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

PG-BGA

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"

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 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

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, Profª. Drª. Vera Lúcia Mores Rall, Profª. Drª. Sandra de Moraes Gimenes Bosco, Profª. Drª. 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 Profª. 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 Profª. Luciana Francisco Fleuri do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas -IBB, que gentilmente forneceu as amostras de *B. subtillis* 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 *Apis mellifera* 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 *Bacillus subtilis*. 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 (μg/mL) de proteínas liberadas no sobrenadante, quando expostas a concentrações equivalentes a 1xCIM e a 2xCIM dos diferentes tratamentos para *B. subtilis*. 41

Figura 7 – Gráficos dos 3 tempos (0h, 2h e 4h) quanto às concentrações (μg/mL) de proteínas liberadas no sobrenadante, quando expostas a concentrações equivalentes a 1xCIM e a 2xCIM dos diferentes tratamentos para *P. alvei*. 42

Figura 8 – Representação gráfica dos constituintes celulares absorvíveis a 260 nm liberados de *B. subtilis* 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 *P. alvei* 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 (µg/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 *B. subtilis* e *P. alvei* e as respectivas concentrações (µg/mL). 38

Tabela 4 – Concentrações (µg/mL) de proteínas liberadas de *B. subtilis* nos tempos 0h, 2h e 4h em concentrações correspondentes aos valores de uma e duas vezes o valor de CIM. 40

Tabela 5 – Concentrações (µg/mL) de proteínas liberadas de *P. alvei* 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 *B. subtilis* e *P. alvei* 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 *B. subtilis* e *P. alvei* 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	*Biochemical Oxygen Demand*
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
EFB	*European foulbrood*
FDA	*Food and Drug Administration*
KCl	Cloreto de Potássio
M+M	Dupla Maceração
M+U	Maceração associada ao uso de banho ultrassônico - Maceração/Ultrasonicação
M_nCl_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
ºC	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. ***Introdução*****.....**	15
2. ***Revisão Bibliográfica*****.....**	16
3. ***Objetivos*****.....**	25
3.1 ***Objetivo geral*****.....**	25
3.2 ***Objetivos específicos*****.....**	25
4. ***Material e métodos*****.....**	25
4.1 ***Obtenção da própolis e preparo dos extratos etanólicos*****.....**	25
4.2 ***Peptídeos antimicrobianos e compostos majoritários de óleos*****..... *essenciais***	29
4.3 ***Análise química dos EEP's e ação antioxidante*****.....**	30
4.4 ***Testes de sensibilidade bacteriana*****.....**	30
4.4.1 ***Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e*****..... *Concentração Bactericida Mínima (CBM)***	30
4.4.2 ***Ensaios para verificação de interações (sinergismo) pela*****..... *metodologia da curva de sobrevivência***	31
4.5 ***Ação anti-esporo das bactérias testadas*****.....**	32
4.5.1 ***Obtenção das bactérias estudadas na forma esporulada*****.....**	32
4.5.2 ***Ensaios para ação anti-esporo*****.....**	33
4.6 ***Efluxo de íons potássio e fosfato*****.....**	33
4.7 ***Liberação de proteínas através da membrana*****.....**	34
4.8 ***Integridade da membrana celular*****.....**	34
5. ***Análise estatística*** **.....**	34
6. ***Resultados e discussão*****.....**	35
6.1 ***Compostos fenólicos totais, flavonoides e ação antioxidante*****.....**	35
6.2 ***Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida*****..... *Mínima (CBM)***	36
6.3 ***Ação anti-esporo*****.....**	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 ultimo, 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 6,25µg/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

híbrido da espécie *A. mellifera* com características morfológicas e comportamentais chamada popularmente de abelha africanizada que manteve muitas das características da subespécie africana, como maior produtividade, alta capacidade de enxameação, maior resistência a doenças e maior defensividade.

Dentre os produtos da colmeia, destaque será dado a própolis. A palavra própolis significa "*pro*", a favor de, e "*polis*", cidade, sendo seu significado muito adequado, dada a sua vasta utilização. É considerado um forte produto natural empregado na diminuição da abertura de colmeias, assim como para cobrir paredes internas dessas e interior das células para defendê-las dos micro-organismos, bem como possibilitar reparos dos favos estragados ou consolidar os favos móveis. Na **Figura 1** são apresentadas ilustrações referentes a coleta de matéria para produção da própolis, a elaboração propriamente dita e própolis bruta sendo preparada para concepção de seus derivados.

Atualmente a própolis é usada como ingrediente em doces, produtos biofarmacêuticos e como componente de cosméticos, e vem ganhando popularidade também como conservante natural e fonte de compostos bioativos para alimentos e bebidas, contribuindo para melhorar o prazo de validade dos produtos e saúde dos consumidores (Gutiérrez-Cortés & Suarez Mahecha, 2014; Duman & Özpolat, 2015).

A própolis é considerada resultado da coleta de substâncias de natureza gomosa, resinosa e/ou balsâmicas, recolhidas pelas abelhas especialmente de brotos, flores, cascas, látex, ramos, pólen e frutos, entre outras partes de espécies vegetais presentes no ambiente em que se situa a colmeia. As abelhas adicionam e modificam a composição dos materiais coletados, através de secreções próprias como a saliva, a partir da adição de ceras, ou ainda pelo processo de digestão do pólen pelas próprias abelhas (Fernandes Junior, 2012).

Análises de amostras de própolis de várias partes do mundo têm mostrado que a este produto da colmeia pode conter mais de 300 compostos químicos diferentes (Huang et al., 2014). Conforme citado por Przybylek e Karpiński (2019) a própolis em seu estado bruto tem uma composição que se aproxima ao apresentado na **Figura 2**.

Assim como sua composição, a coloração da própolis também pode variar de amarelada, parda, vermelho escuro, verde-limão, cinza esverdeado e marrom, dependendo de sua procedência (Couto & Couto, 2006).



Figura 1. Fotos ilustrativas dos passos para elaboração da própolis de *Apis mellifera* até momento prévio ao preparo do derivado da própolis. http://espaber.uspnet.usp.br/espaber/wp-content/uploads/2011/09/raw-própolis-with-mortar.jpg. (Disponível em 04/04/2012) (Fonte Fernandes Junior, 2012).

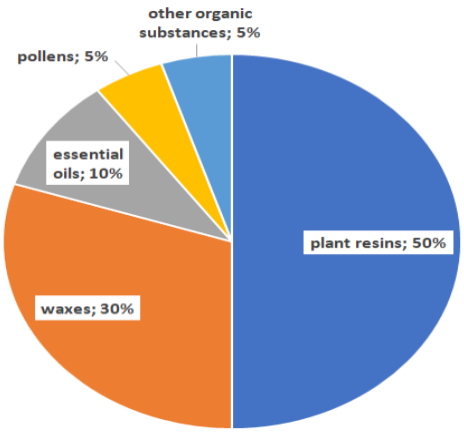


Figura 2. Composição da própolis. Fonte: Przybylek e Karpiński (2019).

Os principais compostos presentes na própolis correspondem os ácidos fenólicos e ésteres, flavonoides, terpenos, aldeídos aromáticos e álcoois, ácidos graxos, estilbenos e β-esteroides (Watanabe et al., 2011). Amostras de própolis do Brasil apresentam diferenças em suas composições químicas quando comparadas com amostras de zonas temperadas. Além disso, diferenças também entre própolis de zonas tropicais foram detectadas em função da flora local e área de coleta. Dentre essas amostras de própolis é possível destacar a própolis verde, obtida a partir do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), e mais recentemente, a própolis denominada vermelha, obtida na região norte do país (Salomão et al., 2008). Além disso, mencionam os autores que enquanto a ação antimicrobiana da própolis europeia se deve a presença de flavonoides e dos derivados do ácido cafeico, as de áreas tropicais destacam-se como compostos ativos os ácidos fenólicos e derivados prenilados.

A heterogeneidade química da própolis é facilmente compreensível, pois essa é constituída de uma mistura complexa de compostos derivados de plantas e processados por enzimas presentes na saliva de abelhas. Assim, a composição da própolis depende das plantas, das estações em que as resinas são coletadas, e das espécies de abelhas. Esta diversidade química traz uma questão crucial de padronização, mesmo que as abelhas por si só não mudem a composição química (Bankova; Castro, Marcucci, 2000). Mantovani et al. (2008) avaliaram a composição química de amostras de própolis coletadas na região Sul e Sudeste do Brasil, sendo que a amostra originária do Sul apresentou maior quantidade de flavonoides em sua composição, enquanto que a amostra proveniente do Sudeste apresentou maior quantidade de compostos fenólicos totais.

Os flavonoides e ésteres de ácidos fenólicos, são importantes compostos no que diz respeito à atividade antimicrobiana (Sforcin et al. 2000) e também frequentemente reportados por sua

atividade antioxidante que agem reduzindo a velocidade de oxidação resultando na redução dos radicais livres (Tungmunnithum et al., 2018).

A própolis é considerada um eficiente antisséptico bem como demonstra as propriedades bactericidas, bacteriostáticas, antifúngicas, analgésicas, cicatrizantes, anti-inflamatórias e anestésicas, conforme relatado por Couto & Couto (2006).

Estudos mostram importante ação antimicrobiana *in vitro* de extratos de própolis sobre micro-organismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii* isolados de materiais biológicos humanos (Fernandes Junior et al., 1995), e amostras clínicas de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *S. typhimurium* (Sforcin et al., 2000). Os efeitos antimicrobianos dos extratos de própolis podem ser observados em amostras de própolis coletadas em diferentes regiões geográficas, como as obtidas no Brasil e na Bulgária, que mostraram efeito inibidor sobre linhagens de *Salmonella* isoladas de amostras biológicas de humanos (*S. typhimurium*), de alimentos (*Salmonella enteritidis*) e sobre duas linhagens padrões ATCC de *S. typhimurium* (13311) e outra de *Salmonella thyphi* (00238) (Orsi et al., 2007); efeito de extratos etanólicos de própolis provenientes da Grécia e Chipre, frente a cepas bacterianas de *Shigella dysenteriae, S. thyphimurium, E. coli, Enterobacter aerogenes, S. aureus, Staphylococcus epidermidis, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus casei, Lactobacillus helveticus, Candida albicans e Candida tropocalis* (Kalogeropoulos et al., 2009), bem como ação de extratos etanólicos de própolis coreana sobre *Streptococcus mutans, S. aureus, Enterococcus faecalis* e *C. albicans* (Roh e Kim, 2018). O extrato da própolis mostrou-se eficaz também na inibição de *Helicobacter pylori* (Shapla et al.,2018) e recentemente ação de própolis sobre cepas resistentes de *Neisseria gonorrhoeae* (Vicã et al., 2021).

Considerando as possibilidades de interações *in vitro* entre produtos naturais e fármacos antibacterianos convencionais, Fernandes Junior et al, (2005) realizaram estudo que objetivou testar efeito sinérgico da própolis com fármacos de uso na terapêutica de doenças infecciosas sendo que nessa pesquisa foram testadas 61 isolados de *S. aureus* e 13 fármacos utilizando as metodologias da difusão a partir de discos (Kirby & Bauer) e pelo E-teste. Os resultados mostraram que pela metodologia do disco, houve sinergismo entre o extrato de própolis com cinco dos 13 fármacos testados (cloranfenicol, gentamicina, netilmicina, tetraciclina e vancomicina), enquanto que pela metodologia do E-Teste, observou-se novamente o sinergismo do extrato com os fármacos cloranfenicol, gentamicina, netilmicina, tetraciclina e também com clindamicina.

Avançando ainda nos estudos com própolis e sinergismo com outros produtos naturais, Probst et al., (2011) reportaram interações sinérgicas em misturas preparadas de extratos etanólicos de própolis de *A. mellifera* e óleos essenciais de plantas (canela, gengibre, cravo da índia e hortelã pimenta). Previamente foram determinados os valores de $CIM_{90\%}$ sobre 16 linhagens de *S. aureus* e 16 de *E. coli*, isoladas de material clínico humano.

A própolis também apresenta atividade antimicrobiana na prevenção da cárie dental. Conforme descrito por Rufatto et al. (2017), o extrato de própolis apresentou eficácia, quando comparado com tratamentos convencionais de aplicação de flúor, reduzindo assim as ocorrências de lesões cariosas.

Em estudo recente, Silva et al. (2021) relataram atividade antiparasitária da própolis vermelha sobre o helminto causador da esquistossomose, *Schistosoma mansoni*, agindo sobre parasitas adultos e imaturos, sugerindo assim que a própolis pode ser mais eficiente para o tratamento da doença do que o medicamento usado atualmente.

Além da ação antimicrobiana de extratos de própolis preparados de formas distintas, também serão abordados neste estudo aspectos da ação antibacteriana, incluindo ação anti-esporo, de dois peptídeos antimicrobianos (nisina e melitina) e dos compostos majoritários de óleos essenciais de duas plantas, o cinamaldeído e eugenol.

Os peptídeos antimicrobianos são estudados a muito tempo como alternativa à resistência bacteriana aos fármacos antimicrobianos, uma vez que estes se mostram menos prováveis a resistência do que fármacos convencionais, bem como apresentam potencial de ação de forma sinérgica com esses (Hollman et al., 2018).

As bacteriocinas são pequenos peptídeos produzidos por bactérias, sintetizados nos ribossomos, e que possuem atividade contra outras bactérias (Cotter; Ross e Hill, 2013). A nisina, um exemplo de peptídeo antimicrobiano, é uma bacteriocina, produzida pela bactéria *Lactococcus lactis*, com potencial de inibição do crescimento bacteriano, sendo seu principal mecanismo de ação, a formação de poros nas membranas, apresentando também ação sobre esporos bacterianos (Moll, Konings e Driessen, 1999; Yeung; Gellatly e Hancock, 2011). Além disso, a nisina apresentou sinergismo com fármacos como a oxacilina, o que pode minimizar uma possível toxicidade bem como a resistência bacteriana, uma vez que as doses terapêuticas poderão ser diminuídas para tal fármaco (Alves et al., 2020).

A melitina, é o principal componente da apitoxina (veneno de abelha) *Apis mellifera*, compreendendo mais de 50% do peso seco do veneno (Haberman, 1972). É um peptídeo anfipático, que apresenta atividade citolítica e age na membrana celular extraindo algumas moléculas lipídicas, induzindo assim a formação de poros (Dempsey, 1990; Liu et al., 2018). A melitina se destaca por sua atividade antibacteriana (Memariani et al., 2019), além de apresentar

efeito sinérgico com a oxacilina, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina – MRSA (Pereira et al., 2020).

Os óleos essenciais são misturas de compostos voláteis de origem vegetal (Baser e Buchbauer, 2015), que consistem em cerca de 20-60 componentes em várias concentrações, sendo que nessa mistura, dois ou três constituintes estão presentes em concentrações relativamente altas (20-70%) em comparação com os outros, denominados estes como compostos majoritários (Yap et al., 2014). São de grande interesse das indústrias cosmética e farmacêutica, apresentando propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, anticâncer, antimutagênicas e antidiabéticas (Raut e Karuppayil, 2014), e já demonstraram a existência de atividade antibacteriana resultante de sinergismo quando testados em associação com extrato etanólico de própolis (Probst et al., 2011).

O cinamaldeído é o composto majoritário do óleo essencial da canela (*Cinnamomum zeylanicum*). Sua atividade antimicrobiana é bastante relatada, bem como ação anti-inflamatória, angiogênica e cicatrizante (Silva et al., 2018). Vasconcelos; Croda e Simionato (2018) relatam seus mecanismos de ação, tais como alterações na membrana celular e alteração do perfil lipídico, inibição de ATPase, inibição da divisão celular, inibição das porinas, inibição da motilidade, inibição do *quorum sensing* e formação de biofilme, bem como também ação sinérgica com fármacos antibacterianos.

O eugenol é o composto majoritário do óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*). Apresenta atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e efeito anestésico (Kaur e Kaushal, 2019). Também foram relatadas propriedades analgésicas, anticâncer, antiulcerogênicas, efeitos antiespasmódico e relaxante, anti-helmínticos, antipiréticos, antidepressivos, antiestresse, preservação óssea, intensificador de permeação cutânea, além de atividade inseticida e de controle de pragas (Kamatou; Vermaak e Viljoen, 2012), sendo, portanto, de grande interesse para a indústria cosmética, farmacêutica e na agricultura. Quanto a sua atividade antibacteriana, são descritos mecanismos de ação, como rompimento da membrana celular, bem como atividade contra algumas enzimas bacterianas como protease, histidina carboxilase, amilase e ATPase (Marchese et al., 2017).

