



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**Atividade antibiofilme de nanopartículas de prata biogênicas e de extratos de própolis em *Corynebacterium pseudotuberculosis***

**LAERTE MARLON CONCEIÇÃO DOS SANTOS**

**SALVADOR – BA**

**2021**

**Atividade antibiofilme de nanopartículas de prata biogênicas e de extratos de própolis em *Corynebacterium pseudotuberculosis***

Tese de doutorado apresentada no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia como requisito para o título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

**SALVADOR – BA**

**2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Conceição dos Santos, Laerte Marlon  
Nanopartículas de prata biogênicas e de extratos de  
própolis em biofilmes de *Corynebacterium*  
*pseudotuberculosis* / Laerte Marlon Conceição dos  
Santos. -- Salvador, 2021.  
133 f.

Orientador: Ricardo Wagner Dias Portela.  
Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em  
Ciência Animal nos Trópicos) -- Universidade Federal  
da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia,  
2021.

1. Agentes antimicrobianos. 2. Linfadenite  
caseosa. 3. Nanotecnologia. 4. Terapias alternativas.  
I. Wagner Dias Portela, Ricardo. II. Título.


**Atividade antibiofilme de nanopartículas de prata biogênicas e de extratos de própolis em *Corynebacterium pseudotuberculosis***

**LAERTE MARLON CONCEIÇÃO DOS SANTOS**

**Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos**

**Salvador, 29 de março de 2021**

**Comissão examinadora:**


  
**Dr. Ricardo Wagner Dias Portela**  
**Orientador**  
**(UFBA)**

**Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende**  
**(UFG)**

**Dr. Mateus MatiuZZi da Costa**  
**(UNIVASF)**

**Dra. Claudilene Ribeiro Chaves**  
**(UFU)**

**Dra. Melissa Hanzen Pinna**  
**(UFBA)**

  
**Dr. Luis Fernando Pita Gondim**  
**Coordenador PPGCAT**  
**EMEVZ / UFBA**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**LAERTE MARLON CONCEIÇÃO DOS SANTOS** – Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Bahia (2015), Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos pela Universidade Federal da Bahia (2021) e Doutorando em Ciência Animal nos Trópicos pela Universidade Federal da Bahia (2021). Atualmente desenvolvendo atividades de pesquisa como bolsista PD&I no laboratório de Microbiologia e Bacteriófagos do Instituto Senai de Inovação em Sistemas Avançados em Saúde (ISI-SAS) do SENAI CIMATEC. Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Microbiologia Médica, atuando principalmente nos seguintes temas: doenças infecciosas de animais domésticos, *C. pseudotuberculosis*, imunodiagnóstico, terapias antimicrobianas, própolis e nanocompostos.

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese de doutorado aos meus pais, Laerte e Aindira. Certamente, eu não chegaria até aqui sem o apoio de vocês. Dedico toda a minha jornada a vocês!

Dedico também esta tese à minha esposa, Larissa. Obrigado por tornar esse feito real. Obrigado pelas motivações, pelo meu crescimento pessoal e profissional e pelo reconhecimento.

## AGRADECIMENTOS

**A Deus toda honra, toda glória toda gratidão. “Portanto dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória perpetuamente! Amém.” (Romanos 11:36).**

Ao meu orientador e pai científico Prof. Ricardo Portela. Obrigado pela dedicação e por ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo desses anos. O senhor sempre será para mim uma referência como ser humano e como profissional.

A Profa. Bruna Machado (SENAI-CIMATEC) e a Profa. Ljubica Tasic (UNICAMP) pela colaboração e apoio científico para o desenvolvimento deste trabalho.

A equipe do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) que me acolheu e foi fundamental para o desenvolvimento das pesquisas.

Ao Prof. Roberto Meyer, pela oportunidade de trabalhar no LABIMUNO.

Agradeços aos amigos e colegas do Grupo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada a Saúde Animal pela vivência, aprendizado, apoio e momentos especiais que passamos ao longo desses seis anos.

Aos professores e funcionários da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia por todo apoio e estrutura oferecidos.

A Unidade de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/Bahia pela contribuição científica neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia FAPESB pela bolsa de estudo e auxílio financeiro.

**EPÍGRAFE**

*“Não é o crítico que importa; nem aquele que aponta onde foi que o homem tropeçou ou como o autor das façanhas poderia ter feito melhor. O crédito pertence ao homem que está por inteiro na arena da vida, cujo rosto está manchado de poeira, suor e sangue; que luta bravamente; que erra, que decepciona, porque não há esforço sem erros e decepções; mas que, na verdade, se empenha em seus feitos; que conhece o entusiasmo, as grandes paixões; que se entrega a uma causa digna; que, na melhor das hipóteses, conhece no final o triunfo da grande conquista e que, na pior, se fracassar, ao menos fracassa ousando grandemente”.*

Trecho do discurso “Cidadania em uma República” (ou “O Homem na Arena”), proferido na Sorbonne por Theodore Roosevelt, em 23 de abril de 1910.



## RESUMO

Santos, L. M. C. **Atividade antibiofilme de nanopartículas de prata biogênicas e de extratos de própolis em *Corynebacterium pseudotuberculosis***. 2021. 128p. Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2021.

A linfadenite caseosa é uma doença infecto-contagiosa, crônica e debilitante causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Esta enfermidade é caracterizada pelo desenvolvimento de granulomas encapsulados em linfonodos superficiais e viscerais, como também em diversos órgãos. O problema principal da LC deve-se a dificuldade de implantação de um tratamento eficaz, em vista de que o atual basea-se na drenagem e limpeza das lesões utilizando solução de iodo a 10%, acarretando assim altos riscos de contaminação ambiental. Além disso, o tratamento é geralmente refratário à terapia antibiótica. Portanto, é vital a busca de estratégias inovadoras, a partir de novas terapias antimicrobianas, para enfrentar o principal problema da LC. A partir deste cenário, objetivou-se com este estudo avaliar, a capacidade de formação de biofilme de *C. pseudotuberculosis* e determinar a susceptibilidade de isolados bacterianos formadores de biofilme aos extratos etanólico e supercrítico de própolis e a nanopartículas de prata (AgNP) biogênicas. Foram utilizadas as metodologias de microdiluição em caldo, atividade da disrupção do biofilme consolidado, interferência na formação de biofilme e imagens obtidas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para determinar a sensibilidade dos isolados aos agentes antimicrobianos. As AgNPs, bem como os extratos etanólico de própolis verde e supercrítico de própolis vermelha causaram disrupção do biofilme consolidado de *C. pseudotuberculosis* e foram eficazes na capacidade de interferir na formação inicial do biofilme bacteriano. As AgNPs reduziram de forma significativa os biofilmes consolidados de *C. pseudotuberculosis*. As imagens da MEV mostram mudanças da morfologia do biofilme consolidado e poucas alterações estruturais das bactérias expostas aos extratos de própolis. Observamos disrupção completa do biofilme e severos danos estruturas das bactérias expostas a AgNPs. Conclui-se que as nanopartículas de prata e os extratos de própolis podem ser consideradas como um agente terapêutico promissor para o tratamento da linfadenite caseosa em pequenos ruminantes, com ações não somente em forma planctônica de *C. pseudotuberculosis*, mas também sobre seu biofilme associado.

**Palavras-chave:** agentes antimicrobianos, linfadenite caseosa, nanotecnologia, terapias alternativas

## ABSTRACT

Santos, L. M. C. **Antibiofilm activity of biogenic silver nanoparticles and propolis extracts in *Corynebacterium pseudotuberculosis***. 2021. 130p. Thesis (PhD in Tropical Animal Science) – School of Veterinary Medicine and Zootechny. Federal University of Bahia, Salvador, 2021.

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is a Gram-positive and intracellular bacterium that causes caseous lymphadenitis (CL) in small ruminants, a chronic disease characterized by the development of encapsulated granulomas in superficial and visceral lymph nodes, as well as in various organs. An important feature of chronic bacterial infections is the development of biofilm. Considering this scenario, the aim of this study was to evaluate the biofilm formation capacity of *C. pseudotuberculosis* and to determine the susceptibility of biofilm-forming bacterial isolates to ethanolic and supercritical extracts of propolis, and to silver nanoparticles (AgNP). The broth microdilution methodology, the analysis of the disruption of the consolidated biofilm and the interference in the formation of biofilm assays were used to determine the sensitivity of the isolates to antimicrobials. Mature biofilms were visualized by Scanning Electron Microscopy. The ethanolic extracts of green propolis and supercritical red propolis were not effective in inhibiting the *C. pseudotuberculosis* consolidated biofilm but were able to interfere in the formation of bacterial biofilm. The AgNPs acted for 48 hours in *C. pseudotuberculosis* controlling the change between planktonic and sessile forms, decreasing the fixation and colonization in a microplate. The colloidal AgNP solution significantly reduced the consolidated biofilms of *C. pseudotuberculosis*. The SEM images showed that the AgNP were able to disrupt the bacterial biofilm, and that there were morphological changes in the bacteria present in the treated biofilms. It can be concluded that AgNPs are promising therapeutical agents for the treatment of the caseous lymphadenitis in small ruminants.

