 14 (C e D); *M. canis* 15 (E e F) e *M. gypseum* 31 (G e H)..... 72

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	Pág
Tabela 1. Classificação das própolis brasileiras.....	26
CAPÍTULO 1	
Tabela 1. Dermatófitos isolados de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário Harmonia e Hospital Veterinário da UFRPE, em Recife-PE.....	48
Tabela 2. Perfil enzimático dos dermatófitos isolados de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário Harmonia e Hospital Veterinário da UFRPE, em Recife-PE.....	49
CAPÍTULO 2	
Tabela 1. – Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato alcoólico da própolis vermelha e dos antifúngicos terbinafina e itraconazol frente a dermatófitos isolados de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário Harmonia e Hospital Veterinário da UFRPE, em Recife-PE.....	69
Tabela 2. Concentração fungicida mínima (CFM) do extrato alcoólico da própolis vermelha e dos antifúngicos terbinafina e itraconazol frente a dermatófitos isolados de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário Harmonia e Hospital Veterinário da UFRPE, em Recife-PE.....	69
Tabela 3. Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) do efeito combinado da própolis vermelha do nordeste brasileiro com o antifúngico terbinafina. Efeitos indiferente (I) e antagonista (A).....	70
Tabela 4. Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) do efeito combinado da própolis vermelha do nordeste brasileiro com o antifúngico itraconazol. Efeitos sinérgico (S), indiferente (I) e antagonista (A).....	70

1. INTRODUÇÃO

Os dermatófitos são fungos especializados que podem degradar e utilizar a queratina (BRASCH, 2010). Pertencem aos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* e são capazes de causar infecções na pele, pelos e unhas denominadas dermatofitoses (SIQUEIRA et al., 2009).

Os agentes etiológicos mais frequentemente isolados de animais domésticos com dermatofitoses são *Microsporum canis*, *M. gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Estas micoses são altamente contagiosas e zoonóticas sendo transmitidas por contato direto com lesões e indireto através de fômites contaminados (BRILHANTE et al., 2003; CABAÑES et al., 1997; CABAÑES, 2000; SEKER; DOGAN, 2011).

As infecções produzidas por dermatófitos são geralmente superficiais e afetam fundamentalmente o estrato córneo da pele e anexos, assim como a superfície das mucosas (DIEGO, 2011). Estas infecções são caracterizadas principalmente por alopecias multifocais e escamações (SEKER; DOGAN, 2011). O processo infeccioso começa pela aderência de propágulos fúngicos, seguida da formação de hifas que podem se espalhar dentro do tecido através da liberação de enzimas fúngicas que permitem-lhes degradar e utilizar queratina e outras proteínas, bem como lipídeos e DNA como fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre (BRASCH, 2010).

A secreção de uma ampla variedade de enzimas pelos dermatófitos, como proteases, lipases, collagenases e fosfatases, é um dos fatores mais importantes durante o processo infeccioso, pois possibilitam que esses patógenos se tornem invasivos. Dentre essa ampla variedade de enzimas secretadas pelos dermatófitos, as enzimas proteolíticas são as mais estudadas e a importância das proteases queratinolíticas para a patogenicidade está bem estabelecida (PERES, 2010).

O tratamento da dermatofitose em cães e gatos pode ser realizado por agentes antifúngicos de uso tópico e também por antifúngicos sistêmicos. Entretanto, o uso inadequado desses medicamentos pode falhar na eliminação do fungo ocasionando o crescimento das estirpes resistentes (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008; MORIELLO, 2004).

Alternativas naturais têm sido investigadas quanto à atividade biológica contra espécies de fungos dermatófitos (CAVALEIRO et al., 2011). Em particular, a própolis mostra potencial devido as suas propriedades terapêuticas e possíveis aplicações na indústria farmacêutica. Uma gama de atividades biológicas têm sido atribuídas a própolis, incluindo propriedades antifúngica, antibacteriana, antiviral, antiinflamatória, antiulcerativa, antitumoral, antioxidante, anestésica local, hepatoprotetora, imunoestimulatória, cicatrizante, entre outras (BANSKOTA et al., 1998; KOC et al., 2005; POSSAMAI et al., 2013).

A atividade antifúngica *in vitro* da própolis foi verificada em relação as espécies de *Candida* (DOTA et al., 2011; OTA et al., 2001; POSSAMAI et al., 2013; SAWAYA et al., 2002), amostras de *Cryptococcus neoformans* (FERNANDES et al., 2007), frente a *Malassezia pachydermatis* (CARDOSO et al., 2010) e leveduras causadoras de onicomicoses (LONGHINI et al., 2007), como também no crescimento de três espécies de dermatófitos: *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton tonsurans* e *T. violaceum* (GAVANJI et al., 2011).

A própolis vermelha do Brasil foi encontrada nos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, onde abelhas *Apis mellifera* foram observadas coletando material resinoso de caules de *Dalbergia ecastophyllum* (rabo-de-bugio). Já foi demonstrada atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis vermelha do Brasil, em relação ao *Staphylococcus aureus* (DAUGSCH et al., 2007) e frente a espécies de *Trichophyton* (SIQUEIRA et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi isolar dermatófitos de cães e gatos, avaliar o perfil enzimático, a atividade antifúngica do extrato alcoólico da própolis vermelha brasileira e o efeito combinado com os antifúngicos terbinafina e itraconazol frente às amostras de dermatófitos isoladas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dermatófitos

Os dermatófitos são fungos filamentosos, hialinos, septados, algumas vezes artrosporados (SIDRIM et al., 2004) que possuem duas propriedades importantes: são queratinolíticos e queratinofílicos (CHERMETTE et al., 2008). Isto significa que eles em seu estado saprobionte podem digerir a queratina *in vitro*, utilizando-a como

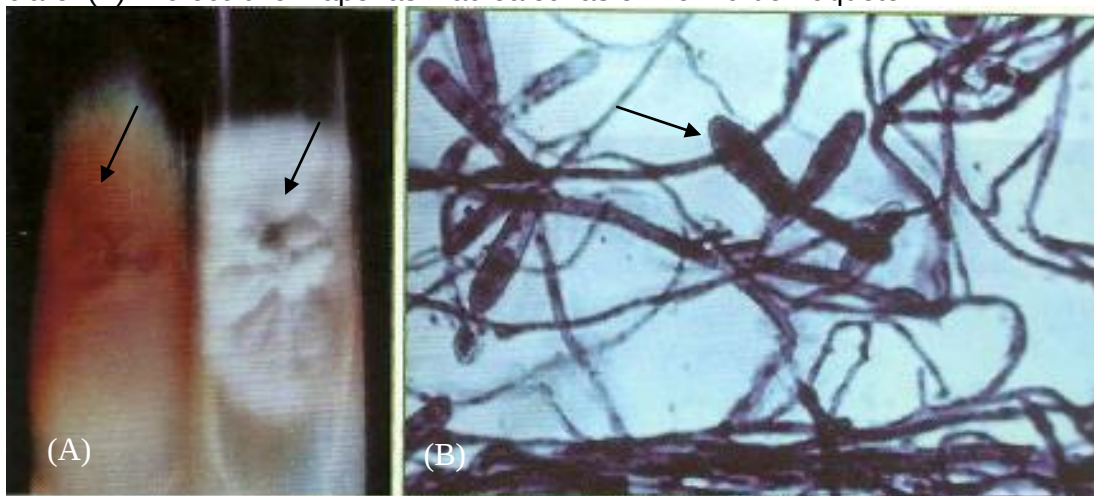
substrato, e também, invadir e colonizar os tecidos queratinizados de homens, outros animais domésticos e silvestres, causando, através de um processo infeccioso, uma micose superficial altamente contagiosa denominada dermatofitose (SIMPANYA, 2000).

Os dermatófitos podem ser classificados como imperfeitos ou anamórficos (reprodução assexuada) e perfeitos ou teleomórficos (reprodução sexuada). Os anamórficos (gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, totalizam aproximadamente 40 espécies) pertencem aos Hyphomycetes; e os teleomórficos são classificados no gênero *Arthroderma* que pertence ao filo Ascomycota (DIEGO, 2011).

A identificação é realizada segundo os critérios morfológicos (macro e microscópicos), bem como por várias propriedades fisiológicas. São avaliadas características como: a forma e textura da cultura em meio sólido, a cor, a difusão de pigmentos em ágar e a morfologia de esporos e hifas (NEJI, 2010). Além dos métodos convencionais podem ser utilizados métodos moleculares baseados na amplificação de ácidos nucleicos que oferecem resultados rápidos e confiáveis na identificação de dermatófitos (BIYIK et al., 2013).

O gênero *Epidermophyton*, descrito por Sabouraud em 1907, contém apenas duas espécies, contudo apenas *E. floccosum* é o patógeno humano. Possui apenas macroaleurias na forma de clava, septados por septos finos e superfície lisa, que podem ser observados agrupados lembrando uma “raquete” e não possui microaleurias. As colônias podem ser aveludadas, pulverulentas e de coloração branca com reverso claro (DIEGO, 2011; REBBEL; TAPLIN, 1979; SIDRIM et al., 2004; ZAITIS, 2010). A figura 1 mostra a morfologia macro e microscópica da espécie *E. floccosum*.

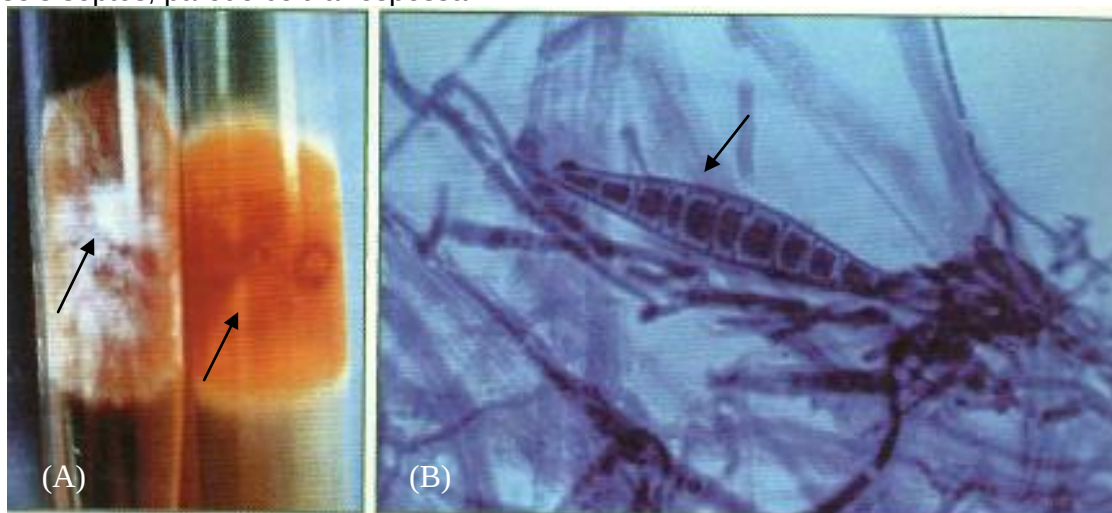
Figura 1 – *Epidermophyton floccosum*. (A) Cultura – filamentosa branca com reverso claro. (B) Microcultivo – apenas macroaleurias em forma de “raquete”.



Fonte: Zaits (2010).

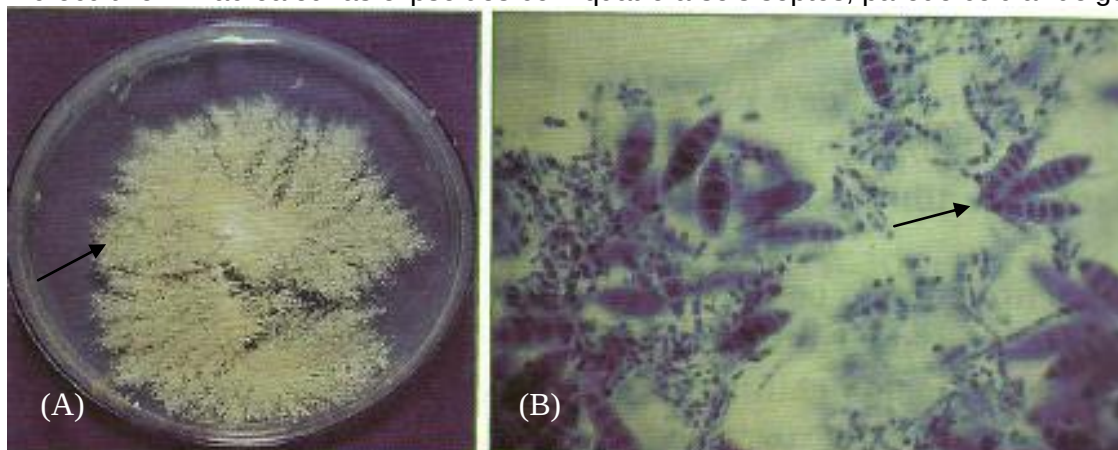
O gênero *Microsporum*, descrito por David Gruby em 1843, possui 20 espécies e sua morfologia microscópica caracteriza-se pela presença de esporos denominados macroaleurias, geralmente septados e na forma fusiforme, e estruturas menores e claviformes chamadas de microaleurias, ambos encontrados ao longo das hifas. Macroscopicamente, as espécies de *Microsporum* podem apresentar colônias algodonosas, terrosas, pulverulentas e produzem pigmentos amarelos-laranja (DIEGO, 2011; REBBEL; TAPLIN, 1979; SIDRIM et al., 2004; ZAITIS, 2010). A morfologia macro e microscópica das espécies *M. canis* e *M. gypseum* estão representadas nas figuras 2 e 3, respectivamente.

Figura 2 - *Microsporum canis*. (A) Cultura – filamentosa branca com reverso amarelo gema de ovo. (B) Microcultivo – macroaleuria fusiforme, afilado nas pontas, com mais de seis septos, parede celular espessa.



Fonte: Zaits (2010).