As bactérias quando em estado vegetativo (metabolicamente ativas) se mostram mais suscetíveis as possíveis variações ambientais. Algumas bactérias, como espécies de *Bacillus* e *Clostridium* apresentam capacidade de formar esporos, conferindo-as uma maior resistência.

Os esporos são formados no interior das células bacterianas, e contém DNA, ribossomos, e outros componentes essenciais, porém não apresentam atividade metabólica. São altamente resistentes ao calor, radiação e a compostos químicos como desinfetantes. Essa resistência pode ser mediada pelo ácido dipicolínico, um quelante de íons cálcio encontrado apenas em esporos

de bactérias (Levinson, 2016). Seu revestimento é composto por proteínas específicas, e encontra-se sob o exosporium, que é uma estrutura composta por proteínas e glicoproteínas, localizado ao redor do esporo, estando presente em algumas espécies, como *P. alvei,* e ausente em *B. subtilis* (Storz e Hengge, 2010).

Algumas espécies de *Bacillus* são agentes causadores de deterioração de alimentos e uma grande variedade de doenças. Devido à sua capacidade de formar esporos altamente resistentes ao calor, é de grande interesse desenvolver estratégias mais eficazes, pelas quais os esporos possam ser inativados (Fan et al., 2019). A característica de alta resistência dos esporos explica a sua presença em produtos alimentícios, onde em condições favoráveis podem germinar, causando assim a deterioração de alimentos e doenças humanas (Brown, 2000; Evelyn & Silva, 2018).

O *Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram-positiva aeróbia facultativa e formadora de esporos (Mazza, 1994). Ele pode ser isolado de vários ambientes, como solos e hábitats marinhos, e sua utilização dá-se desde a produção de enzimas e fermentação de alimentos, até o biocontrole na agricultura (Kovács, 2019).

O início do processo de esporulação de *B. subtilis* ocorre através da ativação do regulador de transcrição Spo0A, regulada por fosforilação (Piggot e Hilbert, 2004). A vasta compreensão quanto a sua bioquímica geral, fisiologia e genéticas, faz de *B. subtilis* uma bactéria de interesse em estudos relacionados a formação de esporos bacterianos **(Figura 3)** (Errington, 2003).

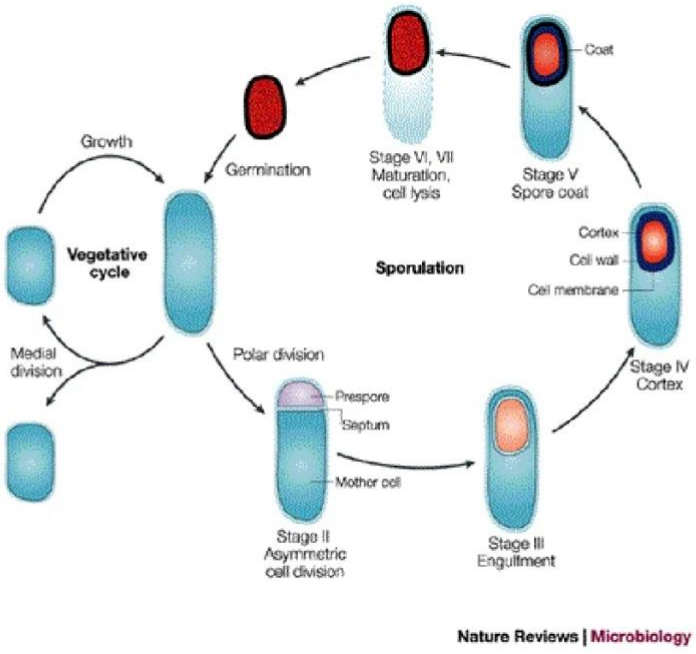


Figura 3. Esquema simplificado, mostrando os estágios principais do ciclo de esporulação de *Bacillus subtilis*. Fonte: Errington (2003).

As abelhas podem ser acometidas por doenças, sendo causadas por inúmeros patógenos como bactérias, vírus e fungos, que colocam em risco as colmeias (Doublet et al., 2015; Beaurepaire et al., 2020; Boncristiani et al., 2020).

Paenibacillus alvei é uma bactéria considerada anaeróbia facultativa, Gram positiva e formadora de esporos. São bactérias móveis, e seus movimentos se dão por "enxameamento", movendo-se coletivamente, e quando expostas a antibióticos, observa-se uma menor taxa de expansão das colônias e a formação de padrões mais compactos (Cohen; Ron e Bem-Jacob, 2000). *P. alvei*, *Brevibacillus laterosporus*, *Enterococcus faecalis* e *Achromobacter eurydice* ocorrem como patógenos, acometendo abelhas durante surtos de podridão europeia (Djordjevic et al., 2000; Forsgren, 2010).

Anandaraj et al. (2009), reportaram a coprodução de dois diferentes novos peptídeos antimicrobianos e proteases específicas para a linhagem de *P. alvei* denominada NP75. Segundo Djukic et al. (2012) foi observado junto a *P. alvei*, a presença de genes putativos que codificam um peptídeo antimicrobiano, uma toxina binária, uma toxina com atividade inseticida, alveolisina e diferentes peptídeos não ribossômicos para uma cepa de *P. alvei* DSM 29.

Conforme citado por Lacerda (2009), a chamada Cria Pútrida Americana é um exemplo de doença que acomete as crias de *Apis mellifera,* sendo causada pela bactéria *Paenibacillus larvae* (antigamente designada como *Bacillus larvae*), a qual forma esporos, que são responsáveis pelas novas infecções, uma vez que esses esporos são ingeridos pelas larvas das abelhas e germinados no intestino das mesmas, bem como a Cria Pútrida Europeia, causada pela bactéria *Melissococcus pluton* (antigamente designada como *Streptococcus pluton*).

A *Melissococus pluton* pode estar associada a outras bactérias, como o *Bacterium eurydice* (atualmente *Achromobacter eurydice*) além do *Paenibacillus alvei,* resultando na Cria Pútrida Europeia (CPE), que ocorre em quase todos os países, incluindo o Brasil, e causa grandes prejuízos, atacando larvas jovens que morrem ainda na fase pré-pupa ou pupa jovem (Itagiba, 1997).

Na CPE, a cria morre entre o 3º e o 5º dia do estágio larval, apresentando uma consistência pastosa. Essas bactérias sobrevivem até três anos em restos secos de larvas mortas (Couto & Couto, 2006). Na Cria Pútrida Americana (CPA), a morte das crias ocorre na fase de pré-pupa, ou pupa jovem, que apresentam uma coloração de amarelada a marrom escura, com consistência viscosa e cheiro forte (Couto & Couto, 2006).

O principal tratamento para a CPE, bem como o tratamento preventivo da CPA, é feito a base de terramicina (Couto & Couto, 2006), uma tetraciclina, aprovada em 1950 pela FDA, obtida de *Streptomyces rimosus* (Nelson e Levy, 2011).

Sendo assim, com o presente estudo pretende-se contribuir com questões relacionadas às propriedades biológicas da própolis, dos peptídeos antimicrobianos e dos compostos majoritários, especialmente para a ação antibacteriana em espécies formadoras de esporos (*P. alvei* e *B. subtilis*) dada a importância do *P. alvei*, que juntamente com outras bactérias, pode provocar doenças especialmente em larvas de abelhas da espécie *Apis mellifera.*

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a atividade inibidora de extratos etanólicos de própolis de *Apis mellifera* preparados de três formas distintas e de peptídeos antimicrobianos (nisina e melitina) e compostos majoritários de óleos essenciais (cinamaldeído e eugenol) sobre linhagem ATCC de *Paenibacillus alvei* e sobre um isolado de *Bacillus subtilis.*

3.2 Objetivos específicos

Determinar ação inibidora em células vegetativas e ação anti-esporo dos vários produtos em estudo utilizando a metodologia da microdiluição (*Resazurin Microtiter Assay Plate* – REMA);

Avaliar atividade dos produtos testados sobre integridade e permeabilidade da membrana plasmática bacteriana verificado pelo extravasamento de proteínas totais, efluxo de íons fosfato e potássio e liberação de ácidos nucléicos;

Testar o possível sinergismo entre os produtos em estudo e o fármaco antibacteriano tetraciclina utilizando metodologia da *time kill curve*.

4. Material e métodos

4.1 Obtenção da própolis e preparo dos extratos etanólicos

Uma única amostra de própolis foi obtida de apiário mantido em propriedade denominada Sítio Árvore Grande de propriedade do senhor Valdir Angelo Paniguel (22º55”10’ S e 48º29”35’ O) localizada no município de Botucatu, Estado de São Paulo. Este apiário é constituído por enxames de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, alojadas em colmeias padrão Langstroth, distribuídas ao acaso e manejadas para a produção de mel, cuja florada foi classificada como do tipo silvestre tendo a coleta da própolis sido feita em novembro de 2018 pela raspagem com formão da própolis aderida nas partes internas das colmeias (adaptado de Inoue, 2007). Após

coleta, a própolis foi acondicionada em recipiente de vidro e mantida em freezer (±20ºC) até o momento do processamento para obtenção dos respectivos extratos etanólicos de própolis (EEP).

Foram utilizados, conforme descrito por Escriche & Juan Borrás (2018) modificado **(Figura 4)**, três diferentes métodos de extração alcoólica para obtenção dos EEP sendo a Dupla Maceração (M+M), a Dupla Ultrasonicação (U+U) realizada em banho Ultrassônico (Vide foto 9 em **Apêndice**) e a Maceração/Ultrasonicação (M+U). Os extratos assim preparados tiveram na sequência a determinação dos respectivos pesos secos (mg/mL), sendo que para isso, alíquotas de 1 mL de extrato foram colocados em cadinhos preparados com papel alumínio que foram mantidos em estufa BOD com temperatura de 37ºC durante 24 horas, e quando totalmente evaporado o volume, o restante permanecido no cadinho foi pesado e este foi considerado o peso seco (Orsi et al., 2000) (Vide seção **Apêndice** foto número 8).

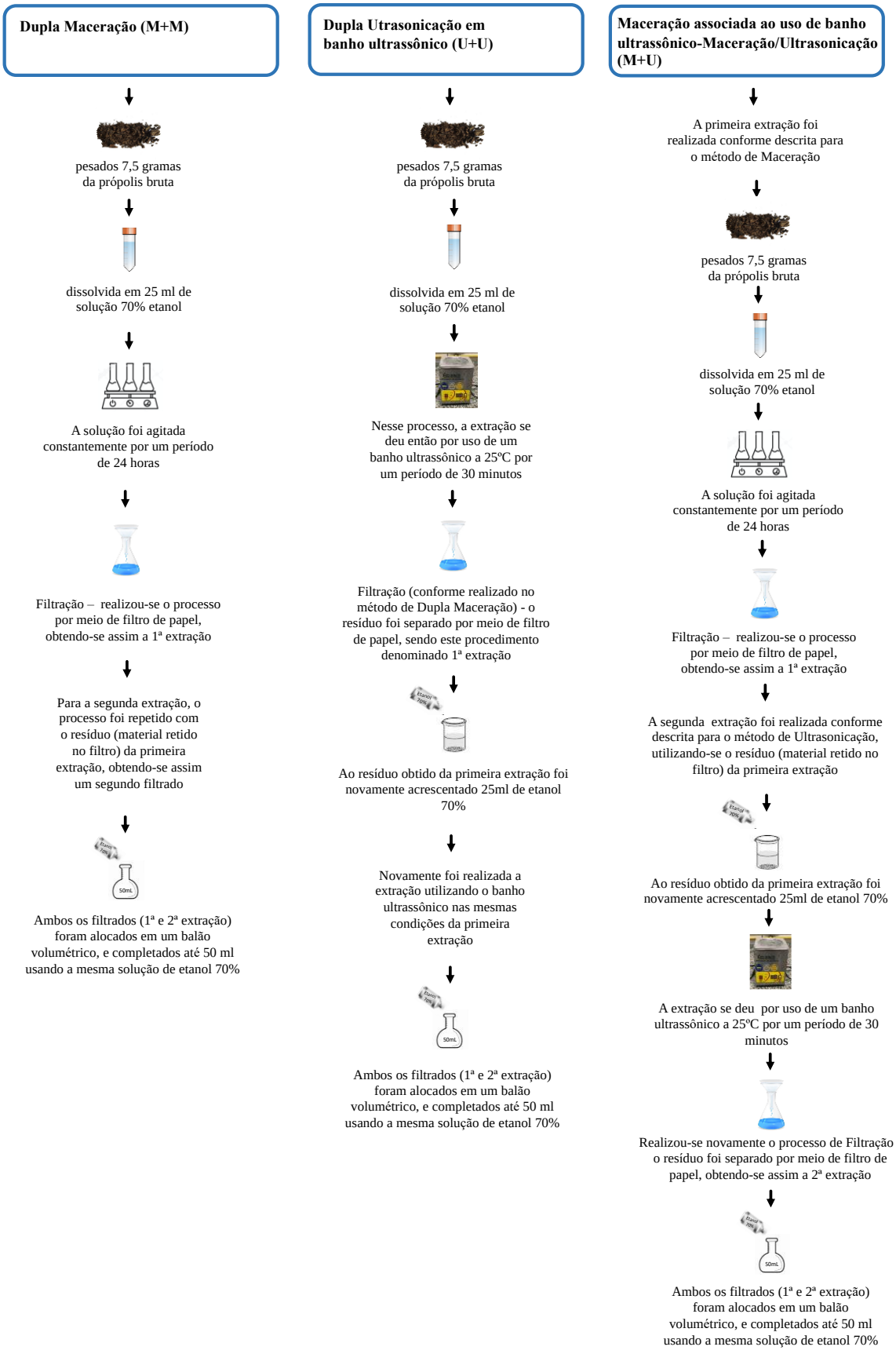


Figura 4. Fluxograma dos processos de preparos dos três extratos etanólicos de própolis (EEP) utilizados neste estudo.

Dupla Maceração (M+M): 7,5 gramas da própolis bruta foram dissolvidas em 25 mL de etanol 70% (70 mL etanol em 30 mL de água destilada estéril). Esta mistura foi mantida em agitação constante, utilizando uma mesa agitadora, durante 24 horas em temperatura ambiente e longe da luz. Após esse período foi feita a filtração, separando o resíduo por meio de papel filtro, sendo o filtrado assim obtido considerado a primeira extração. Para a segunda extração, um processo idêntico foi realizado com o resíduo (material retido no filtro) da primeira extração, obtendo-se assim um segundo filtrado após 24 horas nas mesmas condições da primeira extração. Ambos os filtrados (1ª e 2ª extração) foram alocados em balão volumétrico e completado volume até 50 mL com etanol 70%.

Dupla Ultrasonicação em banho ultrassônico (U+U): Tal como descrito previamente, 7,5 gramas da própolis bruta foram dissolvidas em 25 mL de etanol 70%. Nesse processo, a extração se deu então por uso de um banho ultrassônico (vide seção **Apêndice** foto número 9) a 25ºC por um período de 30 minutos. O processo de filtração se deu conforme o realizado no método de Dupla Maceração. Ao resíduo obtido da primeira extração foi novamente acrescentado 25 mL de etanol 70%, tendo sido feita nova extração utilizando o banho ultrassônico nas mesmas condições da primeira extração seguido de nova filtração. Ambos os filtrados (1ª e 2ª extração) foram alocados em balão volumétrico, e completado volume até 50 mL com etanol 70%.

Maceração associada ao uso de banho ultrassônico – Maceração/Ultrasonicação (M+U): Neste procedimento, a primeira extração (7,5 gramas em 25 mL de etanol 70%) foi realizada conforme descrita para o método de Maceração, sendo posteriormente submetida a uma segunda extração conforme descrita para o método de Ultrasonicação. Novamente ambos os volumes (1ª e 2ª extração) obtidos das duas formas descritas foram misturadas e completado volume para 50 mL utilizando etanol 70%.

Finalizando a questão do preparo dos EEP, merece destaque o fato que as três formas de preparo permitem obter um extrato considerado 15%, ou seja, 7,5 gramas em um total de 50 mL de etanol 70%, ou 15 gramas por 100 mL de etanol 70%.

Visando repetição para o preparo dos extratos, foram realizadas duas extrações em momentos distintos (abril e maio de 2019) **(Figura 5)** para a mesma amostra de própolis bruta e utilizando as mesmas técnicas de preparo, ou seja, Maceração/Maceração (M+M), Maceração/Ultrasonicação (M+U) e Ultrasonicação/Ultrasonicação (U+U). Posteriormente, foi feita a mistura de ambos os extratos assim obtidos, e realizada a devida caracterização química desses, e esses novos extratos resultantes da mistura foram utilizados em todos os ensaios microbiológicos bem como considerados para a discussão dos resultados obtidos.