**Keywords:** antimicrobial agents, caseous lymphadenitis, nanotechnology,

## LISTA DE FIGURAS

	Página
REVISÃO DE LITERATURA GERAL	
<b>Nanopartículas de prata biogênicas e extratos de própolis em biofilmes de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i></b>	
Figura 1-	Abcessos de linfadenite caseosa no fígado e nódulos linfáticos mesentéricos de pequenos ruminantes. (A) Granulomas associados à infecção por <i>C. pseudotuberculosis</i> em fígado de ovino; (B) lesão drenante em linfonodo submandibular de caprino..... 27
Figura 2 -	Representação esquemática das distintas etapas da formação de biofilme bacteriano ..... 32
Figura 3 -	Esquema dos sistemas de detecção de quorum em bactérias Gram-negativas (A) e bactérias Gram-positivas (B) ..... 33
Figura 4 -	Síntese de nanopartículas por meio de abordagens biológicas e físico-químicas ..... 35
Figura 5 -	Diferentes mecanismos de ação das NPS nas células bacterianas ..... 38
Figura 6 -	Mecanismos antibacterianos de AgNPs ..... 40
CAPÍTULO I	
<b>Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting</b>	
Figura 1-	Number of filed patents for propolis-based products for use in animal health, between 1992 and 2017..... 54
Figura 2-	Number of filed patents for propolis-based products for use in animal health, according to patent expiration year..... 54
Figura 3-	Number of filed patents for propolis-based products for use in animal health, according to the country where the patent was filed.... 54

Figura 4-	Number of filed patents for propolis-based products for use in animal health, according to its classification code.....	55
-----------	---	----

## CAPÍTULO II

### **Ação de extratos etanólicos e supercríticos de própolis em biofilme de *Corynebacterium pseudotuberculosis***

Figura 1-	Semi-quantificação de biofilme de cepas de referência e isolados clínicos de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	67
Figura 2 -	Atividade antibiofilme do extrato etanólico de própolis verde (GPR EtOH) em biofilme consolidado de <i>C. pseudotuberculosis</i> . Cepas 1002 (A), N1 (B), VD57 (C) e CAPJ4 (D) .....	68
Figura 3 -	Atividade antibiofilme do extrato etanólico de própolis verde (GPR EtOH) em biofilme consolidado de <i>C. pseudotuberculosis</i> . Isolados clínicos 05 (E), 06 (F), 15 (G) e 96 (H) .....	69
Figura 4 -	Atividade antibiofilme do extrato supercrítico de própolis vermelha (RAL SCO <sub>2</sub> ) em biofilme consolidado de <i>C. pseudotuberculosis</i> . Cepas 1002 (A), N1 (B), VD57 (C) e CAPJ4 (D) .....	70
Figura 5 -	Atividade antibiofilme do extrato supercrítico de própolis vermelha (RAL SCO <sub>2</sub> ) em biofilme consolidado de <i>C. pseudotuberculosis</i> . Isolados clínicos 05 (E), 06 (F), 15 (G) e 96 (H) .....	71
Figura 6 -	Interferência na formação de biofilme do extrato etanólico de própolis verde em <i>C. pseudotuberculosis</i> . Cepas 1002 (A), N1 (B), VD57 (C) e CAPJ4 (D) .....	74
Figura 7 -	Interferência na formação de biofilme do extrato etanólico de própolis verde em <i>C. pseudotuberculosis</i> . Isolados clínicos 05 (E), 06 (F), 15 (G) e 96 (H) .....	75
Figura 8 -	Interferência na formação de biofilme do extrato supercrítico de própolis vermelha em <i>C. pseudotuberculosis</i> . Cepas 1002 (A), N1 (B), VD57 (C) e CAPJ4 (D) .....	76
Figura 9 -	Interferência na formação de biofilme do extrato supercrítico de própolis vermelha em <i>C. pseudotuberculosis</i> . Isolados clínicos 05 (E), 06 (F), 15 (G) e 96 (H) .....	77

Figura 10 -	Micrografias representativas de microscopia eletrônica de varredura da estrutura de biofilmes maduros de <i>C. pseudotuberculosis</i> não expostos (A e B) e expostos ao extrato etanólico de própolis verde (C, D.E e F). As setas brancas indicam deformidades celulares.....	79
Figura 11 -	Micrografias representativas de microscopia eletrônica de varredura da estrutura de biofilmes maduros de <i>C. pseudotuberculosis</i> não expostos (A e B) e expostos ao extrato supercrítico de própolis vermelha (C, D, E e F). A seta azul indica a presença da matriz de exopolissacarídeo em uma macrocolônia de biofilme maduro. As setas brancas indicam deformidades celulares.....	80
CAPÍTULO III		
<b>Ação antimicrobiana de nanopartículas de prata biogênicas em <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> e seus impactos no biofilme</b>		
Figura 1 -	Formação de biofilme de cepas de referência e isolados clínicos de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	97
Figura 2 -	Curva de inibição de crescimento de cepas de referências de <i>C. pseudotuberculosis</i> expostas a diferentes concentrações de AgNP....	99
Figura 3 -	Curva de inibição de crescimento de isolados clínicos de <i>C. pseudotuberculosis</i> expostos a diferentes concentrações de AgNP ....	100
Figura 4 -	Atividade de AgNP sobre biofilme consolidado de <i>C. pseudotuberculosis</i> após 24 e 48 horas de tratamento .....	101
Figura 5 -	Interferência de AgNP na formação de biofilme por <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	103
Figura 6 -	Micrografias representativas de microscopia eletrônica de varredura da estrutura de biofilmes maduros de <i>C. pseudotuberculosis</i> não expostos (A e B) e expostos a AgNPs (C, D, E e F). As setas azuis indicam a presença da matriz de exopolissacarídeo em biofilme maduro. As setas brancas indicam deformidades e debris celulares. As setas verdes apontam para a presença de vesículas na superfície bacteriana .....	105

## LISTA DE TABELAS

Página

### CAPÍTULO I

#### **Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting**

Table 1 -	Some phenolic compounds found in different propolis types and their main associated biological activities .....	46
Table 2 -	Some flavonoids found in different propolis types and their main associated biological activities .....	46
Table 3 -	Some molecules from xanthone and terpenoid classes founded in different propolis types and their main associated biological activities.....	47
Table 4 -	Biological activity of different propolis extracts against Gram-positive bacterial species of veterinary interest.....	48
Table 5 -	Biological activity of different propolis extracts against gram-negative bacterial species of veterinary interest.....	49
Table 6 -	Biological activity of different propolis extracts against yeast species of veterinary interest .....	50
Table 7 -	Biological activity of different propolis extracts against filamentous fungi species of veterinary interest.....	52

### CAPÍTULO II

#### **Ação de extratos etanólicos e supercríticos de própolis em biofilme de *Corynebacterium pseudotuberculosis***

Tabela 1 -	Determinação do teor de umidade, sólidos totais e cinzas totais de amostras de própolis vermelha e verde coletadas em diferentes regiões do Brasil .....	61
------------	--	----

Tabela 2 -	Determinação do teor de proteína bruta, lipídios totais, fibras brutas e atividade da água (aw) de amostras de própolis vermelha e verde coletadas em diferentes regiões do Brasil .....	62
Tabela 3 -	Determinação do teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/g), flavonóides (mg EQ/g), atividade antioxidante por DPPH (IC <sub>50</sub> ) e ABTS (%) dos extratos de diferentes amostras de própolis brasileiras obtidas por extração etanólica (EtOH) e por SFE (SCO <sub>2</sub> ) .....	62
Tabela 4 -	Interferência por extrato etanólico de própolis verde na formação de biofilme de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	72
Tabela 5 -	Interferência por extrato supercrítico de própolis vermelha na formação de biofilme de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	73

### CAPÍTULO III

#### **Ação antimicrobiana de nanopartículas de prata biogênicas em *Corynebacterium pseudotuberculosis* e seus impactos no biofilme**

Tabela 1 -	Perfil de sensibilidade de cepas de referência e isolados clínicos de <i>C. pseudotuberculosis</i> a AgNP.....	98
Tabela 2 -	Interferência de AgNP na formação de biofilme de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	102

**LISTA DE SIGLAS**

<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>AgNPs</b>	Nanopartículas de prata
<b>AuNPs</b>	Nanopartículas de ouro
<b>BHI</b>	Brain-Heart Infusion
<b>CLSI</b>	Clinical & Laboratory Standards Institute
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
<b>EtOH</b>	Extração etanólica
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>GPR</b>	Própolis verde do estado do Paraná
<b>LC</b>	Linfadenite caseosa
<b>µL</b>	Microlitros
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MBC</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>MIC</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>nm</b>	Nanômetros
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>RAL</b>	Própolis vermelha do estado de Alagoas
<b>SCO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono supercrítico
<b>SFE</b>	Extração por fluidos supercríticos
<b>UFC</b>	Unidade de formação de colônias
<b>UV-VIS</b>	Espectroscopia UV/visível



