

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
dissertação apartir de 26/08/2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



ASPECTOS DA AÇÃO INIBIDORA DE PRÓPOLIS, PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE BACTÉRIAS ESPORULADAS.

ALESSANDRA AGUIRRA SANI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração: Biologia de Parasitas e Microrganismos.

Prof. Associado Ary Fernandes Júnior

Botucatu - SP

Agosto de 2021

Instituto de Biociências - Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ASPECTOS DA AÇÃO INIBIDORA DE PRÓPOLIS, PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE BACTÉRIAS ESPORULADAS.

ALESSANDRA AGUIRRA SANI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração: Biologia de Parasitas e Microorganismos.

Prof. Associado Ary Fernandes Júnior

Botucatu - SP

Agosto de 2021

Instituto de Biociências - Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Sani, Alessandra Aguirra.

Aspectos da ação inibidora de própolis, peptídeos antimicrobianos e compostos majoritários de óleos essenciais sobre bactérias esporuladas / Alessandra Aguirra Sani. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ary Fernandes Júnior

Capes: 20000006

1. Abelhas - Produtos. 2. *Bacillus subtilis*. 3. Própole. 4. Antibióticos peptídicos. 5. Essências e óleos essenciais.

Palavras-chave: *Apis mellifera*; *Bacillus subtilis*; *Paenibacillus alvei*; Sinergismo.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por guiar minhas escolhas, iluminar meus caminhos e ser onipresente em minha vida.

Aos meus pais, Tânia e Gilberto Sani, minha família, que me apoiaram com todo carinho e dedicação em mais essa jornada, e particularmente, minhas pets que estiveram ao meu lado literalmente.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ary Fernandes Júnior, por todo ensinamento, paciência e amizade ao longo desses anos, não poupando esforços para me ajudar e orientar nessa etapa da minha vida, deixo aqui minha eterna gratidão.

À minha amiga Ana Flávia Marques Pereira, que me ajudou desde o primeiro dia com todos os experimentos, além de ser uma pessoa muito especial e companhia para todas as horas e risadas, que com certeza vou levar para minha vida.

Aos amigos do Laboratório Alessandra Furlanetto, Débora Sousa, Tatiane Zapata e Nicolas Ripari, por toda troca de experiências e pelos momentos de descontração.

Aos professores presentes na banca de qualificação e na defesa da dissertação, Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Mores Rall, Prof^a. Dr^a. Sandra de Moraes Gimenes Bosco, Prof^a. Dr^a. Nathalia Cristina Cirone Silva e ao Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi, obrigada por aceitarem o convite e por contribuírem muito para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Sr. Valdir Angelo Paniguel que forneceu a própolis utilizada nesse trabalho.

À Prof^a. Titular Giuseppina Pace Pereira Lima do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas – IBB, pela análise química dos extratos etanólicos de própolis, e as alunas Giovana Monar, Letícia Pereira e Marla Diamante que me auxiliaram com essas análises.

À Prof^a. Luciana Francisco Fleuri do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas -IBB, que gentilmente forneceu as amostras de *B. subtilis* utilizadas no trabalho.

Aos funcionários e amigos do departamento de Ciências Químicas e Biológicas – IBB, sempre muito prestativos e atenciosos, o meu muito obrigada.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil) pela bolsa concedida (processo 88887.482345/2020-00) e a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio à pesquisa (processo 2019/24850-0).

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, e ao Instituto de Biociências de Botucatu, que me proporcionaram a oportunidade de formação e aprendizado.

Enfim, sem a ajuda de todos acima referidos, certamente não tornaria de todo possível a execução e término desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos!

Lista de Figuras

Figura 1 – Fotos ilustrativas dos passos para elaboração da própolis de <i>Apis mellifera</i> até momento prévio ao preparo do derivado da própolis.	18
Figura 2 – Composição da própolis.	19
Figura 3 – Esquema simplificado, mostrando os estágios principais do ciclo de esporulação de <i>Bacillus subtilis</i> .	23
Figura 4 – Fluxograma dos processos de preparos dos três extratos etanólicos de própolis (EEP) utilizados neste estudo.	27
Figura 5 – Esquema das etapas do processo das três formas de extração dos extratos etanólicos de própolis (EEP).	29
Figura 6 – Gráficos dos 3 tempos (0h, 2h e 4h) quanto às concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de proteínas liberadas no sobrenadante, quando expostas a concentrações equivalentes a 1xCIM e a 2xCIM dos diferentes tratamentos para <i>B. subtilis</i> .	41
Figura 7 – Gráficos dos 3 tempos (0h, 2h e 4h) quanto às concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de proteínas liberadas no sobrenadante, quando expostas a concentrações equivalentes a 1xCIM e a 2xCIM dos diferentes tratamentos para <i>P. alvei</i> .	42
Figura 8 – Representação gráfica dos constituintes celulares absorvíveis a 260 nm liberados de <i>B. subtilis</i> após tratamento com produtos em estudo nas concentrações de 1xCIM e 2xCIM.	43
Figura 9 – Representação gráfica dos constituintes celulares absorvíveis a 260 nm liberados de <i>P. alvei</i> após tratamento com produtos em estudo nas concentrações de 1xCIM e 2xCIM.	44

- Figura 10** – Representação gráfica da liberação de íons potássio de *B. subtilis* e *P. alvei* após tratamento com produtos em estudo nas concentrações de 1xCIM e 2xCIM nos tempos 0 e 4 horas. 45
- Figura 11** – Representação gráfica da liberação de íons fosfato de *B. subtilis* e *P. alvei* após tratamento com produtos em estudo nas concentrações de 1xCIM e 2xCIM nos tempos 0 e 4 horas. 46
- Figura 12** – Valores obtidos para DO (600 nm) e para Log de UFC/mL, e obtenção de curvas de sobrevivência para verificação do efeito sinérgico entre os produtos em estudo (EEP's, peptídeos antimicrobianos e compostos majoritários) e a tetraciclina, testados de forma isolada e em combinação com a tetraciclina sobre *B. subtilis*. 48
- Figura 13** – Valores obtidos para DO (600 nm) e para Log de UFC/mL, e obtenção de curvas de sobrevivência para verificação do efeito sinérgico entre os produtos em estudo (EEP's, peptídeos antimicrobianos e compostos majoritários) e a tetraciclina, testados de forma isolada e em combinação com a tetraciclina sobre *P. alvei*. 49