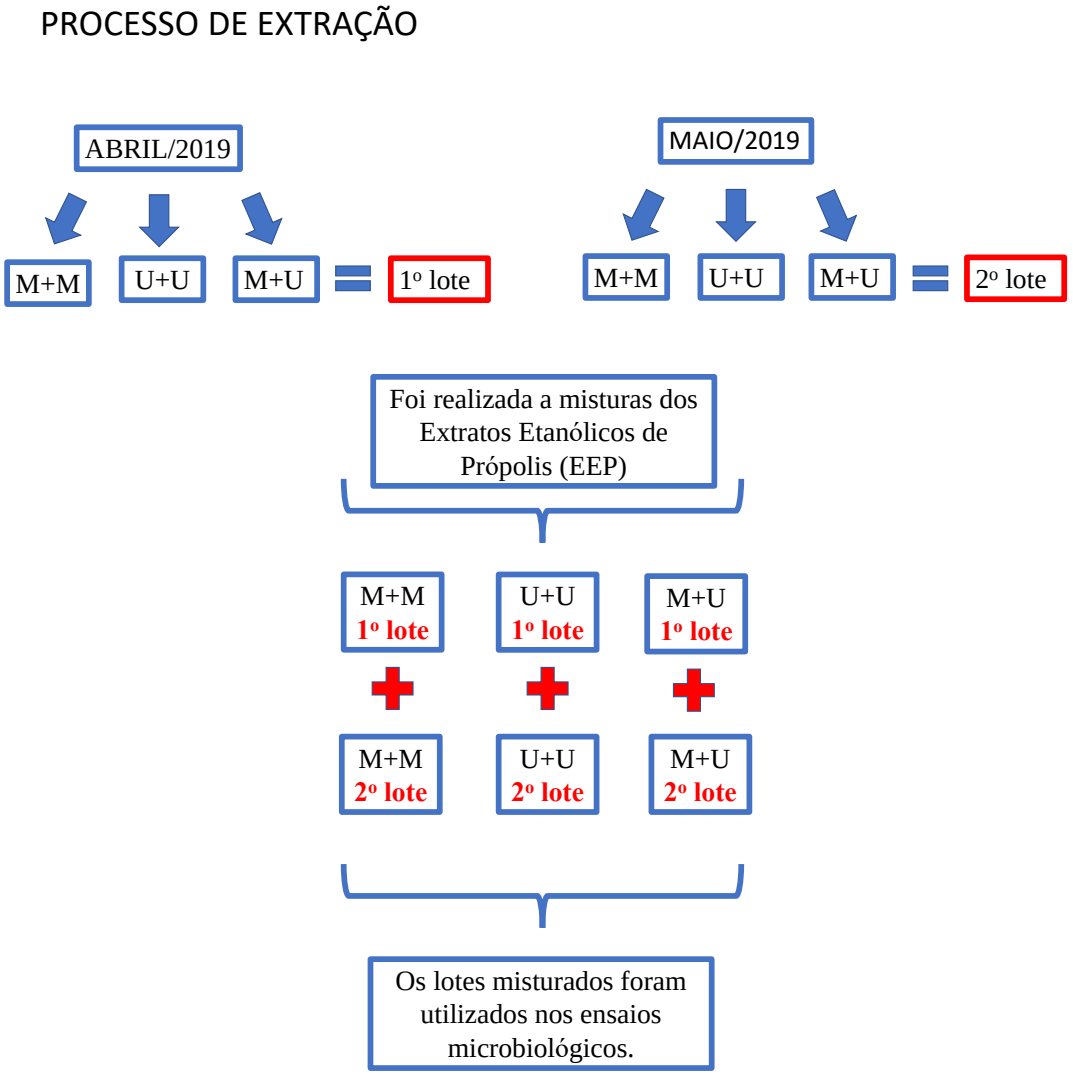


Figura 5. Esquema das etapas do processo das três formas de extração dos extratos etanólicos de própolis (EEP).

4.2 Peptídeos antimicrobianos e compostos majoritários de óleos essenciais

Os peptídeos antimicrobianos melitina e nisina foram obtidos da marca Sigma Aldrich, tendo pureza ao redor de 63% e 2,5% respectivamente. Segundo informações do distribuidor da nisina (Nisin from Sigma Aldrich® do Brasil, produto código 8 N5764-5G) esta tem peso molecular de 3.354,07 g/mol, sendo a potência do produto correspondente a 1.000,000 UI (Unidades Internacionais) /grama. Considerando a grau de pureza de 2,5%, calculou-se em 40 UI/µg de nisina pura contida no produto adquirido. Com relação aos compostos majoritários, para o

cinamaldeído, a densidade foi igual a 1,05 g/mL e grau de pureza maior que 95%. O eugenol apresentou densidade igual a 1,06 g/mL e grau de pureza ao redor de 99%.

4.3 Análise química dos EEP e ação antioxidante

As análises foram realizadas no laboratório sob responsabilidade da Profa. Titular Giuseppina Pace Pereira Lima (Departamento de Ciências Químicas e Biológicas -IBB). Tais análises foram realizadas para todos os extratos obtidos nas duas extrações realizadas (abril e maio de 2019).

A análise de compostos fenólicos totais do EEP foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteau conforme descrito por Woisky & Salatino (1998) utilizando ácido gálico como padrão, sendo a absorbância medida em espectrofotômetro (UV Mini-1240) a 740 nm e os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico (mg/g). As análises de flavonoides totais dos EEP foram realizadas por reação colorimétrica, conforme protocolo proposto por Park et al, (1998), a partir da mistura de 0,5 mL do extrato etanólico de própolis, 4,3 mL de etanol 80%, 0,1 mL de nitrato de alumínio 10% e 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/L. Após 40 min, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 425 nm e o conteúdo de flavonoides expresso em equivalentes de quercetina (mg/g).

A verificação da atividade antioxidante dos EEP's, foi dada pela avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). A mistura da reação consistiu na diluição de 0,1 mL de cada extrato etanólico de própolis e 0,4 mL do extrator, 3 mL de etanol, e 0,3 mL da solução 0,5 mM do radical DPPH, e após 45 minutos, foi realizada uma leitura de absorbância a 517 nm.

4.4 Testes de sensibilidade bacteriana

4.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os ensaios microbiológicos foram realizados com *Bacillus subtilis* (isolado de solo) fornecido pela Profa. Luciana Francisco Fleuri - Departamento de Ciências Químicas e Biológicas-IBB) e *Paenibacillus alvei* (ATCC 6344). Para obtenção das CIMs, foram realizados ensaios de sensibilidade de acordo com a metodologia da microdiluição, em microplacas de Elisa de 96 poços, também conhecida como *Resazurin Microtiter Assay Plate* – REMA (Martin et al., 2003), sendo as concentrações obtidas inicialmente em Mueller Hinton Caldo, porém, como o crescimento da bactéria *P. alvei* não se mostrou abundante neste meio, optou-se pela troca para o meio de Brain Heart Infusion Broth (BHI). Foram preparadas suspensões bacterianas de acordo com a escala 0,5 de McFarland que corresponde a 1,5 x 10^8 unidades formadoras de colônias

por mL (UFC/mL), seguido de inoculação das bactérias nos respectivos poços das microplacas com uma concentração bacteriana corrigida para o equivalente a 10^5 UFC/mL. As placas foram então incubadas à 37ºC por 24 horas. Os ensaios foram realizados com os EEP's, os peptídeos antimicrobianos melitina e nisina, compostos majoritários cinamaldeído e eugenol e a tetraciclina, além de controles positivos e negativos, ou seja, BHI inoculados e não inoculados com as bactérias, e dos controles do álcool 70% e DMSO (dimetilsulfóxido), utilizado para homogeneização dos EEP's e dos compostos majoritários com o meio de cultura (CLSI, 2015, 2018). Esses experimentos foram realizados em duplicatas.

Após incubação, foram realizadas as leituras dos respectivos valores de CIM, definida como a menor concentração de cada composto antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. Isso foi feito pela impressão visual, ou seja, inicialmente a turvação do meio liquido bem como logo em seguida a adição do composto revelador de oxirredução resazurina (0,05%), sendo verificado o crescimento quando a coloração mudou da cor violeta para rosa.

Para obtenção da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram preparadas subculturas a partir das concentrações testadas nos ensaios de microdiluição utilizando placas de BHI ágar. Após este procedimento, as placas foram incubadas em estufa a 37ºC/24 horas e na leitura foi anotada a menor concentração em que não foi possível visualizar a formação de colônias (NCCLS, 1999).

Em seção **Apêndice** são apresentados alguns aspectos morfológicos (morfologia colonial e coloração de Gram) das bactérias em estudo (Fotos 1 a 5) além de imagens sobre os ensaios dos testes de sensibilidade (Fotos 8 e 9).

4.4.2 Ensaios para verificação de interações (sinergismo) pela metodologia da curva de sobrevivência

Após a realização dos ensaios de microdiluição para obtenção dos valores de CIM, foram realizados os ensaios para ambas as bactérias visando obter as curvas de sobrevivência (*time kill curve*), com objetivo de visualizar interações sinérgicas entre a tetraciclina com os diferentes EEP's, os peptídeos antimicrobianos melitina e nisina, e os compostos majoritários cinamaldeído e eugenol.

A metodologia foi realizada de acordo com o CLSI (1999; 2012) com modificações e que prevê o uso de 1x a CIM para os compostos isoladamente (ensaios controles) e combinações dos respectivos agentes antimicrobianos nas proporções de ¼ da CIM dos EEP's, melitina, nisina, cinamaldeído e eugenol bem como também com ¼ da CIM para o fármaco antibacteriano tetraciclina, sobre as bactérias *P. alvei* e *B. subtilis* com inóculo padronizado pela escala 0,5 de McFarland. O meio de cultura utilizado foi o BHI. As placas foram incubadas a 37ºC por 24

horas em leitor de microplacas (Epoch 2 – BioTek) e as leituras de densidade óptica (600 nm) foram realizadas, durante 24 horas sendo estas tomadas em intervalos de 1 hora.

Com os valores obtidos, foram preparados os respectivos gráficos para visualização das interações entre as combinações testadas, e quando a interação foi sinérgica, foi verificado se ela ocorreu de modo bactericida ou bacteriostático (NCCLS, 1999). Esse experimento foi realizado em duplicata.

Paralelamente a este procedimento, ou seja, *time kill curve* pela determinação da DO, também foram preparados os mesmos experimentos e respectivos tratamentos, sendo que nos tempos 0, 2, 4, 8 e 24 horas foram tomadas alíquotas dos cultivos e semeadas em placas de BHI ágar (subculturas para contagem em placa), que após incubação a 37ºC/24 horas foram feitas contagens de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) para verificação de perfil de crescimento em função do tempo visando determinação de ocorrência ou não de sinergismo, bem como uma vez havendo indício de sinergismo se este foi do tipo bactericida ou bacteriostático.

Os valores de UFC/mL foram calculados e transformados em Log de UFC/mL. Os efeitos sinérgico ou antagonista foram estabelecidos de acordo com a redução ou aumento de 2-$\log_{10}$, respectivamente, nas contagens bacterianas no período de 24 horas, bem como também foi considerado bactericida quando se observou uma redução de ≥3-$\log_{10}$ UFC/mL a partir do inóculo inicial (Dosler et al., 2015).

4.5 Ação anti-esporo das bactérias testadas

4.5.1 Obtenção das bactérias estudadas na forma esporulada

O estímulo a esporulação das bactérias, e obtenção das suspensões de esporos, foi realizado de acordo com o método proposto por Silva et al. (2012), modificado conforme Fan et al. (2019). As bactérias *B. subtilis* e *P. alvei* foram mantidas em meio sólido para esporulação, sendo este preparado em nosso laboratório e cuja composição química foi por litro de meio, 10g de peptona, 3g de extrato de carne em pó, 5g de cloreto de potássio (KCl), 15g de ágar e 0,2g de cloreto de manganês (M_nCl_2). As placas foram incubadas a 37°C por 10 dias e ao final deste período foram preparadas lâminas coradas pelo método de Wirtz, consagrado na visualização de esporos (vide seção **Apêndice** fotos 6 e 7). Tal coloração indicou que as bactérias visualizadas na lâmina correspondiam a uma quantidade bastante elevada de esporos. Feito isto, os esporos presentes nas culturas após esse período foram raspados da superfície do ágar com um bastão de vidro estéril, e suspensos em água destilada estéril. Após essa coleta, iniciou-se a etapa de purificação dos esporos para eliminação das células vegetativas remanescentes. A suspensão de esporos foi então aquecida a 80° C por 20 minutos. Os pellets de esporos foram obtidos por centrifugação e

lavagem por 6 vezes com água destilada estéril a 3300 G e 4°C durante 15 minutos. Os esporos obtidos pela centrifugação final, foram ressuspensos em água destilada estéril e feita sonicação durante 1 minuto em banho ultrassônico (**Apêndice** foto número 9), seguida do plaqueamento para contagem. A suspensão purificada foi então armazenada em local escuro, a 4°C, até o momento do uso nos ensaios (**Apêndice** foto número 7).

4.5.2 Ensaios para ação anti-esporo

A determinação da ação anti-esporo foi feita pela adição dos EEP's, melitina, nisina, cinamaldeído, eugenol e tetraciclina em contato com suspensões de esporos obtidas das bactérias em estudo, utilizando uma adaptação do ensaio de microdiluição em microplacas de Elisa de 96 poços, sendo as concentrações dos produtos obtidas diretamente em água destilada estéril. As suspensões dos esporos foram padronizadas segundo a escala 0,5 de McFarland, seguido da inoculação (ao redor de 10^4 esporos por mL), dos esporos bacterianos nos respectivos poços das microplacas, que então foram colocadas em agitação mantidas em temperatura ambiente por 24 horas. Os ensaios foram realizados com os EEP's, os peptídeos antimicrobianos, os compostos majoritários, e a tetraciclina, além de controles positivos e negativos, ou seja, água destilada estéril inoculados e não inoculados com esporos das bactérias em estudo, além do controle do etanol 70% e DMSO (dimetilsulfóxido). Esses experimentos foram realizados em duplicatas.

Para verificação da redução ou não na contagem de esporos, foi realizado o cultivo, ou seja, foram preparadas subculturas a partir das concentrações testadas nos ensaios de microdiluição, utilizando placas de BHI ágar semeadas com alíquotas de 10 μL de cada tratamento realizado. Após este procedimento, as placas foram incubadas a 37ºC/24 horas, e em seguida realizadas as contagens, com auxílio de contador de colônias digital da marca Phoenix seguido da obtenção dos respectivos valores de Log. Vale destacar que a contagem inicial também foi obtida por ocasião da adição dos esporos nas respectivas concentrações dos produtos antibacterianos visando comparar contagem de esporos antes e após o período de duração do experimento.

4.6 Efluxo de íons potássio e fosfato

Os ensaios foram realizados de acordo como o método de Lee, Kim e Shin (2002) modificado. Foi feita a determinação das concentrações de íons fosfato e potássio, para as bactérias *B. subtilis* e *Paenibacillus alvei*, utilizando os kits Potassium test kit MQuant® e Phosphate test kit MQuant® conforme protocolo do fabricante, nos intervalos de tempo de 0 horas e 4 horas.

As bactérias foram padronizadas e diluídas em água peptonada preparada (8,5g de cloreto de sódio, 1g de peptona em 1 litro de água destilada estéril), e submetidas a concentrações de 1 e 2

vezes o valor de CIM previamente determinados nos ensaios de microdiluição com os produtos em estudo além da tetraciclina.

4.7 Liberação de proteínas através da membrana

A integridade celular das bactérias *B. subtilis* e *P. alvei* , foi determinada pela quantificação da concentração de proteínas no sobrenadante, ou seja, proteína liberadas após submissão aos tratamentos com os produtos antimicrobianos em estudo utilizando para isto o método de Bradford (Bradford, 1976). Os tratamentos utilizados foram os EEP's, os peptídeos antimicrobianos melitina e nisina, os compostos majoritários cinamaldeído e eugenol e a tetraciclina.