## SUMÁRIO

### NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS E EXTRATOS DE PRÓPOLIS EM BIOFILMES DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	22
2.1 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	22
2.2 LINFADENITE CASEOSA .....	23
2.3 EPIDEMIOLOGIA .....	24
2.4 PATOGENIA .....	25
2.5 DIAGNÓSTICO.....	27
2.6 TRATAMENTO .....	28
2.7 PREVENÇÃO E CONTROLE .....	29
2.8 BIOFILME .....	30
<b>2.8.1</b> Formação do biofilme e <i>Quorum sensing</i> .....	31
<b>2.8.2</b> Componentes estruturais .....	33
2.9 NANOTECNOLOGIA .....	35
<b>2.9.1</b> Síntese nanopartículas (NPs) .....	35
<b>2.9.2</b> Atividade antimicrobiana de Nanopartículas (NP) .....	37
<b>2.9.3</b> Ação das AgNPs .....	39
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	41
3.1 OBJETIVO GERAL .....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>4 HIPÓTESE</b> .....	42

<b>5 CAPÍTULO I PROPOLIS: TYPES, COMPOSITION, BIOLOGICAL ACTIVITIES, AND VETERINARY PRODUCT PATENT PROSPECTING ..</b>	<b>43</b>
5.1 ABSTRACT .....	44
5.2 INTRODUCTION .....	44
5.3 MATERIAL E METHODS .....	45
5.4 TECHNOLOGICAL PROSPECTION .....	51
5.5 REFERENCES .....	54
<b>6 CAPÍTULO II AÇÃO DE EXTRATOS ETANÓLICOS E SUPERCRÍTICOS DE PRÓPOLIS EM BIOFILME DE <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....</b>	<b>58</b>
6.1 RESUMO .....	59
6.2 INTRODUÇÃO .....	60
6.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	60
6.4 RESULTADOS .....	66
6.5 DISCUSSÃO .....	81
6.6 CONCLUSÕES .....	84
6.7 REFERÊNCIAS .....	84
6.8 MATERIAL SUPLEMENTAR .....	88
<b>7 CAPÍTULO III AÇÃO ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS EM <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> E SEUS IMPACTOS NO BIOFILME .....</b>	<b>90</b>
7.1 RESUMO .....	91
7.2 INTRODUÇÃO .....	92
7.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	93
7.4 RESULTADOS .....	96
7.5 DISCUSSÃO .....	106
7.5 REFERÊNCIAS .....	110
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS (GERAL) .....</b>	<b>116</b>

**9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (GERAL) ..... 117**

## 1 INTRODUÇÃO

A criação de pequenos ruminantes tem contribuído de forma significativa no crescimento socioeconômico do Brasil, com ênfase para a região Nordeste, graças a aplicação de ferramentas inovadoras que proporcionam melhorias no segmento (TEIXEIRA *et al.*, 2013). No entanto, um dos fatores limitantes desse tipo de criação é o alto índice de doenças infecciosas (CAMPOS *et al.*, 2017; DE MACEDO *et al.*, 2020; FURTADO *et al.*, 2020). Dentre essas enfermidades, destaca-se a linfadenite caseosa (SEYFFERT *et al.*, 2010).

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecto-contagiosa, crônica, debilitante, causada por *C. pseudotuberculosis* caracterizada principalmente pelo desenvolvimento de granulomas encapsulados em linfonodos superficiais e viscerais, e em diversos órgãos causando uma redução significativa da produtividade e eficiência reprodutiva dos animais infectados (DORELLA *et al.*, 2006; VOIGT *et al.*, 2012; OREIBY *et al.*, 2014).

Atualmente, os principais avanços tecnológicos aplicados à sanidade desses animais visam o desenvolvimento de métodos capazes de superar o diagnóstico subclínico da enfermidade (BARRAL *et al.*, 2019), bem como o uso da vacina como uma das medidas de controle, a qual tem apresentado taxas de proteção variáveis (SILVA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2018). Todavia, o problema cardinal da LC concentra-se na dificuldade de implantação de um tratamento ecossustentável e eficaz, em vista de que o atual basea-se na drenagem e limpeza das lesões utilizando solução de iodo a 10%, acarretando assim altos riscos de contaminação ambiental (SANTIAGO *et al.*, 2013). Aliado a isto, o tratamento é geralmente refratário à terapia antibiótica, provavelmente devido a espessa cápsula formada em torno das lesões típicas e a natureza caseosa do conteúdo dentro da cápsula (WILLIAMSON, 2001; BAIRD & FONTAINE, 2007).

Diante de uma era onde é vital a busca de ferramentas ecologicamente sustentáveis, a necessidade de implantação de estratégias inovadoras, a partir de novas terapias antimicrobianas, para enfrentar o principal problema da LC além de indispensável, também se mostra urgente. Neste cenário que surge a própolis como um novo agente antibacteriano devido a ação de diversos compostos antimicrobianos de amplo espectro contra inúmeros tipos de bactérias (ALMUHAYAWI, 2020). De igual modo, as nanopartículas protagonizam como agente antibacteriano em potencial para o gerenciamento das infecções bacterianas graças a ação antimicrobiana em biofilmes e cepas multirresistentes (ALMATAR *et al.*, 2018).

Com isso, espera-se obter, sob o viés da bioprospecção, melhores resultados no tratamento desta enfermidade, que tem engendrado prejuízos econômicos e sociais significativos na indústria de curtumes (GUIMARÃES *et al.*, 2011) e afetando principalmente uma cultura de subsistência básica para os pequenos produtores nordestinos, onde a cadeia produtiva da pecuária de pequenos ruminantes envolve um número elevado de estabelecimentos rurais de pequeno porte (FARIAS *et al.*, 2018).

Por fim, visando encontrar estratégias que ofereçam alguma promessa clínica para LC, este trabalho avaliou a ação de extratos de própolis obtidos por diferentes métodos de extração e a ação de nanopartículas de prata biogênica como agentes antibactericida e antibiofilme contra *C. pseudotuberculosis*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

*C. pseudotuberculosis* pertence ao gênero *Corynebacterium*, o qual está incluído em um grupo supragenérico dos Actinomicetos que também inclui os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Este grupo, chamado CMNR, é bastante heterogêneo, porém a maioria destas espécies compartilham características em comum, tais como a organização da parede celular, compostas principalmente de peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos, bem como o elevado teor de guanina-citosina (G + C) do genoma (47-74%) (DORELLA et al., 2006).

Dentro deste gênero, destacam-se *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, que possuem grande importância em saúde humana e veterinária. *C. diphtheriae* é o agente etiológico da difteria (ZASADA, 2015). *C. ulcerans* é considerado um importante patógeno oportunista em infecções hospitalares, e pode causar difteria (OTSUJI et al., 2017). *C. pseudotuberculosis* tem grande importância veterinária por causar a linfadenite caseosa (LC) em pequenos ruminantes (WINDSOR et al., 2016).

*C. pseudotuberculosis* é uma bactéria Gram-positiva intracelular facultativa e pleomórfica, variando de cocos a bacilos, medindo cerca de 0,5 µm a 0,6 µm por 1 µm a 3 µm em tamanho. Este patógeno não esporula, não possui cápsula e é imóvel. Apresenta-se como uma bactéria anaeróbia facultativa com condições ótimas de crescimento a 37 °C em pH entre 7.0 e 7.2. Na superfície do ágar e, se organiza em colônias opacas, de crescimento concêntrico e de coloração creme alaranjado (DORELLA et al., 2006; TRIPATHI et al., 2016). Em meio de cultivo líquido, cresce desenvolvendo um biofilme na superfície, sem turvação. A formação do biofilme na superfície é atribuída principalmente a lipídeos de superfície, e a quantidade destes lipídeos na membrana celular está diretamente correlacionada com a espessura do biofilme e a virulência da cepa bacteriana (MOURA COSTA, 2002).

*C. pseudotuberculosis* é exigente do ponto de vista nutricional, necessitando de meios enriquecidos como ágar sangue, ágar BHI e caldo BHI. A bactéria produz β-hemólise característica em ágar sangue que pode não aparecer até 48 a 72h de incubação (MOURA COSTA, 2002), porém largas zonas de hemólise se desenvolvem na presença do *Rhodococcus equi* teste CAMP (OLIVEIRA et al., 2014a). Pode ser caracterizada por provas

bioquímicas, tais como produção de catalase, produção de urease e fermentação de carboidratos sem produção de gás, tais como maltose, manose, glicose, galactose (variável); não fermenta lactose; não tem atividade proteolítica, não hidrolisando a gelatina ou a caseína, e é oxidase negativo (SANTOS *et al.*, 2019).

A redução de nitrato em nitrito classifica as cepas que infectam principalmente equinos (*biovar equi*) e as cepas que infectam caprinos e ovinos (*biovar ovis*). Os bovinos podem ser infectados pelos dois biovares, com predomínio do *biovar equi* (SONGER *et al.*, 1988; ARAÚJO *et al.*, 2016; BARAÚNA *et al.*, 2017).

