



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



AÇÃO DA PRÓPOLIS, APITOXINA E MELITINA DE *Apis mellifera* E SUAS INFLUÊNCIAS NOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*

ANA FLÁVIA MARQUES PEREIRA

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. Adjunto Ary Fernandes Júnior

Botucatu - SP

Julho de 2017

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



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

AÇÃO DA PRÓPOLIS, APITOXINA E MELITINA DE *Apis mellifera* E SUAS INFLUÊNCIAS NOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*

ANA FLÁVIA MARQUES PEREIRA
PROF. ADJUNTO ARY FERNANDES JÚNIOR

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. Adjunto Ary Fernandes Júnior

Botucatu - SP

Julho de 2017

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 TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pereira, Ana Flávia Marques.

Ação da própolis, apitoxina e melitina de *Apis mellifera*
e suas influências nos fatores de virulência de
Staphylococcus aureus / Ana Flávia Marques Pereira. -
Botucatu, 2017

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

Orientador: Ary Fernandes Júnior

Capes: 21201021

1. Própolis. 2. Abelha - Veneno. 3. *Staphylococcus aureus*
resistente à meticilina. 4. Antibacterianos. 5. Biofilme.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana; Biofilme; MRSA;
Sinergismo; Veneno de abelha.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente ao Prof. Adj. Ary Fernandes Júnior pela oportunidade de aprimorar os meus conhecimentos na bacteriologia e por toda atenção e ajuda recebida durante a iniciação científica e o mestrado. Um ótimo orientador e professor que sempre é muito dedicado e está à disposição para fornecer todo seu conhecimento.

Às meninas do Laboratório de Bacteriologia e Produtos Naturais - L.A.B.A.P. (Fernanda, Mariana, Bruna, Lidiane e Fabiana) que nunca mediram esforços para me ajudar e sempre estavam presentes para sanar todas as dúvidas ao longo do percurso. Um obrigada também às meninas da iniciação científica (Ana Carolina e Alessandra) pelas conversas, conhecimentos trocados e risadas.

À Fernanda que é companheira de bancada, balada e viagens. Um agradecimento à Mariana pelo companheirismo e incentivo à vida fitness. Agradeço à Bruna pelos conselhos e risadas. E também à Lidiane que foi a minha coorientadora na iniciação científica, que participou da minha banca de qualificação e agora estará presente em minha banca de defesa, obrigada pela ajuda e dúvidas sanadas. Enfim, a vocês que mais do que companheiras de laboratório viraram companheiras para a vida, agradeço a todos os passeios, risadas, diversão, viagens e conselhos.

À Fabiana pela ajuda com os experimentos e com as estatísticas.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, principalmente à Ana Cláudia Acerra e à Prof. Dra. Vera Lúcia Mores Rall que contribuiu na elaboração deste trabalho.

A todos do CEVAP (Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos), principalmente ao Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior que não mediu esforços para fornecer a melitina utilizada nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi por todos os materiais fornecidos e todos os esclarecimentos em relação à apicultura que foi muito interessante.

Ao Prof. Dr. Severino Matias de Alencar (ESALQ-USP) pela análise do extrato hidroalcoólico de própolis.

O meu agradecimento pelo conhecimento e formação ao Instituto de Biociências de Botucatu e Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Câmpus de Botucatu.

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida (processo 162208/2015-4).

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio à pesquisa (2015/14278-6).

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, sem vocês não teria sido possível. A todos citados deixo aqui o meu muito obrigada.

Lista de Figuras

Figura 1 - O fracionamento do veneno total de *Apis mellifera* (1 mg/mL) foi realizado em cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em coluna C18.

Figura 2 - Curva de sobrevivência para verificação das interações entre as diferentes apitoxinas e a oxacilina testados isoladamente e em combinação com a oxacilina sobre MRSA ATCC.

Figura 3 - Curva de sobrevivência para verificação das interações entre as diferentes apitoxinas e a oxacilina testados isoladamente e em combinação com a oxacilina sobre um isolado clínico de MRSA.

Figura 4 - Curva de sobrevivência para verificação das interações entre a oxacilina, melitina, Api 1 e própolis testados isoladamente e em combinação com a oxacilina sobre MRSA ATCC.

Figura 5 - Curva de sobrevivência para verificação das interações entre a oxacilina, melitina, Api 1 e própolis testados isoladamente e em combinação com a oxacilina sobre um isolado clínico de MRSA.

Figura 6 - Alterações morfológicas causadas pela Api 1 em MRSA ATCC 33591 observadas por microscopia eletrônica de transmissão.

Figura 7 - Alterações morfológicas causadas pela melitina em MRSA ATCC 33591 observadas por microscopia eletrônica de transmissão.

Figura 8 - Alterações morfológicas causadas pela Api 1 em *E. coli* ATCC 45895 observadas por microscopia eletrônica de transmissão.

Figura 9 - Alterações morfológicas causadas pela melitina em *E. coli* ATCC 45895 observadas por microscopia eletrônica de transmissão.

Lista de Quadros

Quadro 1. Composição do veneno da abelha *Apis mellifera*.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Conteúdo de flavonoides totais, fenólicos totais e capacidade sequestrante de DPPH da amostra do extrato de própolis testada.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM_{90%}) e concentração bactericida mínima (CBM_{90%}) em µg/mL para as diferentes apitoxinas, EHP, melitina, oxacilina e cefalotina para as linhagens de MRSA testadas.

Tabela 3. CIM (µg/mL) da Api 1 e melitina sobre linhagens ATCC de *S. aureus* produtores de enterotoxinas A, B, C e D e respectivos valores correspondentes a 70% do CIM.

Tabela 4. CIM (µg/mL) da Api 1 e melitina sobre linhagem ATCC de *S. aureus* produtor de biofilme e respectivos valores correspondentes a 50% do CIM.

Tabela 5. Produção de enterotoxinas A, B, C e D por *S. aureus* cultivado com concentrações de 70% da CIM da Api 1 e da melitina.

Tabela 6. Valores de UFC/mL para as cepas padrões ATCC de *S. aureus* enterotoxigênicos no tempo zero do cultivo e após 24 horas submetidos em condições de 70% das CIMs obtidas previamente para Api 1 e melitina.

Tabela 7. Porcentagem de inibição na produção de biofilme por Api 1 e melitina sobre *S. aureus* produtor de biofilme.

Lista de Abreviaturas

agr	Gene acessório regulador
Api 1	Apitoxina obtida de abelhas com flora apícola silvestre
Api 2	Apitoxina de abelhas com flora apícola de eucalipto
Api 3	Apitoxina de abelhas com flora apícola de laranjeira
Api 4	Apitoxina de abelhas flora apícola silvestre associada à alimentação artificial
BHI	Infusão de cérebro e coração
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EHP	Extrato hidroalcoólico de própolis
ESBL	Enterobacteriaceae produtoras de beta-lactamase de espectro amplo
IFN-gamma	Intérferon gamma
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
MCD	Peptídeo degranulador de mastócitos
MHC	Mueller Hinton Caldo
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSCRAMMs	Componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz
PBP2a	Proteína de ligação da penicilina
PBS	Tampão fosfato salino
PIA	Polissacarídeo intercelular adesina
PNSSP	<i>Streptococcus pneumoniae</i> não suscetível à penicilina
REMA	Resazurin Microtiter Assay Plate
SCCmec	Cassete cromossômico estafilocócico
SEA	Enterotoxina tipo A
SEB	Enterotoxina tipo B
SEC	Enterotoxina tipo C
SED	Enterotoxina tipo D
SEs	Enterotoxinas estafilocócicas

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSA	Ágar tríptico de soja
TSB	Caldo tríptico de soja
UFC	Unidade formadora de colônia
VRE	<i>Enterococcus</i> spp. resistente à vancomicina

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
g	Gramma
h	Hora
kDa	Kilodalton
Log	Logaritmo
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
μL	Microlitro
μmol	Micromol

Resumo: A busca por novos fármacos é uma constante, especialmente para aqueles obtidos a partir de produtos naturais, que apresentem melhor eficácia e vários efeitos terapêuticos. A própolis e o veneno (apitoxina) da abelha *Apis mellifera*, além da melitina, uma fração da apitoxina, possuem ação antimicrobiana reportada na literatura. As ações antibacterianas do extrato hidroalcoólico de própolis (EHP), de apitoxinas obtidas das abelhas *Apis mellifera* submetidas a floras apícolas diferentes (Api 1 - flora apícola silvestre, Api 2 - flora apícola de eucalipto, Api 3 - flora apícola de laranjeira, Api 4 - flora apícola silvestre associada com alimentação artificial) e de melitina foram testadas sobre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) utilizando metodologia da microdiluição (*Resazurin Microtiter Assay Plate* – REMA) para obtenção dos respectivos valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Ensaios também foram realizados para verificação de sinergismo entre o EHP, as diferentes apitoxinas e a melitina em combinação com a oxacilina sobre uma linhagem de MRSA ATCC e um isolado clínico de MRSA utilizando metodologia da curva de sobrevivência (*time kill curve*). Foram realizados ensaios inéditos objetivando verificar também se a Api 1 e melitina inibem a produção de enterotoxinas sobre cepas ATCC de *S. aureus* SEA, SEB, SEC, SED e se inibem a produção de biofilme sobre a cepa ATCC de *S. aureus*. A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para verificar alterações morfológicas e estruturais provocadas pela Api 1 e melitina sobre MRSA e *E. coli*.

Todas as apitoxinas testadas e a melitina apresentaram ação antibacteriana frente ao MRSA além de sinergismos com efeitos bactericidas quando em combinação com a oxacilina, especialmente para melitina e Api 1. O EHP mostrou um alto valor de CIM e também um sinergismo bacteriostático com a oxacilina. A Api 1 e melitina não foram capazes de inibir a produção e/ou liberação de enterotoxinas de *S. aureus* e Api 1 mostrou uma baixa porcentagem de redução sobre a produção de biofilme (35,1%) enquanto a melitina mostrou ser um produto eficiente na redução de produção de biofilme (66,3%). Assim, conclui-se que a melitina e Api 1 se mostram potencialmente adequados para o desenvolvimento de fármacos no futuro.

Palavras chave: Atividade antibacteriana, Biofilme, MRSA, Sinergismo, Veneno de abelha.

Abstract: The search for new drugs is a constant, especially those obtained from natural products with better efficacy and many therapeutic effects. The propolis, bee venom (apitoxin) from *Apis mellifera* bee and melittin, a fraction of apitoxin, have reported antibacterial activity in the literature. We verified the antibacterial action of hydroalcoholic extract of propolis (HEP), the bee venom corresponding to different bee blossoms (Api 1 - Wild bee blossom, Api 2 - Eucalyptus bee blossom, Api 3 - Orange tree bee blossom, Api 4 - Wild bee blossom associated with artificial food) and melittin on strains of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) through microdilution assays (Assay Resazurin Microtiter Plate - REMA) to obtaining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). We performed assays to verify synergism of HEP, the different apitoxins and melittin in combination with oxacillin on a strain of MRSA ATCC and a clinical isolate of MRSA using time-kill curve methodology. Unpublished trials were carried out to verify also if Api 1 and melittin inhibit the enterotoxins production of *S. aureus* ATCC strains (SEA, SEB, SEC, SED) and biofilm production of *S. aureus* ATCC strain. We did the transmission electron microscopy to check the phenotypic changes caused by Api 1 and melittin on MRSA and *E. coli*.

All the tested apitoxins and melittin showed an antibacterial action against MRSA and bactericidal synergisms in combination with oxacillin, especially for melittin and Api 1. The HEP showed a high value MIC and a bacteriostatic synergism with oxacillin. Api 1 and melittin were not able to inhibit the production and or the release of enterotoxins. Api 1 showed a low reduction percentage on biofilm production (35,1%) while melittin showed to be a good product to reduce biofilm production (66,3%). Therefore, we concluded that melittin and Api 1 are potentially suitable for the development of drugs in the future.

Keywords: Antibacterial activity, Bee venom, Biofilm, MRSA, Synergism.

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente (MRSA)	15
1.1.2. Enterotoxinas estafilocócicas	16
1.1.3. Biofilme	17
1.2. Produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos	19
1.3. Abelha <i>Apis mellifera</i>	19
1.3.1. Própolis	20
1.3.2. Veneno (apitoxina)	21
2. Objetivos	25
2.1. Objetivo geral:	25
3. Material e métodos:	26
3.1. Obtenção da própolis, apitoxina e melitina	26
3.2. Obtenção da própolis e preparo de seu extrato hidroalcoólico	26
3.3. Compostos fenólicos totais, flavonoides e ação antioxidante do extrato de própolis	26
3.4. Apitoxina de <i>Apis mellifera</i>	27
3.5. Obtenção da melitina	27
3.6. Linhagens bacterianas	28
3.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	29
3.8. Verificação de interações (sinergismo) pela curva de sobrevivência	29
3.9. Ensaio com concentração subinibitória da Api 1 e melitina sobre <i>S. aureus</i> produtores de enterotoxinas A, B, C e D.	30

3.10. Ensaio com concentração subinibitória da Api 1 e melitina sobre <i>S. aureus</i> produtor de biofilme.....	31
3.11. Microscopia eletrônica de transmissão sobre cepas bacterianas	32
4. Análise Estatística	33
5. Resultados e discussão	34
5.1. Compostos fenólicos totais, flavonoides e ação antioxidante do extrato hidroalcoólico de própolis	34
5.2. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima	34
5.3. Verificação de interações (sinergismo) pela curva de sobrevivência	37
5.4. Ensaio com concentrações subinibitórias da Api 1 e a melitina sobre <i>S. aureus</i> produtores de enterotoxinas A, B, C e D.	40
5.5. Ensaio com concentrações subinibitórias da Api 1 e melitina sobre <i>S. aureus</i> produtor de biofilme.....	42
5.6. Microscopia eletrônica de transmissão	43
6. Considerações Gerais.	49
7. Referência Bibliográfica.....	50
APÊNDICE.....	61

1. Introdução

As pesquisas por alternativas terapêuticas para as doenças infecciosas são uma medida constante e necessária. Além disto, a resistência bacteriana tornou-se um problema mundial, devido ao uso indiscriminado de antibióticos tanto em animais como em humanos, principalmente nos hospitais, já que nesses ambientes normalmente ocorrem falhas nas medidas básicas de controle de infecção hospitalar (SANTOS, 2004).

Outro aspecto é que a resistência bacteriana vem afetando o mundo todo e assim elevando a mortalidade, morbidade e os custos com a saúde. Assim, destaque é dado para cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* não suscetível à penicilina (PNSSP), *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE) e enterobactérias produtoras de beta-lactamase de amplo espectro (ESBL), essas apresentam ampla disseminação tanto nos hospitais como também nas comunidades (SANTOS, 2004).

O surgimento das cepas resistentes tem explicação nas mutações cromossômicas ou devido a recombinação genética, provocada pelos processos de: conjugação (a bactéria doadora transfere o plasmídeo contendo os genes de resistência para uma bactéria receptora, geralmente, através do pili, havendo contato entre as células), transformação (uma bactéria incorpora fragmentos de DNA de outra bactéria que sofreu lise celular) ou transdução (genes de resistência são transferidos por bacteriófago) (SHLAES et al., 1997).

Existem alguns mecanismos que explicam a resistência bacteriana tal como a alteração estrutural do sítio alvo do antibiótico; alteração da permeabilidade da membrana externa (limitando o acesso do antibiótico para dentro da célula através de bombas de efluxo, bombeando o antibiótico para o exterior) e por meio da inativação enzimática do fármaco (HEMAISWARYA et al., 2008).

O uso racional de antibióticos associado a prevenção de infecções bacterianas com o uso de vacinas e o controle da disseminação de bactérias resistentes são algumas das medidas a serem tomadas para evitar a resistência bacteriana (GUIMARÃES et al., 2010).