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Valores obtidos para os parâmetros de caracterização química dos extratos etanólicos de própolis.	35
Tabela 2 – Valores obtidos ($\mu\text{g/mL}$) para Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para todos os antimicrobianos testados utilizando a metodologia da microdiluição.	36
Tabela 3 – Valores dos percentuais de redução (%) obtidos pela contagem de esporos que germinaram após 24 horas de contato com os tratamentos para as bactérias <i>B. subtilis</i> e <i>P. alvei</i> e as respectivas concentrações ($\mu\text{g/mL}$).	38
Tabela 4 – Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de proteínas liberadas de <i>B. subtilis</i> nos tempos 0h, 2h e 4h em concentrações correspondentes aos valores de uma e duas vezes o valor de CIM.	40
Tabela 5 – Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de proteínas liberadas de <i>P. alvei</i> nos tempos 0h, 2h e 4h em concentrações correspondentes aos valores de uma e duas vezes o valor de CIM.	41
Tabela 6 – Concentrações (mg/L) de íons potássio liberados de <i>B. subtilis</i> e <i>P. alvei</i> nos tempos 0h e 4h em concentrações correspondentes aos valores de uma e duas vezes o valor de CIM.	45
Tabela 7 – Concentrações (mg/L) de íons fosfato liberados de <i>B. subtilis</i> e <i>P. alvei</i> nos tempos 0h e 4h em concentrações correspondentes aos valores de uma e duas vezes o valor de CIM.	46

Lista de Abreviaturas

BHI	Infusão de Cérebro e Coração
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CPA	Cria Pútrida Americana
CPE	Cria Pútrida Europeia
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EEP	Extrato Etanólico de Própolis
<i>EFB</i>	<i>European foulbrood</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
KCl	Cloreto de Potássio
M+M	Dupla Maceração
M+U	Maceração associada ao uso de banho ultrassônico - Maceração/Ultrasonicação
MnCl ₂	Cloreto de Manganês
PBS	Tampão Fosfato Salino
REMA	Resazurin Microtiter Assay Plate
U+U	Dupla Ultrasonicação em banho ultrassônico
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UI	Unidades Internacional
UV	Ultravioleta

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
g	Grama
G	Gravitacional
h	Hora
L	Litro
Log	Logaritmo
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro

Sumário	Página
Resumo.....	13
Abstract.....	14
1. <i>Introdução</i>	15
2. <i>Revisão Bibliográfica</i>	16
3. <i>Objetivos</i>	25
3.1 <i>Objetivo geral</i>	25
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	25
4. <i>Material e métodos</i>	25
4.1 <i>Obtenção da própolis e preparo dos extratos etanólicos</i>	25
4.2 <i>Peptídeos antimicrobianos e compostos majoritários de óleos essenciais</i>	29
4.3 <i>Análise química dos EEP's e ação antioxidante</i>	30
4.4 <i>Testes de sensibilidade bacteriana</i>	30
4.4.1 <i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)</i>	30
4.4.2 <i>Ensaio para verificação de interações (sinergismo) pela metodologia da curva de sobrevivência</i>	31
4.5 <i>Ação anti-esporo das bactérias testadas</i>	32
4.5.1 <i>Obtenção das bactérias estudadas na forma esporulada</i>	32
4.5.2 <i>Ensaio para ação anti-esporo</i>	33
4.6 <i>Efluxo de íons potássio e fosfato</i>	33
4.7 <i>Liberação de proteínas através da membrana</i>	34
4.8 <i>Integridade da membrana celular</i>	34
5. <i>Análise estatística</i>	34
6. <i>Resultados e discussão</i>	35
6.1 <i>Compostos fenólicos totais, flavonoides e ação antioxidante</i>	35
6.2 <i>Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida..... Mínima (CBM)</i>	36
6.3 <i>Ação anti-esporo</i>	38

6.4 Liberação de proteínas.....	40
6.5 Integridade da membrana celular.....	43
6.6 Efluxo de íons potássio e fosfato.....	44
6.7 Sinergismo entre os antimicrobianos testados e a tetraciclina.....	48
7. Conclusões.....	50
8. Referências bibliográficas	52
9. Apêndice.....	61