## 2.2 LINFADENITE CASEOSA

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecto-contagiosa, crônica, debilitante, causada por *C. pseudotuberculosis*. Eventualmente, a infecção pode ser encontrada em bovinos e equinos, causando a acne contagiosa e a linfangite ulcerativa, respectivamente (ARAÚJO *et al.*, 2016; CORBEIL *et al.*, 2016). Os suínos são descritos como hospedeiros da bactéria (OLIVEIRA *et al.*, 2014), porém, em ovinos e caprinos, esta enfermidade assume importância econômica e sanitária (DORELLA *et al.*, 2006; SELLERA *et al.*, 2016).

A LC é caracterizada principalmente pelo desenvolvimento de granulomas em linfonodos superficiais e viscerais, como também em diversos órgãos (SOUZA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2019), com período de incubação podendo variar de 2 a 6 semanas (CHIRINO-ZARRAGA *et al.*, 2006). A doença culmina com duas manifestações, podendo ocorrer concomitantemente, levando a perdas econômicas significativas relacionadas à redução da produtividade e desempenho, bem como redução da eficiência reprodutiva dos animais infectados (DORELLA *et al.*, 2006a; O'REILLY *et al.*, 2010). Tais situações se tornam evidentes quando a bactéria coloniza órgãos reprodutivos e nódulos linfáticos associados causando orquite e infertilidade em machos e mastite e aborto em fêmeas (LATIF *et al.*, 2015; OTHMAN *et al.*, 2016; YITAGESU *et al.*, 2020).

As perdas econômicas são devidas ao caráter debilitante da doença (ARSENAULT *et al.*, 2003; SEYFFERT *et al.*, 2010), custos com medicamentos (GUIMARÃES *et al.*, 2011) e por afetar uma cultura de subsistência básica para o pequeno produtor nordestino, onde a cadeia produtiva da pecuária de pequenos ruminantes envolve um número elevado de estabelecimentos

rurais de pequeno porte (FARIAS *et al.*, 2018). Os prejuízos significativos também são observados nos curtumes regionais, devido as lesões de pele geradas pelos granulomas em linfonodos superficiais (GUIMARÃES *et al.*, 2011).

Diante de tais fatores, é importante considerar a LC como um problema de saúde pública, pois há 33 casos relatados na literatura científica de infecção em humanos em diversos países (Bastos *et al.* 2012). O relato mais recente descreve a infecção em uma estudante de medicina veterinária de 23 anos, previamente saudável, com um histórico de 4 semanas de sintomas leves das vias aéreas evoluindo para tosse com secreção purulenta. O alto nível de identidade genômica compartilhada entre a cepa isolada do paciente e a cepa do curso apóia fortemente a hipótese de que a infecção foi adquirida durante o trabalho de laboratório, uma observação relevante para os profissionais de laboratório que trabalham com isolados de *C pseudotuberculosis* (HEGGELUND *et al.*, 2015).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA

A ocorrência da LC é relatada em diversos países, tais como Argentina (AUAD *et al.*, 2018), Índia (KUMAR *et al.*, 2012), Egito (AL-GAABARY *et al.*, 2009), Tunísia (BEN SAID *et al.*, 2002), Estados Unidos (HAAS *et al.*, 2017), Canadá (ARSENAULT *et al.*, 2003) e Brasil (FARIAS *et al.*, 2018). No Brasil, estima-se que a maioria dos rebanhos esteja infectado, sendo os estados da região Nordeste os mais afetados, em razão de possuírem a maior concentração de rebanhos caprinos do país (IBGE, 2015). Um estudo de prevalência em caprinos de cinco estados do Nordeste realizado por Farias *et al.* (2018) concluiu que, dos 2571 caprinos avaliados, 783 (30,4%) foram soropositivos, sendo a menor prevalência de animais observada em Sergipe (22,5%), e a maior no Piauí (41,4%).

Em Minas Gerais, um levantamento soropidemiológico realizado por Seyffert *et al.* (2010) apresentou uma elevada soroprevalência (78,9%) de animais positivos para LC. No Distrito Federal, a soroprevalência da linfadenite caseosa em rebanhos comerciais de ovinos, determinada através de ELISA indireto, foi de 44% (CARMO *et al.*, 2012).

A transmissão ocorre por contato direto com secreções ou por fômites, e a entrada da bactéria no organismo é facilitada por lesões na pele (WILLIAMSON, 2001; ANDRADE *et al.*, 2012). Animais infectados podem transmitir a infecção para muitos animais em um curto



período sob condições de contato próximo e fluxo de ar reduzido em galpões cobertos (OREIBY *et al.*, 2014).

A frequência de infecção em linfonodos parotídeos indica que a ingestão de alimentos, a tosquia e a descorna possuem um papel importante na transmissão de LC em ovinos (O'REILLY *et al.*, 2008). A falta de higiene das instalações, o contato direto entre animais infectados e a poeira são outros fatores de risco (O'REILLY *et al.*, 2008).

Os estudos epidemiológicos sobre LC realizados na Polônia entre 1996 e 2002 em rebanhos de cabras leiteiras evidenciaram que os principais fatores de risco foram a presença de machos soropositivos em um rebanho, presença de abscessos superficiais em animais, presença de sintomas respiratórios, presença de animais debilitados e a ocorrência de falhas reprodutivas em rebanhos (KABA *et al.*, 2011).

Considerando o papel socioeconômico da caprinocultura na região Nordeste do Brasil, Farias *et al.* (2019) identificaram a ausência de silagem de forragem, não separação dos animais por sexo ou por idade, não substituição dos caprinos idosos e não tratamento de caroços de LC antes da ruptura espontânea são os principais fatores de riscos da doença. Outro importante fator de risco é a vegetação presente na região nordeste brasileira, caracterizada pela presença de numerosas plantas cactáceas que podem provocar lesões na pele dos animais (ANDRADE *et al.*, 2012).

## 2.4 PATOGENIA

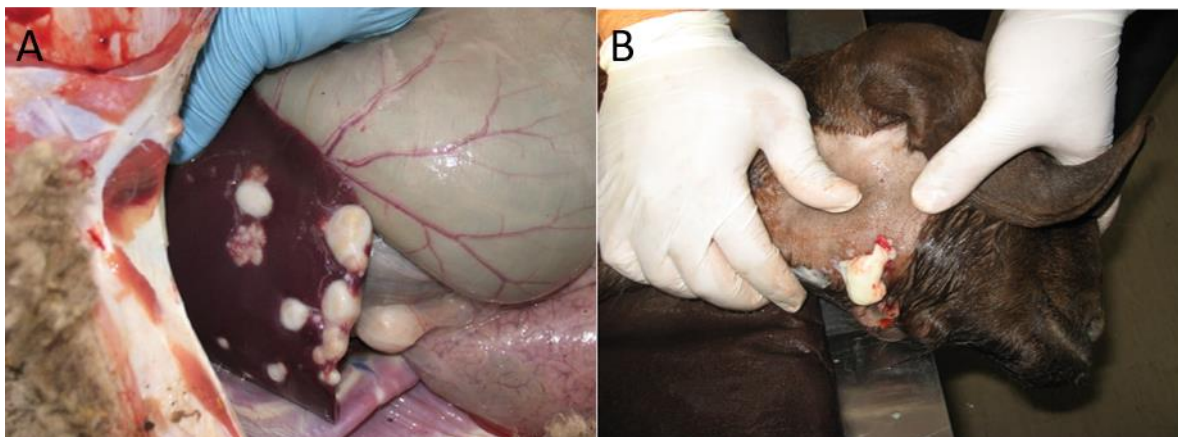
Após a entrada da bactéria no hospedeiro, há uma rápida disseminação do microrganismo para o linfonodo de drenagem local, onde se desenvolvem múltiplos granulomas microscópicos, que vão crescendo e se unindo até formar um granuloma maior. A disseminação da infecção também pode ocorrer através da circulação sanguínea ou pelo sistema linfático, o que pode resultar na formação de lesões em linfonodos internos e/ou pulmão, podendo também atingir outros tecidos e órgãos (BAIRD & FONTAINE, 2007). Estes incluem fígado, baço, rim, coração, glândula mamária, testículo, sistema nervoso central e articulações (DOMENIS *et al.*, 2018). A infecção pode ocorrer através do contato entre o conteúdo caseoso da lesão e a pele ou mucosas íntegras dos animais sadios, ou onde existem soluções de continuidade (WASHBURN *et al.*, 2013), ou, aerossóis (BASTOS *et al.*, 2011).