1.1. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococcaceae e o *S. aureus* é considerado a principal espécie do gênero. É uma bactéria Gram-positiva, ubíqua, possui forma de cocos que se agrupam como cachos de uva e é anaeróbio facultativo. Na parede celular do *S. aureus* há uma camada espessa de peptidoglicano, ácido teicóico e a proteína A, que apresenta uma grande afinidade pela fração Fc da IgG, impedindo a adesão destas e evitando a ativação do complemento (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

A importância clínica do *S. aureus* é indiscutível, especialmente para as cepas multirresistentes, dentre elas a MRSA (*S. aureus* meticilina resistente). Essa bactéria pode ser encontrada na microbiota da pele e mucosas. Os portadores de *S. aureus* nas narinas anteriores apresentam um maior risco de causar infecções na comunidade e nos hospitais (WERTHEIM et al., 2005; TRABULSI, 2008; HONDA et al., 2010)

O *S. aureus* é uma bactéria oportunista, capaz de invadir através de rupturas na pele ou mucosas de seus portadores e podendo causar desde infecções localizadas até disseminadas, piodermites, osteomielite, artrite séptica, bacteremia e endocardite. Esta bactéria também tem a capacidade de desenvolver resistência a antibióticos e produzir uma grande variedade de toxinas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

1.1.1. *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA)

No final de 1930, com a descoberta das sulfonamidas, verificou-se que pouco tempo depois já surgiram cepas de *S. aureus* resistentes a essa nova droga. No início de 1940, com o uso contínuo da benzilpenicilina (penicilina G), algumas cepas também passaram a ser resistentes, pois começaram a produzir penicilinases (β -lactamases). No final de 1950, as cepas de *S. aureus* haviam adquirido resistência a maioria dos antibióticos, incluindo eritromicina, estreptomicina e tetraciclina. Em 1960, surgiram as penicilinas semissintéticas (meticilina, nafcilina, dicloxacilina e flucloxacilina, que conseguem atuar sobre cepas produtoras de β -lactamases) e as cefalosporinas de primeira geração (cefalotina, cefaloridina e cefalozina que também serviam para o tratamento de cepas de *S. aureus*). Em 1961, os primeiros isolados de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA) começaram a surgir (BRUMFITT; HAMILTON-MILLER, 1989). Até o final dos anos 70, as cepas de MRSA eram consideradas esporádicas, mas logo após foram encontradas no mundo todo podendo ser considerada uma significativa causa de morbidade e mortalidade (DELANEY et al., 2008; NAZARI et al., 2015).

A resistência de MRSA está relacionada com a presença do gene *mecA* que é carregado pelo elemento móvel conhecido como cassete cromossômico estafilocócico (SCCmec). Esse gene codifica uma proteína de ligação da penicilina conhecida como PBP2a e esta faz com que a meticilina e os antibióticos penicilinase-resistentes tenham baixa afinidade pelo local de ligação na bactéria (parede celular), não sendo efetivos frente à bactéria (NAZARI et al., 2015).

A MRSA se propagou dos hospitais e chegou a comunidade, por meio de ondas epidêmicas devido a vários clones (RASIGADE; VANCENESCH, 2014).

MRSA é umas das causas mais comuns de infecções adquiridas no hospital e na comunidade. Cepas de MRSA associadas a comunidade são mais suscetíveis a tetraciclina, clindamicina e cotrimoxazol. Já para as cepas relacionadas com o ambiente hospitalar podem ser utilizadas linezolida, daptomicina e vancomicina (utilizada somente como última alternativa), sendo estes também eficientes frente a MRSA associada a comunidade. Porém, algumas cepas de MRSA vem apresentando resistência à vancomicina e neste caso os antibióticos utilizados são linezolida, daptomicina e tigeciclina (RAYGADA; LEVINE, 2009; NAZARI et al., 2015).

1.1.2. Enterotoxinas estafilocócicas

O *S. aureus* possui uma versatilidade nutricional e pode se desenvolver e produzir toxinas em leites, produtos lácteos (queijo, manteiga, sorvete), doces (tortas, bolos e doces cremosos), carnes, massas, ovos, frutas e vegetais (TRANTER, 1990), sendo estas bactérias importantes causadoras de intoxicação alimentar.

O *S. aureus* está relacionado a intoxicações alimentares, síndrome do choque tóxico, alergias e doenças autoimunes que são causadas por meio das exotoxinas produzidas por esta bactéria, incluindo as enterotoxinas estafilocócicas (SEs) (BALABAN; RASOOLY, 2000).

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são uma grande família de mais de 20 tipos distintos de enterotoxinas, destacando as enterotoxinas A, B (CASMAN et al., 1963), C (BERGDOLL et al., 1965) e D (CASMAN et al., 1967) que são comuns nos casos de intoxicação alimentar (BERGDOLL, 1974; OMOE et al., 2004).

As enterotoxinas são exoproteínas hidrossolúveis, com peso molecular de 26 a 29 KDa, que possuem uma ponte dissulfeto perto do centro da molécula, com grandes quantidades de lisina, ácido aspártico e glutâmico, tirosina, dois resíduos de triptofano e cistinas, formando a cisteína (BERGDOLL; ROBBINS, 1973; CUNHA; CALSOLARI, 2008). Destaca-se o fato de serem pirogênicas, resistentes as enzimas do trato gastrointestinal, termoestáveis e estas provocam a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β e IFN-gamma), sendo superantígenos que estimulam a proliferação de célula T não específica (BALABAN; RASOOLY, 2000; PINCHUK, et al., 2010).

Muitos genes que codificam as enterotoxinas estão localizados em elementos móveis, como plasmídeos, ilhas de patogenicidade e bacteriófagos. Assim, uma mesma cepa de *S. aureus* pode produzir mais de um tipo de SE (BERGDOLL, 1989; PINCHUK et al., 2010).

A intoxicação alimentar é um grande problema de saúde pública. Nos Estados Unidos, estimou-se que a intoxicação alimentar acometeu 47,8 milhões de pessoas, causando 127 mil

hospitalizações e 3 mil mortes por ano. Dessas intoxicações, verificou-se que o *S. aureus* foi o patógeno responsável por 1064 das hospitalizações ocorridas (SCALLAN et al., 2011 a,b).

A real incidência de intoxicação alimentar por *S. aureus* normalmente é subestimada, devido, por exemplo, à falta de relatos de casos para as autoridades da saúde, pois a sintomatologia pode ser branda e de curta duração além das falhas no diagnóstico. É importante o conhecimento dessa incidência, pois a intoxicação afeta o indivíduo social e economicamente, podendo gerar gastos hospitalares, perdas econômicas em indústrias e restaurantes e perda de dias de trabalho (ARGUDÍN et al., 2010).

As intoxicações alimentares causadas por *S. aureus* apresentam um período de incubação rápido, cerca de 2 a 6 horas, após a ingestão de alimentos com a toxina pré-formada e os sintomas mais comuns são vômito, diarreia e dor abdominal, sendo que a quantidade de enterotoxina ingerida e a suscetibilidade do indivíduo podem variar o tempo de aparecimento dos sintomas e a gravidade da doença (BERGDOLL, 1989; TRANTER, 1990).

A contaminação dos alimentos pode ocorrer principalmente pelo manipulador, por equipamentos de preparação contaminados além do armazenamento de forma inadequada dos alimentos preparados (HOLMBERG; BLACK, 1984; TRANTER, 1990). Para a prevenção da contaminação deve-se manter as medidas de higiene, como a lavagem das mãos e uso de luvas além dos alimentos serem mantidos em temperaturas acima de 60° C ou refrigerados em temperaturas abaixo de 5° C (MURRAY, 2005).

1.1.3. Biofilme

As infecções nosocomiais, especialmente aquelas que envolvem o uso de dispositivos implantáveis - cateteres e próteses - geralmente são causadas por bactérias produtoras de biofilmes, e normalmente associadas a *S. aureus* e *S. epidermidis*. O biofilme consiste em uma comunidade de microrganismos associados a uma superfície que produz uma matriz polimérica extracelular que envolve esta comunidade e consiste de fenótipos alterados em relação ao crescimento, expressão de genes e produção de proteínas. Infecções associadas a produção de biofilmes por MRSA são de difícil tratamento o que faz aumentar a necessidade de mais trocas dos dispositivos implantáveis do que nas infecções por *S. epidermidis* (JONES et al., 2001; DONLAN; COSTERTON, 2002).

O biofilme permite a sobrevivência das bactérias em ambientes hostis. As estruturas formadas no biofilme possuem canais pelos quais os nutrientes podem circular e as células podem exibir diferentes padrões de expressão gênica. Um biofilme pode dar origem a bactérias não sésseis, ou bactérias planctônicas, que possuem a capacidade de multiplicar e dispersar rapidamente no organismo (COSTERTON et al., 1999).

Para a regulação da formação e dispersão do biofilme é necessária uma comunicação célula a célula, conhecida como *quorum sensing*. Nesse processo, as bactérias produzem e secretam moléculas de sinal, os autoindutores, e então desencadeiam uma cascata de resposta. Os autoindutores são detectados por receptores específicos e assim as células podem avaliar o tamanho da população por meio da concentração de sinais. O sistema *quorum sensing* é codificado pelo locus do gene *agr* (gene acessório regulador) (ARCIOLA et al., 2012; SOLA et al., 2012).

Os biofilmes geralmente se desenvolvem em superfícies inertes, mas também podem se desenvolver em tecidos vivos. As células sésseis liberam antígenos e assim estimulam a produção de anticorpos, porém estes não são eficientes frente as bactérias presentes nos biofilmes, podendo causar danos aos tecidos circundantes (COSTERTON et al., 1999). As células bacterianas protegidas pelo biofilme são capazes de ser resistentes à antibióticos, desinfetantes, fagocitose e outros componentes das imunidades inata e adaptativa (ARCIOLA et al., 2012).

A formação do biofilme é constituída por 4 etapas principais: aderência à superfície, formação da microcolônia, maturação e o destacamento das células do biofilme (ARCIOLA et al., 2012).

Na primeira etapa, as bactérias são adsorvidas na superfície do material, por diferentes forças, como forças hidrofóbicas, eletrostáticas, força de Van der Waals, entre outras (ARCIOLA et al., 2012).

Na formação da microcolônia, as células bacterianas formam de 3 a 5 camadas na superfície onde estão aderidas sendo este fenômeno mediado pelos MSCRAMMs, componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz, e por meio da produção do polissacarídeo intercelular adesina (PIA), que tem sua síntese codificada pelos genes *icaADBC*. Nessa etapa é necessário o crescimento clonal das células bacterianas e interações de células estáveis para formar e manter a microcolônia (STANLEY; LAZZERA, 2004).

Na etapa de maturação do biofilme, a estrutura é envolta na matriz polimérica extracelular e são desenvolvidas as características estruturais e específicas da espécie bacteriana (ARCIOLA et al., 2012).

E na última etapa, ocorre o destacamento de células do biofilme e essas conseguem ir para outros locais para uma nova colonização. Há muitos fatores que podem contribuir para o destacamento, como forças mecânicas, parada de produção de material para formação de biofilme ou fatores de destacamento como as enzimas que destroem a matriz ou surfactantes.

Isso ocorre para manter a espessura do biofilme e também para garantir a sua disseminação. Em *S. aureus*, esse destacamento é controlado pelo sistema *quorum sensing agr* (OTTO, 2008).

A resistência a antibióticos pelas células protegidas pelo biofilme é de 100 a 1000 vezes maior do que nas bactérias planctônicas. Essa resistência deve-se a sua estrutura tridimensional, neutralização de antimicrobianos pela matriz polimérica extracelular, pela aquisição de genes que conferem a resistência e a taxas reduzidas de crescimento de algumas células bacterianas que são limitadas pela disponibilidade de nutrientes (DONLAN; COSTERTON, 2002; PARKAR; FLINT; BROOKS, 2003; NAPARSTEK et al., 2014)

1.2. Produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos

Segundo Newman e Cragg (2016), os produtos naturais desempenham papel fundamental para o desenvolvimento de novos fármacos, pois possuem ampla diversidade estrutural e química.

Peptídeos antimicrobianos, como os presentes no veneno da abelha *Apis mellifera*, são boas opções para o desenvolvimento de futuros antibióticos, pois possuem grande atividade microbicida, geralmente atingem a membrana celular bacteriana e possuem múltiplos alvos dentro da célula (JENSSEN et al., 2006). Os peptídeos terapêuticos podem agir como um antimicrobiano isoladamente bem como em combinações com outros antimicrobianos onde se visualiza um efeito sinérgico ou ainda podem agir como imunomoduladores (MARR; GOODERHAM; HANCOCK; 2006)

As combinações entre produtos antimicrobianos naturais e fármacos convencionais podem resultar na ação sobre um alvo molecular diferente dos antibióticos, podendo assim contribuir para a superação da resistência bacteriana ou mesmo diminuir a toxicidade e restaurar a eficácia dos antibióticos (CHAN et al., 2011).

1.3. Abelha *Apis mellifera*

Desde a antiguidade, as abelhas são valorizadas pelos seus produtos e admiradas pelo seu comportamento. Os egípcios são considerados os pioneiros na apicultura utilizando o mel para elaboração de inúmeros remédios naquela época (COUTO; COUTO, 1996).

As abelhas são pertencentes à ordem Hymenoptera, da família Apoidea, que compreende aproximadamente 20 mil espécies, sendo a abelha *Apis mellifera* a mais conhecida (BROSI; DAILY; EHRLIC, 2007).

As abelhas europeias (*Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera carnica*, *Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera caucásica*) foram introduzidas pelos imigrantes no Brasil. Em 1956,

abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) foram trazidas para o Brasil pelo professor Warwick Estevam Kerr para tentar obter um híbrido destas com as europeias, buscando uma boa produção de mel e própolis como das abelhas africanas, porém com um comportamento menos defensivo. Porém, em 1957 as abelhas africanas escaparam do apiário localizado na cidade de Rio Claro (São Paulo, Brasil) e assim aconteceu o cruzamento destas com as abelhas europeias, dando origem a um híbrido de *Apis mellifera*, as abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) (WIESE, 2000; BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007).

As abelhas africanizadas mostraram ser mais defensivas que as abelhas europeias, capazes de liberar maior quantidade de veneno após a picada, grande facilidade de enxamear, altamente produtivas e possuem maior resistência a pragas e doenças (FUNARI et al., 2001; BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007).

Dentre os produtos relacionados com as abelhas *Apis mellifera*, destaca-se aqueles com ação antibacteriana já reportada na literatura como a própolis e o veneno (apitoxina).

1.3.1. Própolis

A palavra própolis é derivada do grego e o termo *pro* significa “para ou em defesa” e *polis* significa “cidade”, ou seja, em defesa da cidade (ou da colmeia). A própolis é um produto multifuncional na colmeia, sendo usada para vedar buracos, rachaduras da colmeia, envolver invasores mortos pelas abelhas, sendo também responsável pela baixa incidência de bactérias e fungos na colmeia, prevenindo doenças. É resultante da coleta de substâncias de natureza gomosa, resinosa e/ou balsâmicas pelas abelhas, especialmente de espécies vegetais próximas às colmeias. As abelhas adicionam e modificam a composição dos materiais coletados, por meio de secreções próprias como a saliva, a partir da adição de ceras e até pólen (GHISALBERTI, 1979, PINTO et al., 2001; FERNANDES JÚNIOR et al., 2003).

A própolis pode variar em termos de composição com a origem botânica, mas, em geral, apresenta 50% de resinas vegetais e bálsamos, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de grãos de pólen e 5% de outras substâncias (vitaminas, minerais, ésteres, entre outras). Ela também possui propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antiúlcera, antitumoral, cicatrizante, anestésica e antioxidante (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998), sendo a propriedade antibacteriana e antioxidante resultado da presença de flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos aromáticos e seus ésteres (BURDOCK, 1998; MENEZES, 2005; ÂNGELO; JORGE, 2007; SIMÕES et al., 2008).

A própolis pode ser utilizada para regeneração de tecidos, tratamento de queimaduras, úlceras na perna, psoríase e para o tratamento de herpes. Também é comercializada em pastas de dente, produtos farmacêuticos e cosméticos (BURDOCK, 1998).

A própolis pode conter mais de 300 constituintes que podem variar de acordo com a sua origem geográfica e botânica (GREENAWAY et al., 1991; MARCUCCI, 1995). Grande parte das atividades biológicas da própolis é devido a presença dos flavonoides (quercetina, flavonas, isoflavonas, antocianinas, catequinas e isocatequinas), com a capacidade de modular o sistema imune e também podem eliminar os radicais do oxigênio, ou seja, possuem propriedade antioxidante e os fenólicos também podem contribuir para essa atividade (HAVSTEEN, 1983; ALVES; KUBOTA, 2013).

Em um estudo de Mertz et al. (1975), o ácido cafeico presente na própolis mostrou ser o responsável pela atividade antibacteriana sobre *S. aureus*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Proteus vulgaris*; atividade fungicida contra *Helminthosporium carbonum* e inibição do crescimento de *Streptomyces scabies*. O ester fenetil do ácido cafeico (CAPE) ainda apresenta atividades anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antiviral, antifúngica (JUNG et al., 2008) e também é conhecido por ser parcialmente responsável pela propriedade citostática da própolis (GRUNBERGER et al., 1988).