As bactérias foram inoculadas em meio BHI e incubadas a 37ºC por 24 horas. Em seguida, o meio contendo o crescimento bacteriano foi separado em tubos tipo falcon com os tratamentos, em concentrações de 1 e 2 vezes o valor de CIM obtido previamente nos ensaios de microdiluição para ambas as bactérias em estudo com análises feitas nos tempos 0, 2 e 4 horas. As amostras foram então transferidas para tubos *eppendorffs* e centrifugadas a 10.000 G por 7 minutos a 4ºC sendo os sobrenadantes transferidos com o reagente para uma microplaca de Elisa de 48 poços que posteriormente foi lida a 595nm. O experimento foi realizado em duplicata.

4.8 Integridade da membrana celular

A integridade da membra celular foi determinada através da liberação dos constituintes intracelulares para o meio, conforme o método modificado de Lv et al., (2011). Células provenientes de 50 mL das culturas de *B. subtilis* e *P. alvei* foram coletadas após centrifugação (15 min, 5000 G), lavadas 3 vezes e ressuspendidas em PBS. 40 mL da suspensão celular foi incubada a 37ºC por 4h com os tratamentos em estudo, os EEP's, os peptídeos antimicrobianos, os compostos majoritários e a tetraciclina, nas concentrações de 1xCIM e 2xCIM. As culturas foram centrifugadas a 8000 G por 5 min e a concentração de ácidos nucléicos liberados no sobrenadante foi determinado medindo-se a absorção UV a 260 nm em espectrofotômetro nos tempos 0h, 2h e 4h.

5. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de One-Way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados para denotar diferença estatística significativa. As análises foram feitas no GraphPad Prism 9.2®.

6. Resultados e discussão

6.1 Compostos fenólicos totais, flavonoides e ação antioxidante

Os valores obtidos para os parâmetros teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e ação antioxidante, esse último feito para a avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), são apresentados na **Tabela 1**. Vale destacar que esses valores representam resultados obtidos em triplicata determinados nas misturas dos dois EEP's preparados em dois momentos, segundo as formas de preparo e que foram utilizados em todos os experimentos.

Observa-se que o EEP preparado por dupla ultrasonicação (U+U) apresentou o maior teor de compostos fenólicos (510,066 mg/100mL) tendo valor intermediário no teor de flavonoides (344,705 mg/100mL). Por outro lado, embora o extrato de própolis M+U tenha tido menor teor de compostos fenólicos (433,024 mg/100mL), esse apresentou maior teor de flavonoides (391,764 mg/100mL).

Tabela 1- Valores obtidos para os parâmetros de caracterização química dos extratos etanólicos de própolis.

	Fenólicos totais (mg/100mL)	Flavonoides (mg/100mL)	DPPH (mg/100mL)
EEP U+U*	$510{,}066 \pm 7{,}226^{a}$	$344{,}705 \pm 7{,}843^{ab}$	$54{,}669 \pm 0{,}697^{ab}$
EEP M+M**	$500{,}387 \pm 14{,}195^{ab}$	$302{,}875 \pm 0{,}0^{a}$	$55{,}061 \pm 1{,}220^{a}$
EEP M+U***	$433{,}024 \pm 2{,}581^{b}$	$391{,}764 \pm 2{,}614^{b}$	$40{,}025 \pm 0{,}348^{b}$

*Dupla Ultrasonicação em banho ultrassônico **Dupla Maceração ***Maceração associada ao uso de banho ultrassônico – Maceração/Ultrasonicação.
Letras diferentes na coluna representam diferenças significativas entre os diferentes métodos de extração quando $p \leq 0{,}05$.

Feita a análise estatística, observou-se que os extratos U+U e M+M apresentaram resultados semelhantes quanto a atividade antioxidante, medida pelo DPPH e a quantidade de fenólicos totais. Esses resultados se mostram de acordo com a literatura, conforme estudo de Andrade et al. (2017), onde relatam que a atividade antioxidante da própolis se deve principalmente aos seus compostos fenólicos. O extrato M+U apresentou maior quantidade de flavonoides, porém os valores de fenólicos totais e DPPH mostraram-se menores, diferindo assim dos demais EEP's. Bridi et al. (2015) relata que a quantidade desses compostos não reflete necessariamente uma maior atividade antibacteriana, e sugere que outros testes, como por exemplo, Capacidade de Absorção do Radical de Oxigênio (ORAC) e os próprios testes antimicrobianos, devem ser considerados no estabelecimento de padrões internacionais de qualidade para a própolis. Ghasemi et al. (2009) apontam que o valor de flavonoides pode nem sempre estar relacionado a atividade antioxidante, e que dependendo de sua conformação estrutural, flavonoides com uma

determinada estrutura, podem ou não apresentar atividade de eliminação de radicais. Escriche & Juan Borrás (2018) destacam a importância da realização de uma dupla extração na mesma amostra de própolis, e que o método de preparo U+U mostrou-se como a melhor alternativa de extração de compostos fenólicos na própolis, pois esse procedimento economiza um tempo considerável, uma vez que requer apenas uma hora mesmo após a realização das duas extrações.

6.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Considerando o ponto principal deste estudo, que é a ação inibidora, os resultados das CIM's e das CBM's são apresentados na **Tabela 2.** Nessa tabela, são apresentados os valores tanto para os extratos etanólicos de própolis como também para os demais antimicrobianos testados (melitina, nisina, cinamaldeído e eugenol), além da tetraciclina.

Os EEP's apresentaram resultados significativos, uma vez que os ensaios controle feitos com o etanol não apresentaram atividade bacteriostática ou bactericida, mantendo os valores extremamente elevados (>3950 µg/mL) tanto para CIM como CBM. Observa-se que os valores de CIM e CBM foram praticamente os mesmos para as diferentes formas de extração dos EEP's, com exceção do extrato M+U que apresentou valor de CBM de 156,25 µg/mL para *P. alvei,* diferindo assim dos demais EEP's que apresentaram valores menores (78,12 µg/mL).

Tabela 2. Valores obtidos (µg/mL) para Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para todos os antimicrobianos testados utilizando a metodologia da microdiluição.

	CIM (µg/mL)		**CBM (µg/mL)**	
	P. alvei	***B. subtilis***	***P. alvei***	***B. subtilis***
EEP U+U	$78,12^{a\#}$	$156,25^{a\#}$	$78,12^{a\#}$	$156,25^{a\#}$
EEP M+M	$78,12^{a\#}$	$156,25^{a\#}$	$78,12^{a\#}$	$156,25^{a\#}$
EEP M+U	$78,12^{a\#}$	$156,25^{a\#}$	$156,25^{ac\#}$	$156,25^{a\#}$
Álcool 70%	$>3.950,00^{b\#}$	$>3.950,00^{b\#}$	$>3.950,00^{b\#}$	$>3.950,00^{b\#}$
Cinamaldeído	$39,06^{a\#}$	$312,50^{ad\#}$	$78,12^{a\#}$	$312,50^{a\#}$
Eugenol	$312,50^{a\#}$	$1250,00^{d\#}$	$625,00^{c\#}$	$2500,00^{c\#}$
Melitina	$50,00^{a\#}$	$12,00^{c\#}$	$50,00^{a\#}$	$28,00^{d\#}$
Nisina	$50,00^{a\#}$	$37,50^{c\#}$	$50,00^{a\#}$	$37,50^{d\#}$
Tetraciclina	$2,34^{d\#}$	$0,58^{e\#}$	$4,68^{d\#}$	$0,58^{e\#}$

*Dupla Ultrasonicação em banho ultrassônico **Dupla Maceração ***Maceração associada ao uso de banho ultrassônico – Maceração/Ultrasonicação.
Letras diferentes na coluna representam diferenças significativas de atividade antimicrobiana entre os produtos para o mesmo microrganismo quando $p \leq 0,05$. Símbolos diferentes nas linhas representam diferenças significativas de atividade antimicrobiana de um mesmo produto frente a microrganismos diferentes quando $p \leq 0,05$.

Para ambas as bactérias, os três modos de preparo dos EEP's apresentaram valores semelhantes de CIM e CBM, 156,25 µg/mL para *B. subtilis,* e 78,12 µg/mL para *P. alvei,* exceto para o extrato M+U que apresentou valor de 156,25 µg/mL para CBM. Corroborando com estudos anteriores, a própolis apresenta significante ação antibacteriana sobre *P. alvei* e *B. subtilis* (Dezmirean, 2017; Abdullah, 2019).

Com esses resultados, nota-se que não houve uma relação direta entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides com ação antibacteriana, pois conforme mencionado, não houve diferença nos valores de CIM para as bactérias em função da composição química dos respectivos EEP. Espera-se que um maior teor de compostos fenólicos totais e flavonoides estejam relacionados a melhores efeitos antibacterianos, porém conforme relatado em estudos, a quantidade desses compostos nem sempre refletem uma maior atividade antibacteriana (Przybylek e Karpiński, 2019).

O avanço das técnicas de extração de compostos vegetais mostra-se cada vez mais necessário, buscando vantagens e uma maior eficiência no processo, como menor tempo de extração (Belwal, 2018). Sendo assim, o método de extração U+U apresentou a vantagem de ser um processo mais rápido se comparado aos outros métodos descritos, sem influenciar significativamente a atividade antimicrobiana. Segundo Bankova; Trusheva e Popova (2021), o processo de extração utilizando banho ultrassônico parece ser o método ideal, levando em consideração o tempo e o rendimento da extração, bem como o custo-benefício.

Para *B. subtilis*, os peptídeos antimicrobianos melitina e nisina apresentaram os menores valores tanto inibitórios quanto bactericidas, sendo para melitina 12,0 µg/mL e 28 µg/mL de CIM e CBM respectivamente, e para nisina 37,50 µg/mL em ambas concentrações. Encontra-se na literatura resultados semelhantes aos obtidos, que mostram atividade antimicrobiana da nisina, bem como do veneno de abelhas sobre *B. subtilis* (Mahfouz et al.,2020; Roshanak et al., 2020).

Para *P. alvei*, todos os produtos apresentaram efeitos similares de ação antimicrobiana quanto aos valores de CIM e CBM, exceto o eugenol que apresentou valor de CBM significativamente maior (625 µg/mL). Embora não haja muita informação na literatura sobre atividade de produtos naturais junto a *P. alvei*, Sahinler e Kaftanoglu (2005) reportaram em seu estudo a atividade antibacteriana da própolis sobre *P. alvei*. O cinamaldeído mostrou o menor valor de CIM junto a *P. alvei*, 39,06 µg/mL e CBM de 78,12 µg/mL. Resultados semelhantes são descritos na literatura, como a atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre *P. larvae*, mesmo gênero de *P. alvei* (González, Marioli, 2010; Vaucher et al., 2015). Melitina e nisina apresentaram os menores valores de CIM (50 µg/mL), resultado esse que se repetiu também com a CBM para ambos os peptídeos. A apidaecina, um peptídeo isolado a partir da hemolinfa de abelhas

apresentou atividade inibitória sobre *P. alvei* em concentração de 100 µg/mL, valor portanto, mais elevado que os apresentados pelos peptídeos antimicrobianos nisina e melitina (Casteels et al., 1990)

Quando comparadas as duas bactérias, foram encontrados os mesmos efeitos antimicrobianos de cada produto, compatibilizando com o fato de os produtos testados apresentarem mecanismos de ação semelhantes por atuarem na membrana das células bacterianas.

Quanto ao antibiótico tetraciclina, os valores se mantiveram, conforme esperado, menor ou igual a 4,68 µg/mL para as bactérias no seu estado vegetativo, sendo novamente o *B. subtilis* o mais sensível (0,58 µg/mL) tanto para CIM como para CBM. Desta forma conclui-se que os antimicrobianos testados foram capazes de inibir o crescimento das bactérias na fase vegetativa de forma bastante eficiente.

Outros produtos naturais, extratos de folha e flores de ervas medicinais, mostraram ação antibacteriana frente ao *P. alvei*, com resultado de CIM variando entre 80 µg/mL e 2500 µg/mL, e para *B. cereus*, mesmo gênero de *B. subtilis*, a CIM mostrou variação entre 31 µg/mL e >5000 µg/mL (Hassan et al., 2014). Assim, dados encontrados na literatura também mostram ação inibidora, estando em concordância com os resultados obtidos neste estudo.

6.3 Ação anti-esporo

Uma vez determinadas CIM e CBM para as bactérias na forma vegetativa, o estudo teve também por objetivo, verificar a ação esporocida ou inibidora de esporo. Na **Tabela 3** são apresentados os maiores valores percentuais na taxa de redução da contagem de esporos de *B. subtilis* e *P. alvei* além das respectivas concentrações.

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 *B. subtilis* e *P. alvei* e as respectivas concentrações (µg/mL).

Tratamentos	***B. subtilis***	***P. alvei***
EEP U+U*	83% - 6.000	95% - 16.000
EEP M+M**	92% - 2.000	79% - 12.000
EEP M+U***	86% - 8.000	81% - 14.000
Álcool 70%	82% - 20.000	33% - 20.000
Cinamaldeído	95% - 8.000	87% - 8.000
Eugenol	87% - 6.000	89% - 8.000
Melitina	100% - 6,25	93% - 80
Nisina	100% - 0,78	98% - 15
Tetraciclina	94% - 300	99% - 300

*Dupla Ultrasonicação em banho ultrassônico **Dupla Maceração ***Maceração associada ao uso de banho ultrassônico – Maceração/Ultrasonicação.

O *P. alvei* na forma esporulada apresentou maior resistência aos produtos testados, quando comparados a *B. subtilis*. A presença do exosporium em *P. alvei* pode ser um fator para essa tolerância aos tratamentos, uma vez que essa estrutura pode conferir uma maior resistência a esses esporos (Henriques, Moran Jr., 2007; Stewart, 2015). A tetraciclina, que apresentou os valores mais baixos de concentração inibitória junto as bactérias em seu estado vegetativo (CBM de 4,68 µg/mL para *P. alvei* e 0,58 µg/mL para *B. subtilis*), mostrou-se menos eficaz sobre a sua forma esporulada, sendo capaz de reduzir 94% e 99% de esporos de *B. subtilis* e *P. alvei* respectivamente, a uma concentração de 300µg/mL.

Estudos sugerem que bactérias formadoras de esporos podem desempenhar um papel importante na evolução e disseminação da resistência a antibióticos, devido a sua capacidade de resistir aos tratamentos como os realizados neste estudo. Conforme relatado por Paul et al. (2019), a capacidade do esporo em se manter em repouso, e por sua vez de se manter por mais tempo no ambiente, faz com que esses organismos tenham maior chance de sofrer mutações genéticas que podem conferir resistência aos antibióticos, o que pode justificar os altos valores de concentração da tetraciclina para redução na contagem de esporos.

O cinamaldeído e o eugenol, mesmo em concentrações mais altas (entre 6000 µg/mL e 8000 µg/mL), apresentaram ação anti-esporo sobre as bactérias testadas. Conforme constatado por Alanazi (2018), os compostos cinamaldeído e eugenol também já mostraram ação sobre esporos bacterianos.

Melitina e nisina foram os compostos com maior capacidade de redução no número de esporos quando em menores concentrações, sendo que para melitina foi obtida uma redução de 100% dos esporos a uma concentração de 6,25 µg/mL para *B. subtilis* e 93% de redução a uma concentração de 80 µg/mL para *P. alvei*. Com relação a nisina para *B. subtilis* houve uma redução de 100% a uma concentração de 0,78 µg/mL enquanto que para *P. alvei* houve 98% de redução na contagem em concentração de 15 µg/mL.

Os mecanismos de ação da nisina sobre células vegetativas e esporos bacterianos são distintos, motivo pelo qual pode-se elucidar as concentrações mais baixas de ação da nisina sobre esporos. A estrutura da nisina contem cinco anéis formados por resíduos de lantionina ou metil-lantionina, juntamente com três resíduos de desidro aminoacidos (desidrobutirina 2, Dha5 e Dha33). O resíduo de desidroalanina na posição 5 (Dha5) quando substituído por uma alanina, não apresenta alteração do efeito da atividade da nisina sobre células vegetativas, porém diminui drasticamente sua atividade junto a esporos bacterianos, sugerindo assim que a nisina tem efeitos biológicos diferentes frente a células vegetativas e esporos bacterianos, sendo esses produzidos por mecanismos moleculares distintos (Chan et al., 1996). Enquanto é bem estabelecido que a nisina inibe o crescimento de bactérias vegetativas ao se ligar ao lipídio II, facilitando a formação de

poros, o mecanismo de ação junto a esporos bacterianos ainda precisa ser melhor elucidado (McAuliffe, Ross e Hill, 2001; Gut; Blanke e Van der Donk, 2011).