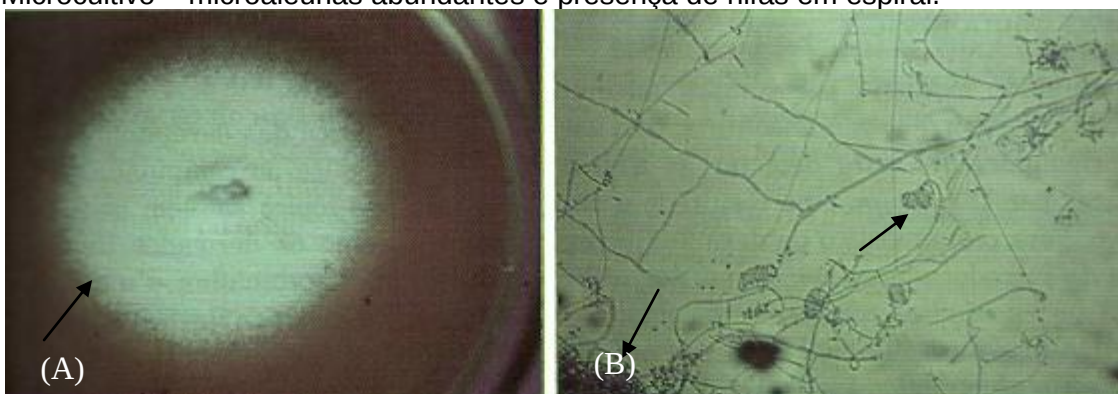
Figura 3 – *Microsporium gypseum*. (A) Cultura – pulverulenta cor de canela. (B) Microcultivo – macroaleurias elipsoides com quatro a seis septos, parede celular delgada.



Fonte: Zaits (2010).

Descrito por Malmsten em 1845, o gênero *Trichophyton* possui cerca de 30 espécies e apresenta inúmeras microaleurias de forma arredondada ou claviforme e dispostos nas hifas de maneira peculiar, associados a poucas macroaleurias e hifas espiraladas. A macroscopia deste gênero é bastante variável, de modo que as colônias podem ser algodonosas, pulverulentas, cerebriforme, aveludadas e etc. O reverso pode apresentar pigmentação avermelhada ou marrom (DIEGO, 2011; REBBEL; TAPLIN, 1979; SIDRIM et al., 2004; ZAITTS, 2010). As características macro e microscópica da espécie *T. mentagrophytes* podem ser visualizadas na Figura 4.

Figura 4 – *Trichophyton mentagrophytes*. (A) Cultura – pulverulenta branca. (B) Microcultivo – microaleurias abundantes e presença de hifas em espiral.



Fonte: Zaits (2010).

De acordo com o habitat natural, os dermatófitos podem ser classificados como zoofílicos, espécies que estão adaptadas a hospedeiros animais, mas ocasionalmente infectam seres humanos ou outras espécies animais em contato com o animal doente; geofílicos os que utilizam a queratina de detritos encontrados no solo e por vezes afetam homens e animais; e os antropofílicos que mantêm estreita relação com humanos, raramente transmitidos para outros animais (BOND, 2010).

O contágio pode ser feito por contato direto com seres humanos, animais e solo contaminado ou através do contato indireto por exposição à fomites contaminados (ZAITZ, 2010). O processo infeccioso da dermatofitose inicia-se pela aderência do patógeno através da germinação do artrósporo e penetração da hifa no estrato córneo. A interação inicial deste com o estrato córneo ocorre após 3 a 4 horas de contato (PERES et al., 2010). Após este período, os dermatófitos precisam obter nutrientes para seu desenvolvimento e sobrevivência, através da degradação de macromoléculas presentes no tecido hospedeiro como fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre. A quebra das macromoléculas é feita por enzimas hidrolíticas como proteases, lipases, fosfolipases, collagenases, elastases e esterases. Essa variedade enzimática é um dos fatores mais importantes durante o processo infeccioso e pode definir a virulência dos dermatófitos (PEREZ et al., 2010). O perfil enzimático pode variar de acordo com a espécie de dermatófito e provavelmente está relacionado ao aspecto ecológico (antropofílico, zoofílico e geofílico) devido à adequação nutricional envolvida no processo evolutivo (do solo para o homem e outros animais) (MUHSIN; SALIH, 2000).

2.2 Dermatofitoses em cães e gatos

Os animais podem ser infectados por uma grande variedade de dermatófitos, principalmente por espécies zoofílicas, mas também geofílicas, e excepcionalmente por dermatófitos antropofílicos (CHERMETTE et al., 2008). Por manterem contato direto com o homem, principalmente crianças, os animais domésticos, em especial cães e gatos, desempenham um papel importante na disseminação dos dermatófitos por se tratarem de uma fonte primária e direta de infecção (BETANCOURT et al., 2009). A transmissão pode ocorrer por contato direto do esporo com o hospedeiro susceptível (MORIELLO, 2004) e pode ser facilitada pela existência de ferimentos.

Cerca de 30 espécies de dermatófitos podem causar infecções em mamíferos e aves, contudo apenas poucas espécies são rotineiramente isoladas (BOND, 2010). Estudos epidemiológicos relativos à ocorrência de dermatófitos em cães e gatos têm sido reportados por diversos autores (COELHO et al., 2008; LÓPEZ et al., 2012; PRADO et al., 2008; SEKER; DOGAN, 2011) com taxas de isolamento entre 13-20%. Segundo Cabañes (2000) os percentuais de isolados destes fungos variam entre 4 e 20%. As espécies comumente isoladas de cães e gatos são: *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*, sendo *M. canis* a espécie mais frequentemente isolada (COELHO et al., 2008; LÓPEZ et al., 2012), pois esta espécie possui boa adaptação à pele e pelos de cães e gatos parasitando até mesmo animais assintomáticos (BETANCOURT et al., 2009; LÓPEZ et al., 2012).

A doença ocorre mais comumente em animais jovens, velhos e imunodeprimidos (MORIELLO, 2004). Seker e Dogan (2011), num trabalho de isolamento de dermatófitos de cães e gatos com suspeita de dermatofitose no oeste da Turquia, relataram que o único fator de risco significativamente associado à infecção foi a idade, mostrando uma prevalência de dermatofitose no grupo de cães e gatos com menos de um ano de idade. Contudo, López et al. (2012) trabalharam com amostras de gatos e não encontrou diferenças significativas em relação às categorias estudadas (idade, sexo, raça e procedência).

A dermatofitose em cães e gatos é primariamente uma doença folicular e os sinais clínicos são reflexos de danos no folículo piloso e consequente inflamação. Estes sinais são muito variáveis, com diferentes combinações de prurido, perda de pelos, descamação, formação de crostas (MORIELLO, 2004). A sua apresentação geral é alopecia regular e circular, com margem eritematosa e fina descamação, podendo apresentar-se como lesão única ou múltiplas lesões localizadas em qualquer parte do corpo do animal, embora a cabeça e membros sejam as partes mais afetadas; o prurido é geralmente ausente (CHERMETTE et al., 2008). Os gatos também podem desenvolver lesões granulomatosas (kerions, micetomas, pseudomicetomas) dos tecidos da pele e subcutâneos (MORIELLO, 2004).

O diagnóstico da dermatofitose em pequenos animais não deve ser realizado apenas com base nos sinais clínicos, pois se corre o risco de diagnosticar como dermatofitose outras enfermidades dérmicas com características clínicas semelhantes, diagnosticando-se um falso-positivo (BETANCOURT et al., 2009). Por

isso, o diagnóstico pode ser feito por exames complementares: exame com Lâmpada de Wood; exame direto através da visualização microscópica dos pelos; crescimento do fungo em cultura e exames histopatológicos (MORIELLO, 2001).

A técnica da Lâmpada de Wood e o exame direto são testes rápidos e baratos, contudo, não são conclusivos, pois apenas pelos infectados com *M. canis* emitem fluorescência esverdeada, e para realização do exame direto é primordial a experiência do manipulador da amostra na visualização e interpretação do resultado. A cultura micológica continua sendo o método mais confiável, pois permite o isolamento e a identificação do patógeno. O exame histológico pode ser útil no caso de apresentações clínicas não usuais (CHERMETTE et al., 2008).

2.2.1 Antifúngicos utilizados para tratamentos de dermatofitoses em cães e gatos

A resposta imune do hospedeiro pode ser suficiente para controlar a propagação das lesões causadas por dermatófitos, pois a dermatofitose é considerada como doença auto-limitante em animais imunocompetentes. No entanto, o tratamento da dermatofitose é recomendado a fim de encurtar o curso da infecção e reduzir a disseminação de artrósporos que servirão como fonte de contaminação para o homem, outros animais e ao ambiente (CHERMETTE et al., 2008).

O protocolo de tratamento ideal para cães ou gatos com dermatofitose envolve uma combinação de corte de pelos, terapia tópica e terapia sistêmica concomitante, como também descontaminação ambiental (MORIELLO, 2004). O corte dos pelos pode ser útil, desde que seja realizado em um ambiente adequado, posteriormente higienizado, e os pelos removidos destruídos para evitar a contaminação do ambiente. Se as lesões forem generalizadas, o corte deve ser realizado em uma área limitada para evitar o agravamento das lesões (CARLOTTI, 2008). Antifúngicos de uso tópico são indicados em casos de lesões pequenas e localizadas, enquanto que os sistêmicos são utilizados no tratamento de lesões extensas e disseminadas (FEEDBERG et al., 2003; KARACA; KOÇ, 2004). A desinfecção ambiental e a separação de animais infectados de animais não infectados também são necessárias (CHERMETTE et al., 2008). O ponto final de

tratamento é considerado após duas ou três culturas micológicas negativas consecutivas (MORIELLO, 2004).

Os agentes antifúngicos mais eficazes utilizados na terapia tópica são a calda sulfocálcica, o enilconazol, o miconazol sozinho e em combinação com clorexidina, com duas aplicações por semana. Na terapia sistêmica são recomendados como eficazes: griseofulvina, itraconazol e terbinafina. Devido aos efeitos colaterais, a griseofulvina vem sendo substituída pelo itraconazol e a terbinafina (MORIELLO, 2004).

A griseofulvina é um antifúngico com função fungistática sobre dermatófitos que age inibindo a síntese do ácido nucleico e a metáfase da mitose celular, através da interferência na função dos microtúbulos, destruindo o fuso mitótico necessário para a divisão celular (HECTOR, 2005; MORIELLO, 2004). Os efeitos colaterais podem ser perturbações gastrointestinais e alterações teratogênicas, não sendo indicada para animais em reprodução (NOBRE et al., 2002).

O itraconazol é derivado do triazol que tem função na alteração da permeabilidade da membrana celular do fungo, através da inibição da síntese do ergosterol. Possui ação fungistática e fungicida. (MORIELLO, 2004). Efeitos colaterais gastrointestinais podem ser observados na terapia com itraconazol (KELLER, 2011).

A terbinafina é um antifúngico químico, do grupo das alilaminas, que inibe a ação da esqualeno epoxidase, enzima importante no processo de formação do ergosterol na membrana fúngica, causando a morte celular. Apresenta ação fungicida em dermatófitos (MORIELLO, 2004). Balda et al. (2007) avaliaram a possibilidade de adotar a terbinafina como alternativa no tratamento de cães e gatos com dermatofitose e concluíram que a terbinafina é uma droga eficaz e relativamente segura quando utilizada na dose de 5mg/kg, pois a mesma não apresentou qualquer manifestação sintomática. A dose de 20mg/kg desencadeou quadro gastroentérico em dois animais (um cão e um gato) num grupo de 12 animais.

Além dos efeitos colaterais causados em cães e gatos pela ação dos antifúngicos químicos, existe a possibilidade de resistência dos dermatófitos aos antifúngicos convencionalmente utilizados. A resistência clínica de micro-organismos é definida como a persistência ou a progressão de uma infecção, apesar da terapia antimicrobiana apropriada e pode está correlacionada com o uso inadequado do

antifúngico, pois muitas vezes o tratamento é abandonado ainda em curso. O uso inadequado dos antifúngicos pode falhar na eliminação do agente causador da doença, estimulando o crescimento das estirpes mais resistentes, dificultando o tratamento das infecções fúngicas (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008).

Os mecanismos de resistência dos dermatófitos aos antifúngicos envolvem modificadores de enzimas alvo, superexpressão de transportadores ABC (ATP *binding cassette*) e proteínas relacionadas ao estresse celular, causado pela droga antifúngica, que permite a superação dos efeitos tóxicos e a sobrevivência do fungo (PERES et al., 2010). Os efeitos adversos causados pelas drogas nos animais e o desenvolvimento da resistência dos dermatófitos aos agentes inibidores motivam a busca e o desenvolvimento de novos medicamentos. Os produtos naturais, como a própolis, estão sendo estudados como alternativa de controle para a dermatofitose (AGUERO et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2009).

2.3 Própolis

2.3.1 Características

A palavra própolis vem do grego *pro-* (em defesa) e *polis-* (cidade ou comunidade), o que significa “em defesa da cidade ou comunidade” (PEREIRA et al., 2002). É utilizada pelas abelhas da colmeia contra a proliferação de microrganismos, como fungos e bactérias além de possíveis invasores, garantindo a higiene sanitária e a sobrevivência na colmeia (SILVA et al., 2006). A importância da própolis para o homem abrange diversas áreas: na medicina veterinária (cicatrização de feridas, cortes pós-operatórios, combate a hemorragias, tratamento de mastites), na agricultura como tratamento alternativo de doenças de plantas, na indústria de cosméticos (shampoos, sabonetes, cremes de beleza e creme dental) além da indústria alimentícia (chicletes, bombons, pastilhas) (COSTA; OLIVEIRA, 2005).

A própolis é uma substância complexa formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas a partir de diversas partes jovens das plantas como ramos, flores, pólen, brotos e também exudados de árvores, adicionado de enzimas e secreções salivares das abelhas (PEREIRA et al., 2002). A coloração da própolis é bastante variável e depende de sua procedência, ou seja, da sua origem botânica, podendo se apresentar nas tonalidades marrom escuro, esverdeada e marrom avermelhada (LUSTOSA et al., 2008). O sabor é de suave balsâmico a forte,

amargo e picante e a consistência variando de maleável a ligeiramente rígida, à temperatura ambiente, e rígida em temperaturas abaixo de 20°C (PINTO et al., 2001).

O uso da própolis já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. Trata-se de um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade. Foi utilizada no Egito antigo como um dos materiais para embalsamar os mortos. Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, e também na segunda guerra mundial, foi bastante utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes (PEREIRA et al., 2002).