Benkovick et al. (2009) observaram que houve um efeito radioprotetor da própolis sobre os glóbulos brancos de ratos que foram irradiados, protegendo-os de danos letais e diminuindo os danos no DNA.

A ação antimicrobiana dos ácidos fenólicos (presentes nos fenólicos totais) da própolis pode ocorrer pela hiperacidificação que ele provoca na membrana plasmática, alterando o potencial de membrana celular e afetando a bomba de ATPase. Em bactérias Gram-positivas, como o *S. aureus*, a difusão dos ácidos fenólicos por meio da parede celular e a acidificação com alteração na bomba de ATPase poderia levar a morte celular (CUEVA et al., 2010).

Vários grupos de compostos presentes na própolis têm demonstrado sinergia entre flavonoides ativos e antimicrobianos de uso convencional (CUSHNIE; LAMB, 2005; FERNANDES JUNIOR et al., 2005, ORSI et al., 2006 a,b), bem como sinergismo com outros compostos antimicrobianos naturais a exemplo dos óleos essenciais de plantas aromáticas (PROBST et al., 2011).

1.3.2. Veneno (apitoxina)

De todos os componentes do veneno da abelha *Apis mellifera*, há dois que apresentam grande importância: a melitina, um dos peptídeos mais abundantes do veneno (cerca de 50%

do peso seco do veneno) (ZHOU et al., 2010) e a fosfolipase A2 (10 a 12%). Também estão presentes substâncias como: aminas biogênicas (histamina, dopamina, noradrenalina), peptídeos ativos (apamina e peptídeo degranulador de mastócitos – MCD) e componentes enzimáticos (hialuronidase, serino-protease com domínio CUB e fosfatase ácida) (HABERMANN, 1972; VETTER et al., 1999; PEIREN et al., 2005). Os componentes principais presentes do veneno de abelha estão no **Quadro 1**. Contudo, a composição do veneno pode ser influenciada pela subespécie das abelhas (PALMA; BROCHETTO-BRAGA, 1993), idade (OWEN; BRIDGES, 1982) e época do ano para a coleta (OWEN; PFAFF, 1995; FERREIRA-JUNIOR, 2010).

Quadro 1. Composição do veneno da abelha *Apis mellifera*.

Grupos da substância	Componentes	% do peso seco
Proteínas (enzimas)	Fosfolipase A2	10-12
	Fosfolipase B	1
	Hialuronidase	1-2
	Fosfatase	1
	α -glicosidase	0,6
Peptídeos	Melitina	40-50
	Apamina	2-3
	Peptídeo MCD	2-3
	Secapina	0,5-2
	Pamina	1-3
	Minimine	2
	Adolapina	0,5-1
	Procamina A, B	1-2
	Inibidor de protease	0,1-0,8
	Tertiapina, cardiopep, melitina F	1-2
Fosfolipídeos		1-3
Aminas Biogênicas	Histamina	0,5-2
	Dopamina	0,2-1
	Noradrenalina	0,1-0,5
Aminoácidos	Ácido aminobutírico, α -aminoácidos	1
Açúcares	Glicose, Frutose	2-4
Volátil (feromonas)	Éteres complexos	4-8
Minerais	Fósforo, cálcio, magnésio	3-4

Fonte: adaptado de BOGDANOV, 2011

A toxicidade do veneno deve-se a três tipos de componentes proteicos: enzimas (fosfolipase A2 e hialuronidase), grandes peptídeos (melitina, apamina e MCD) e pequenas moléculas (peptídeos e aminas biogênicas) (JORGE, 2008).

As fosfolipases são enzimas, dependentes de cálcio, que podem hidrolisar uma ou mais ligações de éster em glicerofosfolipídeos. Há 4 classes de fosfolipases, sendo elas: A, B, C e D, que variam de acordo com o sítio de hidrólise. A fosfolipase A2 realiza a hidrólise de

fosfolípídeos na ligação éster do carbono 2, liberando lisofosfolípídeos e ácidos graxos, geralmente o ácido araquidônico. Este ácido, é precursor de eicosanoides, que é o substrato de duas vias enzimáticas: a da ciclooxigenases (Cox), que produz prostaglandinas e a da lipooxigenase, que produz leucotrienos, que são mediadores pró-inflamatórios (DENNIS, 1994; BALSINDE et al., 1999). A melitina e a fosfolipase A2 apresentam ação sinérgica e podem agir nas membranas celulares, ocasionando danos celulares (LEE; BAE, 2016).

Em um estudo de Boutrin et al. (2008), a fosfolipase A2, um dos principais componentes da apitoxina, mostrou-se eficiente para inibir o crescimento de *Trypanosoma brucei brucei* e mostrou ação bactericida em culturas (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* e *Enterobacter cloacae*) cultivadas por 2 horas e ação bacteriostática em culturas cultivadas por 12 horas.

A hialuronidase é responsável por hidrolisar o ácido hialurônico, permitindo a difusão do veneno pelos espaços intercelulares (LIMA; BROCHETTO-BRAGA, 2003).

A apamina é um pequeno peptídeo com 18 resíduos de aminoácidos e que possui propriedades neurotóxicas. A neurotoxicidade da apamina deve-se a sua capacidade de ligação com alta afinidade aos receptores de membrana pós-sináptica e assim bloquear efeitos inibitórios ou de hiperpolarização (LIMA; BROCHETTO-BRAGA, 2003).

O MCD, peptídeo degranulador de mastócitos, estimula a degranulação mastocitária, ele é o principal fator responsável pela liberação de histamina. A histamina causa vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, podendo, em quantidades elevadas, ativar a liberação de adrenalina (LIMA; BROCHETTO-BRAGA, 2003; BOGDANOV, 2011).

A amina biogênica mais comum presente na apitoxina é a histamina; porém a sua quantidade no veneno é tão baixa que quase não interfere no envenenamento. Outras aminas biogênicas que podem estar presentes na composição do veneno são serotonina, noradrenalina e dopamina (LIMA; BROCHETTO-BRAGA, 2003).

A apiterapia é uma terapia que utiliza os produtos apícolas para propósitos terapêuticos, que vêm sendo usada para o tratamento de algumas desordens inflamatórias, como tendinite, herpes zoster, psoríase, artrite reumatoide, esclerose múltipla, osteoartrite, entre outras (ALI, 2012; HEGAZI, 2012).

A administração da apitoxina em paciente com doenças inflamatórias, contribui para a diminuição das respostas imunes excessivas e oferece uma alternativa para controlar as doenças inflamatórias. A melitina, o principal constituinte do veneno, em grandes quantidades causa inflamação, porém quando usada em pequenas doses, como na apiterapia, proporciona efeitos anti-inflamatórios (LEE; BAE, 2016).

1.3.2.1. Melitina

Os peptídeos catiônicos antimicrobianos apresentam diversidade em suas sequências e estruturas, mas são, geralmente, anfipáticos, pequenos (12 a 50 aminoácidos), possuem carga positiva global e grande teor de resíduos catiônicos. Esses peptídeos são moléculas de defesa de insetos, anfíbios e mamíferos que possuem atividade antimicrobiana, como é o caso da melitina. Assim, os peptídeos antimicrobianos são uma boa escolha para futuros antibióticos, pois possuem rápida ação bactericida, amplo espectro de ação (bactéria, vírus, fungo e parasita) bem como não são afetados por muitos dos mecanismos de resistência conhecidos aos antibióticos (YEUNG et al., 2011).

A melitina é um peptídeo anfifílico, com 26 resíduos de aminoácidos (HABERMANN; JENTSCH, 1967), distribuídos em uma estrutura secundária do tipo alfa-hélice anfipática altamente carregada (PEREZ-PAYA et al., 1995) e, uma atividade biológica hemolítica elevada. Apresenta papel importante como surfactante, aumentando a permeabilidade de membranas plasmáticas (HABERMANN, 1972) e com capacidade de interagir e ativar células de defesa do tipo leucócitos, mastócitos e macrófagos. Dentre as inúmeras propriedades destaca-se a antifúngica (PARK LEE, 2010); antiprotozoário (ADADE et al., 2013), antiviral (FALCO et al, 2013), antibacteriana (AL-ANI et al, 2015), sendo estas propriedades obtidas em concentrações micromolares (KUHN-NENTWIG et al., 2003; CONLON et al., 2004).

A melitina é eficiente contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Enterobacter cloacae* e *K. pneumoniae*) e contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis*), incluindo também cepas resistentes de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. enterica* serovar Typhimurium (AGEITOS et al., 2017).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral:

- Avaliar a ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis, veneno (apitoxina) da abelha *Apis mellifera* e a fração do veneno denominada melitina.

3. Material e métodos:

3.1. Obtenção da própolis e preparo de seu extrato hidroalcoólico

A amostra de própolis foi obtida em apiário padrão do setor de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ – UNESP Botucatu).

Foram utilizados enxames de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, alojadas em caixas padrão Langstroth, distribuídas ao acaso e manejadas apenas para a produção de própolis. O coletor inteligente de própolis (CPI) foi utilizado para produção de própolis e consiste de uma melgueira modificada com sarrafos laterais móveis, com altura aproximada de 2 cm. Semanalmente, foi retirado um sarrafo de cada lateral da melgueira para estimular a produção de própolis. Após um mês, a própolis produzida foi retirada do coletor, acondicionada em recipientes e mantida em freezer.

Para a preparação do extrato hidroalcoólico de própolis (EHP), a amostra de própolis foi triturada e a solução foi feita na diluição de 30% (30 gramas de própolis completando o volume para 100 ml com álcool etílico 70%). Após 7 dias, sob frequente agitação e ao abrigo da luz, o preparado foi filtrado em papel comum, sendo o filtrado considerado o EHP, com o qual foi determinado o peso seco (mg/mL) após evaporação do solvente em alíquotas de 1 mL (ORSI et al., 2000).

3.2. Compostos fenólicos totais, flavonoides e ação antioxidante do extrato de própolis

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ-USP, Piracicaba, SP, sob responsabilidade do prof. Dr. Severino Matias de Alencar.

A análise de compostos fenólicos totais do extrato hidroalcoólico de própolis foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu conforme descrito por WOISKY e 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 do EHP foram realizadas por reação colorimétrica, conforme protocolo proposto por PARK et al (1998), a partir da mistura de 0,5 mL do extrato hidroalcoólico 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 415 nm e o conteúdo de flavonoides expresso em equivalentes de quercetina (mg/g).

A atividade sequestradora do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi realizada de acordo com a metodologia de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). A

mistura de reação foi constituída de 0,5 mL do extrato hidroalcoólico de própolis, 3 mL de etanol e 0,3 mL da solução 0,5 mM do radical DPPH em etanol. Depois de 45 minutos, foi realizada uma leitura de absorbância a 517 nm.

3.3. Apitoxina de *Apis mellifera*

A apitoxina foi obtida em apiário padrão do setor de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ – UNESP Botucatu).

As amostras de apitoxinas foram nominadas em Api 1 - obtida de abelhas com flora apícola silvestre, Api 2 - obtida de abelhas com flora apícola de eucalipto, Api 3 - obtida de abelhas com flora apícola de laranjeira e Api 4 - obtida de abelhas com flora apícola silvestre associada à alimentação artificial. Com exceção da Api 1 que foi coletada em 2016, as amostras de apitoxinas foram coletadas e utilizadas em estudo prévio de LOMELE (2014).

A amostra de Api 1 foi obtida no ano de 2016, sendo que as demais amostras (Api 2, Api 3 e Api 4) foram coletadas, no ano de 2013, nos meses de junho (Api 2), outubro (Api 3) e novembro (Api 4). Todos os enxames estavam instalados em áreas com predominância do recurso floral de interesse num raio de 1 km do apiário. Foram selecionados em cada área quatro enxames que foram mantidos em caixas de madeira modelo Langstroth e em cavaletes de 50 cm de altura.

A metodologia para obtenção da apitoxina foi aquela em que se utiliza coletor elétrico posicionado no alvado da colmeia, constituído por filamentos de arame com corrente elétrica de aproximadamente seis volts, além de uma placa de vidro para a queda do veneno liberado pelas abelhas (DUSSART; BARTHOLOMÉ, 2007). Foi colocado um equipamento em cada colmeia, com tempo de colheita de uma hora, no período da manhã. Ao final do período, os coletores foram retirados e as placas de vidro foram mantidas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após a evaporação da fase volátil, a apitoxina foi raspada com auxílio de espátula, foi armazenada em tubo eppendorf identificado e esse foi mantido em freezer. A apitoxina, proveniente das diferentes floras apícolas, foi solubilizada em solução fisiológica (0,9% de NaCl), centrifugada a 3.500 rpm durante 15 minutos em centrífuga (Centrífuga Refrigerada Marconi – modelo MA1815). O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi separado e liofilizado. A apitoxina purificada foi mantida congelada a -20° C até seu uso.

3.4. Obtenção da melitina

A melitina liofilizada foi fornecida pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP – UNESP Botucatu) a partir da apitoxina liofilizada de *Apis mellifera*.

Foram utilizadas técnicas cromatográficas de fase reversa em sistema binário no cromatógrafo HPLC Shimadzu modelo LC-20AT por meio de colunas C18. A apitoxina liofilizada foi solubilizada em 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético na concentração de 1 mg/mL. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante separado para análise cromatográfica. Uma alíquota de 20µL foi carregada em coluna C18 (250×4,6 mm). Para o fracionamento é utilizado um sistema de dois solventes: (A) ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) e (B) ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) e acetonitrila 90% (v/v). Na sequência, a eluição foi realizada em um fluxo constante de 0,7 mL/min para melitina, com um gradiente de 5-70% de solvente. O material foi obtido a partir de sua detecção por um espectrofotômetro em absorbância UV de 214 nm.

As frações isoladas foram submetidas ao sequenciamento peptídico por química degradativa de Edman e Begg (1967) através de um sequenciador automático de proteínas (marca Shimadzu, modelo PPSQ-33). Após a determinação da sequência da melitina, foram comparadas as homologias de aminoácidos com as sequências anteriormente depositadas e obtidas no UniProt da melitina de *Apis mellifera*. As sequências foram analisadas por alinhamento usando programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997).

3.5. Linhagens bacterianas

Foram utilizadas linhagens bacterianas ATCC e isolados clínicos de humanos obtidos através do Hospital das Clínicas de Botucatu que estavam armazenados no Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNESP – Botucatu. Sendo os isolados clínicos caracterizados pela presença do gene *mecA* por Martins, Pereira e Cunha (2010).

O parecer do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP foi fornecido sob número de parecer 1.621.737 e CAAE 56098416.8.0000.5411.

- Concentração inibitória mínima: MRSA (ATCC 33591 e 5 isolados clínicos); *S. aureus* produtor de biofilme (ATCC 29213), *S. aureus* enterotoxigênicos SEA (ATCC 13565); SEB (ATCC 14558); SEC (ATCC 19095) e SED (ATCC 23235).
- Curva de sobrevivência: MRSA (ATCC 33591 e 1 isolado clínico).
- Ensaio para verificação da inibição da produção de enterotoxinas: *S. aureus* enterotoxigênicos SEA (ATCC 13565); SEB (ATCC 14558); SEC (ATCC 19095) e SED (ATCC 23235).
- Ensaio para verificação da inibição da produção de biofilme: *S. aureus* (ATCC 29213).

- Microscopia eletrônica de transmissão: MRSA (ATCC 33591) e *E. coli* (ATCC 43895).

3.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

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 em meio Mueller Hinton Caldo (MHC) variando de 917 a 0,45 µg/ml. Foram preparadas suspensões bacterianas de acordo com a escala 0,5 de McFarland que corresponde a $1,5 \times 10^8$ 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 incubadas à 37 °C por 24 horas. Foram utilizados como controles positivos a oxacilina e a cefalotina e controles negativos foram feitos em todos os ensaios (MHC sem bactérias) (CLSI, 2015). Esse experimento foi realizado em sextuplicata.

Após incubação, foram realizadas leituras dos respectivos valores de CIM, definida como a menor concentração de cada tratamento capaz de inibir o crescimento bacteriano. Isto foi feito pela impressão visual através da adição do composto revelador de oxirredução resazurina (0,05%), sendo verificado o crescimento quando a coloração mudar da cor violeta para rosa.

Foram realizados os cálculos de CIM para 90% das cepas (CIM_{90%}) os quais foram utilizadas para comparação da eficácia de cada tratamento.