Resumo

A própolis desde muito tempo é estudada visando elucidar suas inúmeras propriedades biológicas. Os preparados à base de própolis, especialmente de *Apis mellifera*, são utilizados na elaboração de fitoterápicos além de matéria prima em alguns setores da indústria de alimentos e cosméticos. Nesse estudo buscou-se testar ações antimicrobianas dos extratos etanólicos de própolis (EEP) considerando três formas de preparo, Dupla Ultrasonicação em banho ultrassônico (U+U), Dupla Maceração (M+M) e Maceração associada a Ultrasonicação (M+U), além dos peptídeos antimicrobianos melitina e nisina, dos compostos majoritários presentes nos óleos essenciais da canela (cinamaldeído - *Cinnamomum zeylanicum*) e do cravo da Índia (eugenol - *Syzygium aromaticum*) bem como do antibiótico tetraciclina, sobre isolado de *Bacillus subtilis* (isolado de solo) e *Paenibacillus alvei* (ATCC 6344), este último, importante patógeno para larvas de abelhas contribuindo para ocorrência da doença conhecida como Cria Pútrida Europeia (CPE). Foram testadas ação anti-esporo, atividade inibidora pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) utilizando a metodologia da microdiluição (Resazurin Microtiter Assay – REMA). Verificou-se também a ação dos EEP's, peptídeos antimicrobianos e compostos majoritários sobre membrana plasmática bacteriana, integridade bem como permeabilidade, através dos ensaios de liberação de proteínas por meio da metodologia de Bradford, liberação de ácidos nucleicos, e ensaios de efluxo de íons potássio e fosfato. Também foi avaliado o efeito sinérgico dos antimicrobianos naturais com a tetraciclina, determinados pela metodologia *time kill curve* visando a potencialização da eficácia destes produtos. Os três modos de preparo dos EEP's apresentaram semelhante atividade antimicrobiana, com valores análogos de CIM e CBM, 156,25 µg/mL para *B. subtilis*, e 78,12 µg/mL para *P. alvei*, exceto para o extrato etanólico M+U que apresentou valor de 156,25 µg/mL para CBM. Observou-se que os peptídeos melitina e nisina apresentaram melhor atividade frente a *B. subtilis* com valores de CIM de 12,00 µg/mL e 37,50 µg/mL respectivamente, bem como CBM de 28,0 µg/mL para melitina e 37,5 µg/mL para nisina. Para *P. alvei* todos os produtos mostraram efeitos similares de ação antimicrobiana seja de efeitos bactericida ou bacteriostático, exceto o eugenol, que mostrou menor atividade. Quanto a ação anti-esporo, nota-se que *P. alvei* apresentou uma maior resistência aos produtos testados quando comparados a *B. subtilis*. Melitina e nisina foram os produtos que mostraram maior capacidade de redução de esporos em menores concentrações, sendo que para *B. subtilis* obteve-se 100% redução em concentrações de 6,25 µg/mL e 0,78 µg/mL respectivamente, e para *P. alvei*, redução foi de 93% para a melitina e 98% para nisina, em concentrações de 80 µg/mL e 15 µg/mL respectivamente. Quanto aos testes de liberação de proteínas, foi possível observar um aumento gradual das concentrações de proteínas extravasadas em função do tempo para todos os tratamentos, sendo que para *B. subtilis*, os EEP's e os peptídeos antimicrobianos mostraram maior liberação de proteínas, e para *P. alvei*, os EEP's foram os tratamentos que apresentaram melhor efeito na liberação proteica. Foi possível observar a liberação de ácidos nucleicos após 4 horas de tratamento com os produtos em estudo, indicando assim danos a membrana celular bacteriana. Os ensaios de efluxo de íons fosfato mostraram melhor atividade da melitina junto às bactérias em estudo, com resultados de liberação variando de 10 mg/L para 50 mg/L na concentração de 2xCIM para *B. subtilis*, e de 10 mg/L para 25 mg/L nas concentrações 1xCIM e 2xCIM, sobre *P. alvei*. Para os ensaios de efluxo de íons potássio, os três métodos de preparo dos EEP's apresentaram resultados semelhantes, com liberação de 450 mg/L na concentração de 2xCIM após 4 horas, para *B. subtilis* e *P. alvei*. Os resultados obtidos com a metodologia da *time kill curve* mostraram sinergismo entre todos os antimicrobianos testados e a tetraciclina, para ambas as bactérias. Pretendeu-se esclarecer a ação dos produtos em estudo, sobre bactérias esporuladas com intuito de se obter um antibacteriano com uso potencial no manejo de apiários de abelha *Apis mellifera*, especialmente contra a doença da Cria Pútrida Europeia também conhecida como Loque Europeia, e sendo assim, pode-se concluir, que os EEP's, os peptídeos antimicrobianos e os compostos majoritários utilizados no estudo, apresentam atividade antimicrobiana e ação junto a membrana celular bacteriana, e que todos os produtos testados possuem potencial como futuros agentes antimicrobianos, com destaque aos peptídeos melitina e nisina por sua atividade anti-esporo.

Palavras Chaves- *Paenibacillus alvei*, *Bacillus subtilis*, *Apis mellifera*, Melitina, Nisina, Eugenol, Cinamaldeído, Tetraciclina, Sinergismo.

Abstract

Propolis has been studied for a long time in order to elucidate its many biological properties. Propolis-based preparations, especially *Apis mellifera*, are used in the preparation of herbal medicines as well as raw material in some sectors of the food and cosmetics industry. In this study, we aim to test the antimicrobial actions of ethanolic extracts of propolis (EEP) considering three procedures of preparation such as Double Ultrasonication in an ultrasonic bath (U+U), Double Maceration (M+M) and Maceration associated with Ultrasonication (M+U), in addition to the antimicrobial peptides mellitin and nisin, the major compounds present in the essential oils of cinnamon (cinnamaldehyde – *Cinnamomum zeylanicum*) and clove (eugenol – *Syzygium aromaticum*) as well as the antibiotic tetracycline, against *Bacillus subtilis* isolate (isolated from soil) and *Paenibacillus alvei* (ATCC 6344) strains, the latter, an important pathogen for bee larvae, contributing to the occurrence of the disease known as European Foulbrood (EFB). Anti-spore action and inhibitory activity were tested by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal (CBM) using the microdilution methodology (Resazurin Microtiter Assay – REMA). It was also verified the action of EEP's, antimicrobial peptides and major compounds on bacterial plasmatic membrane, integrity as well as permeability, through protein release assays using the Bradford methodology, nucleic acid release and efflux assays of potassium and phosphate ions. The synergistic effect of natural antimicrobials with tetracycline was also evaluated, determined by the *time kill curve* methodology, aiming at enhancing the effectiveness of these products. The three modes of preparation of EEP's showed similar antimicrobial activity, with analogous MIC and CBM values, 156.25 µg/mL for *B. subtilis*, and 78.12 µg/mL for *P. alvei*, except for the M+U ethanol extract that presented a value of 156.25 µg/ml for CBM. It was observed that the peptides mellitin and nisin showed better activity against *B. subtilis* with MIC values of 12.00 µg/mL and 37.50 µg/mL respectively, and CBM of 28.00 µg/mL for melittin and 37.50 µg/ml for nisin. For *P. alvei*, all products showed similar antimicrobial effects, whether bactericidal or bacteriostatic, except for eugenol, which showed lower activity. As for the anti-spore action, it is noted that *P. alvei* has a greater resistance to the products tested when compared to *B. subtilis*. Melittin and nisin were the products with greatest spore reduction capacity at lower concentrations, and for *B. subtilis* there was 100% reduction at concentrations of 6.25µg/mL and 0.78 µg/mL respectively, and for *P. alvei*, reduction was 93% with melittin and 98% for nisin, at concentrations of 80 µg/ml and 15 µg/ml respectively. As for the protein release tests, it was possible to observe a gradual increase in extravasated protein concentrations as a function of time for all treatments, and for *B. subtilis*, EEP's and antimicrobial peptides showed greater protein release, and for *P. alvei*, EEP's were the treatments that showed the best effect on protein release. It was possible to observe the release of nucleic acids after 4 hours of treatment with the products under study, thus indicating damage to the bacterial cell membrane. Phosphate ion efflux showed better mellitin activity with the bacterias under study, with release results ranging from 10 mg/L to 50 mg/L at a concentration of 2xCIM for *B. subtilis*, and from 10 mg/L to 25 mg/L at concentrations 1xCIM and 2xCIM, for *P. alvei*. For the potassium ion efflux assays, the three methods of preparation of EEP's obtained similar results, with a release of 450 mg/L at a concentration of 2xMIC after 4 hours, for *B. subtilis* and *P. alvei*. The results from the *time kill curve* assays showed synergism between all tested antimicrobials and tetracycline on both bacteria. It was intended to clarify the action of the products on sporulated bacteria in order to obtain an antibacterial with potential use in the management of apiaries with *Apis mellifera* bee, especially against the European foulbrood disease, and thus, it can be concluded that the EEP's, the antimicrobial peptides and the major compounds used in the study, have antimicrobial activity and action on the bacterial cell membrane, and that all tested products have potential as future antimicrobial agents with emphasis on melittin peptides and nisin for its anti-spore activity.