Acredita-se que fosfolipase D (PLD, um importante fator de virulência de *C. pseudotuberculosis*, desempenhe um papel crítico na disseminação da bactéria no local da infecção (MOURA-COSTA, 2002). A fosfolipase D é uma exotoxina que possui atividade esfingomielinase e age causando a hidrólise das ligações éster da esfingomielinina da membrana celular dos mamíferos, facilitando a disseminação bacteriana do sítio inicial de infecção para sítios secundários (DORELLA et. al., 2006; BAIRD & FONTAINEY, 2007). A PLD é capaz de ativar o sistema complemento, esgotando assim o complemento na região que circunda as bactérias invasoras e protegendo-as da opsonização. Ela pode prejudicar a quimiotaxia dos neutrófilos e, como consequência, diminuir a probabilidade de fagocitose no início da infecção (YOZWIAK E SONGER, 1993). A expressão de Plid por *C. pseudotuberculosis* intracelular desempenha um significativo na redução da viabilidade dos macrófagos após a infecção (MCKEAN et al., 2007).

A infecção, seja em linfonodos, seja em outros órgãos, evolui com fagocitose por neutrófilos e macrófagos, multiplicação intracelular do *C. pseudotuberculosis* e degeneração e morte das células hospedeiras (DORELLA et. al., 2006). Em infecções naturais, o revestimento ceroso de ácidos micólicos fornecem à bactéria proteção mecânica, e possivelmente bioquímica, contra as enzimas hidrolíticas presentes nos lisossomos., permitindo resistência a fagocitose e sobrevivência dentro do hospedeiro como um parasita intracelular facultativo. (WILLIAMSON, 2001; BAIRD & FONTAINEY, 2007). Com a morte dos macrófagos, há liberação da bactéria e formação de uma lesão necrótica, ficando a bactéria livre para se disseminar para outros órgãos. Na tentativa de conter e eliminar o microrganismo, ocorre a formação de granulomas. (KURIA et al., 2001; KALIL et al., 2019).

As lesões ocorrem em duas formas principais: superficial e visceral. A forma superficial é caracterizada pela formação de lesões nos gânglios linfáticos, com ou sem abscessos, de tamanhos variados e em diferentes locais, com conteúdo coloração amarelo-esverdeado ou branco-amarelado de consistência variando de purulenta a caseosa (DOMENIS et al., 2018). Clinicamente, a LC desenvolve abscessos em linfonodos superficiais na cabeça e no pescoço, sendo os gânglios linfáticos parotídeos mais comumente afetados nos ovinos e os linfonodos cervicais são os mais comumente afetados nos caprinos (AL-GABARY et al., 2009; OREIBY et al., 2014). A forma visceral está associada a lesões nos gânglios linfáticos internos, parênquima pulmonar e vísceras. As lesões também podem ser encontradas no fígado, nos rins, úber e, em menor frequência, no coração, nos testículos, nas articulações e no sistema nervoso central (DOMENIS et al., 2018). Exemplos de lesão são encontrados na **Figura 1**.

**Figura 1 - Abscessos de linfadenite caseosa no fígado e nódulos linfáticos mesentéricos de pequenos ruminantes. (A) Granulomas associados à infecção por *C. pseudotuberculosis* em fígado de ovino; (B) lesão drenante em linfonodo submandibular de caprino.**



Fonte: WASHBURN, 2014

## 2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LC é fundamentado nos achados clínico e epidemiológicos, onde se observam a formação de lesões típicas, a presença de cicatrizes nos linfonodos superficiais ou, em casos mais raros, se o envolvimento de órgãos viscerais causar emagrecimento (conhecido como síndrome da ovelha magra) (WINDSOR, *et al.*, 2011; AZEVEDO *et al.*, 2012). O exame clínico por si só não é capaz de detectar todos os animais infectados no rebanho (MALONE *et al.*, 2006), por isso vários métodos sorológicos foram desenvolvidos para superar o problema do diagnóstico subclínico da LC. Os ensaios desenvolvidos e considerados aplicáveis ao diagnóstico de LC são: o ensaio de microaglutinação (MENZIES & MUCKLE., 1989), teste de imunodifusão (RAMLAN *et al.*, 2010), teste sinérgico de inibição de hemólise (JESKE *et al.*, 2013), Dot-blot (PRODHAN *et al.*, 2013), Western blot (KABA *et al.*, 2001), teste de hemaglutinação indireta (SHIGIDI, 1978) e PCR (ÇETINKAYA *et al.*, 2002; BASTOS *et al.*, 2012).

Alguns testes sorológicos, como o ELISA, foram capazes de detectar animais portadores da forma visceral da LC e são eficazes em programas do controle da enfermidade (DERCKSEN *et al.*, 2000; MALONE *et al.*, 2006; REBOUÇAS *et al.*, 2013). O ELISA indireto, utilizando as proteínas CP40 e PLD em forma recombinante, surge como uma ferramenta promissora que pode ser utilizada em pesquisas epidemiológicas e programas de controle de LC devido à sua

alta precisão na detecção de cabras e ovelhas infectadas por *C. pseudotuberculosis* (BARRAL *et al.*, 2019)

O isolamento de *C. pseudotuberculosis* feito diretamente do material purulento de linfonodos permanece como um dos procedimentos mais fidedignos de diagnóstico, o qual é considerado o teste padrão ouro. As amostras de linfonodos com lesões são coletadas para exame de esfregaço e exame microbiológico, seguida por identificação bioquímica de isolados (KALIL *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2019).

A identificação de bactérias corineformes é realizada de forma bem estabelecida pelo sistema API Coryne (API-bioMérieux, Inc., La Balme lês Grottes, France). Esse método consiste em uma bateria de 21 testes bioquímicos que podem ser realizados entre 24 e 48 horas. O sistema contém 20 tubos contendo substratos que permitem testes para 11 enzimas (pirazinamidase, pirrolidonilarilamidase,  $\beta$ -galactosidase, fosfatase alcalina,  $\alpha$ -glucosidase, N-acetilglucosaminidase,  $\beta$ -glucoronidase, redução de nitrato e hidrólise de esculina e uréia) e 8 testes de fermentação de carboidratos (glucose, ribose, D-xilose, manitol, maltose, lactose, sacarose e glicogênio).

Um ensaio de PCR com base no gene 16S rRNA foi desenvolvido para identificação de isolados de *C. pseudotuberculosis*. Embora sendo útil para estimar a prevalência de LC nos animais estudados, a técnica apresentou algumas limitações de dependência da cultura bacteriana e não foi suficientemente específico para distinguir *C. pseudotuberculosis* de *C. ulcerans* (ÇETINKAYA *et al.*, 2002). A fim de melhorar a detecção de *C. pseudotuberculosis* por PCR, Almeida *et al.* (2017) desenvolveram um ensaio de PCR quadruplex com os genes *16S*, *narG*, *rpoB* e *pld*, aumentando o valor diagnóstico e detecção simultânea das cepas de *C. pseudotuberculosis* biovares equi e ovis.

## 2.6 TRATAMENTO

Atualmente, o tratamento baseia-se na drenagem e limpeza das lesões, utilizando solução de iodo a 10%. Porém, este método representa elevados riscos de contaminação ambiental, por ruptura espontânea e inesperada de lesão ou por exposição do patógeno ao ambiente externo através dos abscessos. A aplicação de tintura de iodo a 10% e hipoclorito de sódio a 2,5% nas lesões de animais afetados pelo LC não tem sido eficaz para controlar a

enfermidade, além de serem responsáveis pelas reações de dor e edema na região dos gânglios linfáticos (SANTIAGO *et al.*, 2013).

A espessa cápsula formada em torno das lesões típicas e à natureza espessa e caseosa do conteúdo contido dentro da cápsula torna a antibioticoterapia um tratamento. Com isso, os antibióticos conseguem eliminar apenas os microrganismos presentes nas lesões superficiais, não atingindo aqueles contidos nas lesões ou em abscessos internos (WILLIAMSON, 2001; BAIRD & FONTAINE, 2007). Uma alternativa à abertura e drenagem para o tratamento de ovinos e caprinos com linfadenite caseosa foi proposta por Washburn *et al.* (2009), onde conseguiram a resolução de lesões de infecção um mês após o tratamento com o uso de tulatromicina e penicilina; entretanto, o uso dessas drogas exige tempo de carência prolongados antes que o leite ou a carne sejam vendidos para consumo humano.

Sendo as terapias com antibióticos ineficazes no tratamento da LC, a excisão cirúrgica associada ao uso de compostos com propriedades antimicrobiana tem apresentado resultados promissores. O uso de uma pomada à base de própolis verde como agente terapêutico para o tratamento pós-cirúrgico da LC em ovinos foi eficiente devido à aceleração da cicatrização da ferida cirúrgica, recuperação capilar, inibição da contaminação da ferida e crescimento bacteriano (KALIL *et al.*, 2019). Santos *et al.* (2019) também verificaram ação notável de uma pomada à base de nanopartículas de prata biogênicas (AgNPs) no tratamento pós-cirúrgico da LC. Os animais tratados com AgNP demonstraram uma cicatrização mais rápida, uma diminuição da contaminação da ferida, nenhum efeito tóxico aparente e uma atividade antimicrobiana significativa de AgNPs sobre os isolados de *C. pseudotuberculosis*.