Para obtenção da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram realizadas subculturas a partir das concentrações testadas nos ensaios de microdiluição utilizando placas de ágar infusão de cérebro e coração (BHI). Após este procedimento, as placas foram incubadas em estufa por 37 °C por 24 horas e na leitura anotou-se a menor concentração em que não era visualizada a formação de colônias (NCCLS, 1999). Esse procedimento foi realizado em sextuplicata.

3.7. Verificação de interações (sinergismo) pela curva de sobrevivência

Após a realização dos ensaios de microdiluição para obtenção dos valores de CIM, e respectivos cálculos de CIM_{90%} para *S. aureus* meticilina resistente (MRSA), foram realizados ensaios para obtenção das curvas de sobrevivência (*time kill curve*), visando interação

sinérgica entre a oxacilina e as diferentes apitoxinas, EHP e melitina sobre linhagens de MRSA.

A metodologia prevê o uso de CIM_{90%} para os compostos utilizados isoladamente e a combinação dos respectivos nas proporções de ¼ da CIM com ¼ da CIM da oxacilina, sendo alíquotas dos cultivos tomadas nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas, com as quais foram realizadas subculturas em ágar tríptico de soja (TSA) que foram incubados a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, foram realizadas as contagens de colônias, com auxílio de contador de colônias digital da marca Phoenix e obtidos os valores de Log de UFC/mL. Desta forma, com os valores de Log UFC/mL foram preparados os respectivos gráficos para visualização das interações entre as combinações com a oxacilina e quando a interação foi sinérgica, verificamos se ela ocorreu de modo bactericida ou bacteriostático (NCCLS, 1999). Esse experimento foi realizado em triplicata.

O sinergismo e antagonismo foram definidos como uma diminuição ou aumento de 2-log_{10} , respectivamente, na contagem de colônias em 24 horas. Além disto, quando houve redução $\geq 3\text{-log}_{10}$ UFC/mL a partir do inóculo inicial esse efeito foi considerado bactericida (DOSLER et al., 2015).

3.8. Ensaio para verificação da inibição da produção de enterotoxinas

Cada uma das cepas produtoras de enterotoxina A, B, C e D foi cultivada em caldo tríptico de soja (TSB) e incubada a 37 °C por 24 horas, sendo realizados os controles (apenas TSB e inóculo) e para os tratamentos (melitina ou Api 1) foi utilizada uma dose subinibitória referente a 70% da CIM que foi obtida previamente. A escolha desse valor de CIM foi feita com base no estudo realizado por Albano et al (2016) que obteve resultados satisfatórios usando concentrações de 60 e 80% do CIM para verificação de inibição da produção de enterotoxinas de *S. aureus* por compostos majoritários.

Plaqueamentos de cada tratamento foram feitos no momento da adição do inóculo padronizado (escala 0,5 de McFarland) e após 24 horas de incubação, visando contagem bacteriana e confirmação de que as quantidades de bactérias na cultura atingiram valores suficientes para a produção das enterotoxinas estudadas. Após incubação (37 °C por 24 horas), cada tratamento (melitina + inóculo ou Api 1 + inóculo) foi centrifugado a 9000 g, 4°C por 30 minutos e o procedimento foi realizado utilizando o kit SET-RPLA de acordo com as instruções do fabricante (Oxoid). Esse experimento foi realizado em sextuplicata.

O kit SET-RPLA baseia-se na ligação entre anticorpos específicos e antígeno (enterotoxina). Os anticorpos vêm ligados a partículas de látex, que na presença de antígeno se aglutinam e quando não há antígenos presentes ocorre uma precipitação dessas partículas

no fundo do poço da placa (microtitulação com fundo em “V”), podendo ser observada como um ponto rosa. Assim, a produção de enterotoxina foi quantificada visualmente e caracterizada pelos símbolos de + ou -, ou seja, se a produção de enterotoxina é considerada forte a aglutinação é caracterizada como (+++), uma produção moderada é caracterizada como (++) , uma produção fraca (+) e ausência de produção quando não há aglutinação visível (-).

3.9. Ensaio para verificação da inibição da produção de biofilme

O experimento foi realizado conforme a metodologia de Henriques et al. (2005) adaptada. O *S. aureus* produtor de enterotoxina foi plaqueado em TSA e a placa foi incubada à 37 °C por 24 horas, posteriormente colônias isoladas foram colocadas em tubo tipo falcon contendo 15 ml de TSB e novamente foi incubado à 37 °C por 24 horas em um agitador orbital à 130 rpm. Depois o tubo falcon foi centrifugado (5 minutos, 10000 rpm, 4°C) e as células lavadas e resuspendidas em salina (0,9%) para uma densidade óptica equivalente à 1×10^9 células/mL (DO₆₀₀ de 1,25) em Microplate Reader Biotek Epoch-2. Neste ensaio foram utilizadas placas de cultura de células com 6 poços sendo em cada poço colocado uma quantidade de 6 mL de TSB + 0,25% de glicose + Api 1 ou melitina, sendo neste caso utilizadas concentrações subinibitórias equivalentes à metade da CIM, que neste caso foi 1 µg/mL. Em seguida, foram acrescentados 200 µL do inóculo padronizado em salina e a placa incubada por 48 horas à 37 °C em agitador orbital à 120 rpm (marca SciLogex, modelo SK 0180-Pro). Em intervalos de 8 horas, o meio TSB com as células suspensas era removido e a mesma quantidade de meio TSB + 0,25% de glicose + Api 1 ou melitina era adicionado. Foram feitos controles negativos (TSB + 0,25% de glicose + Api 1 ou melitina sem adição de bactérias) e controles positivos (TSB + 0,25% de glicose sem a adição de Api 1 ou melitina, mas com a adição de bactéria).

O experimento foi realizado em quadruplicata com três repetições. A quantificação do biofilme foi feita após 48 horas de incubação, quando os conteúdos das placas incubadas foram transferidos para novas placas que continham 1 mL de metanol e após 15 minutos de contato, novamente os conteúdos foram retirados e as placas ficaram secando em temperatura ambiente. Posteriormente, 600 µL de cristal violeta (1%) foram adicionados e após 5 minutos de contato as placas foram lavadas com água destilada e depois 1 mL de ácido acético (33%) foi adicionado e a densidade óptica foi medida à 570 nm.

3.10. Microscopia eletrônica de transmissão

Para estes ensaios foram utilizadas uma cepa de ATCC de MRSA e uma de *E. coli*. A inclusão da *E. coli* ATCC foi pensada visando comparar efeitos dos compostos estudados sobre a estrutura também de um bacilo Gram-negativo.

Uma suspensão bacteriana das cepas foi padronizada para 10^6 UFC/mL em caldo BHI sendo posteriormente colocada em concentrações correspondentes a uma e quatro vezes os valores das CIM de cada tratamento e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após este período foi adicionado o glutaraldeído 2,5% e as culturas centrifugadas (20 min/1500 g/4 °C). Os pellets obtidos foram lavados três vezes com PBS (tampão fosfato salino) e foram centrifugados (3 min/1500 g/4 °C), o PBS foi retirado e foi adicionado glutaraldeído 2,5% para fixação e posteriormente foram armazenados a 4°C por 24 horas (SUWALAKI; VORAVUTHIKUNCHAI, 2009). As amostras foram preparadas para visualização em microscópio eletrônico de transmissão (Microscópio Eletrônico Tecnai Spirit - FEI Company) no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Câmpus de Botucatu, SP.

4. Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido por Student-Newman-Keuls para análises de CIM, CBM e para resultados da inibição da produção de biofilmes. Para comparação dos resultados de inibição da produção de enterotoxinas, o teste de Kruskal-Wallis foi empregado a partir da classificação por escores relativos aos resultados encontrados. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados para denotar diferença estatística significativa e para estas análises foi utilizado o programa SigmaPlot 11.0.

5. Resultados e discussão

5.1. Compostos fenólicos totais, flavonoides e ação antioxidante do extrato hidroalcoólico de própolis

A **Tabela 1** mostra os teores encontrados de fenólicos totais, flavonoides totais e a capacidade sequestrante de DPPH da amostra do EHP utilizada nesse estudo. O DPPH é usado para verificar a capacidade antioxidante em sequestrar radicais livres, no caso o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (radical de nitrogênio orgânico) (KALOGEROPOULOS et al., 2009).

Tabela 1. Conteúdo de flavonoides totais, fenólicos totais e capacidade sequestrante de DPPH da amostra do extrato de própolis testada.

Própolis	Fenólicos (mg de ácido gálico/g)	Flavonoides (mg de quercetina/g)	DPPH ($\mu\text{mol trolox/g}$)
	38,61 \pm 0,66	12,43 \pm 0,38	253,75 \pm 1,87

O EHP estudado apresentou baixos teores de fenólicos totais e flavonoides. A própolis pode apresentar diferenças quanto as quantidades de flavonoides e fenólicos totais devido a fatores como a variação da flora apícola e região geográfica onde foi coletada (GREENAWAY et al., 1991), justificando a grande divergência de valores apresentada na literatura (ALVES; KUBOTA, 2013; TIVERON et al., 2016). De acordo com Mantovani et al (2008), os extratos hidroalcoólicos de própolis com a maior quantidade de fenólicos totais apresentaram a melhor atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus coagulase negativo*.

5.2. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

Os resultados das CIMs e CBMs são representados na **Tabela 2**. Tanto para a Api 1 quanto para melitina verifica-se as melhores atividades inibidoras (7,2 $\mu\text{g/mL}$ e 6,7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Por outro lado, a própolis apresentou uma CIM extremamente elevada (13204,8 $\mu\text{g/mL}$). Todas as amostras de apitoxinas apresentaram diferenças significativas entre si, sendo a amostra Api 1 a que apresentou melhor atividade inibidora. Nesta Tabela 2 também são apresentados os valores para os controles positivos (oxacilina e cefalotina), sendo que a oxacilina foi utilizada para a realização dos ensaios de curva de sobrevivência combinada com os produtos testados. Verifica-se que a cefalotina apresentou a menor CIM (2,0 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM_{90%}) e concentração bactericida mínima (CBM_{90%}) em µg/mL para as diferentes apitoxinas, EHP, melitina, oxacilina e cefalotina para as linhagens de MRSA testadas.

CIM _{90%} e CBM _{90%} (µg/mL)								
	Api 1	Api 2	Api 3	Api 4	EHP	Melitina	Oxacilina	Cefalotina
CIM	7,2 ^a	80,2 ^b	25,8 ^c	40,1 ^d	13204,8 ^e	6,7 ^a	32,0 ^f	2,0 ^g
CBM	28,7 ^a	97,0 ^b	27,0 ^a	40,1 ^c	>14672,0 ^d	26,0 ^a	32,0 ^e	2,0 ^f

Seis replicatas; Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas de atividade antimicrobiana entre produtos para um mesmo microrganismo quando $p \leq 0,05$.

A Api 1 resultou em CIM de 7,2 µg/mL sobre MRSA. Este valor é menor do que o apresentado na literatura (HAN et al. 2007), com CIM de 16,8 µg/mL, e maior do que apresentado pelos mesmos autores em estudo posterior (HAN et al. 2016), que variou de 0,08 e 0,11 µg/mL.

Nos estudos de Dosler e Gerceker (2012), a CIM_{90%} da melitina sobre MRSA foi de 4 µg/mL e conforme relatado por Ravensdale et al (2016), a melitina mostrou uma CIM de 5 µg/mL sobre MRSA. Estes valores foram bem próximos aos obtidos nesse estudo que foi de 6,7 µg/mL. Em outro trabalho, as CIMs da melitina e da apitoxina foram de 0,06 µg/mL (HAN et al, 2009).

No Brasil, dentre as floras apícolas mais utilizadas comercialmente para abelhas está a de laranjeiras (*Citrus sp.*), eucalipto (*Eucalyptus sp.*) e plantas nativas (silvestre). Porém, em período de escassez é comum a utilização de alimentação artificial, composta basicamente por xarope de açúcar associado a vegetação silvestre (LOMELE, 2014).

As quatro apitoxinas testadas mostraram diferentes resultados frente a MRSA, porém, a amostra Api 1 foi aquela com a melhor ação. Segundo LOMELE (2014), a composição da apitoxina de *Apis mellifera* pode sofrer influência conforme a flora apícola. Assim, segundo a mesma autora, o perfil cromatográfico para os três tipos de apitoxinas (Api 2, Api 3 e Api 4), que foram as mesmas utilizadas nesta pesquisa, resultou em cinco picos de compostos já conhecidos (apamina, fosfolipase, isoforma da fosfolipase, melitina, isoforma de melitina) e diferenças em suas intensidades foram verificadas, sugerindo que as floras apícolas consideradas influenciaram também a composição qualitativa da apitoxina.

O pólen, outro recurso floral coletado pelas abelhas, é a fonte natural de proteínas destas, sendo que o pólen de diferentes fontes florais possui valores nutricionais também

distintos (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010). Assim sendo, a variação da composição dos venenos pode ser modulada pelo teor proteico durante alimentação das abelhas.

O EHP apresentou uma CIM significativamente maior (13204,8 $\mu\text{g/mL}$) em relação a encontrada na literatura, como a obtida por WOJTYCZKA et al. (2013) que foi de 3800 $\mu\text{g/mL}$ sobre MRSA bem como para outros estudos (MIORIN et al., 2003; PAMPLONA-ZOMENHAN et al., 2011). A amostra aqui utilizada apresentou uma baixa atividade antibacteriana, provavelmente devido aos baixos teores de fenólicos e flavonoides presentes (**Tabela 1**), pois conforme verificado no estudo de Mantovani et al (2008), cujos resultados mostraram relação entre a quantidade de fenólicos totais e atividade antibacteriana. As diferenças verificadas entre as CIMs das própolis reportadas na literatura podem ser explicadas possivelmente porque as abelhas no Brasil têm a disposição uma variedade de plantas para coleta de resinas utilizadas na produção da própolis e que, dependendo da região e época em que foram coletadas, podem provocar mudanças significativas em suas respectivas composições químicas (GHISALBERTI, 1979; BANKOVA 1998).

Os resultados das CBMs são apresentados na **Tabela 2** também. A amostra Api 1 (28,7 $\mu\text{g/mL}$), Api 3 (27,0 $\mu\text{g/mL}$) e a melitina (26,0 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram a melhor ação antibacteriana entre os tratamentos testados. Assim percebe-se grande potencial de uso desses produtos como futuros fármacos antimicrobianos, devido ao seu potencial bactericida.

De maneira geral, nota-se que a apitoxina de flora apícola de laranjeira (Api 3) foi aquela que apresentou o melhor efeito inibidor quando comparada as Api 2 e Api 4, tendo efeito inclusive melhor ação bactericida que a Api 1. Em estudo realizado por LOMELE (2014), a análise química dessa mesma amostra foi a que apresentou maior quantidade de picos apresentando os maiores teores para os seguintes compostos: apamina, fosfolipase, isoforma de fosfolipase e melitina.

AL-lani et al. (2015), mostraram que o veneno da abelha *Apis mellifera* e a melitina possuem um grande espectro de atividade antibacteriana agindo em bactérias Gram-positivas, com CIM variando de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$, e Gram-negativas, com CIM entre 30 e >500 $\mu\text{g/mL}$.

Na **Tabela 3** estão as CIM de Api 1 e melitina sobre *S. aureus* produtores de enterotoxinas tipos A, B, C e D e os valores de 70% dessas concentrações que foram utilizados nos ensaios de verificação da inibição da produção de enterotoxinas.

Tabela 3. CIM ($\mu\text{g/mL}$) da Api 1 e melitina sobre linhagens ATCC de *S. aureus* produtores de enterotoxinas A, B, C e D e respectivos valores correspondentes a 70% do CIM.

CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
Cepas	Apitoxina 1 (70% CIM)	Melitina (70% CIM)
<i>S. aureus</i> SEA	57,3 ^{af} (40,1)	57,3 ^{af} (40,1)
<i>S. aureus</i> SEB	57,3 ^{af} (40,1)	57,3 ^{af} (40,1)
<i>S. aureus</i> SEC	7,2 ^{a#} (5,0)	5,4 ^{a#} (3,8)
<i>S. aureus</i> SED	10,7 ^{a#} (7,5)	3,6 ^{b#} (2,5)

Seis replicatas; Letras diferentes nas linhas representam diferenças significativas de atividade antimicrobiana entre produtos para um mesmo microrganismo quando $p \leq 0,05$. Símbolos diferentes nas colunas representam diferenças significativas de atividade antimicrobiana de um mesmo produto frente a microrganismos diferentes quando $p \leq 0,05$

A cepa de *S. aureus* produtora de enterotoxina C e a produtora de enterotoxina D foram as mais susceptíveis a Api 1 e melitina, sendo o melhor resultado obtido com a melitina.