A melitina apresenta a capacidade de formação de poros na membrana. Mesmo em baixas concentrações, ela pode induzir a formação de poros, permitindo o extravasamento de moléculas transmembrana, correspondendo assim as suas atividades antimicrobianas (Lee at al., 2013). Gut; Blanke e Van der Donk (2011) sugerem que a capacidade de formar poros na membrana é essencial para a inibição de esporos bacterianos, o que pode justificar os baixos valores de concentração da melitina e da nisina para a atividade inibidora de esporo.

6.4 Liberação de proteínas

Os testes de liberação de proteínas foram realizados visando observar danos a membrana plasmática das bactérias, em decorrência da utilização dos tratamentos com os produtos antimicrobianos além do fármaco de escolha tetraciclina. Os resultados obtidos nos ensaios com *B. subtilis* e *P. alvei* podem ser observados nas **Tabelas 4** e **5** e **Figuras 6** e **7** respectivamente, que mostram as concentrações (μg/mL) de proteínas liberadas quando expostas aos produtos em estudo em concentrações correspondentes a uma e duas vezes o valor de CIM, nos tempos T0h, T2h e T4h.

Tabela 4. Concentrações (μg/mL) de proteínas liberadas de *B. subtilis* nos tempos 0h, 2h e 4h em concentrações correspondentes aos valores de uma e duas vezes o valor de CIM.

B. subtilis	**0h**		**2h**		**4h**	
Controle	1,01		1,01		1,01	
	1xCIM	**2xCIM**	**1xCIM**	**2xCIM**	**1xCIM**	**2xCIM**
EEP U+U*	1,01	1.01	1,27	1,29	1,31	1,35
EEP M+M**	1,01	1,02	1,30	1,32	1,39	1,44
EEP M+U***	1,01	1,01	1,30	1,31	1,32	1,36
Melitina	1,02	1,02	1,34	1,37	1,39	1,42
Nisina	1,02	1,02	1,30	1,36	1,38	1,40
Cinamaldeído	1,01	1,01	1,14	1,18	1,20	1,26
Eugenol	1,01	1,01	1,19	1,21	1,23	1,29
Tetraciclina	1,01	1,01	1,11	1,12	1,20	1,22

*Dupla Ultrasonicação em banho ultrassônico **Dupla Maceração ***Maceração associada ao uso de banho ultrassônico – Maceração/Ultrasonicação.

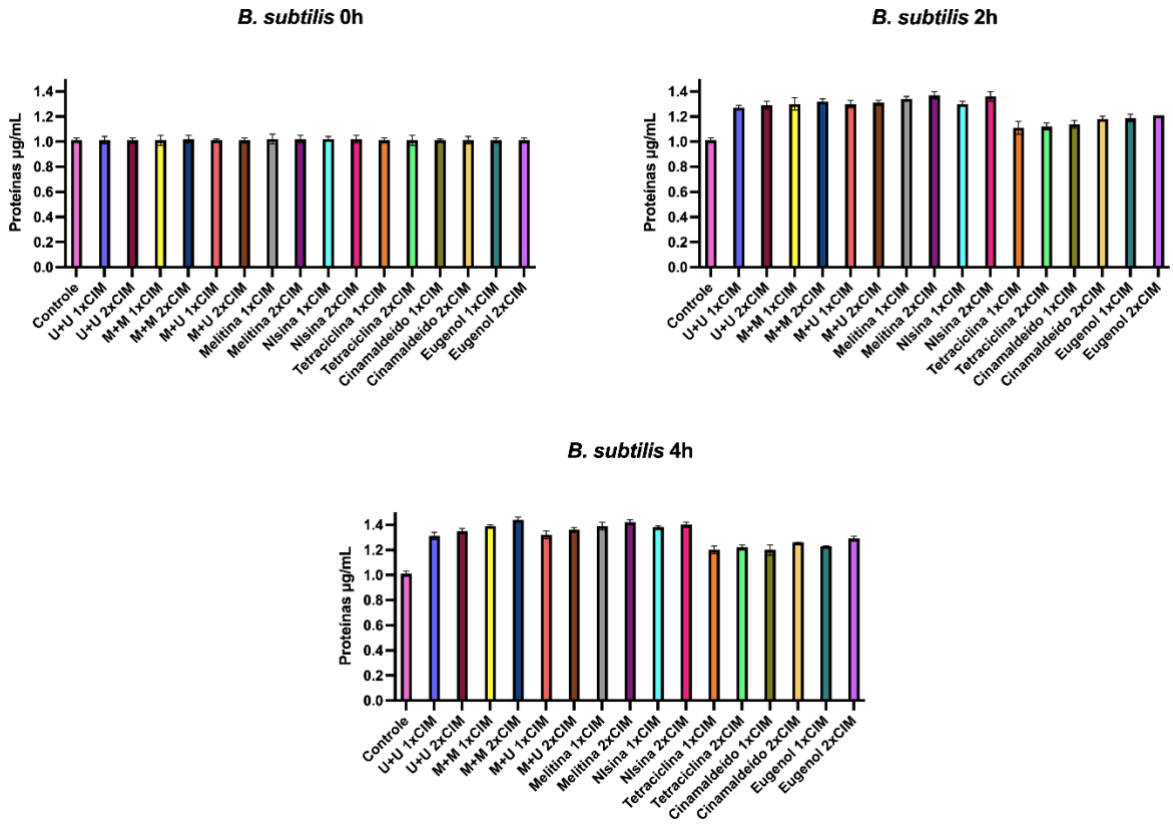


Figura 6. Gráficos dos 3 tempos (0h, 2h e 4h) quanto às concentrações (µg/mL) de proteínas liberadas no sobrenadante, quando expostas a concentrações equivalentes a 1xCIM e a 2xCIM dos diferentes tratamentos para *B. subtilis*.

Tabela 5. Concentrações (µg/mL) de proteínas liberadas de *P. alvei* nos tempos 0h, 2h e 4h em concentrações correspondentes aos valores de uma e duas vezes o valor de CIM.

P. alvei	**0h**		**2h**		**4h**	
Controle	1,01		1,01		1,01	
	1xCIM	**2xCIM**	**1xCIM**	**2xCIM**	**1xCIM**	**2xCIM**
EEP U+U*	1,01	1.01	1,35	1,37	1,39	1,42
EEP M+M**	1.01	1,02	1,30	1,35	1,37	1,40
EEP M+U***	1,01	1,03	1,31	1,36	1,39	1,40
Melitina	1,02	1,02	1,16	1,19	1,21	1,23
Nisina	1,02	1,02	1,29	1,31	1,32	1,36
Cinamaldeído	1,01	1,01	1,11	1,19	1,22	1,28
Eugenol	1,01	1,01	1,26	1,28	1,33	1,35
Tetraciclina	1,01	1,01	1,19	1,26	1,30	1,34

*Dupla Ultrasonicação em banho ultrassônico **Dupla Maceração ***Maceração associada ao uso de banho ultrassônico – Maceração/Ultrasonicação.

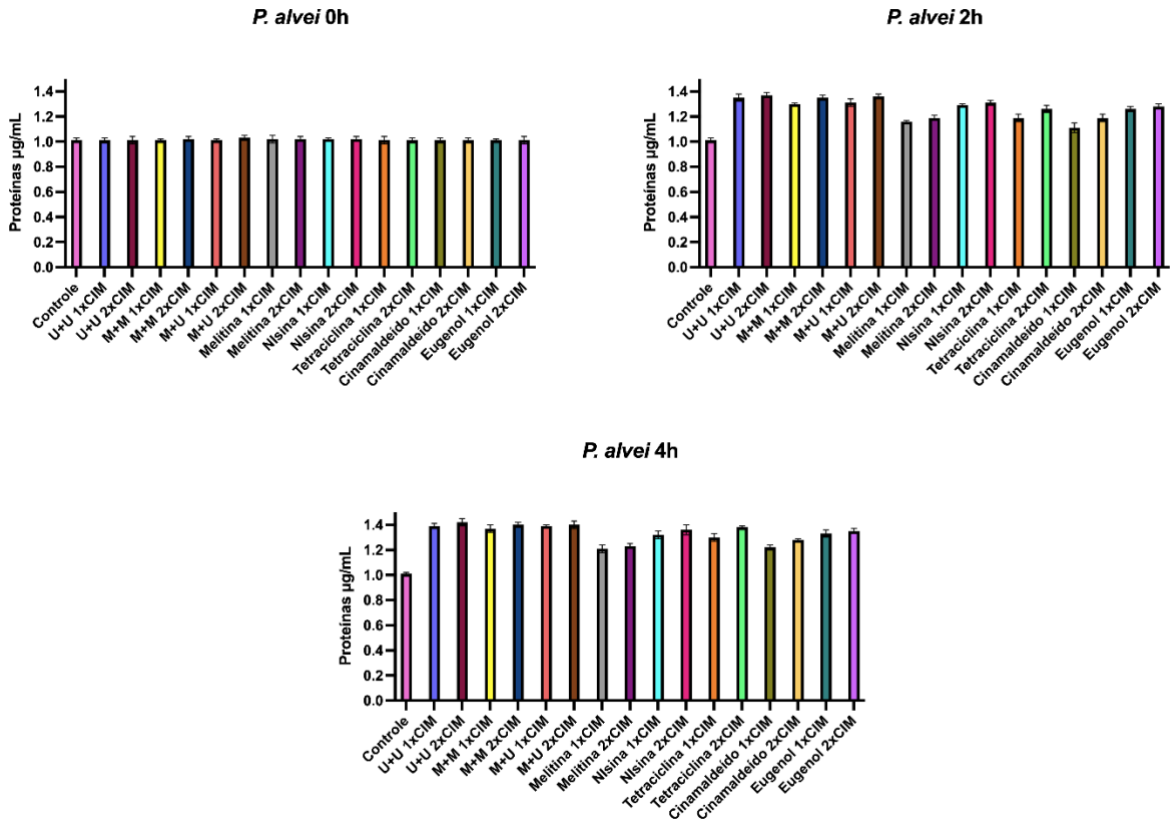


Figura 7. Gráficos dos 3 tempos (0h, 2h e 4h) quanto às concentrações (µg/mL) de proteínas liberadas no sobrenadante, quando expostas a concentrações equivalentes a 1xCIM e a 2xCIM dos diferentes tratamentos para *P. alvei*.

Em todos os produtos testados, observou-se o aumento gradual da concentração de proteínas liberadas em função do tempo e também quando houve incremento de 1 para 2 vezes os valores de CIM testadas.

Em relação ao *B. subtilis,* os valores de liberação de proteínas variaram de 1,20 µg/mL a 1,44 µg/mL após 4 horas de tratamento, com destaque para o extrato de própolis M+M que variou de 1,02 µg/mL (T0h) para 1,44 µg/mL (T4h) na concentração de 2xCIM, e os peptídeos antimicrobianos nisina e melitina que apesentaram variação de 1,02 µg/mL (T0h) para 1,40 µg/mL (T4h) e 1,02 µg/mL (T0h) para 1,42 µg/mL (T4h) respectivamente na concentração de 2xCIM.

Para *P. alvei* a variação dos valores de liberação proteica foram de 1,01 µg/mL (T0h) para 1,42 µg/mL (T4h), destacando os EEP's, que variaram de 1,01 µg/mL (T0h) para 1,42 µg/mL (T4h) para U+U, 1,02 µg/mL (T0h) para 1,40 µg/mL (T4h) para M+M, e de 1,03 µg/mL (T0h) para 1,40 µg/mL (T4h) para M+U, na concentração de 2xCIM.

Observou-se então que em ambas as bactérias em estudo os EEP's mostraram resultados significativos quanto a liberação proteica. Conforme citado por Popova et al. (2017), compostos

ativos da própolis quando em contato com a membrana celular bacteriana, podem causar danos a mesma, induzindo assim a bacteriólise. Uma vez estabelecida a interação entre os EEP's e a membrana celular bacteriana, espera-se a ocorrência de danos significativos a mesma, e como consequência é de se esperar uma maior liberação proteica quando expostos a tratamentos com EEP's. No caso da nisina já é bem conhecido o mecanismo de ação quanto a formação de poros, resultando em aumento na liberação de produtos do citoplasma. Como tais resultados também se repetiram com a melitina, pode-se inferir também mecanismo de ação compatível aos demais produtos.

6.5 Integridade da membrana celular

Os ensaios de libração de ácidos nucléicos foram realizados em busca da presença de material genético, sendo também realizados com todos os produtos em estudo, também em concentrações de uma e duas vezes os valores de CIM, nos tempos nos tempos T0 (0 horas), T1 (2 horas) e T2 (4 horas). Os resultados desses ensaios junto a *B. subtilis* e *P. alvei* são apresentados nas **Figuras 8** e **9** respectivamente.

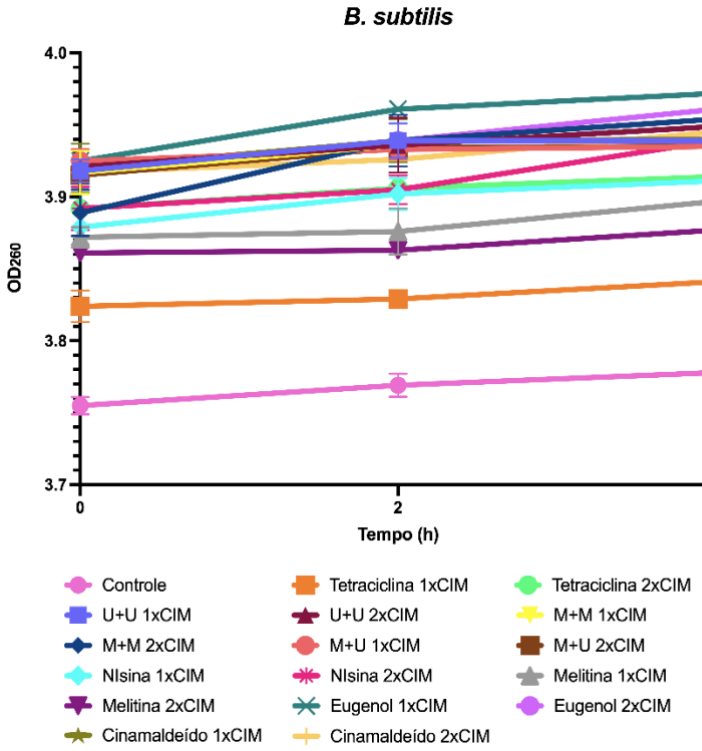


Figura 8. Representação gráfica dos constituintes celulares absorvíveis a 260 nm liberados de *B. subtilis* após tratamento com produtos em estudo nas concentrações de 1xCIM e 2xCIM.

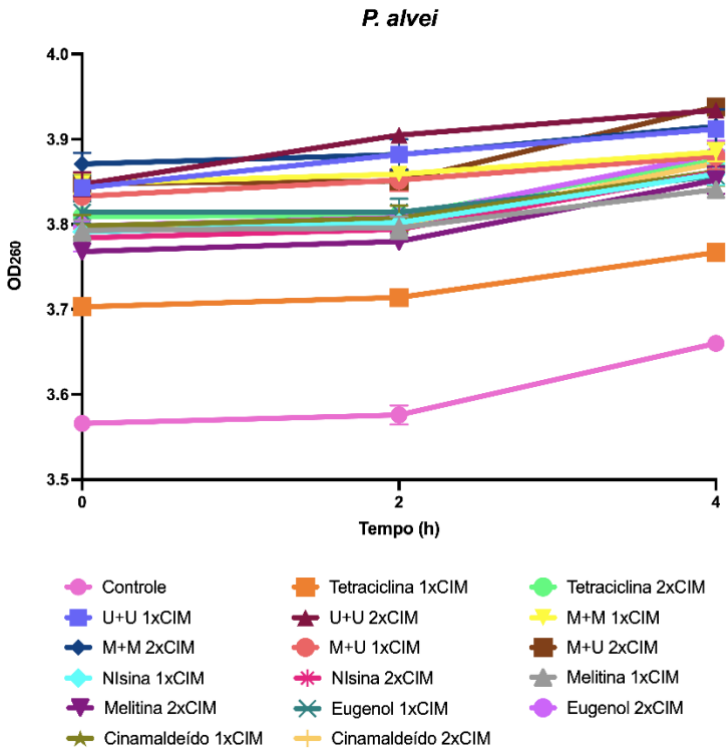


Figura 9. Representação gráfica dos constituintes celulares absorvíveis a 260 nm liberados de *P. alvei* após tratamento com produtos em estudo nas concentrações de 1xCIM e 2xCIM.