## 2.7 PREVENÇÃO E CONTROLE

Devido à capacidade do patógeno em persistir no meio ambiente e na dificuldade em detectar os animais com infecção subclínica nos rebanhos, a prevenção tem sido a melhor alternativa, a qual pode ser feita através de inspeções periódicas do rebanho, isolamento dos animais doentes, limpeza das instalações e tratamento e desinfecção de qualquer tipo de ferimento superficial (WILLIAMSON, 2001; COLOM-CADENA *et al.*, 2014; SÁ *et al.*, 2018).

Atualmente, a medida de controle com melhor custo-benefício contra a introdução da LC no plantel seria a imunização. A eficácia da vacina nos rebanhos depende do programa de

vacinação, bem como das recomendações dos fabricantes quanto as doses e reforços anuais (WINDSOR *et al.*, 2011). Vários relatos na literatura mostram diferentes tipos de vacinas oferecendo níveis de proteção variáveis contra LC, com o uso de bactérias atenuadas, mortas, frações contendo antígenos da parede bacteriana, do sobrenadante de cultura bacteriana, mistura de componentes celulares e sobrenadante, proteínas recombinantes e DNA (EGGLETON *et al.*, 1991; ELLIS *et al.*, 1991; FONTAINE *et al.*, 2006; WINDSOR *et al.*, 2011; COLOM-CADENA *et al.*, 2014; MOUSSA *et al.*, 2016; BRUM *et al.*, 2017).

A principal medida de controle atual se baseia em procedimentos de manejo cujo objetivo é evitar a disseminação bacteriana. Todos os instrumentos de uso comunitário devem ser descontaminados com desinfetantes após contato com cada animal. Os galpões, troncos de tosquia e baias de contenção também devem ser desinfetados (WINDSOR *et al.*, 2011). É sugerida a retirada de animais soropositivos e com lesões superficiais do rebanho como medida de controle na fase inicial da infecção e com prevalência inferior a 60% (O'REILLY *et al.*, 2010).

Outras medidas de controle incluem um manejo dos animais durante a tosquia, que deve ser iniciada pelos animais mais jovens e deixando por últimos aqueles com leões palpáveis. As lesões dos animais devem ser desinfetadas. Agentes bactericidas devem ser adicionados à água a ser utilizada no banho dos animais. No caso de caprinos confinados, deve-se evitar equipamentos que constituam possíveis fontes de traumas, como arames. Além disso, deve-se realizar a quarentena dos animais recém adquiridos, mesmo que a antiga propriedade tenha o histórico livre da patologia (AL-GAABARY *et al.*, 2009).

## 2.8 BIOFILME

Um biofilme é um conjunto de células microbianas associadas a uma superfície, envoltas por uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS). Os biofilmes podem se formar em uma ampla variedade de superfícies, incluindo tecidos vivos, dispositivos médicos, tubulações industriais ou de sistemas de água potável ou sistemas aquáticos naturais (DONLAN, 2002; SKNOWNLEY *et al.*, 2004). Dependendo do ambiente em que foi desenvolvido, materiais não celulares, tais como cristais minerais, partículas de corrosão, partículas de argila ou componentes sanguíneos podem ser encontrados na sua matriz (DONLAN, 2002).

A capacidade de formar biofilmes é um atributo universal das bactérias. A maioria das bactérias na natureza não existem de forma independente, mas persistem em comunidades multicelulares organizadas e metabolicamente ativas em superfícies naturais ou artificiais (LOPEZ *et al.*, 2010).

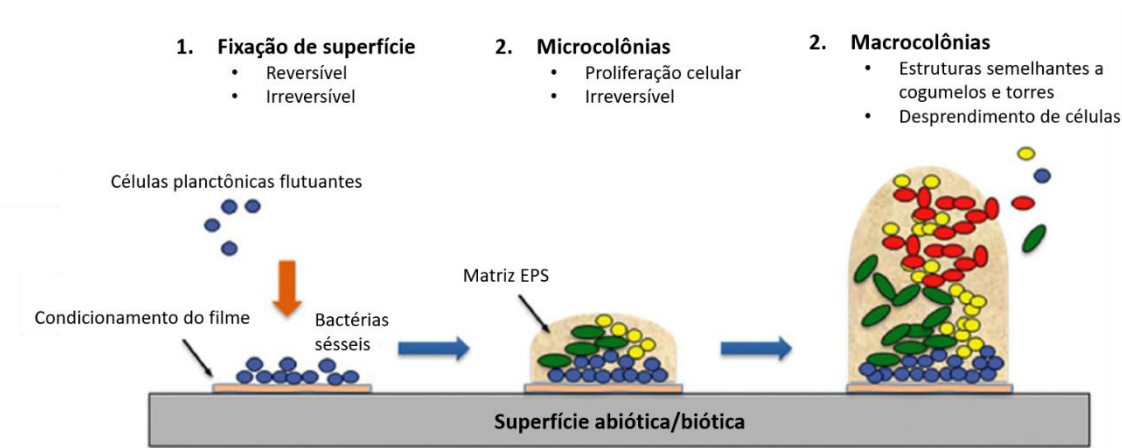
### 2.8.1 Formação do biofilme e *Quorum sensing*

A formação do biofilme bacteriano passou a ser reconhecida como um processo de desenvolvimento complexo, multifacetado e dinâmico (KOSTAKIOTO *et al.*, 2013). A transição do crescimento planctônico para o biofilme envolve diversas etapas em respostas aos fatores ambientais, múltiplas redes regulatórias e tradução de sinais para mudanças combinadas de expressão gênica (RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015).

Segundo Stoodley *et al.* (2002), os estágios envolvidos no desenvolvimento do biofilme incluem (I) a fixação reversível da bactéria a uma superfície; (II) fixação irreversível mediada pela formação de material exopolimérico; (III) formação de microcolônias e início da maturação do biofilme; (IV) formação de biofilme maduro com estrutura tridimensional contendo células acondicionadas em cachos com canais de água, permitindo o transporte de nutrientes e a remoção de resíduos; e (V) descolamento e dispersão das células do biofilme e início da formação de novo biofilme (as células dispersas são mais semelhantes às células planctônicas do que às células maduras do biofilme). Uma representação simplificada desse processo pode ser encontrada na **Figura 2**.

Dentro da comunidade bacteriana, as células se comunicam entre si por meio de comunicação baseada em sinais químicos conhecido como *quorum sensing* (QS). O papel do QS é modular as funções celulares, patogênese baseada na densidade populacional, aquisição de nutrientes, transferência de material genético entre as células, motilidade e síntese de metabólitos secundários e a sincronização da expressão diferencial de genes para regular as características de virulência e formação de biofilme (PREDA *et al.*, 2019; MUNIR *et al.*, 2020).

**Figura 2. Representação esquemática das distintas etapas da formação de biofilme bacteriano.**

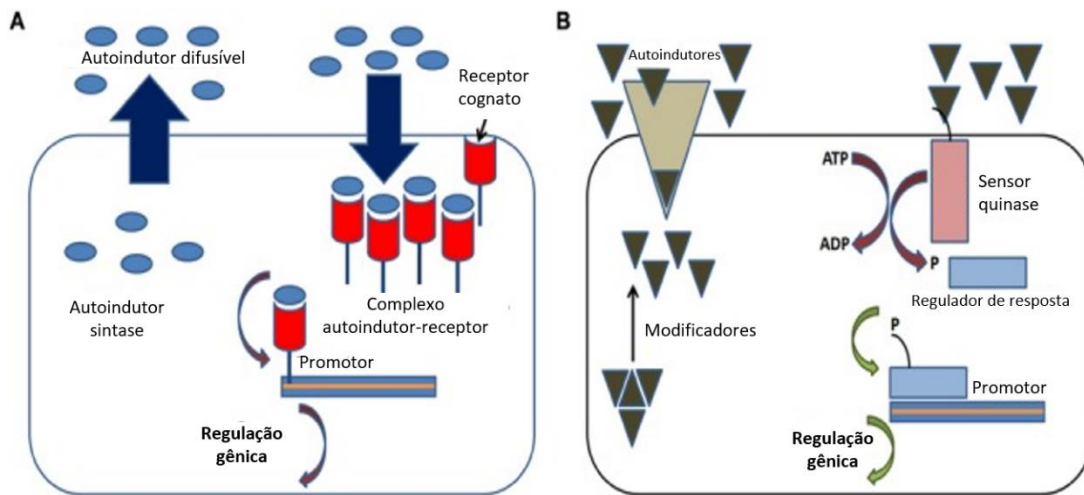


Fonte: DUFOUR *et al.* (2012)

Esse sistema de sinalização depende da capacidade dessas bactérias de sintetizarem pequenas moléculas sinalizadoras intracelularmente, que são passivamente ou ativamente trocadas com o ambiente circundante. O acúmulo de moléculas de sinais é compatível com o aumento da população bacteriana e, quando a densidade bacteriana excede um limite de “quorção”, os níveis correspondentes de sinais podem induzir uma resposta sincronizada na expressão gênica em toda a população (LI & NAIR, 2012). Essas moléculas de sinais são chamadas de autoindutores, e desencadeiam o processo QS ao se ligar a receptores cognatos, que por sua vez regulam a transcrição de muitos genes que estão envolvidos no comportamento dependente de densidade celular (**Figura 3**) (LI & NAIR, 2012). Esses processos são importantes para os biofilmes e em diversos tipos de infecções e doenças, controlando a expressão do gene de virulência, processos fisiológicos celulares ou a aderência microbiana e a formação de biofilme (PREDA *et al.*, 2019)



**Figura 3 - Esquema dos sistemas de detecção de quorum em bactérias Gram-negativas (A) e bactérias Gram-positivas (B).**



Fonte: POLKADE *et al.*, 2016

### 2.8.2 Componentes estruturais

Todos os biofilmes contêm uma matriz extracelular que mantém as células unidas. A natureza do exopolissacarídeo da matriz é variável e depende das condições de crescimento, meio e substrato. Geralmente, a matriz é composta por um biopolímero de polissacarídeo associado com outros componentes, tais como DNA ou proteínas (LOPEZ *et al.*, 2010).