Na **Tabela 4** encontram-se os valores de CIM de Api 1 e melitina para a cepa *S. aureus* ATCC produtora de biofilme e os valores de 50% desses CIMs que foram utilizados nos ensaios de verificação da inibição da produção de biofilme.

Tabela 4. CIM ($\mu\text{g/mL}$) da Api 1 e melitina sobre linhagem ATCC de *S. aureus* produtor de biofilme e respectivos valores correspondentes a 50% do CIM.

CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
Cepa	Api 1 (50% CIM)	Melitina (50% CIM)
<i>S. aureus</i> produtor de biofilme	2,0 ^a (1,0)	2,0 ^a (1,0)

Seis replicatas; Letras diferentes nas linhas representam diferenças significativas de atividade antimicrobiana entre produtos para um mesmo microrganismo quando $p \leq 0,05$.

A Api 1 e a melitina mostraram a mesma ação sobre a cepa produtora de biofilme, mostrando uma CIM extremamente baixa (2 $\mu\text{g/mL}$).

5.3. Verificação de interações (sinergismo) pela curva de sobrevivência

Nas **Figuras 2 e 3** estão apresentados os resultados para as interações entre as diferentes amostras de apitoxinas com a oxacilina sobre uma cepa MRSA ATCC além de um isolado clínico. De acordo com os resultados, para as duas cepas de MRSA, as interações entre todos os venenos com a oxacilina (Api 1 + Oxacilina, Api 2 + Oxacilina, Api 3 + Oxacilina, Api 4 + Oxacilina) apresentaram sinergismo com efeito bactericida.

Para a cepa MRSA ATCC (**Figura 2**), a combinação da Api 1, Api 2 e Api 4 com a oxacilina mostrou efeito bactericida após 6 horas do início dos tratamentos e a combinação da

Api 3 foi bactericida após 8 horas. Já para o isolado clínico de MRSA (**Figura 3**), a combinação entre Api 1, Api 3 e Api 4 mostrou efeito bactericida após 6 horas do início do tratamento e para Api 2 após 8 horas.

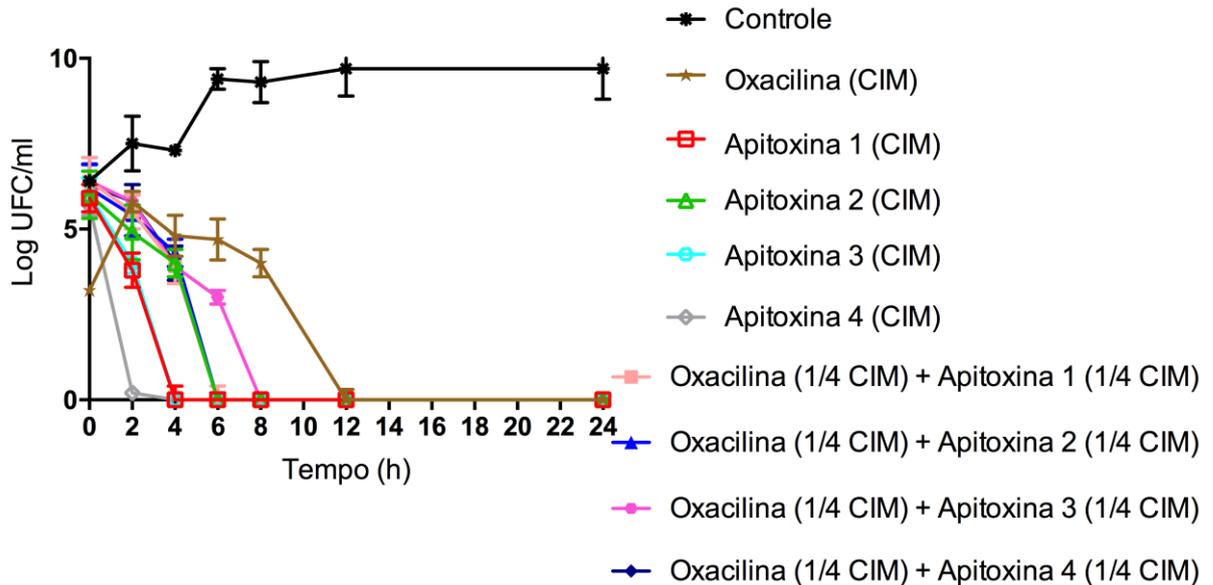


Figura 2: Curva de sobrevivência para verificação das interações entre as diferentes apitoxinas e a oxacilina testados isoladamente e em combinação com a oxacilina sobre MRSA ATCC.

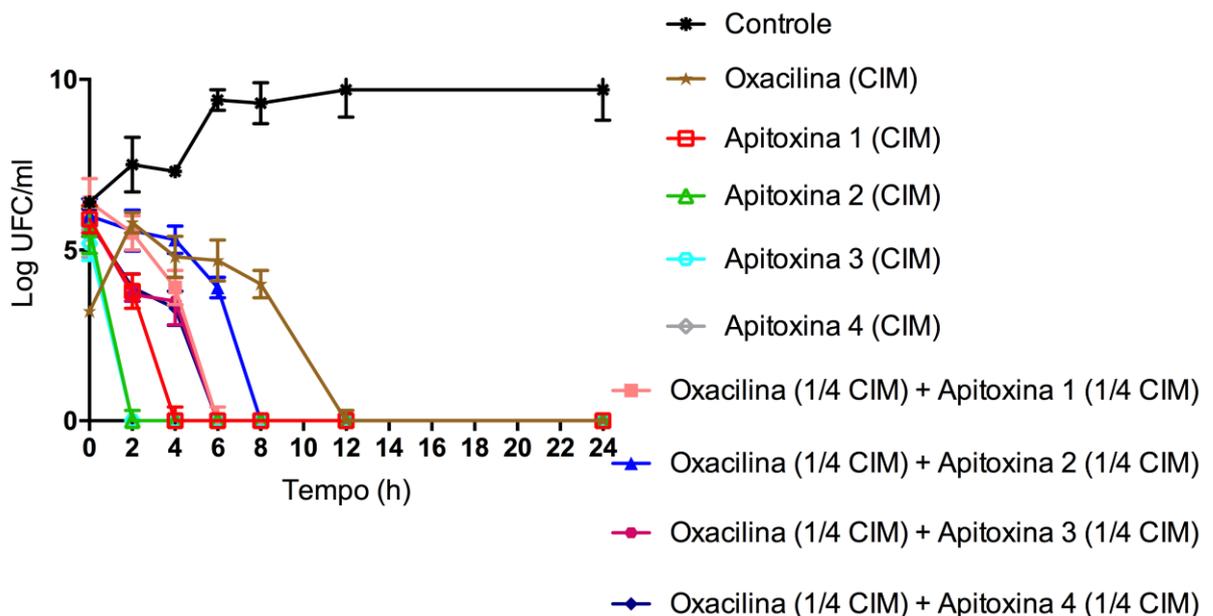


Figura 3: Curva de sobrevivência para verificação das interações entre as diferentes apitoxinas e a oxacilina testados isoladamente e em combinação com a oxacilina sobre um isolado clínico de MRSA.

Nas **Figuras 4 e 5** são apresentados os dados da interação da própolis, melitina e da Api 1 (melhor eficácia - CIM - entre os venenos estudados) com a oxacilina sobre uma cepa

MRSA ATCC e um isolado clínico de MRSA respectivamente. Para as duas cepas analisadas, as combinações de oxacilina com a melitina e oxacilina com Api 1 mostraram um efeito sinérgico e bactericida, enquanto que a interação da própolis com a oxacilina apresentou um sinergismo, porém com efeito bacteriostático.

Pela **Figura 4** verificou-se que na interação entre melitina e oxacilina houve um efeito bactericida após 4 horas de experimentação, enquanto que para a combinação de Api 1 com oxacilina, o efeito bactericida ocorreu após 6 horas. Quanto ao isolado clínico de MRSA (**Figura 5**), a combinação entre a melitina e a oxacilina foi bactericida após 12 horas e para Api 1 e oxacilina foi de 8 horas após o início do tratamento.

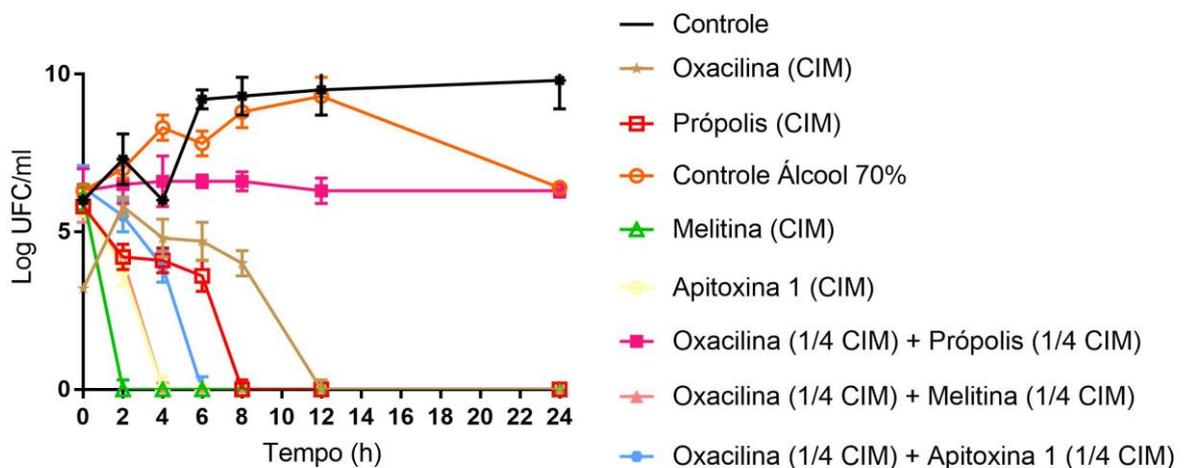


Figura 4: Curva de sobrevivência para verificação das interações entre a oxacilina, melitina, Api 1 e própolis testados isoladamente e em combinação com a oxacilina sobre MRSA ATCC.

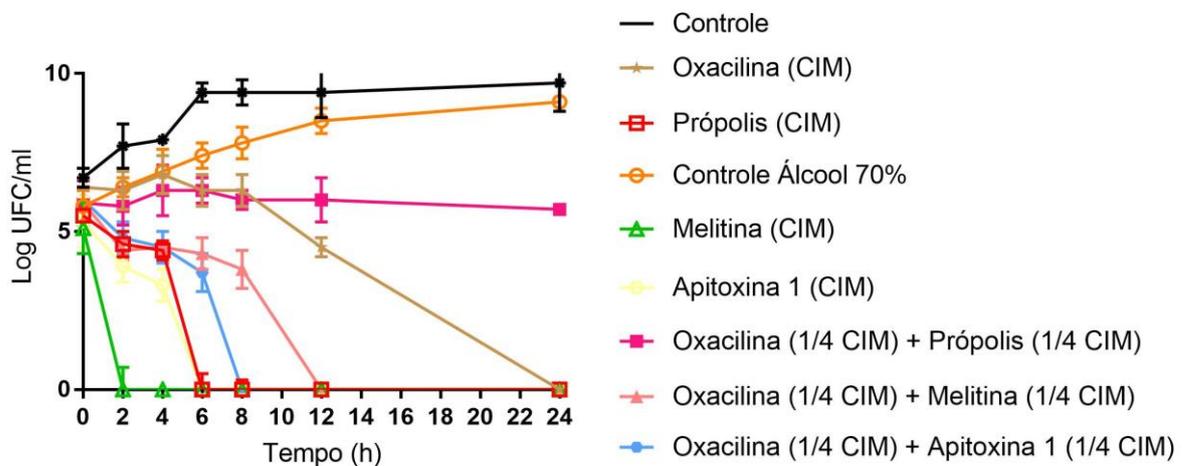


Figura 5: Curva de sobrevivência para verificação das interações entre a oxacilina, melitina, Api 1 e própolis testados isoladamente e em combinação com a oxacilina sobre um isolado clínico de MRSA.

A interação entre um produto natural e um fármaco comercial pode ser utilizada como um método rápido e eficaz contra infecções graves, podendo ter efeito bactericida mais rápido e talvez até prevenir a resistência bacteriana (DOSLER et al., 2015).

O sinergismo entre a própolis e drogas antibacterianas já tem sido estudado. Fernandes Júnior et al. (2005) mostraram existência de sinergismo entre o extrato de própolis e cinco drogas (cloranfenicol, gentamicina, netilmicina, tetraciclina e vancomicina) para o *S. aureus*. Em um estudo de Orsi et al. (2006 b), duas amostras diferentes de própolis, uma coletada no Brasil e uma na Bulgária, apresentaram sinergismo com drogas antibacterianas (amoxicilina, ampicilina e cefalexina) e efeitos bactericidas a partir de 3 horas de tratamento.

HAN et al (2016), também testaram o sinergismo entre o veneno de abelha *Apis mellifera* e alguns antibióticos, sendo observado efeito sinérgico bactericida para as combinações de veneno com gentamicina e também com vancomicina.

A melitina mostrou ação sinérgica junto com a amoxicilina e cefuroxima contra bactérias Gram-positivas e e ação sinérgica com eritromicina frente a bactérias Gram-negativas (MOERMAN et al., 2002). Dosler et al. (2015), também mostraram pela metodologia da curva de sobrevivência que a melitina sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foi bactericida no intervalo de 2 a 7 horas após o início do experimento, enquanto que as combinações da melitina com drogas (amicacina, ceftazidima, imipenem e ciprofloxacina) também apresentaram efeitos bactericidas e sinérgicos, porém de modo mais lento.

5.4. Ensaio com concentrações subinibitórias da Api 1 e a melitina sobre *S. aureus* produtores de enterotoxinas A, B, C e D.

Nesta etapa do estudo foram selecionados os produtos com a melhor atividade antibacteriana (melitina e a Api 1) para a realização dos ensaios visando determinar a interferência destes na produção de enterotoxinas por cepas padrões ATCC de *S. aureus* enterotoxigênicos (SEA, SEB, SEC e SED).

Primeiramente, foram realizados os ensaios de CIM para tais cepas padrões ATCC visando definir os valores equivalentes a 70% do CIM para execução dos ensaios para verificar a influência da Api 1 e melitina sobre a produção de enterotoxinas (**Tabela 3**).

Na **Tabela 5** são mostrados os resultados obtidos para os ensaios com produção de enterotoxinas e observa-se que tanto a Api 1 quanto a melitina não interferiram na produção de enterotoxinas das cepas testadas. Isto pode ser verificado pela mesma intensidade dos ensaios de controle, segundo a metodologia preconizada pelo fabricante do kit SET-RPLA (Oxoid), ou seja, todos mostraram produção forte de enterotoxinas (+++).

Tabela 5. Produção de enterotoxinas A, B, C e D por *S. aureus* cultivado com concentrações de 70% da CIM da Api 1 e da melitina.

SEA, SEB, SEC, SED			
Diluições	70% CIM Api 1	70% CIM Melitina	Controle
1:1	+++	+++	+++
1:10	+++	+++	+++
1:100	+++	+++	+++
1:1000	+++	+++	+++

Seis replicatas; diluições realizadas para checar a intensidade da produção da enterotoxinas; (-) não houve produção de enterotoxinas; (+) produção fraca de enterotoxinas; (++) produção moderada de enterotoxinas; (+++) produção forte de enterotoxinas. O teste estatístico não mostrou diferenças significativas entre as diluições ou entre os tratamentos.

Na **tabela 6** encontram-se as contagens de células das culturas de linhagens ATCC no momento inicial dos ensaios, ou seja, no momento considerado zero da incubação e após o período de 24 horas à 37 °C. Verificou-se que em nenhum dos tratamentos houve inibição de crescimento bacteriano a partir do número inicial de células. Assim, essa contagem indica que caso houver essa inibição da produção de qualquer uma das enterotoxinas analisadas, isto aconteceu não por morte bacteriana ou mesmo por qualquer tipo de inibição do crescimento bacteriano nas culturas.

Tabela 6. Valores de UFC/mL para as cepas padrões ATCC de *S. aureus* enterotoxigênicos no tempo zero do cultivo e após 24 horas submetidos em condições de 70% das CIMs obtidas previamente para Api 1 e melitina.