2.3.2 Composição química

A própolis é composta basicamente de cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelhas, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5 % de detritos de madeira e terra; são conhecidos mais de 200 compostos que incluem flavonoides (galangina, quercetina, pinocembrina e canferol), ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos, cetonas, terpenóides e fenilpropanóides (ácidos caféico e clorogênico), esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, além de diversos minerais (BANKOVA et al., 2000; LUSTOSA et al., 2008; MENEZES, 2005; WIESE, 2005).

A composição química da própolis é considerada similar a dos exudados de brotos das plantas visitadas pelas abelhas, portanto determinada pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia (SILVA et al., 2005; MENEZES, 2005).

Na Europa e América do Norte, a principal fonte botânica para elaboração da própolis é o botão do álamo *Populus* sp., na América do Sul, esta espécie não é nativa, existindo uma grande diversidade vegetal para retirada da resina, contudo, a espécie *P. alba* foi comprovada, segundo perfis fitoquímicos comparativos, ser a origem botânica de própolis originárias do sul do Brasil, da Argentina e do Uruguai. Mesmo não sendo nativa dos trópicos, esta espécie vegetal pode existir em regiões com clima ameno, despertando a preferência das abelhas em retirarem resinas deste vegetal para elaboração da própolis (PARK et al., 2002).

No Brasil, poucas espécies são identificadas como fontes para a elaboração da própolis, sendo o assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.), a aroeira (*Schinus*

terebinthifolius Raddi), o alecrim (*Baccharis dracunculifolia*), o eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e o rabo-de-bugio (*Dalbergia ecastophyllum*) algumas das espécies vegetais utilizadas pelas abelhas como fonte de matéria-prima (PARK et al., 2000). Levando-se em consideração essa variabilidade de ecossistemas, Park et al. (2000) classificaram amostras de própolis coletadas de todas as regiões do Brasil (com exceção da região norte) através de métodos físico-químicos e analisaram algumas propriedades biológicas. As amostras foram analisadas: quanto à aparência e coloração dos extratos; e classificadas em 12 grupos de própolis (Tabela 1). Os autores sugeriram que a maior diversidade de própolis, nas regiões sul e nordeste, reflete a variabilidade da flora destas regiões.

Tabela 1 – Classificação das própolis brasileiras

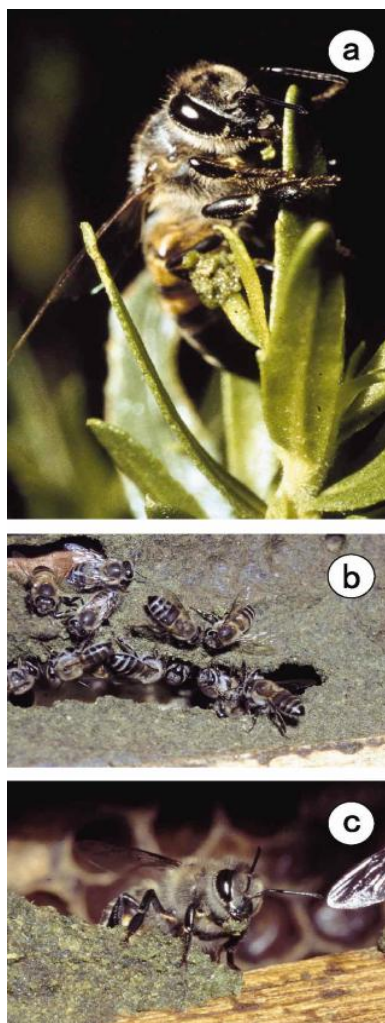
Grupos	Origem	Cor
Grupo 01	Região Sul (RS)	Amarelo
Grupo 02	Região Sul (RS)	Castanho claro
Grupo 03	Região Sul (PR)	Castanho escuro
Grupo 04	Região Sul (PR)	Castanho claro
Grupo 05	Região Sul (PR)	Marrom esverdeado
Grupo 06	Região Nordeste (BA)	Marrom avermelhado
Grupo 07	Região Nordeste (BA)	Marrom esverdeado
Grupo 08	Região Nordeste (PE)	Castanho escuro
Grupo 09	Região Nordeste (PE)	Amarelo
Grupo 10	Região Nordeste (CE)	Amarelo escuro
Grupo 11	Região Nordeste (PI)	Amarelo
Grupo 12	Região Sudeste (SP)	Verde ou marrom esverdeado
Grupo 13*	Região Nordeste (BA, AL, PB)	Vermelho

FONTE: PARK et al. (2000); *(DAUGSCH et al., 2007)

A própolis brasileira mais estudada é a de cor verde (Figura 5), a qual possui aroma suave, textura consistente, sua fonte botânica predominante é o alecrim (*Baccharis dracunculifolia*) e é elaborada por abelhas *Apis mellifera* (LIMA, 2006). Vários estudos relataram para própolis verde propriedades como anti-inflamatória (MACHADO et al., 2012; REIS et al., 2000), antimutagênica (TAVARES et al., 2006), antifúngica (JORGE et al., 2008), imunomodulatória (MACHADO et al., 2012; ORSATTI et al., 2010) e antioxidante (ROCHA et al., 2012).

A própolis vermelha do Brasil foi descoberta ao longo do mar e costas de rios de estados do nordeste brasileiro (Pernambuco-PE, Paraíba-PB, Alagoas-AL, Bahia-BA e Sergipe-SE), foi inserida no grupo 13 das própolis brasileiras e vem despertando o interesse de pesquisadores e da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos medicamentos (DAUGSCH et al., 2007).

Figura 5 – Abelhas coletando exudados nas folhas de *Baccharis dracunculifolia* (a) e elaborando própolis na colmeia (b e c).



Fonte: KUMAZAWA et al. (2003)

2.3.3 Própolis vermelha brasileira

2.3.3.1 Fonte botânica e composição química

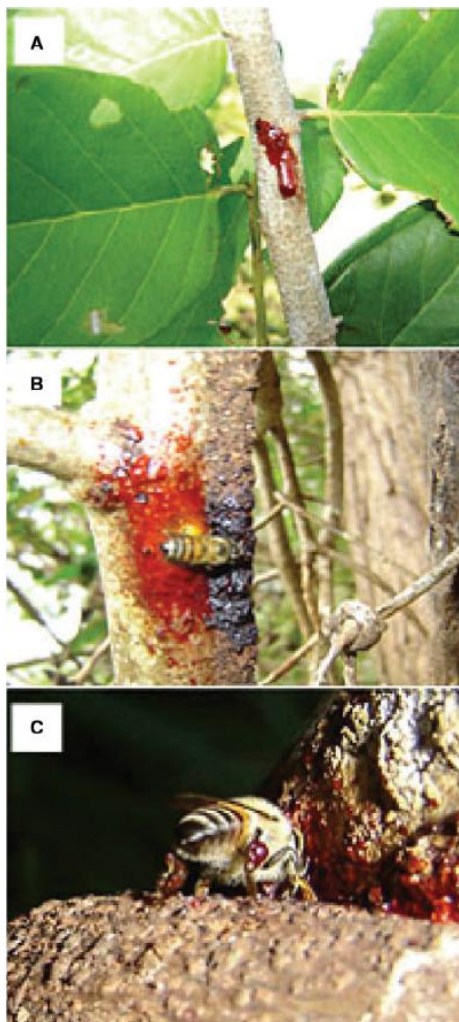
A própolis vermelha foi encontrada em colmeias localizadas ao longo do mar e costas de rios no nordeste brasileiro. Este novo tipo de própolis foi classificado no grupo 13 das própolis brasileiras. As abelhas *Apis mellifera* foram observadas

coletando o exudado vermelho da superfície de *Dalbergia ecastophyllum*, conhecida como rabo-de-bugio (Figura 6) (DAUGSCH et al., 2007).

A análise comparativa da própolis vermelha com as amostras de exudados da planta mostrou que o perfil cromatográfico da própolis era exatamente o mesmo da *D. ecastophyllum*, sendo esta planta considerada a fonte botânica da própolis vermelha. Os flavonóides identificados tanto na própolis vermelha quanto em *D. ecastophyllum* foram: rutina, liquiritigenina, daidzeína, pinobanksina, quercetina, luteolina, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina, pinocembrina, pinobanksina-3-acetato e biochanina A (DAUGSCH et al., 2007). Contudo, este tipo de própolis, também, foi identificado em Cuba e na Venezuela onde as origens botânicas foram, respectivamente, como *Clusia nemorosa* e *C. scrobiculata* (TRUSHEVA et al., 2006).

A própolis vermelha possui composição química distinta da própolis verde e de outros tipos estudados até então; 14 compostos já foram identificados, entre eles compostos fenólicos simples, triterpenoides, isoflavonoides, benzofenonas preniladas e um epóxido de naftoquinona (isolado pela primeira vez a partir de uma fonte natural) (TRUSHEVA et al., 2006). A partir do fracionamento da própolis vermelha brasileira, foram isolados dois isoflavonoides bioativos (vestitol e neovestitol) e uma chalcona (isoliquiritigenina), compostos nunca antes relatados nos 12 tipos de própolis do Brasil. Os isoflavonoides são metabólitos secundários de plantas com múltiplas propriedades biológicas e farmacológicas, como antioxidante, antibacteriana, antiviral e anti-inflamatória (OLDONI et al., 2011). Silva et al. (2008) identificaram quercetina, crisina, medicarpin e ácido felúrico na própolis vermelha de Alagoas. A composição química da própolis vermelha do Brasil é considerada semelhante a da própolis vermelha de Cuba, embora alguns compostos tenham sido observados somente na própolis vermelha brasileira, como as benzofenonas preniladas (PICCINELLI et al., 2011).

Figura 6 - Coleta de exudados resinosos avermelhados de *Dalbergia ecastophyllum* por abelhas africanizadas *Apis mellifera*. (A) exudado avermelhado a partir de um buraco em um ramo da árvore. (B) Abelha coletando os exudados avermelhados. (C) Os exudados recolhidos na perna traseira para fazer a própolis.



Fonte: DAUGSCH et al., 2007

2.3.4 Atividades biológicas

Diversos trabalhos relatam inúmeras aplicações da própolis e demonstram o seu potencial para atividades biológicas como antimicrobiana (CARDOSO et al., 2010; CHOUDHARI et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2003; FERNANDEZ JÚNIOR et al., 2006; MARGHITAS et al., 2010; MENDONÇA et al., 2011; SILVA et al., 2006), antibacteriana (ARAÚJO; MARCUCCI, 2011; CABRAL et al., 2009; CASTRO et al., 2007; DIAS; PEREIRA; ESTEVINHO, 2012; MIHAI et al., 2012;), antifúngica (DOTA et al., 2011; FERNANDES et al., 2007; GAVANJI et al., 2011; LONGHINI et al., 2007;

NGATU et al., 2011; SILICI et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2009; YANG et al., 2011), antiparasitária (GRESSLER et al., 2012), antioxidante (CABRAL et al., 2009; FROZZA et al., 2013), anti-inflamatória e imunomodulatória (MACHADO et al., 2012; SILVA et al., 2012) entre outras.

O potencial biológico pode ser relacionado ao sinergismo que ocorre entre os muitos constituintes da própolis (MARCUCCI et al., 1996). Os flavonoides, juntamente com alguns ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos, alcoóis e cetonas, têm sido relatados como os responsáveis pelos efeitos terapêuticos da própolis (PARK et al., 2005).

POPOVA et al. (2009) isolaram terpenos, diterpenos e triterpenos da própolis de Creta e constataram a atividade antifúngica destes compostos frente às leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (ATCC 13801) e *Candida glabrata* (ATCC 28838). O ácido caféico, presente no extrato de própolis, além da atividade antimicrobiana apresenta atividade antiprotzoal (KARTAL et al., 2003). GRESSLER et al. (2012) consideraram o ácido caféico o responsável pela atividade tripanocida do extrato de própolis quando avaliada frente a *Trypanosoma evansi*.

Dentre as atividades atribuídas à própolis, a antimicrobiana é a mais estudada, com maior destaque para a antibacteriana, contudo, a antifúngica também tem despertado interesse devido à importância médica das infecções fúngicas. Os flavonoides, ácidos fenólicos e flavonas tais como a galangina e a quercetina são os responsáveis pela atividade antifúngica. A ação da quercetina tem sido atribuída à inibição da síntese proteica, síntese de DNA, da função da membrana plasmática do fungo e também na produção de toxina (BURDOCK, 1998).

A atividade antifúngica da própolis foi relatada frente a dermatófitos. Agüero et al. (2011) observaram o efeito antifúngico da própolis da Argentina frente a *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*. Gavanji et al. (2011) avaliaram o efeito do extrato alcoólico da própolis no crescimento das espécies *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton tonsurans* e *T. violaceum*.

Da mesma forma, trabalhos de atividade antifúngica para outros fungos não dermatófitos são citados pela literatura. LONGHINI et al. (2007) relataram atividade da própolis frente as leveduras causadoras de onicomicoses. Cardoso et al. (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de própolis frente a *Malassezia pachydermatis*, isolados de cães com otites. Assim como, DOTA et al.

(2011), relataram a atividade antifúngica do extrato alcoólico da própolis e também de micropartículas, obtidas a partir deste, frente a leveduras e concluíram que as micropartículas do extrato de própolis possuem potencial para o tratamento e prevenção de candidíases vulvovaginais. Fernandes et al. (2007) observou ação antifúngica (fungistática e fungicida) do extrato alcoólico da própolis brasileira, pertencente ao grupo 12, frente a *Cryptococcus neoformans*. Os produtos naturais consistem de fontes promissoras para a descoberta de novos produtos farmacêuticos. Trabalhos publicados, a cerca da composição química e propriedades biológicas da própolis, revelam o interesse neste produto para o desenvolvimento de novos medicamentos (CABRAL et al., 2009; SFORCIN; BANKOVA, 2011).

Várias atividades biológicas já foram atribuídas à própolis vermelha: antibacteriana (CABRAL et al., 2009; RIGHI et al., 2011; TRUSHEVA et al., 2006), antifúngica (SIQUEIRA et al., 2009), antioxidante (CABRAL et al., 2009; RIGHI et al., 2011; TRUSHEVA et al., 2006), antitumoral (ALENCAR et al., 2007; LI et al., 2008), antiprotozoária (AYRES et al., 2007) entre outras.