Key words: *Paenibacillus alvei*, *Bacillus subtilis*, *Apis mellifera*, Melittin, Nisin, Eugenol, Cinnamaldehyde, Tetracycline, Synergism.

1. Introdução

O amplo uso de fármacos antimicrobianos tem contribuído para a seleção, e com isto o surgimento de micro-organismos resistentes aos fármacos convencionais, resultando em um problema de saúde pública, pois as doenças causadas por estes patógenos ampliam os índices de morbidade e mortalidade das populações, tanto para humanos como para animais.

Nesse contexto, é perceptível o crescimento no número de pesquisas nas áreas de produtos naturais, pois sabe-se que esses produtos, a exemplo da própolis de *Apis mellifera*, como também dos óleos essenciais e extratos de espécies vegetais, tem revelado múltiplas propriedades biológicas com potencial reduzido de toxicidade além de potencialmente também mais aceitos pela população em geral.

Segundo reportado pela Embrapa (Lopes et al, 2004), no que diz respeito a enfermidades e inimigos naturais das abelhas, a ocorrência de doenças nas colmeias pode acarretar prejuízos diretos pela diminuição da produtividade uma vez que o aumento da mortalidade, tanto de crias como de abelhas adultas, leva a uma redução da população da colônia com consequente redução na produção. Em casos mais graves, o apicultor poderá perder enxames, já que as abelhas africanizadas costumam abandonar as colmeias quando a população se torna reduzida e na ocorrência de muita cria morta.

Diversas são as doenças que afetam as colônias de abelhas em todo o mundo, tanto as crias quanto as abelhas adultas. Elas são causadas por micro-organismos (bactérias, fungos, vírus e protozoários) e animais, como ácaro e besouro. Sem controle das doenças, as colmeias podem sofrer perdas enormes em sua população e, casos graves de infestação podem dizimá-las. Por isso, os apicultores precisam saber reconhecer essas ameaças a tempo e evitar a propagação.

De acordo com Djordjevic et al (2000), o *Paenibacillus alvei* é uma bactéria com capacidade de formar esporos sendo frequentemente isoladas em meios de culturas. O *P. alvei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Achromobacter eurydice* são também frequentemente isolados de larvas doentes de abelhas do mel (*Apis mellifera*) quando colônias estão infectadas com *Melissococcus pluton*, agente causador da *European foulbrood (EFB)* (podridão europeia ou loque europeia). Segundo ainda os autores, na Austrália por exemplo, o *P. alvei* era o terceiro isolado mais comum em colmeias de abelhas do mel, enquanto *E. faecalis*, *E. faecium* e *A. eurydice* eram raramente isolados em colmeias acometidas por loque europeia. Finalmente, o *P. alvei* também pode produzir sinais em larvas que são similares aqueles produzidos por *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae*, agente este responsável pela *American foulbrood* (loque americana, podridão americana) que é outra importante doença em abelhas *Apis mellifera*.

O *Bacillus subtilis* é outro exemplo de bactéria formadora de esporos. Pode-se destacar o seu uso potencial como agente de controle de patógenos em plantas bem como biossurfactantes

(Kaspar; Neubauer; Gimpel, 2019). Muito do que se sabe sobre o processo de esporulação de bactérias se deve a pesquisas realizadas com *B. subtilis*, sendo esse considerado um organismo modelo em estudo do gênero (Stewart, 2015)

Feitas as considerações anteriores, neste estudo verificou-se se alguns produtos antimicrobianos naturais, sendo estes, extratos etanólicos de própolis de *Apis mellifera*, peptídeos antimicrobianos (nisina e melitina) e compostos majoritários presentes em óleos essenciais (cinamaldeído e eugenol) apresentam ação eficiente sobre duas bactérias (*Paenibacillus alvei* e *Bacillus subtilis*) em especial sobre as respectivas formas esporuladas destas bactérias, bem como também testar alguns possíveis mecanismos de ação destes produtos e compostos.

2. Revisão bibliográfica

Desde a antiguidade, as abelhas são valorizadas pelos seus produtos e admiradas pelo seu comportamento. Elas já foram desenhadas em quadros e pinturas em cavernas, descritas em manuscritos, livros científicos, líricos, cunhas em medalhas, bijuterias, moedas e objetos de barro. Supõe-se que os egípcios foram os pioneiros na apicultura – arte de criar abelhas – tendo o mel sido considerado um medicamento popular com participação em um número expressivo de remédios utilizados naquela época (Couto & Couto, 2006).