Cepa	SEA	SEB	SEC	SED	
Tratamento / tempo (h)					
Controle	0h	8,0x10 ⁵	5,3x10 ⁵	5,3x10 ⁵	1,4x10 ⁶

	24h	3,7x10 ⁹	1,9x10 ⁹	2,2x10 ⁹	3,9x10 ⁹
70% apitoxina 1	0h	5,7x10 ⁵	3,0x10 ⁵	4,9x10 ⁵	9,2x10 ⁵
	24h	2,0x10 ⁹	1,7x10 ⁹	1,7x10 ⁹	2,6x10 ⁹
70% melitina	0h	2,3x10 ⁵	2,4x10 ⁵	4,3x10 ⁵	6,4x10 ⁵
	24h	2,4x10 ⁹	1,6x10 ⁹	1,8x10 ⁹	2,7x10 ⁹

UFC: unidades formadoras de colônias; h: hora

O estudo sobre ação da apitoxina e melitina na produção de enterotoxinas é considerado inédito, pois não foi encontrado na literatura qualquer relato sobre este tipo de pesquisa. Por outro lado, a ação de produtos naturais, como por exemplo compostos fenólicos aromáticos, já foi demonstrada em relação a produção de enterotoxinas. ALBANO et al. (2016) mostraram que o eugenol, citronelol e geraniol diminuíram a produção de biofilme de SEA, o eugenol e terpineol diminuiu a produção de SEB e todos os produtos testados (eugenol, citronelol, geraniol, cinamaldeído e terpineol) mostraram inibição da produção de SEC. Destaque é dado para o fato de que todos os compostos mostraram em graus distintos a capacidade inibidora na produção e liberação das enterotoxinas em *S. aureus* padrão ATCC, sendo importante esta informação considerando que as cepas testadas por ALBANO et al. (2016) foram as mesmas testadas nesta pesquisa.

5.5. Ensaio com concentrações subinibitórias da Api 1 e melitina sobre *S. aureus* produtor de biofilme

Previamente foram determinadas as concentrações inibitórias da Api 1 e melitina para o *S. aureus* produtor de biofilme (ATCC 29213) para na sequência testar a inibição na produção de biofilme utilizando para isto valores correspondentes a 50% das CIMs (**Tabela 4**). Assim, na **Tabela 7** encontram-se os percentuais de inibição da produção de biofilme de Api 1 e melitina.

Tabela 7. Porcentagem de inibição na produção de biofilme por Api 1 e melitina sobre *S. aureus* produtor de biofilme.

Cepa	Porcentagem de inibição	
	50% CIM Api 1	50% CIM Melitina
<i>S. aureus</i> produtor de biofilme	35,1% ^a ± 4,0	66,3% ^b ± 4,9

Seis replicatas; Letras diferentes nas linhas representam diferenças significativas de atividade antimicrobiana entre produtos para um mesmo microrganismo quando $p \leq 0,05$.

Esse ensaio também foi considerado inédito, sem relatos na literatura tenham sido encontrados. A porcentagem de inibição da Api 1 sobre o *S. aureus* foi de 35,1%, e mesmo sendo eficaz contra as células planctônicas, esta apitoxina mostrou não ser um bom produto antimicrobiano para as infecções causadas por *S. aureus* produtor de biofilme. Em estudo de Smith et al (2009) foi mostrado que antibióticos como linezolida e tigeciclina inibem biofilmes de MRSA em 55% e 57%, respectivamente, enquanto que para a vancomicina e daptomicina as porcentagens de redução foram de 81% e 96% respectivamente. Isto mostra que a Api 1 não foi tão eficaz para tal finalidade. Por outro lado, Giovagnoly et al (2017) verificaram que amicacina, canamicina e vancomicina apresentaram percentuais de inibição ao redor de 27,6%, 58,2% e 53,7%, respectivamente, utilizando uma concentração subinibitória de 0,2 vezes a CIM e a mesma cepa ATCC utilizada neste estudo. Quanto a melitina, a inibição foi ao redor de 66,3%, valor este de percentual de inibição na produção de biofilme semelhante aos mencionados para os antibióticos testados por Smith et al. (2009) e Giovagnoly et al (2017).

Como as bactérias envoltas pelo biofilme apresentam uma grande resistência aos antimicrobianos o uso de novos agentes, principalmente em combinações com antimicrobianos convencionais podem proporcionar efeitos sinérgicos com atividades antibiofilme podendo prevenir ou atrasar a emergência de resistência (DOSLER et al., 2015).

5.6. Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada sobre células de MRSA e *E. coli*, sendo testadas com os valores de CIM obtidas previamente bem como concentrações equivalentes a 4 vezes os valores de CIM. Nas figuras a seguir (**Figuras 6 a 9**), podem ser observadas as células tratadas com a Api 1 e com a melitina. Nota-se uma série de deformações, como por exemplo: distorção da célula, extravasamento do conteúdo citoplasmático, entre outras manifestações.

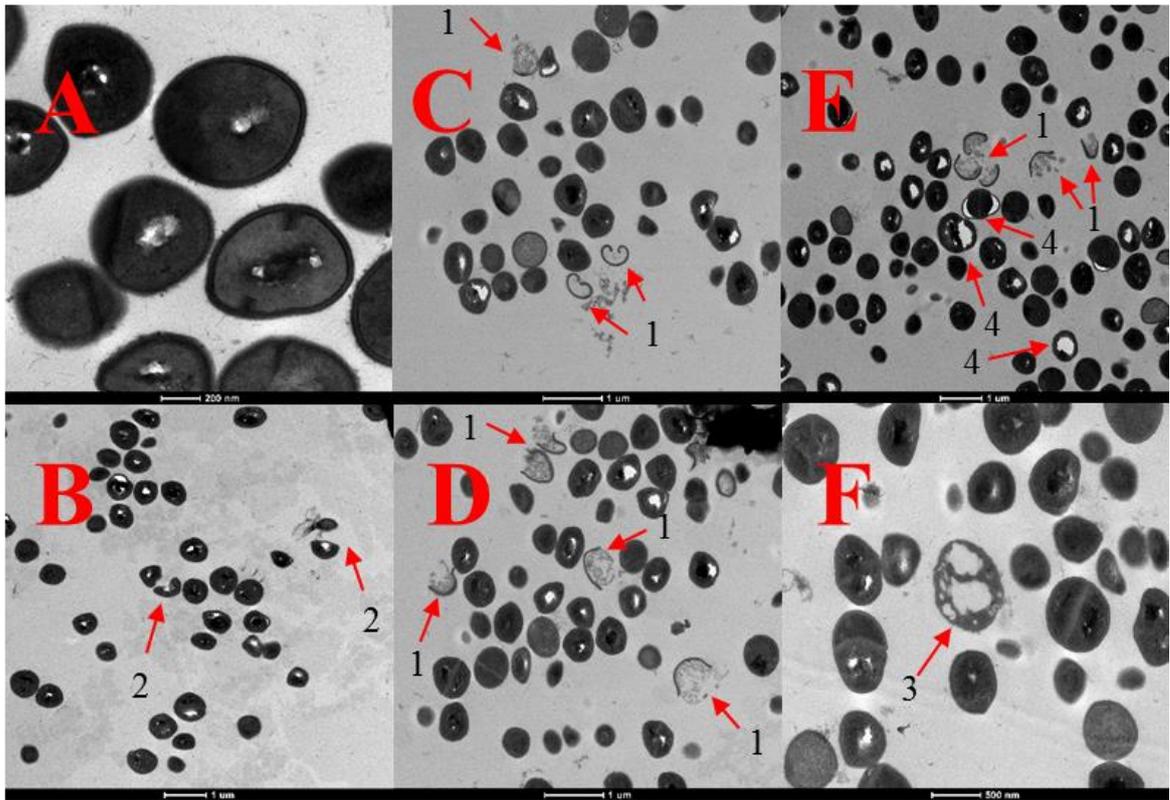


Figura 6 - Alterações morfológicas causadas pela Api 1 em MRSA ATCC 33591 observadas por microscopia eletrônica de transmissão.

A – células de MRSA cultivadas na ausência de compostos (controle); B – células tratadas com o CIM da Api 1 (7,2 µg/mL); C, D, E, F – células tratadas com 4 vezes o CIM da Api 1 (28,8 µg/mL); 1 – desintegração da célula com extravasamento do conteúdo citoplasmático; 2 – distorção da estrutura celular; 3 – completa lise celular; 4 – polarização do conteúdo plasmático

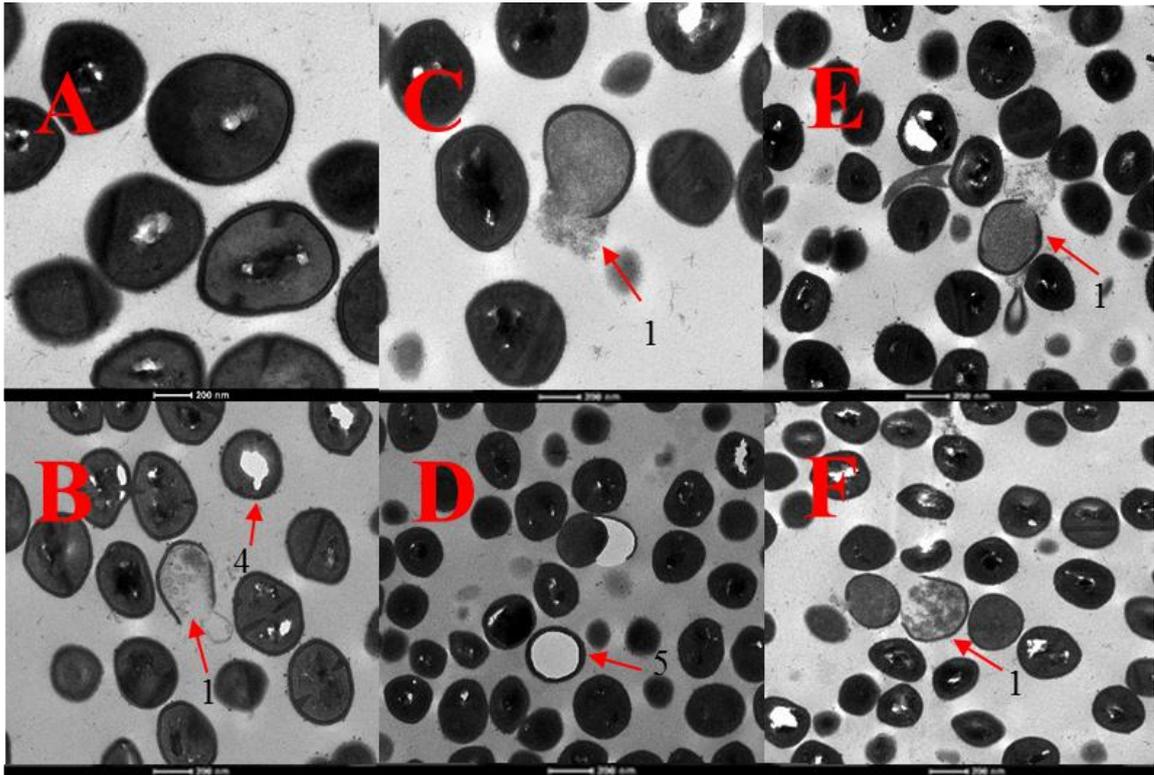


Figura 7 - Alterações morfológicas causadas pela melitina em MRSA ATCC 33591 observadas por microscopia eletrônica de transmissão.

A – células de MRSA cultivadas na ausência de compostos (controle); B – células tratadas com o CIM da melitina (6,7 µg/mL); C, D, E, F – células tratadas com 4 vezes o CIM da melitina (26,8 µg/mL); 1 – desintegração da célula com extravasamento do conteúdo citoplasmático; 4 – polarização do conteúdo plasmático; 5 – extravasamento do conteúdo citoplasmático

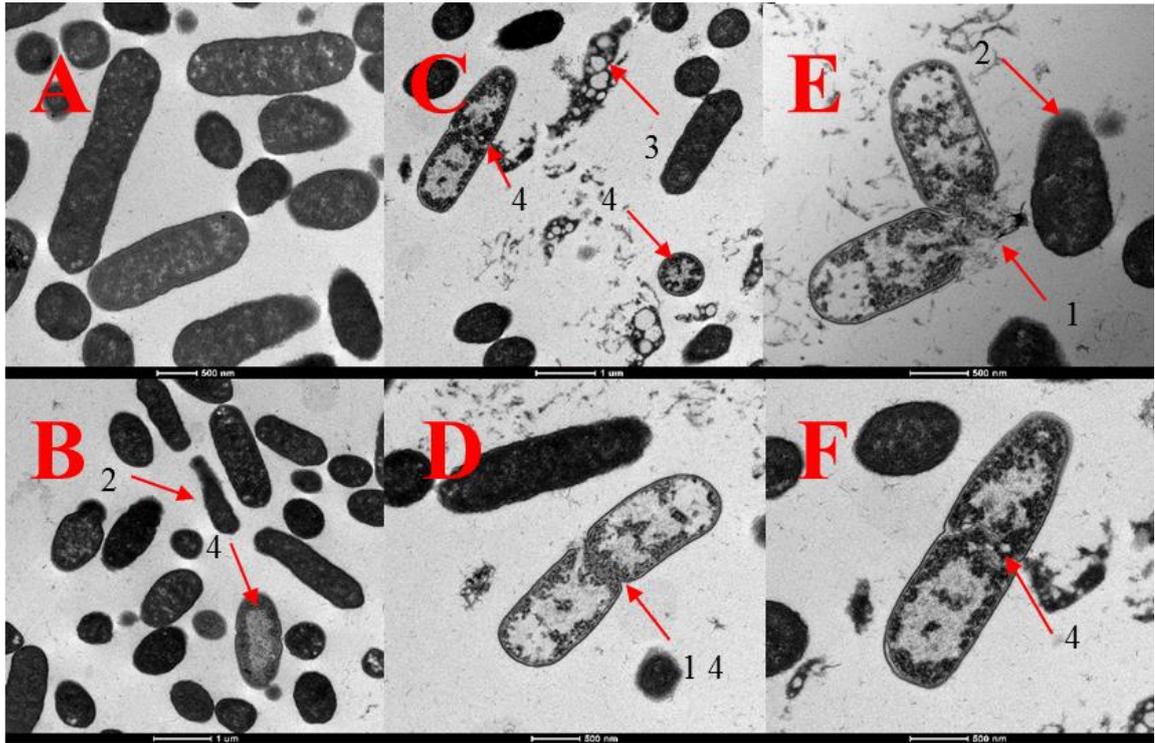


Figura 8 - Alterações morfológicas causadas pela Api 1 em *E. coli* ATCC 45895 observadas por microscopia eletrônica de transmissão.

A – células de *E. coli* cultivadas na ausência de compostos (controle); B – células tratadas com o CIM da Api 1 (7,2 µg/mL); C, D, E, F – células tratadas com 4 vezes o CIM da Api 1 (28,8 µg/mL); 1 – desintegração da célula com extravasamento do conteúdo citoplasmático; 2 – distorção da estrutura celular; 3 – completa lise celular; 4 – polarização do conteúdo plasmático

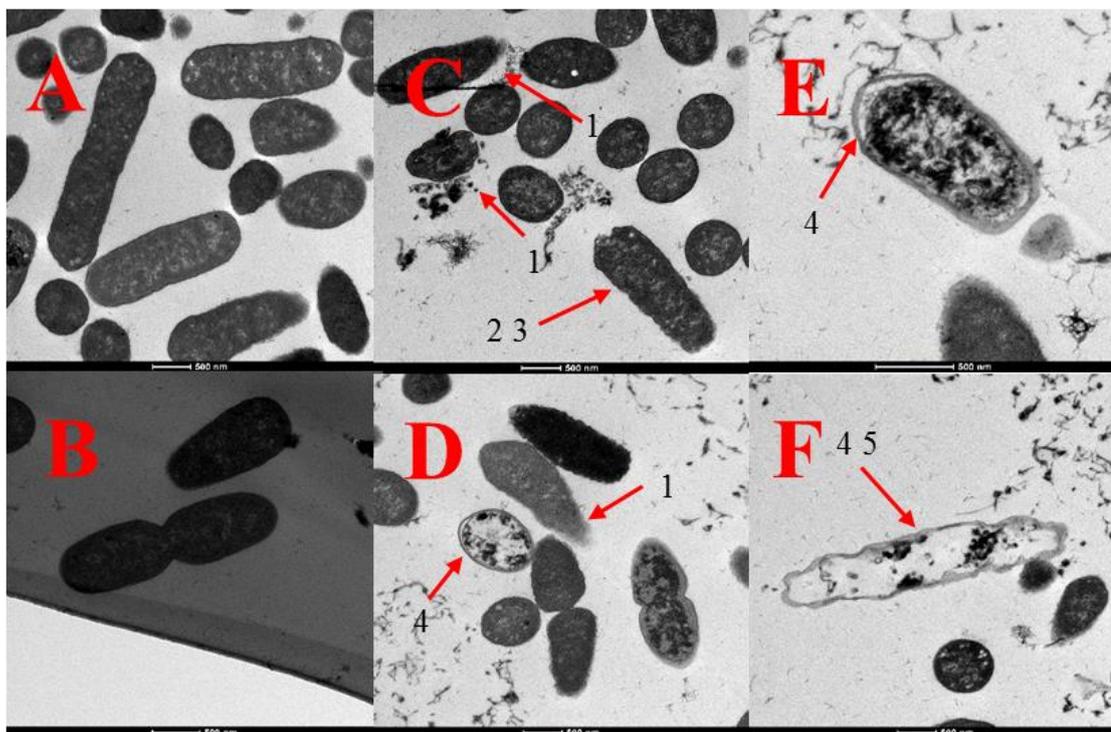


Figura 9 - Alterações morfológicas causadas pela melitina em *E. coli* ATCC 45895 observadas por microscopia eletrônica de transmissão.