A atividade antimicrobiana da própolis vermelha brasileira foi estudada frente a diversos micro-organismos como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (TRUSHEVA et al., 2006); *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, e *Actinomyces naeslundii* (OLDONI et al., 2011); *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus mutans* UA 159 (ALENCAR et al., 2007); *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CABRAL et al., 2009) e a atividade antifúngica dos extratos aquosos e alcoólicos das própolis verde e vermelha brasileiras foi avaliada frente a espécies de *Trichophyton* que se demonstraram sensíveis aos extratos alcoólicos de ambas, contudo, o extrato alcoólico da própolis vermelha foi considerado mais eficiente (SIQUEIRA et al., 2009).

Ainda são poucos os trabalhos realizados acerca do potencial biológico da própolis vermelha do Brasil, principalmente comparando-se com a própolis verde brasileira, amplamente estudada e divulgada.

2.3.5 Associação da própolis vermelha com drogas antifúngicas

A associação entre antifúngicos sintéticos e produtos naturais pode ampliar os espectros de ação e a eficácia de cada droga permitindo a utilização de concentrações menores de cada droga (CUENCA-ESTRELLA, 2004).

A própolis pode apresentar efeitos sinérgicos com drogas antimicrobianas e sua associação a medicamentos comercialmente disponíveis é um campo de interesse para o desenvolvimento de novos produtos pela indústria farmacêutica (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

A atividade sinérgica entre ciprofloxacina e própolis foi verificada no tratamento de *Staphylococcus aureus* (OKSUZ et al., 2005). Orsi et al. (2006) observaram que a própolis diminuiu a resistência da parede das bactérias aos antibióticos (amoxicilina, ampicilina e cefalexina). Araújo e Marcucci (2011) relataram o efeito sinérgico da associação da própolis vermelha com o antibiótico vancomicina frente a *Enterococcus faecalis*. Esses trabalhos relatam a ação sinérgica da própolis com antimicrobianos comerciais, que pode ser considerada uma alternativa terapêutica para a resistência microbiana. Contudo, ainda são escassos trabalhos relacionando o efeito da associação da própolis vermelha a antifúngicos comerciais.

3. Objetivos

3.1 Geral:

Isolar dermatófitos de cães e gatos e avaliar a atividade antifúngica do extrato alcoólico da própolis vermelha brasileira sozinho e em combinação com os antifúngicos terbinafina e itraconazol frente aos isolados.

3.2 Específicos:

- Isolar dermatófitos de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE e no Hospital Veterinário Harmonia, na cidade de Recife-PE;
- Avaliar o perfil enzimático dos dermatófitos isolados;
- Avaliar a atividade antifúngica da própolis vermelha do nordeste brasileiro frente aos dermatófitos isolados;
- Verificar o efeito da própolis vermelha do nordeste brasileiro sobre a morfologia das hifas dos dermatófitos isolados;
- Verificar o efeito combinado da própolis vermelha com os antifúngicos terbinafina e itraconazol.

REFERÊNCIAS

- AGÜERO, M. B., et al. Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC-MS and GC-MS characterization and antifungal activity. **Food and chemical toxicology**, v. 49, p. 1970–1978, 2011.
- ALENCAR, S. M., et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**. v.113, p. 278–283, 2007.
- ARAÚJO, K. C. DOS S.; MARCUCCI, M. C. Efeito sinérgico da própolis tipificada contra *Enterococcus faecalis*. **Revista Pesquisa Inovação Farmacêutica** v. 3, p. 9-14, 2011.
- AYRES, D.C.; MARCUCCI, M.C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 215–220, 2007.
- BALDA, A.C.; OTSUKA, M.; LARSSON, C.E. Ensaio clínico da griseofulvina e da terbinafina na terapia das dermatofitoses em cães e gatos, **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.750-754, 2007.
- BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3–15, 2000.
- BANSKOTA, A.H. et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 7, p. 896-900, 1998.
- BETANCOURT, O., et al. *Microsporum canis* on dermatologically healthy cats in Temuco city, Chile. **Revista iberoamericana de micología**, v. 26, p. 206–210, 2009.
- BOND, R. Superficial veterinary mycoses. **Clinics in dermatology**, v. 28, p. 226–236, 2010.
- BRASCH, J. Pathogenesis of tinea. **Journal of the German Society of Dermatology**, v.8, p. 780-786, 2010.
- BRILHANTE, R.S. et al. High rate of *Microsporum canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: epidemiological and diagnostic features. **Mycopathologia**, v. 156, n. 4, p. 303-308. 2003.
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347–363, 1998.
- CABAÑES, F.J. Dermatophytes in domestic animals. Revista Iberoamericana de Micología. In: Kushwaha RKS, Guarro J (Eds.). Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, 2000.

CABAÑES, F.J. Identificación de hongos dermatofitos. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2001.

CABAÑES, F.J. et al. Dermatophytes isolated from domestic animals in Barcelona, Spain. **Mycopathologia**, v. 137, p. 107-113, 1997.

CABRAL, I.S.R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, p. 1523–1527, 2009.

CARDOSO, R.L., et al. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 432–434, 2010.

CARLOTTI, D.-N. Le traitement des dermatophytoses du chien et du chat. Gestion de la teigne en chatterie. **Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, v. 43, p. 1–13, 2008.

CASTRO, M. L., et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica, **Química Nova**, v. 30, p. 1512–1516, 2007.

CAVALEIRO, C. et al. Composition of a volatile extract of *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum* (M. Laínz) M. Laínz, signalised by the antifungal activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 619–622, 2011.

CHERMETTE, R.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Dermatophytoses in animals. **Mycopathologia**, v. 166, p. 385–405, 2008.

CHOUDHARI, M.K., et al., Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India. **Journal of Ethnopharmacology**. doi:10.1016/j.jep.2012.02.047, 2012.

COELHO, A. C.; ALEGRIA, N.; RODRIGUES, J. Isolamento de dermatófitos em animais domésticos em Vila Real, Portugal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.4, p. 1017-1020, 2008.

COSTA, P. S. C.; OLIVEIRA, J. S. **Manual prático de criação de abelhas**. Viçosa: Aprenda Fácil. 424p. 2005.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian Red Propolis – Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-7, 2007.

DIAS, L. G.; PEREIRA, A. P.; ESTEVINHO, L. M. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. **Food and chemical toxicology**, v. 50, p. 4246–4253, 2012.

DIEGO, A. M. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 29, p.33-39, 2011.

DOS SANTOS, C. R. et al. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 71-74, 2003.

DOTA K. F. et al. Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, doi:10.1093/ecam/nej029, 2011.

FERNANDES, F.F. et al. The *in vitro* antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.49, n. 2, p. 93-95, 2007.

FERNADES JÚNIOR, A. et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.1, 2006.

FROZZA, C. O. D. S. et al. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and chemical toxicology**, v. 52, p. 137–142. 2013.

GAVANJI, S., et al. Antifungal effect of the extract of propolis on the growth of three species of *Epidermophyton flucosum*, *Trichophyton violaceum* and *Trichophyton tonsorans* in laboratory environment. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 2642–2646, 2011.

GRESSLER, L. T., et al. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract *in vitro* and in experimentally infected rats. **Research in veterinary science**, v. 93, p. 1314–1317, 2012.

HECTOR, R. F. An Overview of Antifungal Drugs and Their Use for Treatment of Deep and Superficial Mycoses in Animals, **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 20, p. 240-249, 2005.

KARTAL, M., et al. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 69–73, 2003.

KELLER, K. A. Itraconazole. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 20, p. 156–160, 2011.

KOC, A.N. et al. Comparison of *in vitro* activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. **Mycoses**, v. 48, n. 3, p. 205-210, 2005.

KUMAZAWA, S. et al. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 740–742, 2003.

LI, F. et al. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5434–5440, 2008.

LONGHINI, R. et al. 2007. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 388-395, 2007.

LÓPEZ, M. F. et al. Frequency of dermatophytes in a sample of cats in the urban area of Gran Mendoza, Argentina. **Revista iberoamericana de micología**, v. 29, p. 238–240, 2012.

LUSTOSA, S.R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 447– 454, 2008.

MACHADO, J. L. et al. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, doi:10.1155/2012/157652, 2012.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, p. 529-536, 1996.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N.T.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**. v. 166, n. 5-6, p. 369-83, 2008.

MARGHITAS L. A. et al. The study of the antimicrobial activity of Transylvanian (Romanian) propolis. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, vol. 38, n. 3, p. 40–44, 2010.

MENDONÇA, L. S.; ORELLANA, S. C.; CARDOSO, J. C. Influência da coloração de frações cromatográficas na atividade antimicrobiana de própolis vermelha, **Scientia Plena**, v. 7, p. 1–6, 2011.

MENEZES H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 72, p.405-411, 2005.

MIHAI, C. M., et al.(2012). Interactions among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 110, p. 68–72, 2012.

MORIELLO, K. A. (2001). Diagnostic techniques for dermatophytosis. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 16, p. 219–224, 2001.

MORIELLO, K. A. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. **Veterinary Dermatology**, v.15, n. 2, p. 99-107, 2004.

MUHSIN, T.M.; SALIH, T.H. Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi isolated from ruminants in Southern Iraq. **Mycopathologia**, v. 150, n. 2, p. 49-52, 2000.

NEJI, S., et al. Molecular identification of dermatophytes isolated in Sfax-Tunisia. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 20, p. 85–90, 2010.

NGATU, N. R. et al. Antifungal efficacy of Brazilian green propolis extracts and honey on *Tinea capitis* and *Tinea versicolor*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 3, p. 281–287, 2011.

NOBRE, M. de O. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 175-184, 2002.

OKSUZ, H. et al. Effect of propolis in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* keratitis in rabbits. **Ophtalmic Research**, v. 37, p. 328–334, 2005.

OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, p. 208–213, 2011.

ORSI, R.O. et al. Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella typhi*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p. 108-112, 2006.

OTA, C. et al. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. **Mycoses**, v. 44, p. 375-378, 2001.

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

PARK, Y.K., ALENCAR, S.M., AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 2502–2506, 2002.

PARK, Y. K. et al. Suppressive effects of ethanolic extracts from propolis and its main botanical origin on dioxin toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 10306-10309, 2005.

PERES, N.T.A. et al. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v.85(5), p.657-667, 2010.

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

PICCINELLI, A.L., et al 2011. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6484–6491, 2011.

PINTO, M. S. et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.

POPOVA, M. P., et al (2009). Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1262–1271, 2009.

POSSAMAI, M. M., et al. Brazilian Propolis : A Natural Product That Improved the Fungicidal Activity by Blood Phagocytes, **BioMed Research International**, <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/541018>>, 2013.

PRADO, M. R. et al. Frequency of yeasts and dermatophytes from healthy and diseased dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 2, p. 197-202, 2008.

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

SANTOS, V.R. et al. Oral candidiasis treatment with brazilian ethanol propolis extract. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 7, p. 652–654, 2005.

SAWAYA, A.C.H.F. et al. Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 203–207, 2002.

SCAZZOCCHIO F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v. 4, p. 327-333, 2005.

SEKER, E.; DOGAN, N. Isolation of dermatophytes from dogs and cats with suspected dermatophytosis in Western Turkey. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, p. 46–51, 2011.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, p. 253–260, 2011.

SIDRIM J.J.C., ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanaba Koogan, p. 135-161., 2004.

SILICI, S., et al. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial, **Mycoses**, v. 44, p. 39–44, 2005.

SILVA, R. A. et al. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1842-1848, 2006.

SILVA, B. B. et al. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p. 313–316, 2008.

SILVA, J.C., et al. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1790-1795, 2012

SIMPANYA, M. F. Dermatophytes : Their taxonomy, ecology and pathogenicity. Revista Iberoamericana de Micologia. In: Kushwaha RKS, Guarro J (Eds.). Biology of

Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, 2000.

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

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249-254, 2006.

UZEL, A. et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v. 160, p. 189-195, 2005.

WIESE, H. **Apicultura Novos Tempos**. Guaíba: Novos Livros. 2ª Ed. 378 p. 2005.

YANG, S. Z. et al. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. **Food Chemistry**, v. 127, p. 210–215, 2011

ZAITS, C. Dermatofitoses. In: ZAITS, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B.; FRAMIL, V. M. de S. **Compêndio de Micologia Médica**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. cap. 15, p. 157-167.

CAPÍTULO I

**Perfil enzimático de dermatófitos obtidos de cães e gatos atendidos em
hospitais veterinários de Recife-PE**

A ser submetido à revista:

*Arquivo brasileiro de medicina
veterinária e zootecnia*



**Perfil enzimático de dermatófitos obtidos de cães e gatos atendidos em
hospitais veterinários de Recife-PE**

**[Profile of dermatophytes obtained from dogs and cats presented to veterinary
hospitals in Recife-PE]**

Menezes, M.E.L.¹, Herculano, P.N.¹, Lima, M.L.F.¹, Soares, P.T.², Siqueira,
A.B.S.³, Souza-Motta, C.M.⁴, Porto, A.L.F.^{1,5}, Nascimento, C.O.^{1*}

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal- UFRPE - Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos –
CEP 52171-900 – Recife – PE – Brasil

²Hospital Veterinário Harmonia - Estrada do Encanamento, nº 585 - Casa Forte
- Recife - PE - Brasil

³Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPE – Universidade Federal de
Pernambuco, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária – CEP 50740-520 –
Recife – PE – Brasil

⁴Departamento de Micologia – UFPE – Universidade Federal de Pernambuco,
Av. Prof. Moraes Lins do Rego, s/n, Cidade Universitária – CEP 50670-420 – Recife
– PE – Brasil

⁵LIKA-UFPE - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Av. Prof. Moraes
Lins do Rego, s/n, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

* Autor para correspondência cynthiaonbm@yahoo.com.br

RESUMO

Os dermatófitos são fungos que causam micoses superficiais em homens e animais. As espécies mais frequentemente isoladas de cães e gatos com dermatofitose, são *Microsporum canis*, *M. gypseum*, com maior destaque para *M. canis*. Durante o processo infeccioso, os dermatófitos produzem enzimas extracelulares que são importantes para invasão e estabelecimento do patógeno no tecido hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi isolar dermatófitos de cães e gatos e avaliar o perfil enzimático dos isolados obtidos. A coleta das amostras foi realizada em hospitais veterinários da cidade de Recife-PE (Hospital Veterinário Harmonia e no Hospital Veterinário da UFRPE). Foi avaliada qualitativamente a atividade de urease, protease, lipase, fosfolipase e collagenase. A frequência de dermatófitos foi 7,55%. A espécie mais frequente foi *Microsporum canis* (87,5%), seguida de *M. gypseum* (12,5%). Todos os dermatófitos apresentaram atividade para as enzimas urease, lipase, protease, fosfolipase e collagenase.