Foi possível observar a liberação dos constituintes celulares absorvíveis a 260 nm principalmente no T4h, indicando assim danos a membrana celular bacteriana quando expostos aos tratamentos em estudo. Os EEP's mostraram valores significativos quanto a liberação de ácidos nucleicos tanto para *B. subtilis* quanto para *P. alvei*. Os resultados encontrados estão em conformidade com os relatados na literatura por Vadillo-Rodríguez et al. (2021) que reportam dados semelhantes sobre os aspectos de extravasamento de constituintes intracelulares sob ação de EEP's testados em *E. coli* e *S. epidermidis*, que provocaram danos irreversíveis a membrana celular provocando consequentemente morte bacteriana.

6.6 Efluxo de íons potássio e fosfato

Os ensaios de efluxo de íons potássio e fosfato foram realizados buscando um possível comprometimento quanto a permeabilidade bem como o rompimento da membrana celular das bactérias em estudo, quando expostas aos tratamentos, incluindo a tetraciclina, sendo o extravasamento desses íons um bom indicativo de possíveis alterações metabólicas da célula bacteriana. Os resultados apresentados nas **Tabelas 6** e **7** e **Figuras 10 e 11** mostram as concentrações (mg/L) de íons potássio e fosfato respectivamente, liberados pelas bactérias *B. subtilis* e *P. alvei* submetidas aos tratamentos nos tempos T0 e após T4 horas.

Tabela 6. Concentrações (mg/L) de íons potássio liberados de *B. subtilis* e *P. alvei* nos tempos 0h e 4h em concentrações correspondentes aos valores de uma e duas vezes o valor de CIM.

Íons Potássio	***B. subtilis***				***P. alvei***			
	T0h		**T4h**		**T0h**		**T4h**	
Controle	250		250		250		250	
	1xCIM	**2xCIM**	**1xCIM**	**2xCIM**	**1xCIM**	**2xCIM**	**1xCIM**	**2xCIM**
EEP U+U*	250	250	250	450	250	250	450	450
EEP M+M**	250	250	250	450	250	250	450	450
EEP M+U***	250	250	250	450	250	250	450	450
Melitina	250	250	450	450	250	250	250	450
Nisina	250	250	450	450	250	250	250	450
Cinamaldeído	250	250	250	450	250	250	450	450
Eugenol	250	250	250	450	250	250	250	450
Tetraciclina	250	250	250	450	250	250	250	450

*Dupla Ultrasonicação em banho ultrassônico **Dupla Maceração ***Maceração associada ao uso de banho ultrassônico – Maceração/Ultrasonicação.

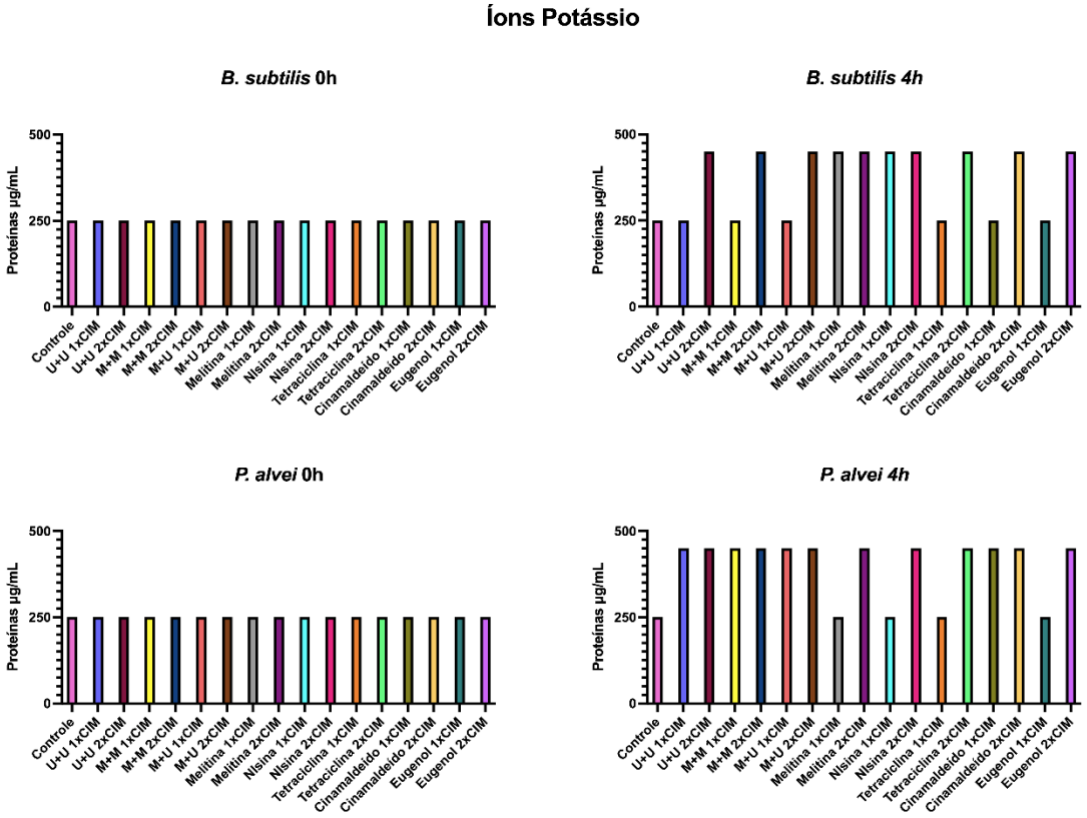


Figura 10. Representação gráfica da liberação de íons potássio de *B. subtilis* e *P. alvei* após tratamento com produtos em estudo nas concentrações de 1xCIM e 2xCIM nos tempos 0 e 4 horas.

Tabela 7. Concentrações (mg/L) de íons fosfato liberados de *B. subtilis* e *P. alvei* nos tempos 0h e 4h em concentrações correspondentes aos valores de uma e duas vezes o valor de CIM.

Íons Fosfato	***B. subtilis***				***P. alvei***			
	T0h		**T4h**		**T0h**		**T4h**	
Controle	0		0		10		10	
	1xCIM	**2xCIM**	**1xCIM**	**2xCIM**	**1xCIM**	**2xCIM**	**1xCIM**	**2xCIM**
EEP U+U*	10	10	10	25	10	10	10	25
EEP M+M**	10	10	10	25	10	10	10	25
EEP M+U***	10	10	10	25	10	10	10	25
Melitina	10	10	25	50	10	10	25	25
Nisina	10	10	10	25	10	10	10	25
Cinamaldeído	10	10	25	25	10	10	25	25
Eugenol	10	10	10	25	10	10	10	25
Tetraciclina	10	10	10	25	10	10	10	25

*Dupla Ultrasonicação em banho ultrassônico **Dupla Maceração ***Maceração associada ao uso de banho ultrassônico – Maceração/Ultrasonicação

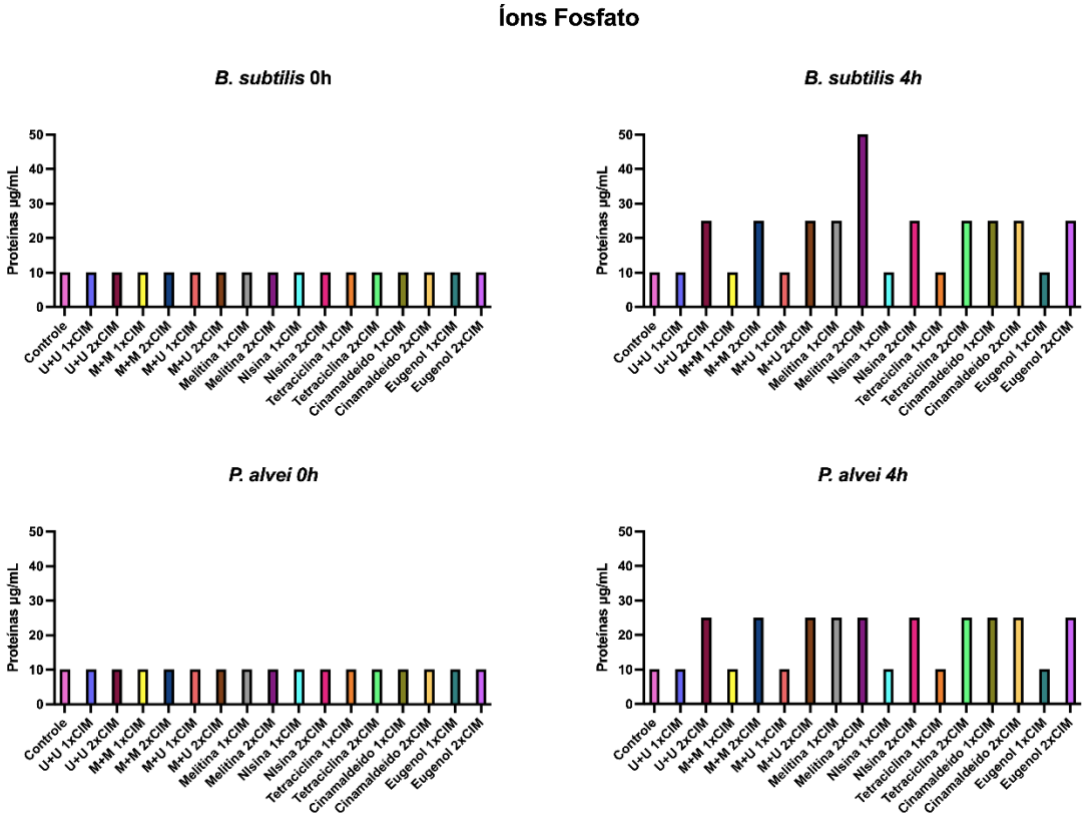


Figura 11. Representação gráfica da liberação de íons fosfato de *B. subtilis* e *P. alvei* após tratamento com produtos em estudo nas concentrações de 1xCIM e 2xCIM nos tempos 0 e 4 horas.

Quanto a liberação de íons potássio, para *B. subtilis*, os três EEP's mostraram resultados semelhantes, com liberação após 4 horas na concentração de 2 vezes o valor de CIM (de 250 mg/L para 450 mg/L). Melitina e nisina mostraram os melhores resultados, variando de 250 mg/L (T0) para 450 mg/L (T4h), para ambas as concentrações de CIM testadas.

Para *P. alvei*, as três formas de preparo dos EEP's apresentaram resultados semelhantes variando de 250 mg/L (T0) para 450 mg/L (T4h) nas concentrações de 1xCIM e 2xCIM. Para melitina, nisina, cinamaldeído, eugenol e tetraciclina, a liberação de íons potássio ocorreu após 4 horas na concentração de 2 vezes o valor de CIM.

Quanto a liberação de íons fosfato, para *B. subtilis*, os três EEP's, bem como a nisina, eugenol e tetraciclina apresentaram mudanças nas concentrações de liberação variando de 10 mg/L (T0h) para 25 mg/L (T4h) na concentração de 2xCIM. Melitina e cinamaldeído provocaram liberação no T4h para as concentrações de 1 e 2 vezes o valor de CIM, sendo a melitina, o produto com maior variação, ou seja, foi de 10 mg/L (T0h) para 50 mg/L (T4h) na concentração de 2 vezes o valor de CIM.

Para *P. alvei*, as três formas de preparo dos EEP's, o composto majoritário eugenol, o peptídeo antimicrobiano nisina, bem como a tetraciclina apresentaram liberação de íons fosfatos após 4 horas para 2 vezes o valor de CIM, variando de 10 mg/L (T0) para 25 mg/L (T4h). A melitina e o cinamaldeído mostraram os melhores resultados, liberando após quatro horas, 25 mg/L para ambas as concentrações de CIM.

Conforme relatado por Cintas et al. (2001), a formação de poros na membrana, leva ao extravasamento de íons potássio e fosfato, levando assim a perda da integridade dessa membrana.

Após 4 horas de exposição aos tratamentos, todos os produtos, ainda que em concentrações diferentes, liberaram íons potássio e fosfato no meio extracelular, demonstrando que os produtos em estudo apresentaram a capacidade de perturbação da membrana celular, mesmo resultado encontrado por Miao et al. (2016), em estudo com peptídeos antimicrobianos sobre *S. aureus*.

Os resultados obtidos com os ensaios de liberação de proteínas, integridade da membrana celular e efluxo de íons potássio e fosfato indicaram o efeito sobre a membrana celular bacteriana, observados pelo aumento gradual da concentração de proteínas liberadas em função do tempo, bem como resultados significativos quanto a liberação dos constituintes celulares absorvíveis a 260 nm e dos íons fosfato e potássio. Bajpai et al. (2014) descreveram a relação entre a liberação de íons essenciais bem como de constituintes celulares absorvíveis a 260 nm como indicativo de ação antimicrobiana junto a membrana celular bacteriana, causando danos irreversíveis a mesma. Conforme estudo de Pellegrini et al. (2017), óleos essenciais apresentaram ação sobre *Paenibacillus larvae*, mesmo gênero de *P. alvei*, e também um importante patógeno de abelhas, sendo constatada a atividade antimicrobiana bem como a capacidade de provocar ruptura da membrana celular bacteriana, provocando assim o extravasamento de constituintes citoplasmáticos. Esses indicativos mostram que os produtos testados são capazes de causar danos a membrana celular bacteriana e consequentemente a lise celular, sendo possíveis alternativas naturais de controle de patógenos como os responsáveis por doença em larvas de abelhas.

6.7 Sinergismo entre os antimicrobianos testados e a tetraciclina

A tetraciclina é considerada o fármaco de escolha em muitas atividades relacionadas a produção animal. Assim, como o objetivo deste estudo é poder utilizar estes compostos no caso especialmente da doença em larvas de abelha da espécie *Apis mellifera*, optou-se em realizar ensaios para determinar possíveis interações sinérgicas entre tetraciclina e os antimicrobianos testados. Foram utilizadas as duas metodologias, baseadas no teste do *time kill curve* com valores de densidade óptica (DO) e também contagem após plaqueamento sendo, portanto, unidades formadoras de colônias (UFC) por mL e posterior transformação em Log de UFC/mL.

A importância desses ensaios é mostrar a capacidade potencializadora dos antimicrobianos testados juntamente com a tetraciclina, sendo possível por esta metodologia verificar efeito sinérgico com ação bactericida ou bacteriostática. Assim sendo, os resultados das duas metodologias, DO e Log de UFC/mL, são mostrados nas **Figuras 12 e 13** sobre *B. subtilis* e *P. alvei* respectivamente.

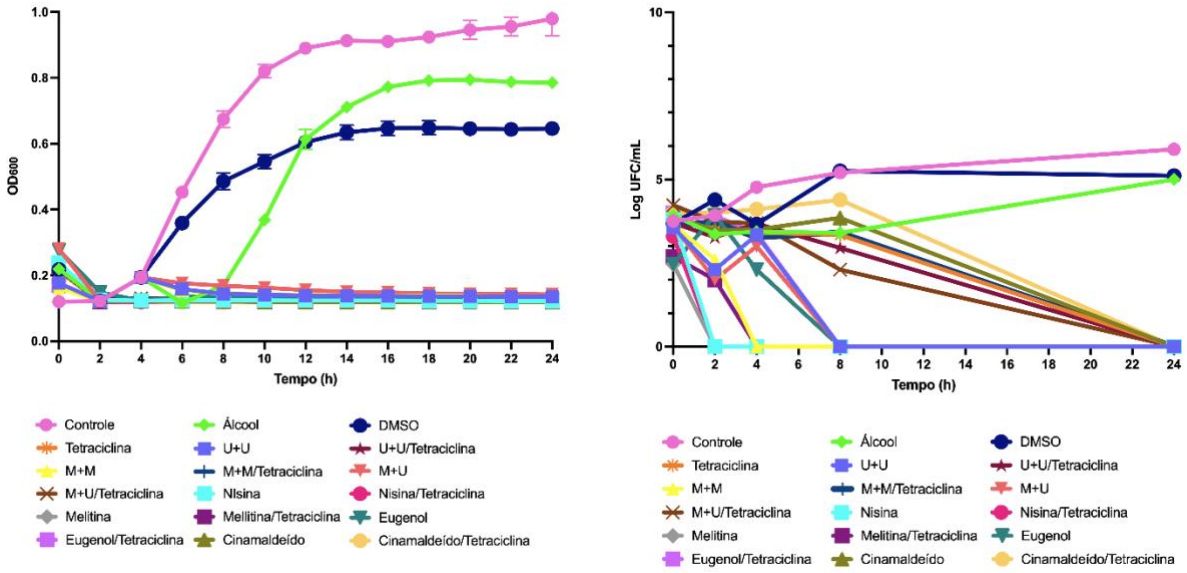


Figura 12. Valores obtidos para DO (600 nm) e para Log de UFC/mL, e obtenção de curvas de sobrevivência para verificação do efeito sinérgico entre os produtos em estudo (EEP's, peptídeos antimicrobianos e compostos majoritários) e a tetraciclina, testados de forma isolada e em combinação com a tetraciclina sobre *B. subtilis*.