A – células de *E. coli* cultivadas na ausência de compostos (controle); B – células tratadas com o CIM da melitina (6,7 µg/mL); C, D, E, F – células tratadas com 4 vezes o CIM da melitina (26,8 µg/mL); 1 – desintegração da célula com extravasamento do conteúdo citoplasmático; 2 – distorção da estrutura celular; 3 – completa lise celular; 4 – polarização do conteúdo plasmático; 5 – extravasamento do conteúdo citoplasmático; 6 – membrana citoplasmática separada da parede celular.

A melitina, principal componente do veneno, possui uma distribuição assimétrica das cadeias laterais polares e apolares, possuindo uma região amino-terminal hidrofóbica, uma região central hidrofóbica e hidrofílica e a região C-terminal hidrofílica (carregada) possibilitando interagir seletivamente com lipídios carregados negativamente. As forças eletrostáticas entre os peptídeos antimicrobianos e as superfícies bacterianas carregadas negativamente, fazem com que os peptídeos possam agir diretamente nas membranas citoplasmáticas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (RAGHURAMAN; CHATTOPADHYAY, 2007; MAHLAPUU et al., 2016).

Tanto o colesterol quanto os lipopolissacarídeos bacterianos agem de maneira semelhante protegendo a membrana da lise que é induzida pela melitina. A melitina interrompe a função de barreira das membranas celulares, podendo formar canais e induzir o aumento da permeabilidade de íons. Em altas concentrações de melitina, a permeabilização

das membranas causa uma ruptura dessas em micelas, também podendo afetar a dinâmica das proteínas da membrana (RAGHURAMAN; CHATTOPADHYAY, 2007).

Existem alguns modelos descritos de como os peptídeos agem na ruptura de membranas, como o modelo poro de barril (“barrel-stave model”), quando os peptídeos se inserem perpendicularmente na bicamada, formando poros transmembranas com formato de barril, onde a parte hidrofílica fica na parte interna do poro, permitindo a passagem de íons, água e componentes intracelulares. Já no modelo poro toroidal (“toroidal-pore model”), os peptídeos forçam os fosfolípidos a se dobrarem, gerando poros alinhados com os peptídeos e por fim, no modelo de tapete (“carpet-like model”), os peptídeos atuam de forma semelhante a um detergente, eles são acumulados na superfície da membrana podendo causar uma tensão na bicamada e assim provocar a sua ruptura e a formação de micelas (MAHLAPUU et al., 2016).

Inicialmente os estudos apontavam que os peptídeos antimicrobianos, como a melitina, por exemplo, só agiam sobre a integridade da membrana citoplasmática por meio de um canal transiente ou dissolução da membrana. Porém, estudos mais recentes indicam que os peptídeos não agem somente perfurando a membrana, mas também podem impedir as sínteses de DNA/RNA, proteína, parede celular, divisão celular e inibir atividades enzimáticas (BROGDEN, 2005; YEUNG; GELLATLY; HANCOCK, 2011).

Os peptídeos biologicamente ativos possuem alta potência e seletividade para uma variedade de alvos. A biodiversidade pode ser atribuída à diversidade de estrutura, o que torna os peptídeos antimicrobianos uma fonte potencial de modelos estruturais para o desenvolvimento de medicamentos (WANG et al., 2016).

6. Considerações Gerais

O EHP, melitina e apitoxinas estudadas apresentaram ação antibacteriana, com destaque para Api 1 e melitina que apresentaram as maiores atividades inibidoras frente a MRSA enquanto o EEP apresentou um valor de CIM muito elevado comparado aos demais antimicrobianos. Isso pode ser explicado pelo seu baixo teor de fenólicos totais.

A melitina e a Api 1 mostraram que podem ser usadas isoladamente ou em combinações com a oxacilina com efeito sinérgico e bactericida também sobre cepas de MRSA.

A Api 1 e a melitina não mostraram efeito inibidor da produção e/ou liberação de enterotoxinas, porém foram capazes de inibir na produção de biofilme com destaque para a melitina com percentual de redução de 66,3 %, mostrando resultados inéditos na literatura.

A microscopia eletrônica de transmissão foi uma ferramenta importante para apontar aspectos da influência sobre a ultraestrutura das bactérias estudadas, importante para entendimento dos mecanismos de ação da Api 1 e melitina.

Os resultados mostram também que a Api 1 e a melitina possuem potencial como futuros agentes antimicrobianos para serem usados tanto isoladamente como em associação com antibióticos convencionais, com destaque para a melitina que apresentou um bom desempenho nos ensaios realizados, e que por ser um peptídeo catiônico, geralmente apresenta ação rápida e não é sujeita aos muitos mecanismos de resistência.

7. Referência Bibliográfica

ADADE, C.M.; OLIVEIRA, I.R.S.; PAIS, J.A.R.; PADRON, T.S.; Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon*, v. 69, p. 227-239, 2013.

AGEITOS, J.M.; SÁNCHEZ-PÉREZ, A.; CALO-MATA, P.; VILLA, T.G. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochemical Pharmacology*, v. 133, p. 117-138, 2017.

AL-LANI, I.; ZIMMERMANN, S.; REICHLING, J.; WINK, M. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine*, v. 22, p. 245-255, 2015.

ALBANO, M.; ALVES, F.C.B.; ANDRADE, B.F.M.T.; BARBOSA, L.N.; PEREIRA, A. F. M.; CUNHA, M.L.R.S.; RALL, V. L. M.; FERNANDES JUNIOR, A. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 38, p. 83-90, 2016.

ALI, M.A.A.M. Studies on bee venom and its medical uses. *International Journal of Advancements in Research & Technology*, v. 1, p. 1-13, 2012.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n.17, p. 3389-402, 1997.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. *Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 34, p. 37-41, 2013.

ÂNGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos e alimentos: uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, p. 1-9, 2007.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P.; MONTANARO, L.; COSTERTON, J.W. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, v. 33, p. 5967-5982, 2012.

ARGUDÍN, M.A.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, v. 7, p. 1751-1773, 2010.

- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 61, p. 1-10, 2000.
- BALSINDE, J.; BALBOA, M.A.; INSEL, P.A.; DENNIS, E.A. Regulation and inhibition of phospholipase A2. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, v. 39, p. 175-189, 1999.
- BANKOVA, V., BOUDOUROVA-KRASTEVA, G., POPOV, S., SFORCIN, J.M., FUNARI, S.R.C. Seasonal variation of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*, v. 29, p. 361-367, 1998
- BARRAVIERA, B.; FERREIRA JÚNIOR, R.S. Abelhas e vespas. In: Acidentes por animais peçonhentos. Botucatu: CEVAP, UNESP, 2007. p. 78-87
- BENKOVIC, V.; HORVAT KNEZEVIC, A.; DIKIC, D.; LISICIC, D.; ORSOLIC, N.; BASIC, I. KOSALEC, I.; KOPJAR, N. Radioprotective effects of propolis and quercetin in irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. *Phytomedicine*, v. 15, p. 851-858, 2009.
- BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. Foodborne bacterial pathogens. *New York: Marcel Dekker*, p. 463-523, 1989.
- BERGDOLL, M.S.; ROBBINS C.P. Characterization of types of staphylococcal enterotoxins. *Journal milk food technology*, v. 36, p. 610-612, 1973.
- BERGDOLL, M.S.; BORJA, C.R.; AVENA, R.M. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. *Journal of Bacteriology*, v. 90, p. 1481-1485, 1965.
- BERGDOLL, M.S.; CZOP, J.K.; GOULD, S.S. Enterotoxin synthesis by the staphylococci. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 236, p. 307-316, 1974.
- BERNARDO, K.; PAKULAT, N.; FLEER, S.; SCHNAITH, A.; UTERMOHLEN, O.; KRUT, O.; MULLER, S.; KRONKE, M. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrobial agents and chemistry*, v. 48, p. 546-555, 2004.
- BODEY, G.P.; BOLIVAR, R.; FAINSTEIN, V.; JADEJA, L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 5, p. 279-313, 1983.
- BOGDANOV, S. Bee Venom: Composition, Health, Medicine: A Review. In: Bee Product Science, 2011. Disponível em <<http://www.bee->

hexagon.net/files/file/fileE/Health/VenomBookReview.pdf >. Acesso em 21 de janeiro de 2017.

BOUTRIN, M.C.F.; FOSTER, H.A.; PENTREATH, V.W. The effects of bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2 on *Trypanosoma brucei brucei* and enterobacteria. *Experimental Parasitology*, v. 119, p. 246-251, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, v. 41, p. 278-291, 2010.

BROGDEN, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, p. 238–250, 2005.

BROSI, B.J.; DAILY, G.C.; EHRLIC, P.R. Bee community shifts with landscape context in a tropical countryside. *Ecological Applications*, v. 17, p. 418-430, 2007.

BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The New England Journal of Medicine*, v. 320, p. 1188-1196, 1989.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 36, p. 347-363, 1998.

CASMAN, E.P.; BENNET, A.E.; DORSEY, A.E.; ISSA, J.A. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *Journal of Bacteriology*, v. 94, p. 1875-1882, 1967.

CASMAN, E.P.; BERGDOLL, M.S.; ROBINSON, J. Designation of staphylococcal enterotoxin. *Journal of Bacteriology*, v. 85, p. 715-716, 1963.

CASTRO, M.L.; CURY, J.M.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; SUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova*, v. 30, p. 1512-1516, 2007.

CHAN, B.C.; IP, M.; LAU, C.B.; LUI, S.L.; JOLIVALT, C.; GANEM-ELBAZ, C.; LITAUDON, M.; REINER, N.E.; GONG, H.; SEE, R.H.; FUNG, K.P.; LEUNG, P.C. Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137, p. 767-773, 2011.

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.

CONLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of therapeutic agents. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1696, p. 1-14, 2004.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. Apicultura: Manejo e produção. *Jaboticabal: FUNEP*, p. 154, 1996.

CUEVA, C.; MORENO-ARRIBAS, A.M.V.; PEDRO, J.; MARTIN ALVAREZ, A., GERALD BILLS, B.C.; VICENTE, M.F.; BASILIO, A.; RIVAS, C.L.; REQUENA, T.; RODRIGUEZ, J.M.; BARTOLOME, C. Antimicrobial activity of phenolic acids against comensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in microbiology*, v. 161, p. 372-382, 2010.

CUNHA, M.L.R.S.; CALSOLARI, R.A.O. Toxigenicity in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci: Epidemiological and Molecular Aspects. *Microbiology Insights*, v. 1, p. 1-12, 2008.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 26, p. 343-356, 2005.

DELANEY, J.A.; SCHNEIDER-LINDNER, V.; BRASSARD, P.; SUISSA, S. Mortality after infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) diagnosed in the community. *BMC Medicine*, v. 6, p. 1-8, 2008.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 13057-13060, 1994.

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

DOSLER, S.; GERCEKER, A.A. In vitro activities of antimicrobial cationic peptides; melittin and nisin, alone or in combination with antibiotics against Gram-positive bacteria. *Journal of Chemotherapy*, v. 24, p. 137-143, 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*, p. 3-9, 2015.
- DUSSART, W.; BARTHOLOMÉ, Y. Taller elaboración de subproductos de la miel y las colmenas. *Nicaragua: Managua*, p. 51, 2007.
- EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequencer. *European Journal of Biochemistry*, v. 1, p. 80-91, 1967.
- FALCO, A.; CATALAN, E.B.; GUTIERREZ, M.P.M.; COLL, J.; MICOL, V.; ESTEPA, A. Melittin-loaded immunoliposomes against viral surface proteins, a new approach to antiviral therapy. *Antiviral Research*, v. 97, p. 218-221, 2013.
- FERNANDES JÚNIOR, A.; BALESTRIN, E. C.; BETONI, J.E.C.; ORSI, R.O.; CUNHA, M. L. R. S.; MONTELLI, A. C. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 563-566, 2005.
- FERNANDES JÚNIOR, A.; BALESTRIN, E.C.D.; CUNHA M.R.L.S. Anti *Staphylococcus aureus* activity of bee propolis extracts prepared with different ethanol concentrations. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v. 24, p. 147-152, 2003.
- FERREIRA-JUNIOR, R.S.; SCIANI, J.M.; MARQUES-PORTO, R.; LOURENÇO, J.A.; ORSI, R.O.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D.C. Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. *Toxicon*, v. 56, p. 355-362, 2010.
- FUNARI, S.R.C.; ZEIDLER, P.R.; ROCHA, H.C.; SFORCIN, J.M. Venom production by Africanized honeybees (*Apis mellifera*) and Africanized-European hybrids. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v. 7, p. 190-198, 2001.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. *Bee World*, v. 60, p. 59-84, 1979.
- GIOVAGNOLI, S.; PIETRELLA, D.; BARBERINI, L.; SANTI, C.; CAROTTI, A.; DI MICHELE, A.; RICCI, M. Reshaping antibiotics through hydrophobic drug-bile acid ionic complexation enhances activity against *Staphylococcus aureus* biofilms. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 528, p. 144-162, 2017.
- GREENAWAY, W.; MAY, J.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. *Zeitschrift fuer Naturforschung*, v. 46, p. 111-121, 1991.

GRUNBERGER, D.; BANERJEE, R.; EISINGER, K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*, v. 44, p. 230-232, 1988.

GUIMARAES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T.. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v. 33, p. 667-679, 2010.

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

HABERMANN, E.; JENTSCH, J. Sequenzanalyse des Melittins aus den tryptischen und peptischen Spaltstücken. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische*, v. 348, p. 37-50, 196

HAN, S.M.; KIM, J.M.; HONG, I.P.; WOO, S.O.; KIM, S.G.; JANG, H.R.; PAK, S.C. Antibacterial activity and antibiotic-enhancing effects of honeybee venom against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, v. 79, p. 1-9, 2016.

HAN, S.M.; LEE, K.; YEO, J.; KWEON, H.; KIM, B.; KIM, J.; BAEK, H.; KIM, S. Antibacterial activity of honey bee venom against bacterial mastitis pathogens infecting dairy cows. *International Journal of Industrial Entomology*, v. 14, p. 147-142, 2007.

HAN, S.M.; YEO, J.; BAEK, H.; LIN, S.; MEYER, S.; MOLAN, P. Postantibiotic effect of purified melittin from honeybee (*Apis mellifera*) venom against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Asian Natural Products Research*, v.11, p. 796-804, 2009.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, v. 32, p. 1141-1148, 1983.

HEGAZI, A.G. Medical importance of bee products. *Bee science*, v. 12, p. 136-146, 2012.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A.K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, v. 15, p. 639-652, 2008.

HENRIQUES, M.; CERCA, N.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Influence of sub-inhibitory concentrations of antimicrobial agents on biofilm formation in indwelling medical devices. *The International Journal of Artificial Organs*, v. 28, p. 1181-1185, 2005.

HOLMBERG, S.D.; BLAKE, P.A. Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *JAMA*, v. 251, p. 487-489, 1984.

HONDA, H; KRAUSS, M.J.; COOPERSMITH, C.M.; KOLLEF, M.H.; RICHMOND, A.M.; FRASER, V.J.; WARREN, D.K. *Staphylococcus aureus* nasal colonization and subsequent infection in intensive care unit patients: Does methicillin resistance matter? *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 31, p. 584-591, 2010.