Palavras-chaves: *Microsporum canis*, *M. gypseum*, dermatofitose, atividade enzimática.

ABSTRACT

Dermatophytes are fungi that cause superficial mycoses in humans and animals. The species most frequently isolated from dogs and cats with ringworm are *Microsporum canis*, *M. gypseum* and *Trichophyton mentagrophytes*, most notably *M. canis*. During the infection process, the dermatophytes produce extracellular enzymes that are important for invasion and establishment of the pathogen in host tissue. The aim of this work was to isolate dermatophytes in dogs and cats and to evaluate the enzymatic profile obtained. The collection of samples was performed in veterinary

hospitals in Recife-PE (Harmony Veterinary Hospital and Veterinary Hospital at UFRPE). Was qualitatively assessed the activity of urease, protease, lipase, phospholipase and collagenase. The frequency of dermatophytes was 7.55%. The species most often isolated was *Microsporum canis* (87.5%), followed by *M. gypseum* (12.5%). All dermatophytes showed activity for the enzyme urease, lipase, protease, phospholipase and collagenase.

Keywords: *Microsporum canis*, *M. gypseum*, dermatophytosis, enzymatic activity.

INTRODUÇÃO

Os dermatófitos são fungos que pertencem aos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (Brasch, 2010). São capazes de causar infecções na pele, no cabelo, pelos e unhas (Siqueira et al., 2009), denominadas de dermatofitoses, que são altamente contagiosas. Podem ser zoonóticas, como também transmitidas por contato direto de lesões e fômites contaminados (Cabañes, 2000). Os animais domésticos, especialmente cães e gatos, desempenham um papel importante na disseminação dos dermatófitos por serem uma fonte primária e direta de infecção (Betancourt et al., 2009).

De acordo com seus habitats naturais, os dermatófitos podem ser classificados como antropofílicos, geofílicos e zoofílicos. Dermatófitos zoofílicos, como *Microsporum canis* e *Trichophyton mentagrophytes* e aqueles geofílicos como *M. gypseum*, são agentes etiológicos frequentemente isolados de animais domésticos com dermatofitoses (Seker e Dogan, 2011).

As infecções produzidas por dermatófitos são geralmente superficiais, afetam fundamentalmente o estrato córneo da pele e anexos, assim como a superfície das

mucosas (Diego, 2011) e são caracterizadas principalmente por alopecias multifocais e descamações (Seker e Dogan, 2011).

A patogênese das dermatofitoses começa pela aderência de estruturas reprodutivas dos dermatófitos, seguida pela formação de hifas que podem se espalhar pelo tecido. Este processo é acompanhado da liberação de enzimas fúngicas que lhes permitem degradar e utilizar queratina e outras proteínas, bem como lipídeos e DNA, como fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre (Brasch, 2010).

A secreção de uma ampla variedade de enzimas por dermatófitos, como proteases, lipases, collagenases, fosfolipases entre outras, é um dos fatores mais importantes durante o processo infeccioso, pois possibilitam que esses patógenos se tornem invasivos. Lipases, proteases e fosfolipases desempenham um papel importante na fase inicial de invasão dos dermatófitos no estrato córneo e podem ter relevância na patogênese de dermatofitoses animais (Peres et al., 2010; Cafarchia et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi isolar dermatófitos de amostras clínicas de cães e gatos atendidos em hospitais veterinários da cidade de Recife-PE (Hospital Veterinário da UFRPE e Hospital Veterinário Harmonia) e avaliar o perfil enzimático dos dermatófitos obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Pelo quadro clínico sugestivo de dermatofitose, foram selecionados cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e Hospital Veterinário Harmonia (HVH) na cidade de Recife-PE. Foram coletadas amostras (escamas epidérmicas e pelos) para exame

micológico de 106 animais, sendo 99 cães e sete gatos, no período de março / 2011 a janeiro / 2012.

As escarificações das lesões foram realizadas com auxílio de bisturis esterilizados e descartáveis, sendo as amostras clínicas acondicionadas em recipientes esterilizados. Para obtenção da cultura as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), acrescido de cloranfenicol 50mg/L. As mesmas foram incubadas em estufa microbiológica à temperatura de 30°C no período de 15 a 20 dias. As colônias fúngicas sugestivas de dermatófitos foram isoladas e posteriormente identificadas e mantidas em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA).

Os dermatófitos foram identificados de acordo com as características macroscópicas e microscópicas, segundo os critérios adotados por Lacaz et al. (2002). Os isolados foram enviados a Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para depósito. Os isolados foram preservados em tubo de ensaio contendo meio Sabouraud acrescido de extrato de levedura e óleo mineral.

Os ensaios para determinar as atividades enzimáticas de protease, lipase, fosfolipase, collagenase e urease foram realizados em meios sólidos com diferentes substratos. Os fragmentos de colônias dos dermatófitos foram colocados no centro das placas de Petri com os meios específicos, e incubados a 30°C por até 20 dias, exceto para atividade de urease cuja avaliação foi realizada após 96 horas de incubação.

Para atividade de protease foi utilizado o meio de caseína composto de leite desnatado 10% (p/v) e ágar bacteriológico 2% (p/v), segundo Kantarcioglu e Yücel, 2001. A atividade enzimática foi detectada pelo cálculo da zona de atividade (diâmetro da colônia (mm) dividido pela soma do diâmetro da colônia e o diâmetro

do halo (mm)). Para valores de zona de atividade (ZA) entre 0,9 – 1,0 (muito baixa +); 0,80 – 0,89 (baixa ++); 0,70 – 0,79 (elevada +++); < 0,69 (muito elevada ++++).

A atividade de lipase foi avaliada utilizando-se o meio composto de peptona 1% (p/v), cloreto de sódio 0,5% (p/v), cloreto de cálcio 0,01% (p/v), ágar 2% (p/v) e 1 % (v/v) de Tween 20. A formação de halo de precipitação foi indicativo de atividade lipásica, o qual foi mensurado e utilizado para o cálculo da zona de atividade como no item anterior, sendo negativo para valor ZA = 1,0 e positivo para valores < 1,0 (Dos Santos, 2001).

A avaliação da fosfolipase foi realizada utilizando-se o meio contendo lecitina de soja 0,2% (p/v), dextrose 4% (p/v), peptona de carne 1% (p/v), cloreto de sódio 0,03% (p/v), cloreto de cálcio 0,05% (p/v), ágar bacteriológico 2% (p/v) a pH 7,0 ± 0,2 (Price, 1977). Foi medido o halo de precipitação e a zona de atividade avaliada como descrito anteriormente (Dos Santos, 2001).

A atividade de collagenase foi avaliada pela capacidade de crescimento fúngico utilizando-se gelatina como substrato. O meio para collagenase foi gelatina 1% (p/v) e ágar 2% (p/v). A habilidade de utilização da gelatina como fonte de carbono e nitrogênio para crescimento foi indicativa da atividade enzimática (Wawrzkievicz, 1991).

A atividade de urease foi detectada em meio de Christensen: peptona 0,1% (p/v), dextrose 0,1% (p/v), cloreto de sódio 0,5 % (p/v), fosfato dissódico 0,1% (p/v), fosfato monopotássico 0,08% (p/v), vermelho fenol: 0,0012% (p/v), ágar 1,5% (p/v); pH final: 6.8 ± 0.2; solução de uréia 40% (p/v). As placas foram incubadas a temperatura 30 °C por 96 horas. O resultado foi considerado positivo quando a coloração do meio modificou de amarelo para róseo e considerado negativo quando o meio permaneceu amarelo (Sidrim e Moreira, 1999; Sidrim e Rocha, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de amostras de pelos e escamas epidérmicas (n = 106) a frequência de dermatófitos isolados foi de 7,55% (n = 8). Dentre os 99 cães foram isolados sete dermatófitos (7,07%) enquanto que dos sete gatos foi obtido um dermatófito (14,29%). A espécie mais frequente foi *M. canis* (87,5%), seguida de *M. gypseum* (12,5%). A Tab. 1 apresenta o número e a percentagem das espécies de dermatófitos isolados de acordo com o animal hospedeiro.

Tabela 1. Dermatófitos isolados de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário Harmonia e Hospital Veterinário da UFRPE, em Recife-PE.

Dermatófito	Total (n =106)	Cão (n=99)	Gato (n=7)
<i>Microsporum canis</i>	7 (87,5%)	6 (85,71%)	1 (100%)
<i>M. gypseum</i>	1 (12,5%)	1 (14,29%)	0
Total	8 (7,55%)	7 (7,07%)	1 (14,29%)

Estudos epidemiológicos sobre isolamento de dermatófitos de animais domésticos, principalmente cães e gatos, com suspeita de dermatofitose tem sido reportados por diversos autores (Coelho, 2008; Prado, 2008; Bentacourt et al., 2009; Bagcigil et al., 2010;). Segundo Cabañes (2000) os percentuais de isolados destes fungos variam entre 4 e 20%, corroborando com a taxa de isolamento de 7,55% obtida. Neste trabalho *M. canis* foi a espécie mais frequente, coincidindo com o resultado encontrado por Seker e Dogan (2011) relataram frequência de *M. canis* de 57,1% em cães e gatos, sendo 198 amostras de cães e 164 de gatos. Silva et al. (2011) isolaram 50% de *M. canis* em cães, sendo 41 amostras de cães e 7 de gatos. A literatura reporta a prevalência de cães atendidos com dermatofitoses maior do que em gatos, resultados semelhantes aos obtidos neste estudo.

A Tab. 2 mostra o perfil enzimático dos dermatófitos isolados em relação à atividade de protease, lipase, fosfolipase, urease e collagenase. Todos os dermatófitos apresentaram atividade para as enzimas testadas.

Tabela 2. Perfil enzimático dos dermatófitos isolados de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário Harmonia e Hospital Veterinário da UFRPE, em Recife-PE.

Dermatófito	Enzimas				
	Protease (ZA)	Lipase (ZA)	Fosfolipase (ZA)	Colagenase	Urease
<i>Microsporum canis</i> (02)	++ (0,84)	+ (0,76)	+ (0,82)	+	+
<i>M. canis</i> (03)	++ (0,83)*	+ (0,83)	+ (0,90)	+	+
<i>M. canis</i> (14)	+ (1,00)**	+ (0,76)	+ (0,90)	+	+
<i>M. canis</i> (15)	+ (0,93)	+ (0,64)	+ (0,78)	+	+
<i>M. canis</i> (16)	+ (0,93)	+ (0,79)	+ (0,77)	+	+
<i>M. canis</i> (17)	++ (0,89)	+ (0,75)	+ (0,81)	+	+
<i>M. canis</i> (18)	+ (1,00)	+ (0,63)	+ (0,94)	+	+
<i>M. gypseum</i> (31)	+ (0,95)	+ (0,67)	+ (0,90)	+	+

ZA: zona de atividade; * ++ (atividade muito baixa); ** + (atividade baixa).

Segundo Muhsin e Salih (2000) a atividade enzimática pode variar de acordo com a espécie de dermatófito, entretanto, neste trabalho, de maneira geral as espécies *M. canis* e *M. gypseum* apresentaram atividades enzimáticas semelhantes. Da mesma forma que Bruguera et al. (1997) que também não verificaram diferenças enzimáticas para proteases, lipases e fosfolipases entre amostras de *M. canis* e *M. gypseum*.

Contudo, entre amostras de uma mesma espécie podem ser observadas variações quanto à atividade enzimática (Maia et al., 2001). Este fato foi observado nas amostras de *M. canis*, analisadas neste estudo, para protease, onde três isolados apresentaram atividade baixa (++) e os demais demonstraram atividade

muito baixa (+), levando-se em consideração o tamanho da zona de atividade. De forma semelhante, Maia et al. (2001) observaram diferença para proteases para amostras de *M. canis*. Abdel-Rahman (2000) estudando o perfil enzimático para queratinases, colagenases e elastases em amostras de *Trichophyton tonsurans* observou diferenças no crescimento fúngico nos meios para estas enzimas.

Cafarchia et al. (2011) avaliaram amostras de *T. mentagrophytes* e *M. canis* isolados de coelhos com e sem lesões de pele quanto a produção de queratinase, DNase, lipase, elastase e gelatinase em meios sólidos, onde as amostras de *T. mentagrophytes* apresentaram as cinco enzimas examinadas enquanto que *M. canis* produziu apenas três (DNase, lipase e queratinase). Segundo os autores, a produção enzimática diferenciada pode ser explicada pela maior especificidade de *T. mentagrophytes* em relação a *M. canis* em causar dermatofitose em coelhos.

CONCLUSÃO

A frequência de dermatófitos obtida é reflexo das dificuldades encontradas no diagnóstico da dermatofitose em cães e gatos, visto que as amostras eram procedentes de animais com suspeita dessa micose. A produção enzimática por isolados de *Microsporum canis* e *M. gypseum* colabora com a habilidade dessas espécies em invadir e colonizar tecidos e pelos de cães e gatos causando a dermatofitose.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro e bolsa concedida pela CAPES, FACEPE (BCT 0284-5.05/11) e CNPq.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, S.M. Polymorphic exocellular protease expression in clinical isolates of *Trichophyton tonsurans*. *Mycopathologia*, v. 150, p. 117-0. 2000.

BAGCIGIL, A. F.; IKIS, S.; ÖZGÜR, N. Y. et al. Recovery of dermatophytes in pet grooming tools from veterinary clinics and pet grooming salons. *J. Small Anim. Pract.*, v. 51, n. 1, p. 39-42, 2010.

BAGCIGIL, A. F.; IKIS, S.; ÖZGÜR, N. Y. et al. Recovery of dermatophytes in pet grooming tools from veterinary clinics and pet grooming salons. *J. Small Anim. Pract.*, v. 51, n. 1, p. 39-2, 2010.

BETANCOURT, O.; SALAS, V.; OTAROLA, A. et al. *Microsporum canis* en gatos dermatológicamente sanos en Temuco, Chile. *Rev. Iberoam. Micol.*, v.26(3), p.206–0, 2009.