Até o momento, os estudos sobre a composição do biofilme de *C. pseudotuberculosis* são escassos. Em uma abordagem proteômica para avaliar as diferenças entre o proteoma das cepas CAPJ4 (cepa formadora de biofilme) e CAP3W (cepa não formadora de biofilme), Sá *et al.* (2021) observaram que a expressão das proteínas Trehalose corinomicolil transferase B, N-Acetimuramil-L-Alanina Amidase (CwlM) e D-alanil-D-alanina carboxipeptidase em CAPJ4 está associada a componentes da parede celular. Segundo Bucher *et al.* (2015), a formação de uma parede celular bacteriana é necessária para a formação do biofilme bacteriano e interferências na parede celular pode prejudicar a formação do biofilme em bactérias Gram-positivas.

O primeiro estudo para demonstrar a composição bioquímica de biofilme de *C. pseudotuberculosis* usando espectroscopia Raman foi realizado por Yacoob *et al.* (2020).

Este estudo mostrou a presença de picos espectrais Raman associados a grupos de proteínas, que desempenham papéis cruciais na fixação inicial à superfície, estabilização da matriz do biofilme desenvolvimento de arquiteturas de biofilme tridimensionais. Os picos espectrais Raman em  $668\text{ cm}^{-1}$  (CN + (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> str., Lipídios) e  $1650\text{ cm}^{-1}$  (C=C e C=O, lipídios) foram encontrados no biofilme, indicando que os lipídios estão presentes na membrana plasmática e na matriz extracelular. Por fim, picos espectrais Raman associados ao grupo de carboidratos ( $1400\text{ cm}^{-1}$ ,  $1450\text{ cm}^{-1}$ ,  $1650\text{ cm}^{-1}$  e  $1725\text{ cm}^{-1}$ ) foram identificados e podem representar componentes importantes da matriz extracelular do biofilme bacteriano.

Outros estudos com *Corynebacterium* spp têm sido concentrados na formação de biofilme em superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas e na influência do fibrinogênio plasmático humano (FBG) na formação do biofilme. O estudo realizado Souza *et al.* (2015) demonstrou a capacidade que diversos isolados de *C. striatum* possuem em aderir a várias superfícies abióticas e formar biofilmes em um modelo de cateter *in vitro*. As cepas multirresistentes (MDR) e susceptíveis a múltiplas drogas (MDS) de *C. striatum* foram capazes de aderir em diferentes níveis a superfícies de plástico carregadas negativamente (poliestireno) e positivamente carregadas (vidro).

De acordo com os estudos realizados por Mattos-Guaraldi & Formiga (1991), Mattos-Guaraldi *et al.* (1999) e Gomes *et al.* (2013), as superfícies celulares carregadas negativamente de *C. striatum* e sua aderência ao cateter de poliuretano podem ser parcialmente explicadas pela carga elétrica positiva associada a este polímero. Além disso, as substâncias amorfas depositadas ou glicocálice observadas em torno das microcolônias de *C. striatum* nas superfícies dos cateteres de poliuretano sugerem que esta bactéria pode produzir ou atrair substâncias que fortalecem sua fixação a superfícies inertes *in vitro*.

Vários microrganismos utilizam proteínas da matriz extracelular, tais como o fibrinogênio, para aumentar sua capacidade de interagir com diferentes células e superfícies abióticas. Souza *et al.* (2015) observaram a produção de biofilme de *C. pseudodiphtheriticum* em filmes condicionantes de fibrinogênio e fibronectina. Quando comparadas com a formação de biofilme em superfícies de poliestireno não revestido, as superfícies revestidas com fibrinogênio e/ou fibronectina aumentaram a formação de biofilme.

Proteínas exógenas de mamíferos podem estimular a formação de biofilme bacteriano (AKIYAMA *et al.* 1997; BONIFAIT *et al.* 2008). A fibronectina solúvel no plasma interage com várias bactérias e a fibronectina da superfície celular pode servir como um receptor na

aderência de bactérias às células epiteliais hospedeiras (HYNES, 1990). Schwarz-Linek *et al.* (2003) demonstraram que as proteínas de ligação a fibronectina (FnBPs) medeiam não apenas a adesão bacteriana às células hospedeiras, mas também a absorção de bactérias pelas células e a formação de biofilme. Em cepas de *Streptococcus suis*, a propriedade de ligação de fibrinogênio permitiu que as bactérias se ligassem umas às outras por meio de pontes cruzadas mediadas pelo fibrinogênio (BONIFAIT *et al.* 2008) e contribuiu para a produção de biofilme.

## 2.9 NANOTECNOLOGIA

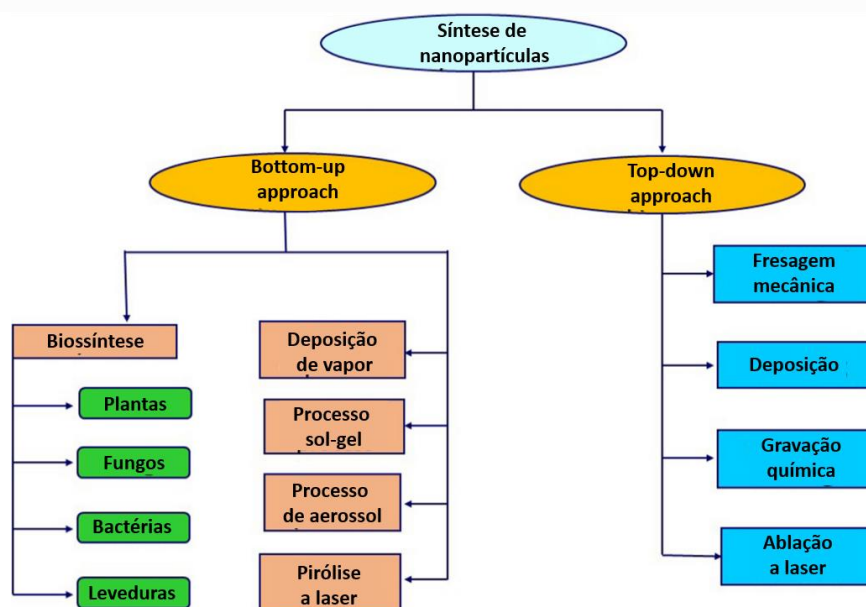
A nanotecnologia é uma área emergente da ciência que envolve a engenharia de partículas nanométricas utilizando vários métodos físicos e químicos (KHARE *et al.*, 2014). A National Nanotechnology Initiative (NNI, 2010) define a nanotecnologia como (i) o desenvolvimento de tecnologia nos níveis atômico, molecular ou macromolecular, na escala de comprimento de 1–100 nm; (ii) criação e uso de estruturas, dispositivos e sistemas que possuem novas propriedades e funções devido ao seu tamanho pequeno e/ou intermediário; e (iii) capacidade de controlar ou manipular na escala atômica/molecular.

A pesquisa e o desenvolvimento da nanotecnologia são muito ativas no mundo todo, e a nanotecnologia já é usada em centenas de produtos, incluindo protetores solares, cosméticos, têxteis e equipamentos esportivos (BAYRAM *et al.*, 2015; MARSLIN *et al.*, 2015; RAMOS *et al.*, 2017; THIRUVENGADAM *et al.*, 2018; PALADINI & POLLINI, 2019). A nanotecnologia também está sendo desenvolvida para melhora na biodistribuição de drogas, desenvolvimento de biossensores e outras aplicações biomédicas (SAINI *et al.*, 2010). Além disso, a nanotecnologia também está sendo aplicada para uso ambiental, como na limpeza de poluentes (KHARE & MOHAPATRA, 2009).

### 2.9.1 Síntese nanopartículas (NPs)

Existem diferentes métodos para a síntese de nanopartículas e esses métodos são divididos em duas classes principais: a abordagem de cima para baixo (“top-down”) e a abordagem de baixo para cima (“bottom-up”). Uma representação desses processos pode ser encontrada na **Figura 4**.