JONES, S.M., MORGAN, M., HUMPHREY, T.J., LAPPIN-SCOTT, H. Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet*, v. 357, p. 40-41, 2001.

JORGE, D.M.M. Busca de inibidores naturais contra o veneno de *Apis mellifera*. 142 p. Tese (Mestrado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2008.

JUNG, W.K.; LEE, D.Y.; CHOI, Y.H.; YEA, S.S.; CHOI, I.; PARK, S.G.; SEO, S.K.; LEE, S.W.; LEE, C.M.; KIM, S.K.; JEON, Y.J.; CHOI, I.W. Caffeic acid phenethyl ester attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine model of ovalbumin-induced asthma. *Life Sciences*, v. 26, p. 797-805, 2008.

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

KONG, M.; CHEN, X.G.; LIU, C.S.; LIU, C.G.; MENG, X.H.; YU, L.J. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 65, p. 197-202, 2008.

KUHN-NENTWIG, L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cellular and Molecular Life and Sciences*, v. 12, p. 2651-2668, 2003.

LEE, G.; BAE, H. Anti-Inflammatory applications of melittin, a major component of bee venom: Detailed mechanism of action and adverse effects. *Molecules*. v. 21, n. 5, p. 616-626, 2016.

LIMA, P. R.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 9, p.149-162, 2003.

LOMELE, R. L. Efeito do recurso floral na composição qualitativa de apitoxina. 2014. 51 p. Tese (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu. 2014.

MAK, T.N.; SCHMID, M.; BRZUSZKIEWICZ, E.; ZENG, G.; MEYER, R.; SFANOS, K.S.; BRINKMANN, V.; MEYER, T.F.; BRÜGGEMANN, H. Comparative genomics reveals distinct host-interacting traits of three major human-associated propionic bacteria. *BMC Genomics*, v. 14, p. 640, 2013.

MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTAD, L.; BJÖRN, C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 6, p. 1-12, 2016.

MANTOVANI, R.P.; RALL, V.L.M.; BATALHA, J.E.N.; FERNANDES, A.A.H.; FERNANDES JUNIOR, A. Anti-coagulase-negative *Staphylococcus* activity of ethanolic extracts of propolis from two brazilian regions and synergism with antimicrobial drugs by the e-test method. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, v. 14, p. 357-365, 2008.

MARCUCCI, M.C., Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity. *Apidologie*, v. 26, p. 83–99, 1995.

MARR, A.K.; GOODERHAM, W.J.; HANCOCK, R.E. Antibacterial peptides for therapeutic use: Obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 6, p.468–472, 2006.

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, p. 3616-3619, 2003.

MARTINS, A.; PEREIRA, V.C.; CUNHA, M.L.R.S. Oxacillin Resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the University Hospital of Botucatu Medical School in Brazil. *Chemotherapy*, v. 56, p. 112-119, 2010.

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

MESAROS, N.; NORDMANN, P.; PLESIAT, P.; ROUSSEL-DELVALLEZ, M.; VAN ELDERE, Y.; JACOBS, F.; LEBECQUE, P.; MALFROOT, A.; TULKENS, P.M.; VAN

BAMBEKE, F. 'Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium'. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 13, p. 560-78, 2007.

METZNER, J.; BEKEMEIER, H.; SCHNEIDEWIND, E.; SCHWAIBERGER, R. Bioautographische Erfassung der antimikrobiell wirksamen Inhaltstoffe von Propolis. *Pharmazie*, v. 30, p. 799-800, 1975.

MIORIN, P.L.; LEVY JUNIOR, N.C.; CUSTODIO, A.R.; BRETZ, W.A.; MARCUCCI, M.C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, p. 913-920, 2003.

MOERMAN, L.; BOSTEELS, S.; NOPPE, W.; WILLEMS, J.; CLYNEN, E.; SCHOOF, L.; THEVISSSEN, K.; TYTGAT, J.; VAN ELDERE, J.; VAN DER WALT, J.; VERDONCK, F. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *European Journal of Biochemistry*, v. 269, 2002.

MURRAY, R.J. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Internal Medicine Journal*, v.35, p. 106-119, 2005.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. *Microbiologia médica*. 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NAPARSTEK, L.; CARMELI, Y.; NAVON-VENEZIA, S.; BANIN, E. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, p. 1027-1034, 2014.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, p. 142-201, 1998.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents, approved guideline M26-A. Wayne PA: NCCLS; 1999.

NAZARI, M.R.; SEKAWI, Z.; SADEGHIFARD, N.; RAFTARI, M. GHAFOURIAN, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a systematic review. *Medical Microbiology*, v. 26, p. 1-7, 2015.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, v. 79, p. 629-661, 2016.

OMOE, K.; IMANISHI, K.; HU, D.; KATO, H.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; UCHIYAMA, T.; SHINAGAWA, K. Biological properties of Staphylococcal enterotoxin-like toxin Type R. *Infection and immunity*, v. 72, p. 3664-3667, 2004.

ORSI, R. O.; FERNANDES JÚNIOR, A.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M. Antibacterial effects of Brazilian and Bulgarian propolis and synergistic effects with antibiotics acting on the bacterial DNA and folic acid. *Natural Product Research*, v. 26, p. 344-349, 2006.

ORSI, R. O.; FERNANDES JÚNIOR, A.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M. Antibacterial effects of Brazilian and Bulgarian propolis *in vitro* against *Salmonella* Typhi and synergism with antibiotics on the ribosome. *Natural Product Research*, v. 26, p. 430-437, 2006.

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.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. *Current topics in microbiology and immunology*, v. 322, p. 207-228, 2008.

OWEN, M. D.; BRIDGES, A. R. Catecholamines in honeybee (*Apis mellifera* L.) and various vespid (Hymenoptera) venoms. *Toxicon*, v. 20, p. 1075-1084, 1982.

OWEN, M. D.; PFAFF, L. A. Melittin synthesis in the venom system of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Toxicon*, v. 33, p. 1181-1188, 1995.

PALMA, M.S.; BROCHETTO-BRAGA, M.R. Biochemical variability between venoms from different honey-bee (*Apis mellifera*) races. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 106, p. 423-427, 1993.

PAMPLONA-ZOMENHAN, L.C.; PAMPLONA, B.C.; SILVA, C.B.; MARCUCCI, M.C.; MIMICA, L.M.J. Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of an ethanol extract of Brazilian classified propolis on strains of *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 1259-1264, 2011.

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.

PARK, C.; LEE, D.G. Melittin induces apoptotic features in *Candida albicans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 394, p. 170-172, 2010.

PARKAR, S.G.; FLINT, S.H.; BROOKS, J.D. Physiology of biofilms of thermophilic bacilli: potential consequences for cleaning. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, v. 30, n.9, p. 553-560, 2003.

PEIREN, N.; VANROBAEYS, F.; GRAF, D. C. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1752, p. 1-5, 2005.

PEREZ-PAYA, E.; HOUGHTEN, R. A.; BLONDELLE, S. E. The role of amphipathicity in the folding, self-association and biological activity of multiple subunit small proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 1048–1056, 1995.

PINCHUK, I.; BESWICK, E.; REYES, V. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins*, v.2, p. 2177-2197, 2010.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 38, p. 278-283, 2001.

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 Disease*. v. 17, p. 159-167, 2011.

RAGHURAMAN, H.; CHATTOPADHYAY, A. Melittin: a Membrane-active peptide with diverse functions. *Bioscience reports*, v. 27, p. 189-223, 2007.

RASIGADE, J.P.; VANDENESCH, F. *Staphylococcus aureus*: A pathogen with still unresolved issues. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 21, p. 510-514, 2014.

RAVENSDALE, J.; WONG, Z.; O'BRIEN, F.; GREGGL, K. Efficacy of antibacterial peptides against peptide-resistant MRSA is restored by permeabilization of bacteria membranes. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1-10, 2016.

RAYGADA, J.L.; LEVINE, D.P. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Growing Risk in the Hospital and in the Community. *American Health & Drug Benefits*, v. 2, p. 86-95, 2009.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto & Contexto enfermagem*, v. 13, p. 64-70, 2004.

SCALLAN, E.; GRIFFIN, P.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; HOEKSTRA, R.M. Foodborne illness acquired in the United States – unspecified agents. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, p. 16 - 22, 2011.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSON, M-A.; ROY, S.L. JONES, J.L.; GRIFFIN, P.M. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, p. 7 - 15, 2011.

SHLAES, D.M.; GERDING, D.N.; JOHN, J.F.; CRAIG, W.A.; BORNSTEIN, D.L.; DUNCAN, R.A.; ECKMAN, M.R.; FARRER, W.E.; GREENE, W.H.; LORIAN, V.; LEVY, S.; MCGOWAN, J.E.; PAUL, S.M.; RUSKIN, J.; TENOVER, F.C.; WATANAKUNAKORN, C. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 18, p. 275-291, 1997.

SIMÕES, C. C.; ARAÚJO, D. B.; ARAÚJO, R. P. C. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos micro-organismos presentes na saliva de humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 84-89, 2008.

SOLA, M.C.; OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, C.S.M. Mecanismos de quorum sensing e sua relevância na microbiologia de alimentos. *Enciclopédia biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, p. 1409-1441, 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.

STANLEY, N.R.; LAZAZZERA, B.A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology*, v., 52, p. 917-924, 2004.

TIVERON, A.P.; ROSALEN, P.L.; FRANCHIN, M.; LACERDA, R.C.C.; BUENO-SILVA, B.; BENSO, B.; DENNY, C.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of south Brazilian organic propolis. *Plos One*, v. 11, p. 1-18, 2016.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5ª edição. São Paulo: Atheneu, 2008.

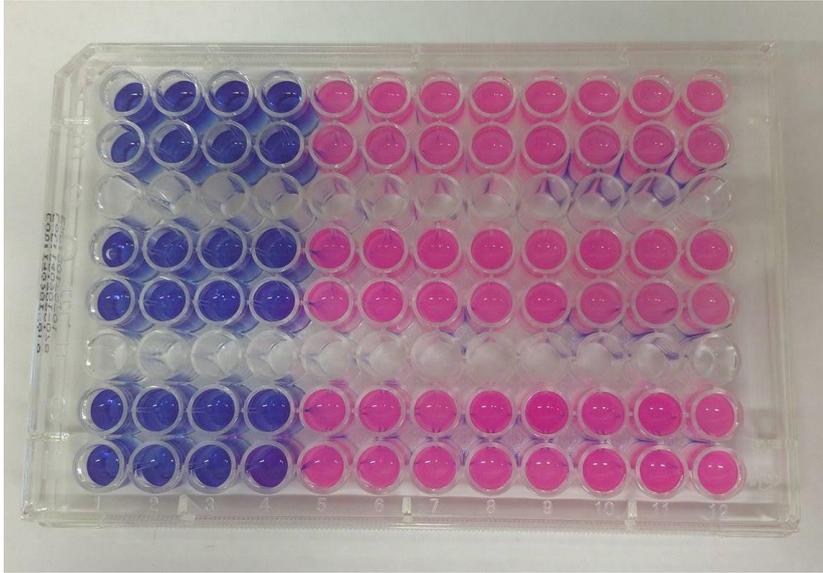
TRANter, H.S. Foodborne staphylococcal illness. *The Lancet*, v. 336, p. 1044-1046, 1990.

- VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology*, v. 92, n. 1-2, p. 179-185, 2003.
- VETTER, R. S.; VISSCHER, P. K.; CAMAZINE, S. Mass envenomations by honey bees and wasps. *Western Journal of Medicine*, v. 170, p. 223-227, 1999.
- WANG, K.; LI, Y.; XIA, Y.; LIU, C. Research on peptide toxins with antimicrobial activities. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*, v. 1, n. 2, p. 1-8, 2016.
- WERTHEIM, H.F.; MELLES, D.C.; VOS, M.C.; VAN LEEUWEN, W.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H.A.; NOUWEN, J.L. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 5, p. 751-762, 2005
- WIESE, H. Apicultura novos tempos. Guaíba: Agropecuária, 2000. 424 p.
- 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.
- WOJTYCZKA, R.D.; DZIEDZIC, A.; IDZIK, D.; KĘPA, M.; KUBINA, R.; KABAŁA-DZIK, A.; SMOLEŃ-DZIRBA, J.; STOJKO, J.; SAJEWICZ, M.; WASIK, T.J. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* clinical isolates to propolis extract alone or in combination with antimicrobial drugs. *Molecules*, v. 18, p. 9623-9640, 2013.
- 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.
- ZHOU, J.; ZHAO, J.; ZHANG, S.; SHEN, J.; QI, Y.; XUE, X.; LI, Y.; WU, L.; ZHANG, J.; CHEN, F.; CHEN, L. Quantification of melittin and apamin in bee venom lyophilized powder from *Apis mellifera* by liquid chromatography–diode array detector–tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, v. 404, p. 171-178, 2010.

APÊNDICE

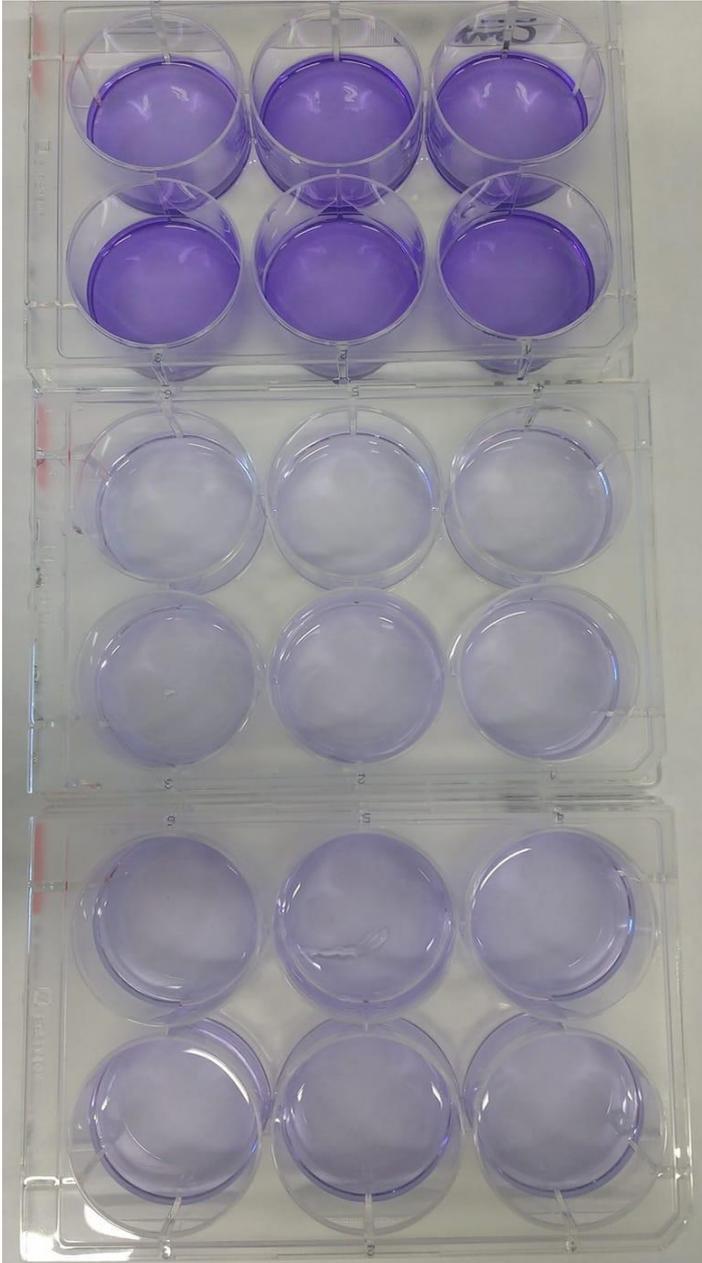
Apêndice 1 – Foto ilustrativa do aparato para a coleta de veneno de *Apis mellifera* por meio de coletor elétrico posicionado no alvado da colmeia.

(Fonte: Ana Flávia Marques Pereira, 2015)



Apêndice 2 - Placa de ELISA utilizada no ensaio de microdiluição para determinação da CIM da melitina sobre a cepa de *S. aureus* enterotoxigênica SEA 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: Ana Flávia Marques Pereira, 2016)



Apêndice 3 - Ensaio da inibição da produção de biofilme pela melitina. A primeira placa (com poços roxos intensos) é a de controle positivo (meio TSB + 0,25% de glicose + bactérias) e demais placas de tratamento (meio TSB + 0,25% de glicose + melitina + bactérias).

(Fonte: Ana Flávia Marques Pereira, 2017)