BRASCH, J. Pathogenesis of tinea. *J. Dtsch. Dermatol. Ge.s*, v.8, p. 780-786, 2010.

BRUGUERA, M.T., ABARCA, M.L., BRAGULAT, M.R. et al. Determinación de actividades enzimáticas en cepas de *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum*. *Rev. Iberoam. Micol.*, v.14, p. 119-4, 1997.

CABAÑES, F.J., ABARCA, M.L., BRAGULAT, M.R. Dermatophytes isolated from domestic animals in Barcelona, Spain. *Mycopathologia*, v. 137, p. 107–3, 1997.

CABAÑES, F.J. Dermatophytes in domestic animals. In: Kushwaha RKS, Guarro J (Eds.). *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi*. *Rev. Iberoam. Micol.*, p. 104-8, 2000.

CAFARCHIA, C.; FIGUEIREDO, L. A.; COCCIOLI, C. et al. Enzymatic activity of *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes* from breeding rabbits with and without skin lesions. *Mycoses* 55, 45–49, 2011.

COELHO, A. C.; ALEGRIA, N.; RODRIGUES, J. Isolamento de dermatófitos em animais domésticos em Vila Real, Portugal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.4, p. 1017-0, 2008.

DIEGO, A.M. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, v. 29(Supl 3), p.33-9, 2011.

DOS SANTOS, J.I.; VICENTE, E.J.; PAULA, C.R. et al. Phenotypic Characterization of *Trichophyton rubrum* isolates from two geographic locations in Brazil. *Eur. J. Epidemiol.* v. 17, p. 729-5, 2001.

KANTARCIOGLU, A.S.; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, v. 45, p. 160-5, 2001.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. et al. Tratado de Micologia Médica. 9. ed. Rio de Janeiro: Sarvier, 1104p., 2002.

MAIA, M.L.S.; DOS SANTOS, J.I.; VIANI, F.C. et al. Phenotypic characterization of *Microsporum canis* isolates from cats and dogs. *Mycoses*, v.44, p. 480-6, 2001.

MAGO, K. Subcellular localization of enzymes of phospholipase metabolism in *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.*, v. 28, n. 5, p. 355-2, 1990.

MUHSIN TM, SALIH TH. Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi solated from ruminants in Southern Iraq. *Mycopathologia*, v. 150, p. 49-2, 2000.

PERES, N.T.A. et al. Dermatófitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. *Anais Brasileiros Dermatologia*. v.85, p.657-667, 2010.

PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A. et al. Frequency of yeasts and dermatophytes from healthy and diseased dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, Columbia, v. 20, n. 2, p. 197-2, 2008.

PRICE, M.F.; CAWSON, R.A. Phospholipase activity in *Candida albicans*. *Saboraudia*, v.15, p. 179-5, 1977.

SEKER, E.; DOGAN, N. Isolation of dermatophytes from dogs and cats with suspected dermatophytosis in Western Turkey. *Prev. Vet. Med.*, v. 98, p. 46–1, 2011.

SIDRIM J.J.C., MOREIRA J.L.B. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, 1999.

SIDRIM J.J.C., ROCHA, M.F.G. Micologia Médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanaba Koogan, p. 135-161, 2004.

SILVA, V. F. da; DRESCHER, G.; MATTIELLO, S. P. Agentes fúngicos da dermatofitose em cães e gatos do município de Xanxerê, Santa Catarina. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 32, n. 3, p. 1095-1100, 2011.

SPARKES, A.H.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; SHAW, S.E. et al. Epidemiological and diagnostic features of canine and feline dermatophytosis in the United Kingdom from 1956 to 1991. *Vet. Rec.*, v. 133, p. 57–1. 1993.

SIQUEIRA, A. B. S.; GOMES, B. S.; CAMBUIM, I. et al. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 48 , p. 90–6, 2009.

WAWRZKIEWICZ, K.; WOLSKI, T.; LOBARZEWSKI, J. Screening the keratinolytic activity of dermatophytes “*in vitro*”. *Mycopathologia*, v. 114, p.1-8, 1991.

CAPÍTULO II

Atividade antifúngica e avaliação do efeito combinado com terbinafina e itraconazol da própolis vermelha brasileira frente a dermatófitos isolados de cães e gatos

A ser submetido à revista:

*Diagnostic Microbiology and
Infectious Disease*



Atividade antifúngica e avaliação do efeito combinado com terbinafina e itraconazol da própolis vermelha brasileira frente a dermatófitos isolados de cães e gatos

Menezes, M.E.L.¹, Herculano, P.N.¹, Lima, M.L.F.¹, Soares, P.T.², Siqueira, A.B.S.³, Souza-Motta, C.M.⁴, Porto, A.L.F.^{1,5}, Nascimento, C.O.^{1*}

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal- UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP 52171-900 – Recife – PE – Brasil

²Hospital Veterinário Harmonia - Estrada do Encanamento, nº 585 - Casa Forte - Recife- PE - Brasil

³Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPE – Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária – CEP 50740-520 – Recife – PE – Brasil

⁴Departamento de Micologia – UFPE – Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Lins do Rego, s/n, Cidade Universitária – CEP 50670-420 – Recife – PE – Brasil

⁵LIKA-UFPE - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Av. Prof. Moraes Lins do Rego, s/n, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

* Autor para correspondência cynthiaonbm@yahoo.com.br

RESUMO

A atividade antifúngica da própolis vermelha do nordeste brasileiro e o efeito combinado com os antifúngicos terbinafina e itraconazol foi avaliada frente a

dermatófitos isolados de cães e gatos. A atividade antifúngica foi realizada conforme o documento M38-A e o efeito combinado pelo método “checkerboard”. A própolis vermelha apresentou atividade fungistática ($62,5-125 \mu\text{g.ml}^{-1}$) e fungicida ($62,5-250 \mu\text{g.ml}^{-1}$) para os isolados testados. No entanto, não apresentou alterações na morfologia de hifas dos dermatófitos. A combinação da própolis vermelha com terbinafina foi indiferente para a maioria dos isolados exceto para *Microsporum gypseum* (31) cujo efeito foi antagonista. A interação com itraconazol apresentou efeito sinérgico para os isolados *M. canis* (02 e 15), indiferente para *M. canis* (18) e antagonista aos demais. A própolis vermelha demonstrou ter potencial antifúngico frente aos dermatófitos testados. Embora o efeito sinérgico tenha sido observado apenas para dois isolados, as combinações testadas foram relevantes pois houve diminuição do valor da CIM dos antifúngicos para a maioria dos isolados.

Palavras-chaves: Dermatofitose, própolis vermelha, sinergismo, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, atividade antifúngica.

ABSTRACT

The antifungal activity of propolis in northeastern Brazil and the combined effect with the antifungals terbinafine and itraconazole was evaluated against dermatophytes isolated from dogs and cats. The antifungal activity was performed according to the document M38-A and the combined effect of the checkerboard method. The propolis showed fungistatic activity (62.5 to $125 \mu\text{g.ml}^{-1}$) and fungicide (62.5 to $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$) for the isolates tested. However, had no effect on the morphology of hyphae of dermatophytes. The combination of propolis with terbinafine was indifferent to most isolates except for *Microsporum gypseum* (31) whose effect was antagonistic. The interaction with itraconazole showed synergistic effect for isolated *M. canis* (2:15), indifferent to *M. canis* (18) and antagonistic to the other. The propolis has

demonstrated antifungal activity against the dermatophytes tested. Although the synergistic effect has been observed for only two isolates were tested combinations as there was significant decrease of the antifungal MIC value for most isolates.

Keywords: Dermatophytosis, propolis, synergism, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, antifungal activity.

INTRODUÇÃO

Os dermatófitos são fungos que degradam e utilizam a queratina e por isso são capazes de causar infecções em tecidos queratinizados de homens e animais (pele, cabelos e unhas), chamadas dermatofitoses. Estes fungos são classificados nos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (Diego, 2011).

As espécies de dermatófitos comumente relacionadas à dermatofitose em cães e gatos são: *Microsporum canis*, *M. gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*, sendo *M. canis* a espécie mais frequente (Coelho et al., 2008; López et al., 2012).

Os antifúngicos recomendados na terapia sistêmica da dermatofitose em cães e gatos são griseofulvina, itraconazol e terbinafina, no entanto, devido aos graves efeitos colaterais causados, a griseofulvina vem sendo substituída pelos antifúngicos terbinafina e itraconazol (Moriello, 2004). Os efeitos colaterais causados pela terapia sistêmica e o desenvolvimento de resistência fúngica aos antifúngicos utilizados tem impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos, sobretudo os de origem natural (Aguero et al., 2011; Martinez-Rossi et al., 2008; Siqueira et al., 2009).

A própolis é uma substância complexa elaborada por abelhas que coletam material resinoso e balsâmico a partir de diversas partes das plantas como ramos, flores, pólen, brotos e também exudados de árvores (Pereira et al., 2002). Na colmeia é utilizada pelas abelhas contra a proliferação de micro-organismos, como

fungos e bactérias além de possíveis invasores, garantindo a higiene sanitária e a sobrevivência na colmeia (Silva et al., 2006). Atualmente, a própolis tem atraído à atenção de pesquisadores devido as suas diversas atividades biológicas e propriedades terapêuticas (Ngatu et al., 2011).

A própolis vermelha foi encontrada em colmeias localizadas ao longo do mar e costas de rios no nordeste brasileiro, onde as abelhas *Apis mellifera* foram observadas coletando o exudado vermelho da superfície de *Dalbergia ecastophyllum*, conhecida como rabo-de-bugio (Daugusch et al., 2007).

Diversas atividades biológicas foram atribuídas à própolis vermelha do nordeste brasileiro, tais como: antibacteriana (Cabral et al., 2009; Righi et al., 2011; Trusheva et al., 2006), antifúngica (Siqueira et al., 2009), antioxidante (Cabral et al., 2009; Righi et al., 2011; Trusheva et al., 2006), antitumoral (Alencar et al., 2007; Li et al., 2008), antiprotozoária (Ayres et al., 2007). A atividade antifúngica da própolis vermelha do nordeste brasileiro foi avaliada frente a espécies de *Trichophyton* que demonstram ser susceptíveis ao seu extrato alcoólico (Siqueira et al., 2009).

A associação de produtos naturais como a própolis pode apresentar efeitos sinérgicos com drogas antimicrobianas, sendo um campo de interesse para o desenvolvimento de novos produtos pela indústria farmacêutica (Sforcin; Bankova, 2011).

A associação entre antifúngicos sintéticos e produtos naturais pode aumentar a eficácia de cada droga, através da utilização de uma dose mais baixa de cada uma das drogas. Além disso, a terapia de combinação pode ser utilizada como tentativa para evitar ou retardar o aparecimento de populações resistentes do patógeno (Cuenca-Estrella, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica da própolis vermelha do nordeste brasileiro frente a dermatófitos isolados de cães e gatos, observar o efeito da própolis vermelha sobre as hifas dos isolados e verificar o efeito da associação da própolis vermelha com os antifúngicos terbinafina e itraconazol.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras fúngicas

As atividades antifúngicas da própolis vermelha e das drogas itraconazol e terbinafina foram avaliadas utilizando oito isolados de dermatófitos, sendo sete *Microsporum canis* e um *M. gypseum*, obtidos de cães e gatos com dermatofitose depositados na Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

Própolis

O extrato foi obtido com álcool etílico a 70% (v/v), através da agitação por 24h, e posterior filtração e centrifugação. Foram utilizadas 10 concentrações entre 1,9 e 1000 µg/mL.

Antifúngicos

As drogas utilizadas foram itraconazol e terbinafina as quais foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Gibco, Belo Horizonte). Foram utilizadas 10 concentrações entre 0.03 a 16 µg/mL para ambas. O procedimento utilizado para preparação das concentrações das drogas foi o mesmo publicado pelo documento M38-A (CLSI, 2002).

Atividade antifúngica da própolis vermelha brasileira

Padronização do inóculo

Os inóculos foram padronizados de acordo com o procedimento adotado pelo CLSI (2002) e descrito por Fernández-Torres et al. (2002). Os dermatófitos foram

cultivados em tubos contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), os quais foram mantidos em estufa de crescimento à temperatura de 30° C durante 15 dias. Para preparo das suspensões fúngicas foi acrescentado 5mL de solução salina e com o auxílio de alças descartáveis foi promovido o desprendimento de esporos e fragmentos de hifas. As suspensões foram aspiradas e após 20 min de repouso o sobrenadante foi transferido para outro tubo onde foi agitado em vortex. As densidades das suspensões foram ajustadas em espectrofotômetro a 595nm, para obter entre 65-70% de transmitância. As suspensões foram diluídas (1:50) em meio RPMI 1640, para obtenção de concentração duas vezes maior que a necessária.

Procedimento do teste

Foi utilizado o método de microdiluição em meio líquido realizado de acordo com o documento M38-A (CLSI, 2002) e descrito por Fernández-Torres et al. (2002). O meio de cultura utilizado para o procedimento foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7.0 com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) a 0.165 M (Sigma-Aldrich, USA). O meio foi esterilizado por filtração em membrana com porosidade de 0.22 µm (Millipore).

Os poços das fileiras de 1 a 10 da microplaca continham 100 µL das drogas e 100 µL do inóculo, os poços 11 e 12 consistiam dos controles de crescimento e esterilização, respectivamente. As microplacas foram incubadas a temperatura de 30°C por sete dias. Após esse período, 50µL do conteúdo de cada poço que apresentou redução de 100% do crescimento fúngico foi inoculado em microtubos contendo 1mL de Sabouraud líquido para constatação da atividade fungicida.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da própolis vermelha e das drogas foi realizada pela leitura visual, levando-se em consideração o poço controle que obteve 100% de crescimento foi atribuído o percentual de inibição das

concentrações testadas. Também foi verificada a inibição de crescimento através da leitura das microplacas em leitor de microplaca, a 595 nm.

Foram determinadas as concentrações inibitória e fungicida mínima (CIM e CFM) da própolis vermelha e dos antifúngicos. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de itraconazol, terbinafina e para própolis foi a que inibiu 100% do crescimento do fungo. A concentração fungicida mínima foi considerada a menor concentração inibitória que impediu o crescimento do fungo.