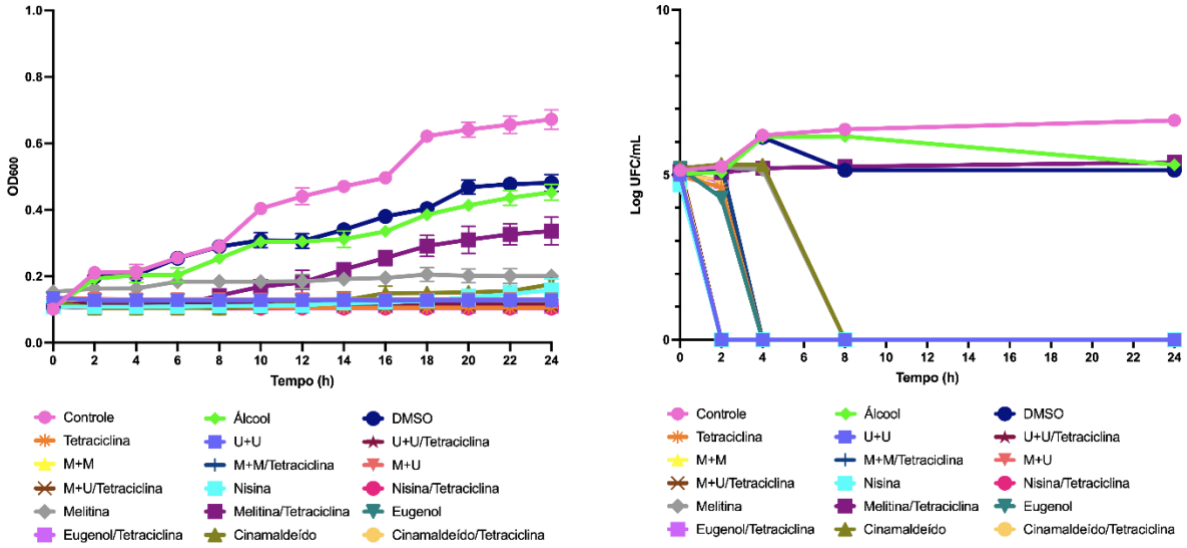


Figura 13. Valores obtidos para DO (600 nm) e para Log de UFC/mL, e obtenção de curvas de sobrevivência para verificação do efeito sinérgico entre os produtos em estudo (EEP's, peptídeos antimicrobianos e compostos majoritários) e a tetraciclina, testados de forma isolada e em combinação com a tetraciclina sobre *P. alvei.*

Referente a bactéria *B. subtilis* (**Figura 12**), as combinações dos produtos nisina, melitina e eugenol com a tetraciclina apresentaram sinergismo com efeito bactericida após 2, 4 e 8 horas respectivamente, e as combinações de cinamaldeído, além de todos os EEP's com a tetraciclina mostraram efeito bactericida somente após 24 horas.

Para *P. alvei*, (**Figura 13**), as combinações dos produtos EEP's U+U, M+U e nisina com a tetraciclina mostraram efeito bactericida após 2 horas do início dos tratamentos e as combinações dos EEP M+M, cinamaldeído e eugenol com a tetraciclina, foram bactericidas após 4 horas. A melitina não mostrou efeito sinérgico com a tetraciclina pela metodologia da OD 600, porém mostra um efeito bacteriostático pela metodologia do Log de UFC/ml.

Hollmann et al. (2018) destacam a atividade sinérgica de peptídeos antimicrobianos e antibióticos, sugerindo que uma vez que os peptídeos agem nas membranas, e consequentemente a formação de poros facilitaria a entrada de antibióticos convencionais, afetando diferentes alvos da célula bacteriana.

Conforme mencionado por Stefanović (2018), o potencial sinérgico entre produtos naturais com fármacos antibacterianos convencionais pode viabilizar alguns benefícios, sendo por exemplo a capacidade de potencializar os efeitos farmacológicos, ou mesmo a utilização em concentrações mais baixas, prevenir a possível seleção de linhagens bacterianas que sejam resistentes a estes mesmos fármacos.

São conhecidos efeitos sinérgicos da própolis com antibióticos convencionais, conforme relatado por Fernandes Júnior et al. (2005), que mostraram atividades sinérgicas entre EEP com os fármacos cloranfenicol, gentamicina, netilmicina, tetraciclina, vancomicina e também com a clindamicina.

Langeveld; Veldhuizen; Burt (2014) descreveram a ação sinérgica de cinamaldeído com os fármacos amicacina e gentamicina, bem como o eugenol, que mostrou sinergismo com ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, norfloxacino, novobiocina, oxacilina, penicilina, polimixina, rifampicina, sulfametoxazol, tetraciclina e vancomicina.

Os resultados obtidos no estudo mostram-se significativos quando comparados aos observados na literatura. Extratos de plantas medicinais inibem o crescimento de *P. alvei* após 12 horas quando testados em concentrações bactericidas mínimas (CBM) dos respectivos extratos, e o peptídeo antimicrobiano trichokonina VI apresenta atividade bactericida após 20 horas, frente a *B. subtilis* (Hassan, 2014; Su et al., 2012).

De acordo com o exposto, a possibilidade de uso associado de tetraciclina com vários dos produtos antibacterianos testados pode ser um grande avanço nas tentativas de se trazer a luz estratégias eficazes para o controle de bactérias patogênicas para abelhas e com isto minimizar de certa forma os prejuízos provocados por conta da ação do *P. alvei.*

7. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que o método de extração U+U mostrou-se o mais vantajoso pela rapidez no modo de preparo além de apresentar o maior valor de compostos fenólicos totais, porém no que diz respeito a atividade antimicrobiana, não houve diferenças significativas quanto aos métodos de extração, apresentando efeitos similares para ambas as bactérias de interesse.

Melitina e nisina foram os produtos com maior capacidade tanto inibidora quanto bactericida apresentando os menores valores de CIM e CBM para o *B. subtilis*, ficando acima apenas da tetraciclina, além de mostrarem também os menores valores de CBM para P. alvei. O cinamaldeído foi o composto majoritário com o menor valor de CIM frente a *P. alvei*.

Quanto a atividade anti-esporo, os peptídeos antimicrobianos nisina e melitina, foram os que mostraram maior capacidade de redução no número de esporos em menores concentrações tanto para *B. subtilis* quanto para *P. alvei*, todavia, os compostos majoritários cinamaldeído e eugenol, ainda que em concentrações mais elevadas, também apresentaram atividade redutora de esporo.

Quando expostas aos tratamentos, as bactérias mostraram um aumento gradual da concentração de proteínas liberadas em função do tempo, bem como resultados significativos

quanto a liberação dos constituintes celulares absorvíveis a 260 nm e dos íons fosfato e potássio, indicando assim danos a membrana celular bacteriana.

Todos os produtos em estudo, mostraram sinergismo com a tetraciclina seja ele bactericida ou bacteriostático e possuem potencial como futuros agentes antimicrobianos, sendo possíveis alternativas de controle de patógenos como os responsáveis por doenças em larvas de abelhas.

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.

BAJPAI, V. K.; SHARMA, A.; MOON, B.; BAEK, K. H. Chemical Composition Analysis and Antibacterial Mode of Action of T axus 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 própolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. **Journal of Venomouns Animals and Toxins**, v. 1, p. 63-65, 1995.

FORSGREN, 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 sensoral 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 apitoxicin 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 própolis exhibits antiparasitic properties in vitro and reduces worm burden and egg production in a mouse model harboring either early or chronic *Schistossoma 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, 2ª edição. Guaíba: Agrolivros, 2005, 378p.

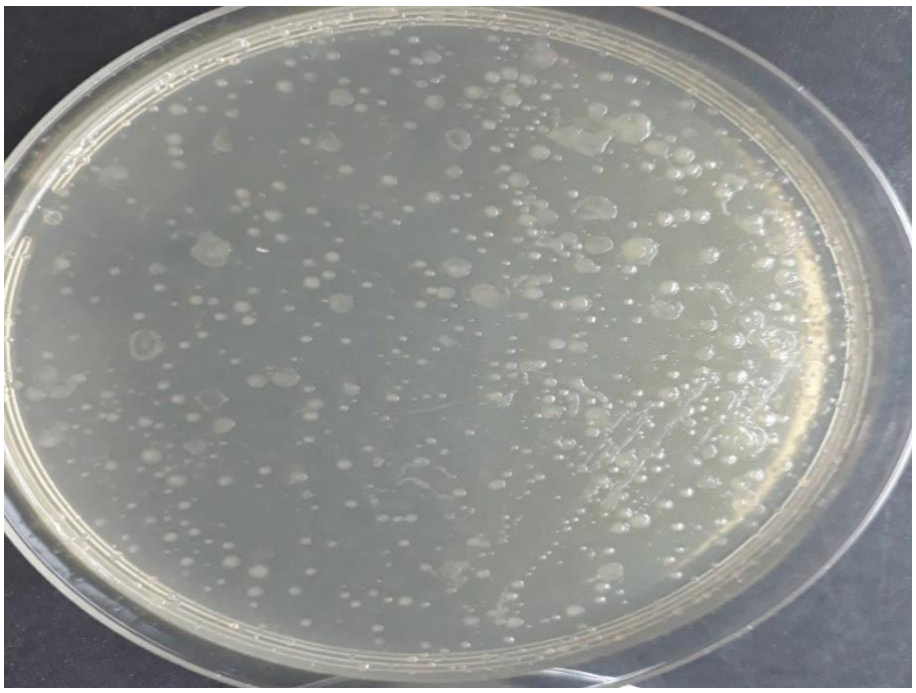
WOISKY, R.G., SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99-105, 1998.

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.

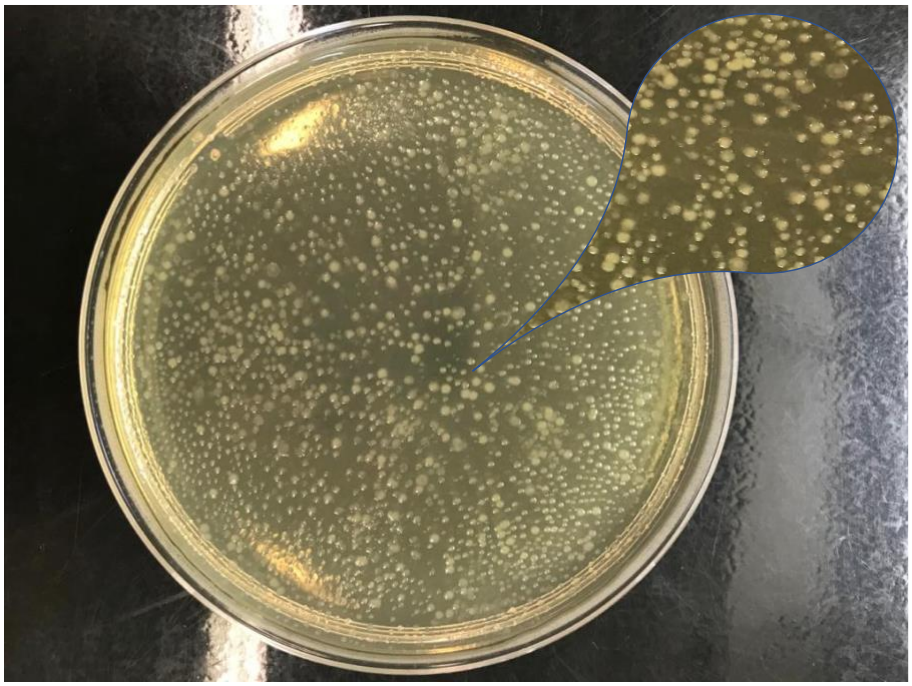
YEUNG, A. T. Y.; GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 2161-2176, 2011.

ZABAIOU, 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.

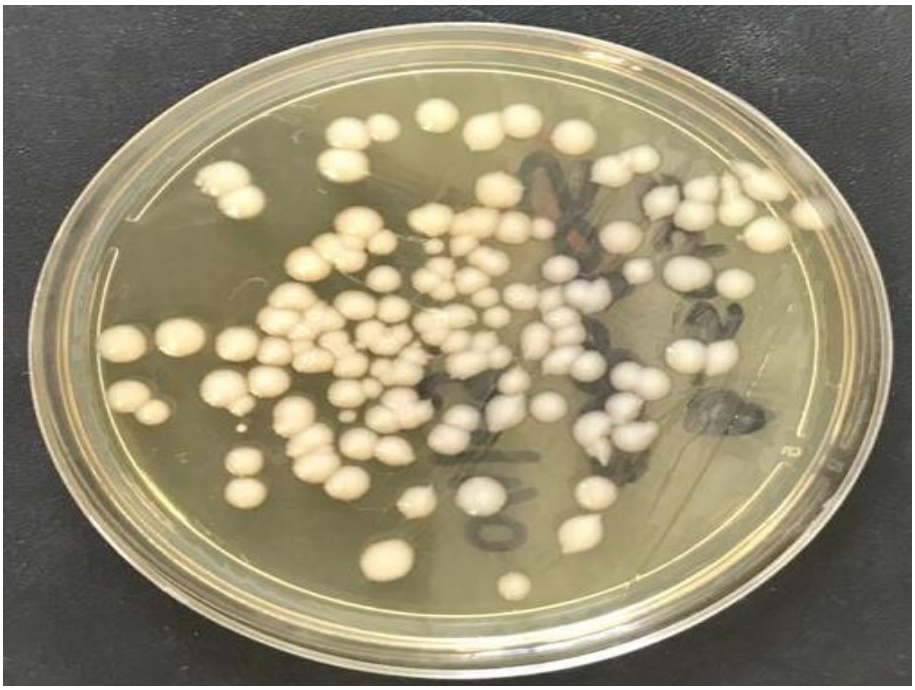
9. Apêndice



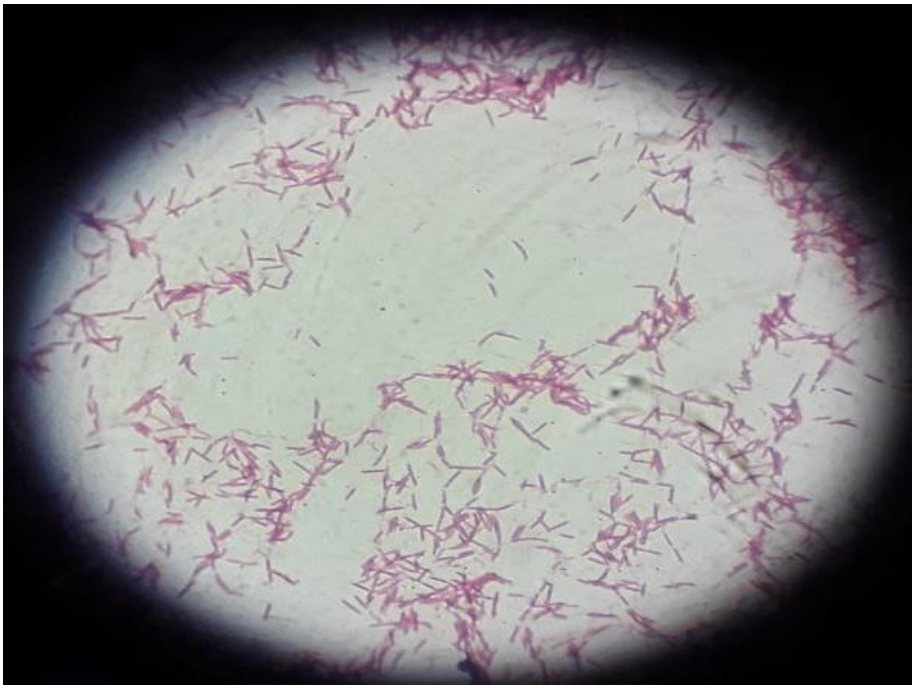
1- Foto de crescimento de *Paenibacillus alvei* em meio de cultura TSA com seu crescimento peculiar. (Fonte: Alessandra Aguirra Sani).