As abelhas são responsáveis por inúmeros benefícios ambientais e exercem papel fundamental para o equilíbrio da vida no planeta Terra. Sendo elas responsáveis por grande parte da polinização, o declínio no número e em espécies de abelhas, acarreta inúmeros prejuízos globais, uma vez que a alimentação da população depende dessa ação polinizadora (Potts et al., 2016). Tais causas responsáveis por perdas e declínio relacionado a população de abelhas são especialmente as mudanças climáticas, uso de pesticidas e os patógenos (Soroye, Newbold e Kerr (2020).

As abelhas mais utilizadas comercialmente pertencem ao gênero *Apis* (Hymenoptera, Apidae). Considerando a importância quanto a produção de derivados da colmeia, a espécie *Apis mellifera* é a mais conhecida e utilizada comercialmente. Segundo Wiese (2005), a *A. mellifera* L. foi introduzida no Brasil no ano de 1839 vinda de Portugal. Na sequência, e com a chegada dos imigrantes europeus, no ano de 1845, houve a introdução de uma raça alemã denominada *A. mellifera mellifera*, conhecida como abelha alemã ou preta. Entre 1870 e 1880, houve outra entrada de abelha no país sendo esta de raça italiana denominada *A. mellifera ligustica* e, finalmente em 1956, a introdução da raça africana denominada *A. mellifera scutellata*. A consequência destas introduções, e repetidos cruzamentos, é que há no Brasil atualmente um poli

8. Referências Bibliográficas

ABDULLAH, N.A.; JA'AFAR, F.; YASIN, H. M.; TAHA, H.; PETALCORIN, M. I. R.; MAMIT, M. H.; KUSRINI, E.; USMAN, A. Physicochemical analyses, antioxidant, antibacterial, and toxicity of propolis particles produced by stingless bee *Heterotrigona itama* found in Brunei Darussalam. **Heliyon**, v. 5, n. 9, p. e02476, 2019.

ALANAZI, S.; ALNOMAN, M.; BANAWAS, S.; SAITO, R.; SARKER, M. R. The inhibitory effects of essential oil constituents against germination, outgrowth and vegetative growth of spores of *Clostridium perfringens* type A in laboratory medium and chicken meat. **Food Microbiology**, v. 73, p. 311-318, 2018.

ALVES, F. C. B.; ALBANO, M.; ANDRADE, B. F. M. T.; CHECHI, J. L.; PEREIRA, A. F. M.; FURLANETTO, A.; RALL, V. L. M.; FERNANDES, A. A. H.; SANTOS, L. D.; BARBOSA, L. N.; FERNANDES JUNIOR, A. Comparative proteomics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* subjected to synergistic effects of the lantibiotic nisin and oxacilin. **Microbial Drug Resistance**, v.26, p. 179-189, 2020.

ANANDARAJ, B.; VELLAICHAMY, A.; KACHMAN, M.; SELVAMANIKANDAN, A.; PEGU, S.; MURUGAN, V. Co-production of two new peptide antibiotics by a bacterial isolate *Paenibacillus alvei* NP75. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 379, p. 179–185, 2009.

ANDRADE, J. K. S.; DENANDAI, M.; OLIVEIRA, C. S.; NINES, M. L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129-138, 2017.

BAJPAL, V. K.; SHARMA, A.; MOON, B.; BAEK, K. H. Chemical Composition Analysis and Antibacterial Mode of Action of T axis Cuspidata Leaf Essential Oil against Foodborne Pathogens. **Journal of food safety**, v. 34, n. 1, p. 9-20, 2014.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 3, p. 3-5, 2000.

BANKOVA, V.; TRUSHEVA, B.; POPOVA, M. Propolis extraction methods: A review. **Journal of Apicultural Research**, p. 1-10, 2021.

BEAUREPAIRE, A.; PIOT, N.; DOUBLET, V.; ANTUNEZ, K.; CAMPBELL, E.; CHANTAWANNAKUL, P.; CHEJANOVSKY, N.; GAJDA, A.; HEERMAN, M.; PANZIERA, D.; SMAGGHE, G.; YAÑEZ, O.; MIRANDA, J. R.; DALMON, A. Diversity and global distribution of viruses of the western honey bee *Apis mellifera*. **Insects**, v. 11, n. 4, p. 239, 2020.

BELWAL, T.; EZZAT, S. M.; RASTRELLI, L.; BHATT, I. D.; DAGLIA, M.; BALDI, A.; DEVKOTA, H. P.; ORHAN, I. E.; PATRA, J. K.; DAS, G.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; GOMEZ-GOMEZ, L.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M.; ATANASOV, A. G. A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p. 82-102, 2018.

BONCRISTIANI, H.; ELLIS, D. J.; BUSTAMANTE, T.; GRAHAM, J.; CAMERON, J.; KIMELL, C. B.; MORTENSEN, A.; SCHMEHL, D. R. World honey bee health: The global

distribution of western honey bee (*Apis mellifera* L.) pests and pathogens. **Bee World**, v. 98, n. 1, p. 2-6, 2020.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRIDI, R.; MONTENEGRO, G.; NUÑES-QUIJADA, G.; GIORDANO, A.; MORÁN-ROMERO, F. M.; JARA-PEZOA, I.; SPEISKY, H.; ATALA, E.; LÓPEZ-ALARCÓN, C.; International regulations of propolis quality: Required assays do not necessarily reflect their polyphenolic-related in vitro activities. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 6, p. C1188-C1195, 2015.

BROWN, K. L. Control of bacterial spores. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 1, p. 158-171, 2000.

CASTEELS, P.; AMPE, C.; RIVIERE, L.; DAMME, J.; ELICONE, C.; FLEMING, M.; JACOBS, F.; TEMPST, P. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). **European Journal of Biochemistry**, v. 187, n. 2, p. 381-386, 1990.

CHAN, W. C.; DODD, H. M.; HORN, N.; MACLEAN, K.; LIAN, L. Y.; BYCROFT, B. W.; GASSON, M. J.; ROBERTS, G. C. K. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2966-2969, 1996.