Efeitos do extrato alcoólico da própolis vermelha na morfologia de hifas

Os efeitos do extrato alcoólico da própolis vermelha sobre a morfologia das hifas dos isolados de *M. canis* (02,14 e 15) e *M. gypseum* (31) foram observadas usando microscopia eletrônica de varredura (MEV), no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE. Após avaliação da atividade antifúngica, foram retirados 50 µL da concentração sub-inibitória e do controle de crescimento, posteriormente inoculados em meio Sabouraud líquido e mantidos a 30° C durante sete dias. As amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 por duas horas. Depois de terem sido lavadas com o tampão, as amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1:1 e lavadas novamente com o mesmo tampão. A desidratação das amostras foi feita através de soluções crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 3 x 100%) por 10 minutos cada. As amostras foram secas pelo procedimento do ponto crítico, metalizadas com ouro e observadas pelo microscópio eletrônico de varredura MEV Quanta 200 FEI.

Avaliação do efeito combinado da própolis vermelha com os antifúngicos terbinafina e itraconazol

O efeito combinado foi avaliado pelo método “checkerboard”, baseado no procedimento estabelecido pelo CLSI (2002). O meio de cultura utilizado para o

procedimento foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7.0 com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) a 0.165 M (Sigma-Aldrich, USA).

Foram avaliadas cinco concentrações da própolis vermelha e de cada antifúngico, sendo uma correspondente ao valor de CIM, duas acima e outras duas abaixo. As combinações testadas foram PROP+TERB (própolis + terbinafina) e PROP+ITRAC (própolis + itraconazol). As concentrações da própolis foram distribuídas ao longo do eixo das ordenadas e o antifúngico ao longo do eixo das abscissas. Em cada poço da microplaca, foram adicionados 50 µL da própolis vermelha e do antifúngico. Os inóculos foram padronizados de acordo com o procedimento adotado pelo CLSI (2002) e descrito por Fernández-Torres et al. (2002). Em cada poço foram adicionados 100 µL de suspensão fúngica. Como controle negativo foram utilizados 200 µL de RPMI e, para controle positivo, 100 µL de RPMI com 100 µL de inóculo. As placas foram incubadas a 30°C e a leitura foi feita após sete dias. Foram realizadas leituras visuais e espectrofotométricas a 595 nm.

A avaliação do efeito combinado foi realizada através do cálculo da Concentração Inibitória Fracionária (CIF) para a própolis vermelha e o antifúngico, cuja soma origina o Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) (Mosquera et al., 2002; Ozawa et al., 2005), determinado pela fórmula:

$$\text{ICIF} = \text{CIF (própolis)} + \text{CIF (antifúngico)}$$

$$\text{ICIF} = \frac{(\text{CIM própolis na combinação})}{(\text{CIM própolis sozinha})} + \frac{(\text{CIM antifúngico na combinação})}{(\text{CIM antifúngico sozinho})}$$

Os resultados obtidos foram classificados, de acordo com o ICIF, em sinérgicos (ICIF<1,0), aditivos (ICIF=1,0), indiferentes (1,0<ICIF<2,0) ou antagonistas (ICIF> 2,0) (Mosquera et al., 2002; Ozawa et al., 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antifúngica da própolis vermelha

As Tabelas 1 e 2 mostram os resultados da atividade antifúngica dos antifúngicos comerciais e da própolis vermelha brasileira. Para terbinafina, em relação a *M. canis*, o isolado nº 18 foi o mais susceptível a esta droga (CIM=0,03 µg.ml⁻¹) e o isolado nº 16 o mais resistente (CIM=1,0 µg.ml⁻¹), enquanto para o itraconazol, os isolados de *M. canis* nº 17 e 18 foram os mais susceptíveis (CIM=0,03 µg.ml⁻¹) e o isolado nº 03 o mais resistente (CIM=1,0 µg.ml⁻¹). Os antifúngicos terbinafina e itraconazol também apresentaram atividade fungicida com valores de CFM entre 0,03-1,0 µg.ml⁻¹ (Tabela 2). A susceptibilidade de dermatófitos aos antifúngicos itraconazol (0,03-0,25 µg.ml⁻¹) e terbinafina (0,03-1,0 µg.ml⁻¹), em pequenas concentrações, também tem sido relatada por outros autores (Araújo et al., 2009; Silva et al., 2013; Siqueira, et al., 2009).

A maioria dos dermatófitos foi sensível para a concentração inibitória mínima de 62,5 µg.ml⁻¹ da própolis vermelha do Brasil, com exceção do isolado *M. canis* nº 15 que demonstrou ser mais resistente com concentração inibitória mínima de 125 µg.ml⁻¹. O isolado *M. gypseum* (31) apresentou semelhante susceptibilidade observada na maioria dos isolados da espécie *M. canis* (Figura 1). A própolis vermelha frente aos isolados testados apresentou atividade fungistática entre 62,5-125 µg.ml⁻¹ e atividade fungicida, concentração capaz de matar o micro-organismo, entre 62,5-250 µg.ml⁻¹ (Tabela 2).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o extrato alcoólico da própolis vermelha brasileira apresentou CIM de $62,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ para a maioria dos dermatófitos testados. Segundo a literatura, a atividade antimicrobiana de um extrato é considerada muito interessante para casos de valores de $\text{CIM} < 100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (Agüero et al., 2010; Ríos e Recio, 2005). Além do efeito fungistático a própolis vermelha apresentou efeito fungicida, características consideradas importantes para um medicamento antifúngico impedir a ocorrência de reincidivas (Agüero et al., 2010).

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram reportados na literatura, por Siqueira et al., (2009) que avaliaram espécies de *Trichophyton* quanto à sensibilidade aos extratos alcoólicos e aquosos, das própolis verde e vermelha do Brasil, onde as espécies de dermatófitos avaliadas demonstraram ser susceptíveis aos extratos alcoólicos de ambas, e a própolis vermelha apresentou valores de CIMs entre $64\text{-}128 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

Ainda são poucos os trabalhos sobre a atividade antifúngica da própolis vermelha brasileira, porém outros tipos de própolis foram estudadas frente a dermatófitos tais como, Agüero et al. (2011) que avaliaram a atividade antifúngica da própolis Argentina frente a *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Microsporum gypseum*, a qual apresentou CIMs entre $62,5\text{-}250 \mu\text{g.ml}^{-1}$ e Gavanji et al. (2011) observaram o efeito do extrato alcoólico da própolis no crescimento de três espécies de dermatófitos: *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton tonsurans* e *T. violaceum*.

A própolis vermelha brasileira, também, tem sido relatada por apresentar atividade antimicrobiana frente a outros micro-organismos, demonstrando atividade antibacteriana frente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, com CIM variando entre $62,5$ e $125 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (Cabral et al., 2009) e apresentando halo de inibição frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e a *Escherichia coli* ATCC

14948 (Mendonça et al., 2011). Júnior et al. (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e das frações hexânica, clorofórmica e acetanólica da própolis vermelha frente aos micro-organismos *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e a *Candida albicans* e observaram que o extrato etanólico apresentou atividade antimicrobiana frente a cepas Gram-positivas (100%), Gram-negativas (62,5%) e fúngicas (100%), com eficiência em 76,9% de todas as espécies testadas, e das frações testadas, a fração acetanólica apresentou atividade frente a todos os micro-organismos testados com 100% de eficiência.

Efeito do extrato alcoólico da própolis vermelha na morfologia de hifas

A microscopia eletrônica de varredura mostrou que não houve efeito do extrato alcoólico da própolis vermelha na morfologia das hifas dos dermatófitos. Comparando-se com as micrografias do controle (sem própolis) as hifas se desenvolveram intactas após terem sido expostas a concentração sub-inibitória do extrato alcoólico da própolis vermelha por sete dias, como também não foi possível visualização das macroaleurias durante este período de incubação em nenhuma das amostras (Figura 2).

Embora a atividade antifúngica de diversos tipos própolis tenha sido amplamente estudada, poucos trabalhos demonstraram os seus efeitos sobre a morfologia e estrutura dos fungos. Alguns trabalhos relatam o efeito sobre fungos leveduriformes. Mora et al. (2011) verificaram que o extrato etanólico de própolis mexicana (EEP) em concentração de 0,25 mg / mL induziu a inibição da formação de tubo germinativo em *Candida albicans*, resultado semelhante foi relatado por Mello et al. (2006) com própolis verde do Brasil que foi capaz de reduzir o

aparecimento de tubos germinativos em *C. albicans* após duas horas de exposição. Na literatura ainda são escassos os trabalhos que relatem o efeito da própolis sobre o desenvolvimento de fungos filamentosos.

As alterações e danos sobre hifas de fungos têm sido relatados em estudos com extratos de plantas como *Desmos chinensis* sobre *Rhizoctonia solani* onde puderam ser visualizadas alterações morfológicas importantes como superfícies celulares rugosas e estruturas globulares de tamanhos diferentes ao longo a superfície do micélio (Plodpai et al., 2013). O extrato de *Polygonum ferrugineum* mostrou induzir malformações nas hifas de *Neurospora crassa* sugerindo que pode atuar através da inibição da parede celular dos fungos (Lopéz et al., 2011).

Avaliação do efeito combinado da própolis vermelha com os antifúngicos terbinafina e itraconazol

Os resultados referentes à avaliação do efeito combinado da própolis vermelha com os antifúngicos estão nas Tabelas 3 e 4. A combinação PROP+TERB foi indiferente frente à maioria dos isolados, com exceção do isolado *M. gypseum* (31) para qual a interação apresentou efeito antagonista, pois o CIM da própolis vermelha aumentou de 62,5 para 125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ na combinação. Embora a interação PROP+TERB não tenha apresentado efeito sinérgico frente a nenhum dos isolados, essa associação foi favorável para redução da CIM da terbinafina em relação a todos os isolados (Tabela 3), essa diminuição pode ser interessante para reduzir os efeitos adversos causados pelo antifúngico sintético sem diminuir a sua ação. A administração tópica e oral de terbinafina pode induzir graves efeitos secundários, como reações cutâneas locais de intensidade leve a moderada no tratamento tópico e efeitos gastrointestinais na terapia oral (Galgóczy et al., 2008; Keller, 2012).

Segundo Cuenca-Estrella (2004), o efeito sinérgico é uma interação positiva quando dois agentes em combinação exercem um efeito inibitório maior que a soma dos seus efeitos individuais, ou seja, a ação de ambos é potencializada. O antagonismo é considerado uma interação negativa observada quando o efeito das drogas combinadas é significativamente inferior aos medicamentos testados separadamente. A aditividade é observada quando o resultado da interação é a soma dos efeitos individuais dos agentes testados e a indiferença é o efeito da droga mais ativa quando testada separadamente.

A combinação PROP+ITRA foi sinérgica frente aos isolados *M. canis* (02) e *M. canis* (15) com redução da CIM tanto da própolis quanto do itraconazol. O efeito indiferente foi observado para o isolado *M. canis* (18). A CIM da própolis vermelha aumentou de 62,5 para 125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ frente aos isolados *M. canis* (03, 14, 17) e *M. gypseum* (31) e a CIM do itraconazol aumentou de 0,25 para 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ frente ao isolado *M. canis* (16), demonstrando o efeito antagonista da interação para estes isolados (Tabela 4). Com exceção do isolado *M. canis* (16), para qual houve aumento da CIM do itraconazol na combinação, a associação PROP+ITRAC favoreceu a diminuição da CIM do itraconazol para os isolados *M. canis* (03, 14, 17 e 18) mesmo na ausência de efeito sinérgico dessa associação para estes isolados. A redução da CIM do itraconazol na combinação sugere que esta interação pode diminuir os efeitos adversos causados pelo antifúngico. Como os efeitos gastrointestinais que podem ser observados durante o tratamento com itraconazol (Keller, 2011).

A combinação ideal de drogas seria aquela em que a interação resultasse em efeito sinérgico, com redução da CIM das duas drogas avaliadas. Contudo, mesmo na ausência de sinergismo, podem haver outras possíveis vantagens na combinação

de drogas. A interação de duas drogas com mecanismos de ação diferentes pode aumentar a taxa de morte microbiana, encurtar a duração da terapia e evitar a surgimento de resistência às drogas (Zhu et al., 2004).

CONCLUSÃO

A própolis vermelha do nordeste brasileiro apresentou atividades fungistática e fungicida frente aos isolados testados, contudo não apresentou efeitos na morfologia das hifas dos dermatófitos na concentração sub-inibitória. A interação da própolis vermelha com o antifúngico terbinafina foi indiferente para a maioria dos isolados, exceto para *M. gypseum* (31) cujo efeito foi antagonista. A combinação com itraconazol foi sinérgica para dois isolados de *M. canis* (02 e 15), indiferente para *M. canis* (18) e antagonista aos demais isolados. Embora o efeito sinérgico tenha sido observado apenas para dois isolados, as combinações da própolis vermelha com os antifúngicos testados foi relevante visto que houve diminuição do valor da CIM dos antifúngicos para a maioria dos isolados. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial da própolis vermelha como antifúngico, contudo faz-se necessário saber os seus possíveis efeitos tóxicos além de estudos *in vivo* que reforcem sua utilização como agente antifúngico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro e bolsa concedida pela CAPES FACEPE (BCT 0284-5.05/11), CNPq e CETENE.

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato alcoólico da própolis vermelha e dos antifúngicos terbinafina e itraconazol frente a dermatófitos isolados de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário Harmonia e Hospital Veterinário da UFRPE, em Recife-PE.

Dermatófito	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (PRÓPOLIS)	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (TERBINAFINA)	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (ITRACONAZOL)
<i>Microsporum canis</i> (02)	62,5	0,25	0,125
<i>M. canis</i> (03)	62,5	0,5	1,0
<i>M. canis</i> (14)	62,5	0,125	0,0625
<i>M. canis</i> (15)	125,0	0,5	0,5
<i>M. canis</i> (16)	62,5	1,0	0,25
<i>M. canis</i> (17)	62,5	0,5	0,03
<i>M. canis</i> (18)	62,5	0,03	0,03
<i>M. gypseum</i> (31)	62,5	0,5	0,25

Tabela 2 – Concentração fungicida mínima (CFM) do extrato alcoólico da própolis vermelha e dos antifúngicos terbinafina e itraconazol frente a dermatófitos isolados de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário Harmonia e Hospital Veterinário da UFRPE, em Recife-PE.