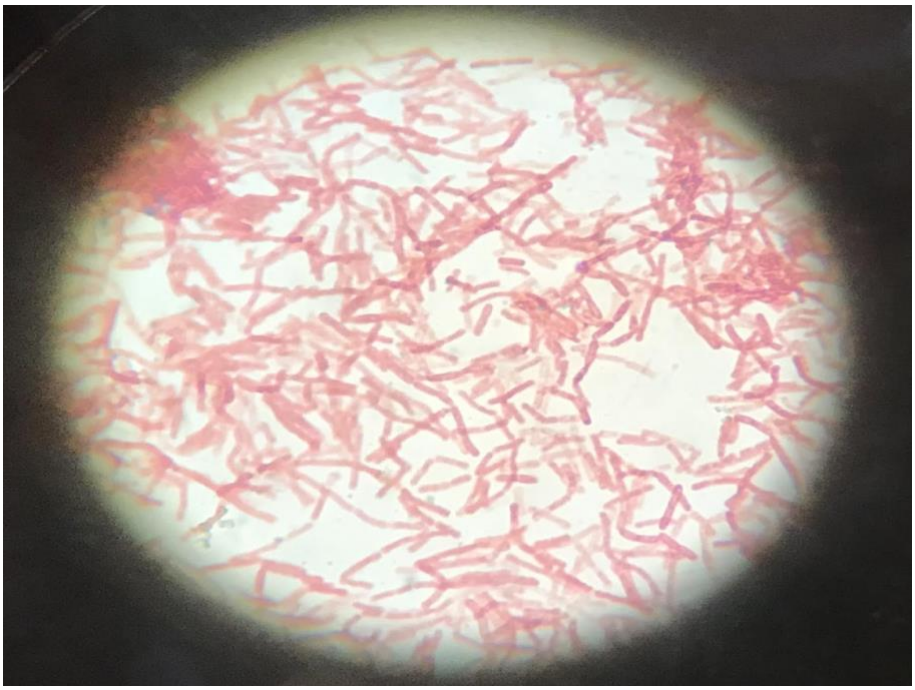
2- Foto de crescimento de *Paenibacillus alvei* em meio de cultura BHI Agar. (Fonte: Alessandra Aguirra Sani).



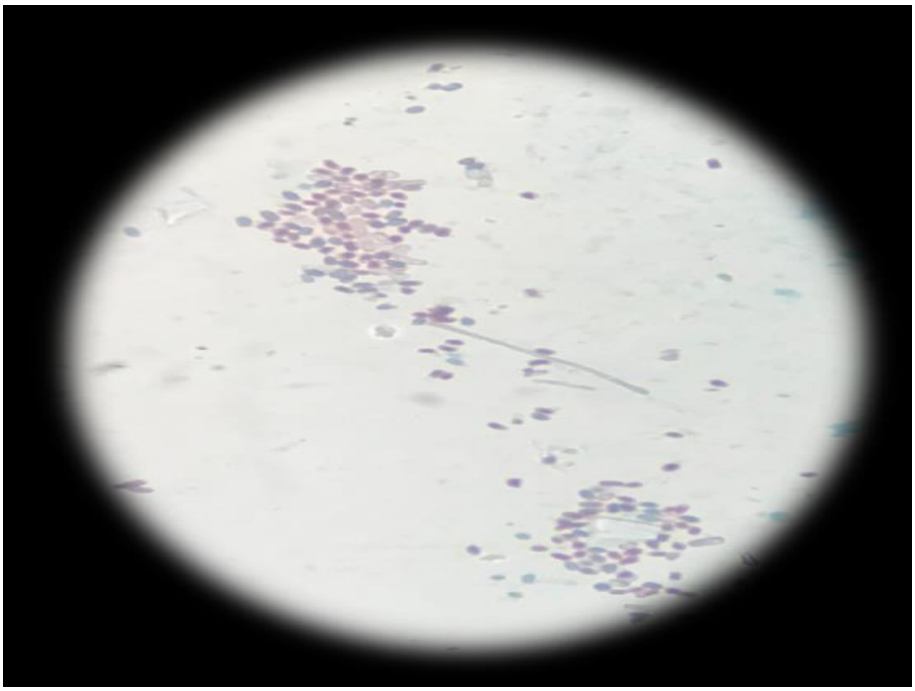
3- Foto de crescimento de *Bacillus subtilis* em meio de cultura BHI Ágar. (Fonte: Alessandra Aguirra Sani).



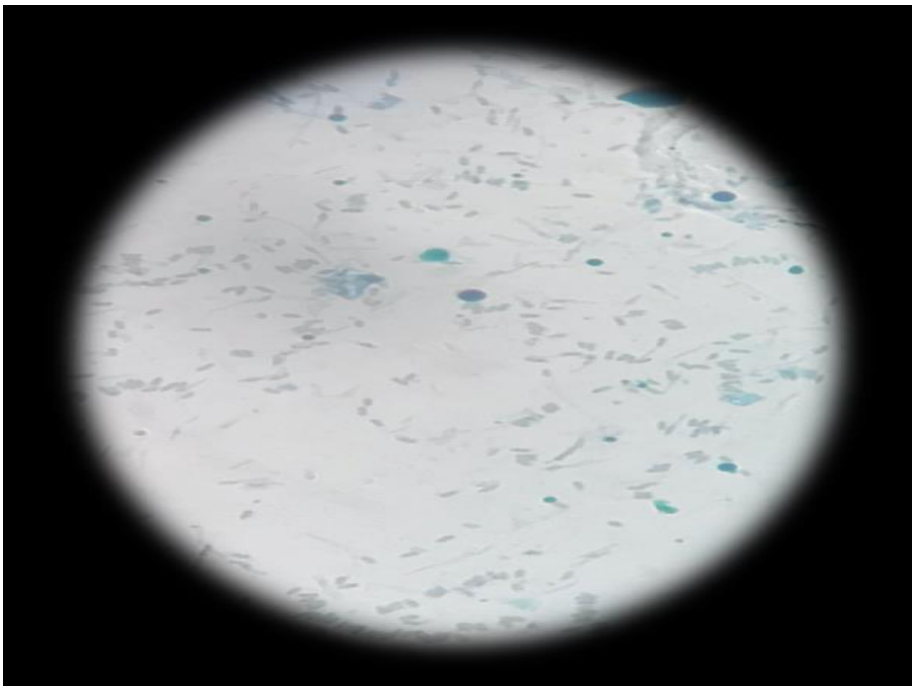
4- Foto de microscopia óptica de *Paenibacillus alvei* corado pelo método de Gram. (Fonte: Alessandra Aguirra Sani).



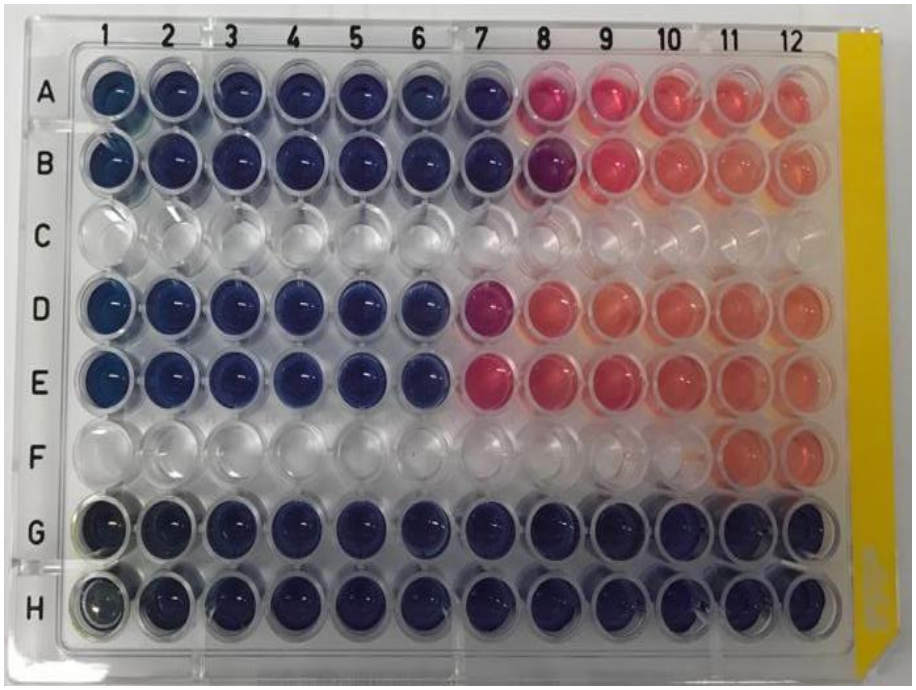
5- Foto de microscopia óptica de *Bacillus subtilis* corado pelo método de Gram. (Fonte: Alessandra Aguirra Sani).



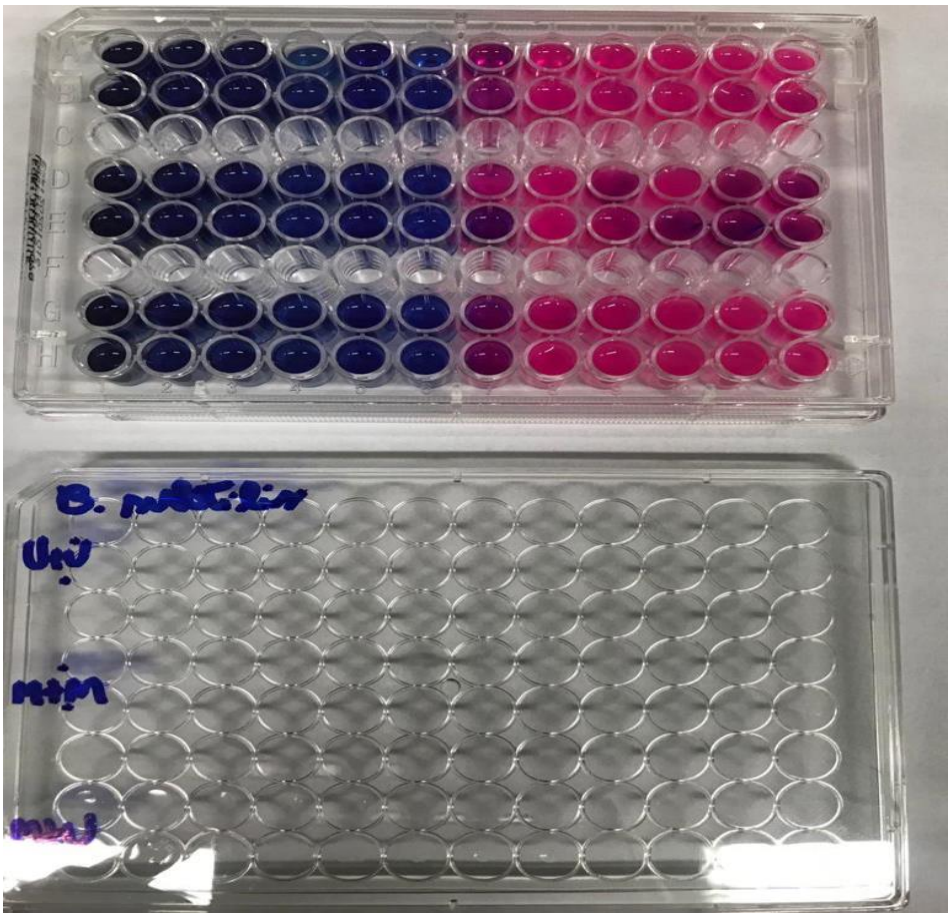
6- Foto de microscopia óptica de esporos de *Bacillus subtilis* corados pelo método de Wirtz. (Fonte: Alessandra Aguirra Sani).



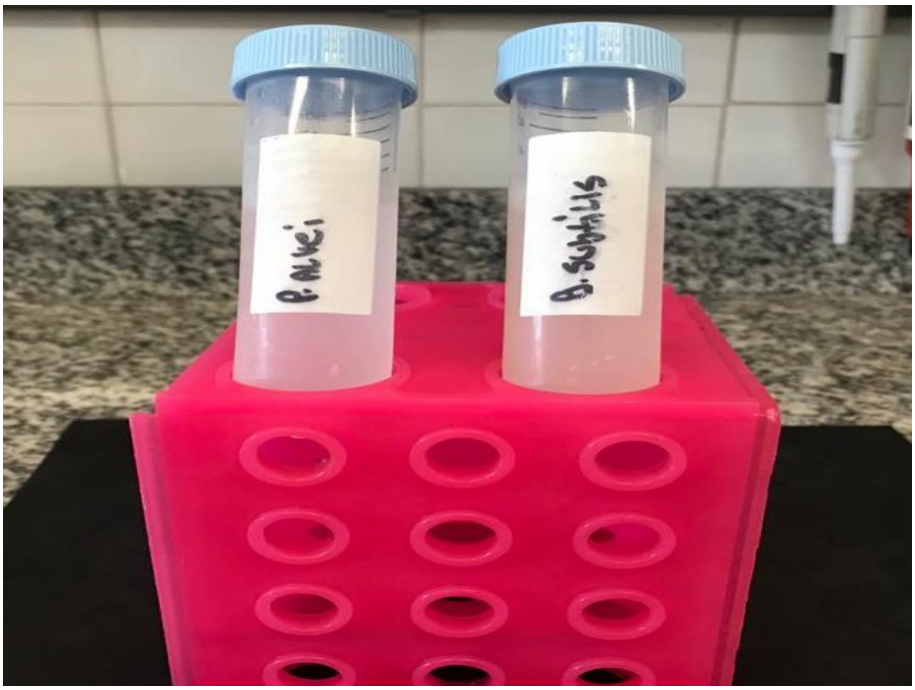
7- Foto de microscopia óptica de esporos de *Paenibacillus alvei* corados pelo método de Wirtz. (Fonte: Alessandra Aguirra Sani).



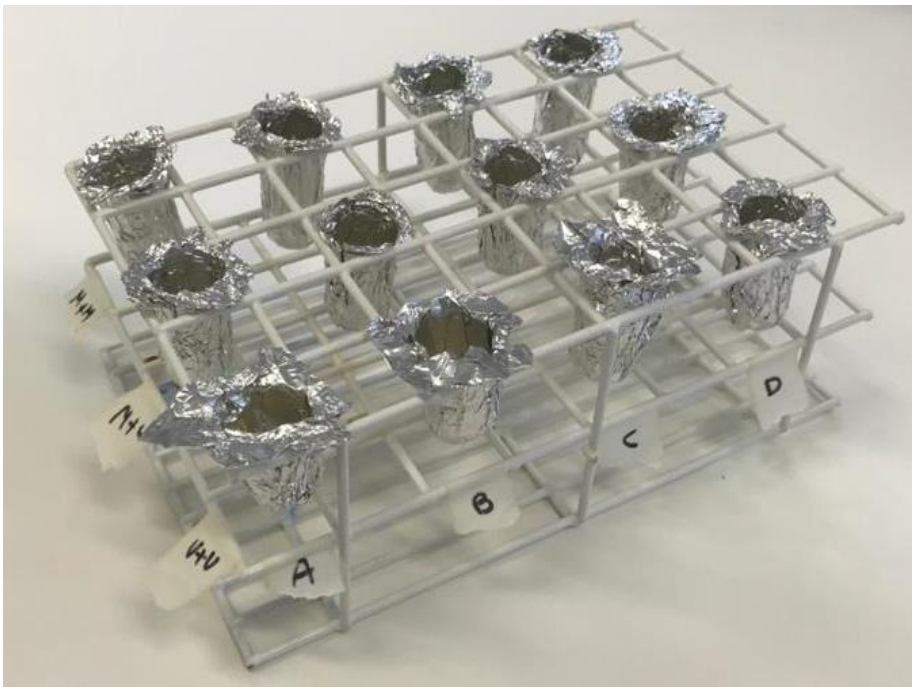
8- Placa de ELISA utilizada no ensaio de microdiluição para determinação da CIM do composto majoritário cinamaldeído sobre *P. alvei* após adição de resazurina (0,1%). Os poços roxos indicam as concentrações sem o crescimento bacteriano e os poços rosas as concentrações com crescimento bacteriano. (Fonte: Alessandra Aguirra Sani).



9- Placa de ELISA utilizada no ensaio de microdiluição para determinação da CIM dos diferentes EEP's sobre *B. subtilis* após adição de resazurina (0,1%). Os poços roxos indicam as concentrações sem o crescimento bacteriano e os poços rosas as concentrações com crescimento bacteriano. (Fonte: Alessandra Aguirra Sani).



10- Suspensões de esporos das bactérias *Paenibacillus alvei* e *Bacillus subtilis*. (Fonte: Alessandra Aguirra Sani).



11- Foto do procedimento de determinação do peso seco (g/mL) dos extratos etanólicos de própolis (EEP) em cadinhos de alumínio após evaporação do solvente etanol. (Fonte: Alessandra Aguirra Sani).



12- Foto do banho ultrassônico utilizado para obtenção dos extratos etanólicos de própolis preparado U+U e M+U, e para o processo de obtenção de esporos. (Fonte: Alessandra Aguirra Sani).