CINTAS, L. M.; CASSAUS, M. P.; HERRANZ, C.; NES, I. F.; HERNÁNDEZ, P. E. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 4, p. 281-305, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement. CLSI Document M100-S25, WAYNE, P.A.: CLSI, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, M07-ED11:2018 11th Edition.

COHEN, I.; RON, I. G.; BEN-JACOB, E. From branching to nebula patterning during colonial development of the *Paenibacillus alvei* bacteria. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 286, n. 1-2, p. 321-336, 2000.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**. 11: 95-105, 2013.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: Manejo e Produtos**. 3ª edição. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 193 p.

DEMPSEY, C. E. The actions of melittin on membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1031, n. 2, p. 143-161, 1990.

DEZMIREAN, D. S.; MĂRGHITAȘ, L. A.; CHIRILĂ, F.; COPACIU, F.; SIMONCA, V.; BOBIȘ, O.; ERLER, S. Influence of geographic origin, plant source and polyphenolic substances

on antimicrobial properties of propolis against human and honey bee pathogens. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 5, p. 588-597, 2017.

DJORDJEVIC, S. P.; FORBES, W. A.; SMITH, L. A.; HORNITZKY, M. A. Genetic and biochemical diversity among isolates of *Paenibacillus alvei* cultured from Australian honeybee (*Apis mellifera*) colonies. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, n. 3, p. 1098-1106, 2000.

DJUKIC, M.; BECKER, D.; POEHLEIN, A.; VOGET, S.; DANIEL, R. Genome sequence of *Paenibacillus alvei* DSM 29, a secondary invader during European Foulbrood Outbreaks. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 22, p. 6365, 2012.

DOSLER, S.; KARAASLAN, E.; ALEV, G. A. Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. **Journal of Chemotherapy**, v. 28, n. 2, p. 95-103, 2016.

DOUBLET, V., LABARUSSIAS, M., DE MIRANDA, J. R., MORITZ, R. F., & PAXTON, R. J. Bees under stress: Sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. **Environmental microbiology**, v. 17, n. 4, p. 969-983, 2015.

DUMAN, M.; ÖZPOLAT, E. Effects of water extract of propolis on fresh shibuta (*Barbus grypus*) fillets during chilled storage. **Food Chemistry**, v. 189, p. 80-85, 2015.

ERRINGTON, J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 117-126, 2003.

ESCRICHE, I.; JUAN-BORRÁS, M. Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. **Food Research International**, v.106, p. 834-841, 2018.

EVELYN, E., SILVA, F. V. M. Differences in the resistance of microbial spores to thermosonication, high pressure thermal processing and thermal treatment alone. **Journal of Food Engineering**, v. 222, p. 292–297, 2018.

FAN, L.; HOU, F.; MUHAMMAD, A. I.; RUILING L. V.; WATHARKAR, R. B.; GUO, M.; DING, T.; LIU, D. Synergistic inactivation and mechanism of thermal and ultrasound treatments against *Bacillus subtilis* spores. **Food Research International**. v. 116, p. 1094–1102, 2019.

FERNANDES JÚNIOR, A.; BALESTRIN, E.C.; BETONI, J.E.C.; ORSI, R.O.; CUNHA, M.L.R.S.; MONTELLI, A.C. Própolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 563-566, 2005.

FERNANDES JÚNIOR, A. Produtos antimicrobianos naturais: potencial de uso na terapêutica das doenças infecciosas e como aditivos em alimentos / Ary Fernandes Junior. - Botucatu : [s.n.], 2012 Tese (livre-docência) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu.

FERNANDES JÚNIOR., A.; LEOMIL, L.; FERNANDES A. A. H.; SFORCIN, J. M. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. **The Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.7, n.2, p.173-82, 2001.

FERNANDES JÚNIOR, A.; SUGIZAKI, M.F.; FOGO, M.L.; FUNARI, S.R.C.; LOPES, C.A.M. *In vitro* activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 1, p. 63-65, 1995.

FORSQREN, E. European foulbrood in honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. S5-S9, 2010.

GHASEMI, K.; GHASEMI, Y.; EBRAHIMZADEH, M. A. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 277-281, 2009.

GONZÁLEZ, M. J.; MARIOLI, J. M. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American Foulbrood. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, n. 3, p. 209-213, 2010.

GUT, I. M.; BLANKE, S. R.; VAN DER DONK, W. A. Mechanism of inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by the lantibiotic nisin. **ACS Chemical Biology**, v. 6, n. 7, p. 744-752, 2011.

GUTIÉRREZ-CORTÉS, C.; SUAREZ MAHECHA, H. Antimicrobial activity of propolis and its effect on the physicochemical and sensorial characteristics in sausages. **Vitae**, v. 21, n. 2, p. 90-96, 2014.

HABERMANN E. 1972. Bee and wasp venoms. **Science**, 177: 314-322, 1972

HASSAN, H. M.; JIANG, Z. H.; ASMUSSEN, C.; MCDONALD, E.; QIN, W. Antibacterial activity of northern Ontario medicinal plant extracts. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 94, n. 2, p. 417-424, 2014.

HENRIQUES, A. O.; MORAN JR, C. P. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 555-588, 2007.

HOLLMANN, A.; MARTINEZ, M.; MATURANA, P. SEMORILE, L. C.; MAFFIA, P. C. Antimicrobial peptides: interaction with model and biological membranes and synergism with chemical antibiotics. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 204, 2018.

HUANG, S.; ZHANG, C. P.; WANG, K.; LI, G. Q.; HU, F. L. Recent advances in the chemical composition of propolis. **Molecules Basel Switz**, v. 19, n. 12, p. 19610-19632, 2014.

INOUE, H.T.; SOUSA, E. A.; ORSI, R. O.; FUNARI, S. R. C., BARRETO, L. M. R. C.; DIB, A. P. S. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**. Vol 15, número 2: 65-69. 2007

ITAGIBA, M. G. O. R. **Noções básicas sobre a criação de abelhas**. São Paulo: Nobel, 1997.

KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S. J.; TROULLIDOU, E.; MOURTZINOS, I.; KARATHANOS, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food chemistry**, v. 116, n. 2, p. 452-461, 2009.

KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. Eugenol-from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6953-6981, 2012.

KASPAR, Felix; NEUBAUER, Peter; GIMPEL, Matthias. Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review. **Journal of natural products**, v. 82, n. 7, p. 2038-2053, 2019.

KAUR, K.; KAUSHAL, S. Phytochemistry and pharmacological aspects of *Syzygium aromaticum*: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, p. 398-406, 2019.

KOVÁCS, Á. T. *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 724-725, 2019.

LACERDA, F. G. Mecanismos de defesa em insetos sociais contra Patógenos. **Revista Educação, Meio Ambiente e Saúde**, v. 4, p. 31-50, 2009.

LANGEVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J. A.; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical reviews in microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76-94, 2014.

LEE, J. Y; KIM, Y. S.; SHIN, D. H. Antimicrobial synergistic effect of linolenic acid and monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 7, p. 2193-2199, 2002.

LEE, M. T.; SUN, T. L.; HUNG, W. C.; HUANG, H. W. Process of inducing pores in membranes by melittin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 35, p. 14243-14248, 2013.

LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. 13ª edição. Brasil: McGraw Hill, 2016. 11-13 p.

LIU, J.; XIAO, S.; LI, J.; YUAN, B.; YANG, K.; MA, Y. Molecular details on the intermediate states of melittin action on a cell membrane. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1860, n. 11, p. 2234-2241, 2018.

LOPES, M.T.R., GONÇALVES, J.C., MESSAGE, D., PEREIRA, F.M., CAMARGO, R.C.R. Doenças e inimigos naturais das abelhas. **Documentos** 103, 26 pagina, dezembro de 2004. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/36207/1/Doc103.pdf> (disponível em 26/07/2021)

LV, F.; LIANG, H.; YUAN, Q.; LI, C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 3057-3064, 2011.

MAHFOUZ, H. M.; EL-BASSIONY, M. N.; EL-BOLOK, D. M.; MOHAMED, W. F. Antibacterial Activities of Honeybee Venom Produced under Different Storage Conditions. **Journal of Plant Protection and Pathology**, v. 11, n. 12, p. 621-625, 2020.

MANTOVANI, R.P.; RALL, V.L.M.; BATALHA, J.E.N.; FERNANDES, A.A.H.; FERNANDES JÚNIOR, A. Anti-coagulase-negative *Staphylococcus* activity of ethanolic extracts of própolis from two Brazilian regions and synergism with antimicrobial drugs by E-Test method. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.14, p.357-365, 2008

MARCHESE, A.; BARBIERI, R.; COPPO, E.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; NABAVI, S. F.; IZADI, M.; ABDOLLAHI, M.; NABAVI, S. M.; AJAMI, M. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 668-689, 2017.

MARTIN, A.; CAMACHO, M.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J. C. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: Rapid, Simple, and inexpensive method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3616-3619, 2003.

MAZZA P. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v.133, n.1, p.3-18, 1994.

MCAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS microbiology reviews**, v. 25, n. 3, p. 285-308, 2001.

MEMARIANI, H.; MEMARIANI, M.; SHAHIDI-DADRAS, M.; NASIRI, S.; AKHAVAN, M. M.; MORAVVEJ, H. Melittin: From honeybees to superbugs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 8, p. 3265-3276, 2019.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents, approved guideline M26-A. Wayne PA: **NCCLS**; 1999.

NELSON, M. L.; LEVY, S. B. The history of the tetracyclines. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1241, n. 1, p. 17-32, 2011.

ORSI, R. O.; FUNARI, S. R. C.; SOARES, A. M. V. C.; CALVI, A. S.; OLIVEIRA, S. L.; SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 6, p. 205-219, 2000.

ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C.; FERNANDES JÚNIOR, A.; RODRIGUES, P.; BANKOVA, V. Effects of própolis from Brazil and Bulgaria on *Salmonella* serovars. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, p. 748-757, 2007.

PARK, Y. K.; HIKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.

PAUL, C.; FILLIPPIDOU, S.; JAMIL, I.; KOOLI, W.; HOUSE, G. L. ESTOPPEY, A.; HAYOZ, M. JUNIER, T.; PALMIERI, F.; WUNDERLIN, T.; LEHMANN, A.; BINDSCHEDLER, S.; VANNEMANN, T.; CHAIN, P. S. G.; JUNIER, P. Bacterial spores, from ecology to biotechnology. **Advances in applied microbiology**, v. 106, p. 79-111, 2019.

PELLEGRINI, M. C.; ALONSO-SALCES, R. M.; UMPIERREZ, M. L.; ROSSINI, C.; FUSELLI, S. R. Chemical composition, antimicrobial activity, and mode of action of essential oils against *Paenibacillus larvae*, etiological agent of American foulbrood on *Apis mellifera*. **Chemistry & biodiversity**, v. 14, n. 4, p. e1600382, 2017.

PEREIRA, A. F. M.; ALBANO, M.; ALVES, F. C. B.; ANDRADE, B. F. M. T.; FURLANETTO, A.; RALL, V. L. M.; SANTOS, L. D.; ORSI, R. O.; FERNANDES JUNIOR,

A. Influence of apitoxin and melittin from *Apis mellifera* bee on *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v.141, p.104011,2020.

PIGGOT, P. J.; HILBERT, D. W. Sporulation of *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 579-586, 2004.

POPOVA, M.; GIANNOPOULOU, E.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GRAIKOU, K.; WIDELSKI, J.; BANKOVA, V.; KALOFONOS, H.; SIVOLAPENKO, G.; GAWEL-BEBEN, K.; ANTOSIEWICZ, B.; CHINOU, I. Characterization and biological evaluation of propolis from Poland. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1159, 2017.

POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; NGO, H. T.; AIZEN, M. A.; BIESMEIJER, J. C.; BREEZE, T. D.; DICKS, L. V.; GARIBALDI, L. A.; HILL, J. S.; VANBERGEN, A. J. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v. 540, n. 7632, p. 220-229, 2016.