Dermatófito	CFM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (PRÓPOLIS)	CFM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (TERBINAFINA)	CFM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (ITRACONAZOL)
<i>Microsporum canis</i> (02)	125	0,5	0,125
<i>M. canis</i> (03)	62,5	0,5	1,0
<i>M. canis</i> (14)	125	0,125	0,125
<i>M. canis</i> (15)	250,0	0,5	0,5
<i>M. canis</i> (16)	250,0	1,0	0,25
<i>M. canis</i> (17)	62,5	0,5	0,03
<i>M. canis</i> (18)	250,0	0,03	0,03
<i>M. gypseum</i> (31)	250,0	1,0	0,25

Tabela 3 – Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) do efeito combinado da própolis vermelha do nordeste brasileiro com o antifúngico terbinafina

Dermatófito (nº de amostra)	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) sozinho		CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) combinado		ICIF (CIF PROP+ CIF TERB)
	PROP	TERB	PROP	TERB	
<i>Microsporum canis</i> (02)	62,5	0,25	62,5	0,06	1,25 (I)
<i>M. canis</i> (03)	62,5	0,5	62,5	0,25	1,50 (I)
<i>M. canis</i> (14)	62,5	0,03	62,5	0,007	1,23 (I)
<i>M. canis</i> (15)	125	0,5	125	0,125	1,25 (I)
<i>M. canis</i> (16)	62,5	1,0	125	0,25	1,25 (I)
<i>M. canis</i> (17)	62,5	0,03	62,5	0,007	1,23 (I)
<i>M. canis</i> (18)	62,5	0,125	62,5	0,003	1,24 (I)
<i>M. gypseum</i> (31)	62,5	0,25	125	0,06	2,24 (A)

Efeitos indifferente (I) e antagonista (A).

Tabela 4 – Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) do efeito combinado da própolis vermelha do nordeste brasileiro com o antifúngico itraconazol.

Dermatófito (nº de amostra)	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) sozinho		CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) combinado		ICIF (CIF PROP+ CIF ITRAC)
	PROP	ITRAC	PROP	ITRAC	
<i>Microsporum canis</i> (02)	62,5	0,125	31,2	0,03	0,74 (S)
<i>M. canis</i> (03)	62,5	1,0	125	0,25	2,25 (A)
<i>M. canis</i> (14)	62,5	0,03	125	0,007	2,23 (A)
<i>M. canis</i> (15)	125	0,5	62,5	0,125	0,75 (S)
<i>M. canis</i> (16)	62,5	0,25	15,6	0,5	2,00 (A)
<i>M. canis</i> (17)	62,5	0,03	125	0,007	2,23 (A)
<i>M. canis</i> (18)	62,5	0,06	62,5	0,015	1,25 (I)
<i>M. gypseum</i> (31)	62,5	0,25	125	0,25	3,00 (A)

Efeitos sinérgico (S), indifferente (I) e antagonista (A).

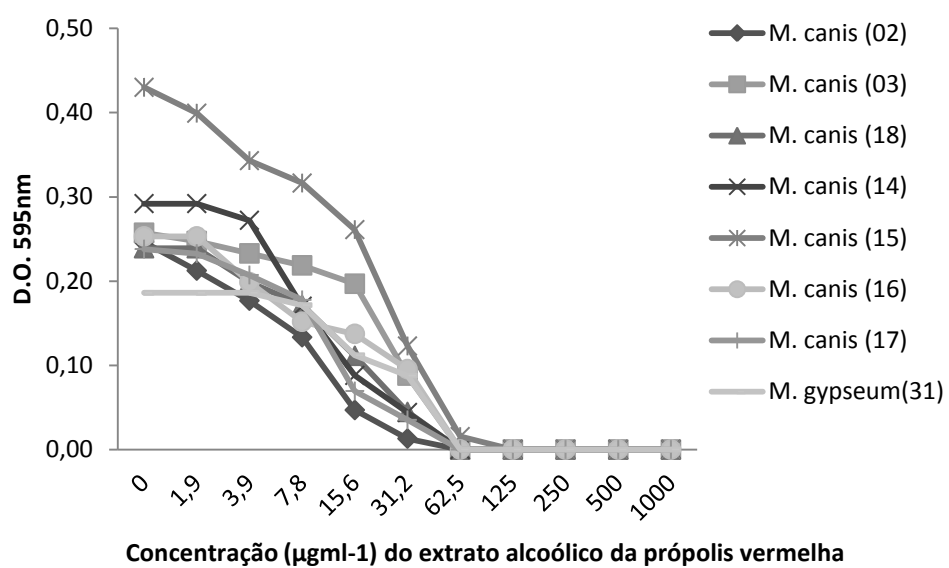


Figura 1 – Curva de inibição do crescimento dos dermatófitos isolados de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário Harmonia e Hospital Veterinário da UFRPE, em Recife-PE, em diferentes concentrações do extrato alcóolico de própolis vermelha brasileira.

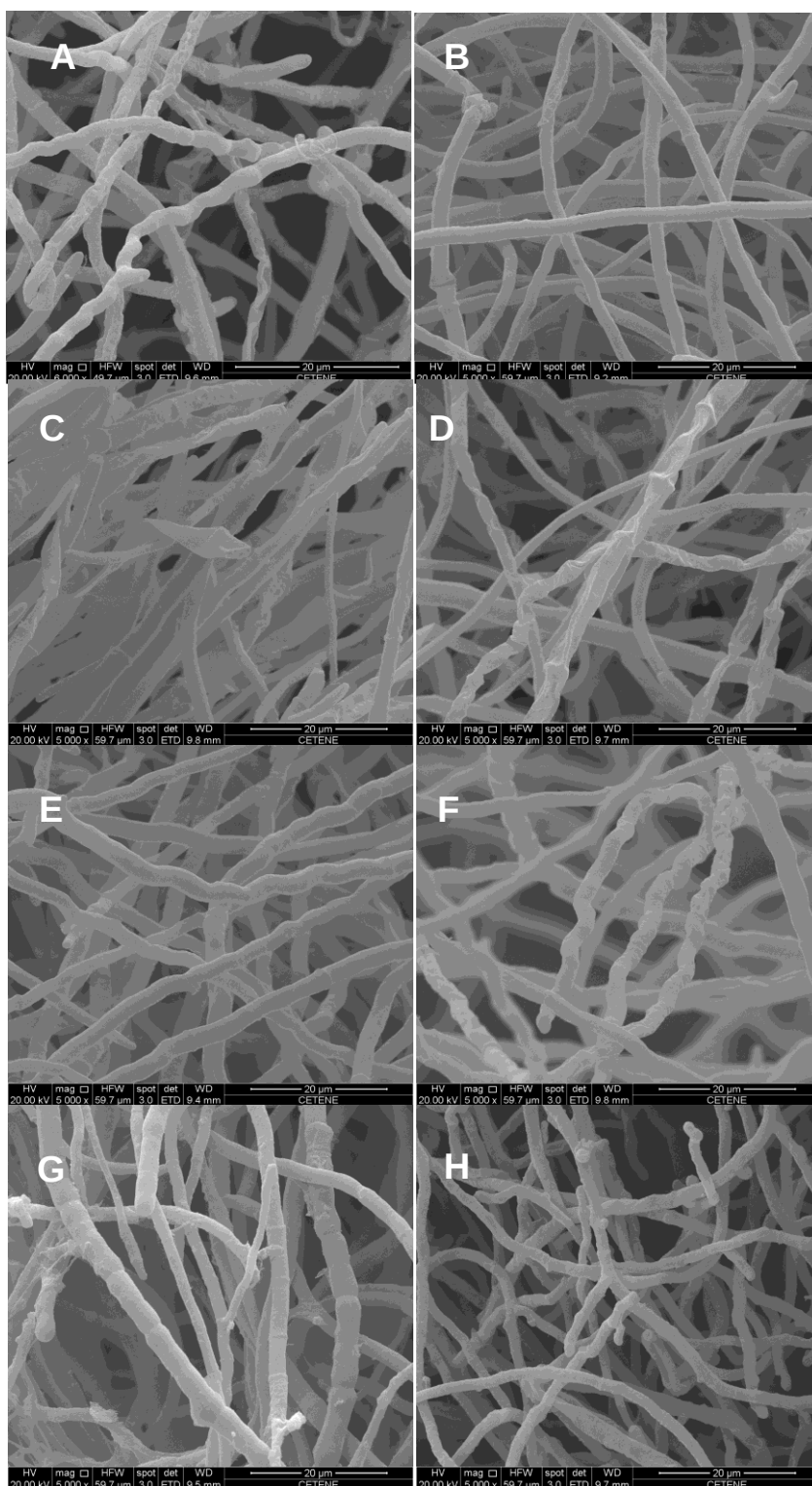


Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura dos isolados de *Microsporium canis* e *M. gypseum*, onde A, C, E e G são as micrografias controle sem própolis e B, D, F e H são as imagens tratadas com a concentração sub-inibitória do extrato alcoólico da própolis vermelha. *M. canis* 02 (A e B); *M. canis* 14 (C e D); *M. canis* 15 (E e F) e *M. gypseum* 31 (G e H).

REFERÊNCIAS

- Agüero, M. B., Gonzalez, M., Lima, B. et al. Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) exudates: phytochemical characterization and antifungal activity. J. Agric. Food Chem. 2010; 58: 194–01.
- Agüero, M. B., Svetaz, L., Sánchez, M. et al. Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC-MS and GC-MS characterization and antifungal activity. Food Chem. Toxicol 2011; 49:1970–8.
- Alencar, S. M., et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. J Ethnopharmacol. 2007; 113: 278–83.
- Araújo, C. R., Miranda, K. C., Fernandes, O. D. F. L. et al. In vitro susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 2009; 51: 9–12.
- Ayres, D.C., Marcucci, M.C., Giorgio, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2007; 102:215–20.
- Cabral, I.S.R., Oldoni, T.L.C., Prado, A. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. Quim. Nova 2009; 32: 1523–27.

Cafarchia, C., Figueredo, L.A., Coccioli, C. et al. Enzymatic activity of *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes* from breeding rabbits with and without skin lesions. *Mycoses* 2011; 55: 45-9.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI): Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos. Norma aprovada, M38-A, v. 22, n. 16. 2002.

Daugusch, A. et al. Brazilian Red Propolis – Chemical Composition and Botanical Origin. *Ecam* 2007; p.1-7.

Fernández-Torres, B., Cabañes, F.J., Carrillo-Muñoz, A.J. et al. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3999-03.

Galgóczy, L., Papp, T., Pócsi, I. In vitro activity of *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) and its combination with fluconazole against different dermatophytes. *Antonie van Leeuwenhoek* 2008; 94:463–70.

Gavanji, S., Asgari, M. J., Vaezi, R. et al. Antifungal effect of the extract of propolis on the growth of three species of *Epidermophyton flucosum*, *Trichophyton violaceum* and *Trichophyton tonsorans* in laboratory environment. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2011; 5:2642–46.

Júnior, W. B., Miranda, E. O., Alvino, V. et al. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* 2012; 33:03-10.

Keller, K. A. Itraconazole. *Journal of Exotic Pet Medicine* 2011; 20: 156–60.

Keller, K. A. Therapeutic Review: Terbinafine. *Journal of Exotic Pet Medicine* 2012; 21:181–85.

Li, F. et al. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. *Bioorgan. Med. Chem* 2008; 16:5434–40.

López, S.N., Furlan, R.L.E., Zacchino, S.A. Detection of antifungal compounds in *Polygonum ferrugineum* Wedd. extracts by bioassay-guided fractionation. Some evidences of their mode of action. *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 138: 633–36.

Martinez-Rossi, N. M., Peres, N.T., Rossi, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia* 2008; 166: 369-83.

Mendonça, L. S., Orellana, S. C., Cardoso, J. C. Influência da coloração de frações cromatográficas na atividade antimicrobiana de própolis vermelha, *Scientia Plena* 2011;7:1–6.

Mello, A. M., Gomes, R. T., Lara, S. R. et al. The effect of brazilian propolis on the germ tube formation and cell wall of *Candida albicans*. *Pharmacologyonline* 2006; 3: 352-58.

Moriello, K. A. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. *Vet. Dermatol.* 2004;15: 99-07.

Mora, M. L. Q., Orozco, A. L., Zárate, C.I. et al. Structural and genetic alterations of fungal cells caused by mexican própolis. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* 2011;1068-73.

Mosquera, J., Sharp, A., Moore, C.B. et al. In vitro interaction of terbinafine with itraconazole, fluconazole, amphotericin B and 5-flucytosine against *Aspergillus* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002; 50: 189-94.

Ngatu, N. R. et al. Antifungal efficacy of Brazilian green propolis extracts and honey on *Tinea capitis* and *Tinea versicolor*. *EUJIM* 2011; 3: 281–87.

Oldoni, T. L. C., Cabral, I. S. R., D'arce, M. A. B. R. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. *Sep. Purif. Technol.* 2011; 77: 208–13.

Ozawa, H., Okabayashi, K., Kano, R. et al. Antifungal activities of the combination of tacrolimus and itraconazole against *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Vet. Med. Sci.* 2005; 67: 629- 30.

Plodpai, P., Chuenchitt, S., Petcharat, V. Anti-*Rhizoctonia solani* activity by *Desmos chinensis* extracts and its mechanism of action. *Crop Protection* 2013; 43: 65-71.

Righi, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. J. Sci. Food. Agric. 2011; 91: 2363–70.

Ríos, J. L., Recio, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol. 2005; 100: 80-4.

Silva, L.B., Oliveira, D.B.C., Da Silva, B. V. et al. Identification and antifungal susceptibility of fungi isolated from dermatomycoses. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol 2013; DOI: 10.1111/jdv.12151.

Silva, B. B. et al. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. eCAM 2008; 5: 313–16.

Siqueira, A. B. S., Gomes, B. S., Cambuim, I. et al. *Trichophyton* species susceptibility to green and red propolis from Brazil. Lett. Appl. Microbiol. 2009; 48: 90–6.

Trusheva, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. eCAM 2006; 3: 249-54.

Zhu, L.-P., Gil-Lamaignere, C., Müller, F.-M.C. Effects of several antifungal drug combinations against clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* from China. Mycoses 2004; 47: 319–25.