PROBST, I. S.; SFORCIN, J. M.; RALL, V. L. M.; FERNANDES, A. A. H.; FERNANDES JÚNIOR, A. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 17(2), 159-167, 2011.

PRZYBYŁEK, I.; KARPIŃSKI, T. M. Antibacterial properties of propolis. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2047, 2019.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

ROH, J.; KIM, K. Antimicrobial activity of Korean propolis extracts on oral pathogenic microorganisms. **Journal of Dental Hygiene Science**, v. 18, n. 1, p. 18-23, 2018.

ROSHANAK, S.; SHAHIDI, F.; YAZDY, F. T.; JAVADMANESH, A.; MOVAFFAGH, J. Evaluation of antimicrobial activity of Buforin I and Nisin and the synergistic effect of their combination as a novel antimicrobial preservative. **Journal of Food Protection**, v. 83, n. 11, p. 2018-2025, 2020.

RUFATTO, L. C.; SANTOS, D. A.; MARINHO, F.; HENRIQUES, J. A. P.; ELY, M. R.; MOURA, S. Red propolis: chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 7, p. 591-598, 2017.

SAHINLER, N.; KAFTANOGLU, O. Natural product propolis: chemical composition. **Natural Product Research**, v. 19, n. 2, p. 183-188, 2005.

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P.R.S.; CAMPOS, L.C.; BORBA, C.M.; PEDRO H. CABELLO, P.H.; MARCUCCI, M.C.; CASTRO, S.L. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **Oxford Journals, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, p. 317–324, 2008.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES JUNIOR, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n.1-2, p. 243-249, 2000.

SHAPLA, U. M.; RAIHAN, J.; ISLAM, A.; ALAM, F.; SOLAYMAN, N.; GAN, S. H.; KHALIL, I. Propolis: The future therapy against *Helicobacter pylori*-mediated gastrointestinal diseases. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 16, n.2, p. 81-99, 2018.

SILVA, F. V., TAN, E. K.; FARID, M. Bacterial spore inactivation at 45-65°C using high pressure processing: study of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice. **Food Microbiology**, v. 32, p. 206-211, 2012.

SILVA, M. P., SILVA, T. M.; MENGARDA, A. C., SALVADORI, M. C., TEIXEIRA, F. S., ALENCAR, S. M., LUZ FILHO, G. C.; SILVA, B. B.; MORAES, J. Brazilian red propolis exhibits antiparasitic properties in vitro and reduces worm burden and egg production in a mouse model harboring either early or chronic *Schistosoma mansoni* infection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. 113387, 2021.

SOROYE, P; NEWBOLD, T.; KERR, J. Climate change contributes to widespread declines among bumble bees across continents. **Science**, v. 367, n. 6478, p. 685-688, 2020.

STEFANOVIĆ, Olgica D. Synergistic activity of antibiotics and bioactive plant extracts: A study against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Bacterial Pathogenesis and Antibacterial Control**, v. 23, p. 23-48, 2018.

STEWART, G. C. The exosporium layer of bacterial spores: a connection to the environment and the infected host. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 4, p. 437-457, 2015.

STORZ, G; HENGGE, R., **Bacterial Stress Responses**, Second Edition. ASM Press, 2011.

SU, H. N.; CHEN, Z. H; SONG, X. Y.; CHEN, X. L.; SHI, M.; ZHOU, B. C.; ZHAO, X.; ZHANG, Y. Z. Antimicrobial peptide trichokonin VI-induced alterations in the morphological and nanomechanical properties of *Bacillus subtilis*. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45818, 2012.

SUWALAK, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Morphological and ultrastructural changes in the cell structure of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 following treatment with *Quercus infectoria* nut galls. **Journal of Electron Microscopy**, v. 58, n.5, p. 315-320, 2009.

TUNGMUNNITHUM, D.; THONGBOONYOU, A.; PHOLBOON, A.; YANGSABAI, A. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 93, 2018.

VADILLO-RODRÍGUEZ, V.; CAVAGNOLA, M. A.; PÉREZ-GIRALDO, C.; FERNÁNDEZ-CALDERÓN, M. C. A physico-chemical study of the interaction of ethanolic extracts of propolis with bacterial cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 200, p. 111571, 2021.

VASCONCELOS, N. G.; CRODA, J.; SIMIONATTO, S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 120, p. 198-203, 2018.

VAUCHER, R. A.; GIONGO, J. L.; BOLZAN, L. P.; CÔRREA, M. S.; FAUSTO, V. P.; ALVES, C. F. S.; LOPES, L. Q. S.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; MOREIRA, A. P.; BRANDELLI, A.; RAFFIN, R. P.; SANTOS, R. C. V. Antimicrobial activity of nanostructured Amazonian oils against *Paenibacillus* species and their toxicity on larvae and adult worker bees. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, n. 2, p. 205-210, 2015.

VICĂ, M. L.; GLEVITZKY, I.; GLEVITZKY, M.; SISERMAN, C. V.; MATEI, H. V.; TEODORU, C. A. Antibacterial activity of propolis extracts from the central region of Romania against *Neisseria gonorrhoeae*. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, p. 689, 2021.

WATANABE, M. A. E.; AMARANTE, M. K.; CONTI, B. J.; SFORCIN, J. M. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 11, p. 1378–1386, 2011.

WIESE, H. **Apicultura**: novos tempos, 2^a edição. Guaíba: Agrolivros, 2005, 378p.

WOISKY, R.G., SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99-105, 1998.

YAP, P. S. X.; YIAP, B. C.; PING, H. C.; LIM, S. H. E. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The open microbiology journal**, v. 8, p. 6, 2014.

YEUNG, A. T. Y.; GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 2161-2176, 2011.

ZABAIYOU, N.; FOUACHE, A.; TROUSSON, A.; BARON, S.; ZELLAGUI, A.; LAHOUEL, M.; LOBACCARO, J. M. A. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 214–222, 2017.