**Figura 4 - Síntese de nanopartículas por meio de abordagens biológicas e físico-químicas**



Fonte: JADOUN *et al.*, 2020

Na abordagem *top-down* o método destrutivo é utilizado. Os materiais se decompõem em partículas menores e, em seguida, essas partículas menores se transformam em nanopartículas. O método de decomposição térmica, a moagem, o método litográfico, a ablação a laser e outras metodologias destrutivas são exemplos de síntese *Top-down* (IJAZ *et al.*, 2020). A abordagem *bottom-up* envolve a geração de nanopartículas a partir de pequenas unidades, como moléculas e átomos. Neste método, a segregação controlada de átomos ou moléculas ocorre conforme eles são montados nas nanoestruturas desejadas, com intervalo de tamanho de 2 a 10 nm. O método do arco de plasma, processo de deposição de vapor químico, decomposição orgânica de metal, pirólise a laser, método de solgel, síntese úmida e processos de automontagem são alguns métodos *bottom-up* (KUMAR *et al.*, 2017).

A síntese verde de nanopartículas é mais ecológica e representa um avanço em relação a outros métodos porque é simples, econômica, relativamente reproduzível, resulta em materiais mais estáveis e não há necessidade de alta pressão, energia, temperatura ou produtos químicos tóxicos (DEVATHA & THALLA, 2018). Esta síntese pode ser realizada com fungos (GUILGER-CASAGRANDE & LIMA, 2019), algas (KHANNA *et al.*, 2019), bactérias (IRAVANI, 2014) e plantas (NARAYANAN e SAKTHIVEL, 2011). Algumas partes de plantas, como folhas, frutos, caule, sementes e raízes têm sido utilizadas para a síntese de nanopartículas devido à presença de fitoquímicos em seus extratos, os quais atuam como agentes estabilizadores e redutores (KUPPUSAMY *et al.*, 2016).

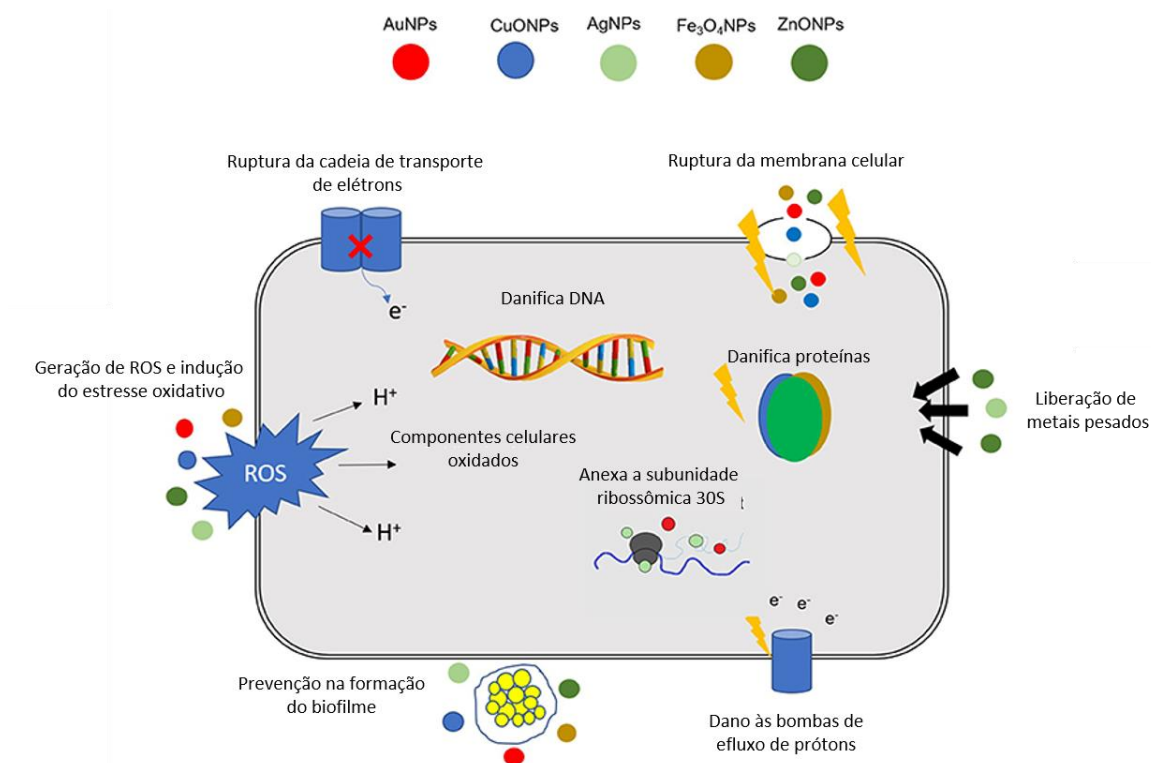
### 2.9.2 Atividade antimicrobiana de Nanopartículas (NP)

O surgimento gradual de populações de bactérias resistentes a antibióticos, resultante do uso indevido e abuso total de antibióticos, tornou-se hoje um grande problema de saúde pública de proporções globais (REYGAERT, 2018). Devido à resistência aos antibióticos convencionais e aumento das infecções bacterianas, que são uma das principais causas de infecções crônicas e mortalidade, as nanopartículas têm recebido atenção crescente por seus potenciais efeitos e aplicações antimicrobianas (WANG *et al.*, 2017). Os mecanismos de resistência incluem a expressão de enzimas que modificam ou degradam antibióticos, como  $\beta$ -lactamases e aminoglicosídeos, modificação de componentes celulares, como da parede celular na resistência à vancomicina ou mesmo de ribossomos na resistência à tetraciclina, ou a expressão de bombas de efluxo, que fornecem resistência simultânea contra vários antibióticos (MUNITA & ARIAS, 2016).

Nanopartículas possuem atividade antimicrobiana que pode superar mecanismos de resistência comuns, incluindo inativação de enzimas, diminuição da permeabilidade celular e aumento de efluxo por meio da super expressão de bombas de efluxo, para escapar da atividade antibacteriana de agentes antimicrobianos (SEIL & WEBSTER, 2012) (**Figura 5**). Além disso, NPs conjugadas com antibióticos mostram efeitos sinérgicos contra bactérias, inibem a formação de biofilme e têm sido utilizadas para combater patógenos multirresistentes (PELGRIFF E FRIEDMAN, 2013; BAPTISTA *et al.*, 2018).

Diversas características das NPs as tornam alternativas aos antibióticos tradicionais. A grande proporção entre a área de superfície e o volume dos NPs aumenta a área de contato com os organismos-alvo. NPs podem atuar em nanoescala, interagindo com células bacterianas, regulando a penetração da membrana celular e interferindo nas vias moleculares (VARIER *et al.*, 2019).

**Figura 5 - Diferentes mecanismos de ação das NPS nas células bacterianas.**



A destruição e a interferência na formação do biofilme são outros mecanismos significativos das nanopartículas, pois retratam uma medida importante no progresso da resistência bacteriana (MARKOWSKA *et al.*, 2013; MU *et al.*, 2016). A atividade antibiofilme de nanopartículas de prata (AgNPs) foi demonstrada em vários estudos. Siddique *et al.* (2020) observaram que a produção de substância polimérica extracelular diminuiu após o tratamento com AgNP, enquanto o vazamento de proteína celular aumentou devido a taxas mais elevadas de ruptura da membrana celular por AgNPs. A porcentagem de inibição do biofilme foi de 64% para *Klebsiella pneumoniae* cepa MF953600 e 86% para a cepa MF953599 com AgNP na concentração de 100  $\mu\text{g/ml}$ .

A ação antimicrobiana de AgNPs sintetizadas a partir de extratos extracelulares de *Phanerochaete chrysosporium* (PchNPs) diminuiu significativamente o teor de ácidos graxos de *Escherichia coli*, o que sugere uma perda da integridade da membrana. Além disso, NPs biogênicas exibiram atividade de interrupção do biofilme e erradicação de biofilmes de *E. coli* e *Candida albicans* em uma concentração de  $3,0 \times 10^{-2}$  nM (ESTEVEZ *et al.*, 2020).

Singh *et al.* (2018) investigaram a produção e ação antibacteriana de nanopartículas obtidas a partir de extratos de rizoma de *Rhodiola rosea* contra *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli* no intervalo de concentração de 1,6 – 200 µg/ml. As nanopartículas inibiram a formação de biofilme em *P. aeruginosa* e *E. coli* em concentrações menores do que a concentração inibitória mínima (MIC). A inibição significativa na formação de biofilme observada foi de 6,25 µg/ml para AgNPs e 12,5 µg/ml para AuNPs. Esses resultados sugerem que o uso de extratos de rizoma da planta medicinal *R. rosea* representa uma alternativa viável para a produção de nanopartículas verdes com efeitos anti-biofilme.

### 2.9.3 Ação das AgNPS

As nanopartículas de prata (AgNPs) estão emergindo como as principais nanopartículas devido à sua propriedade antimicrobiana única. Essas nanopartículas são eficazes contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo várias bactérias multirresistentes (ARYA *et al.*, 2019).

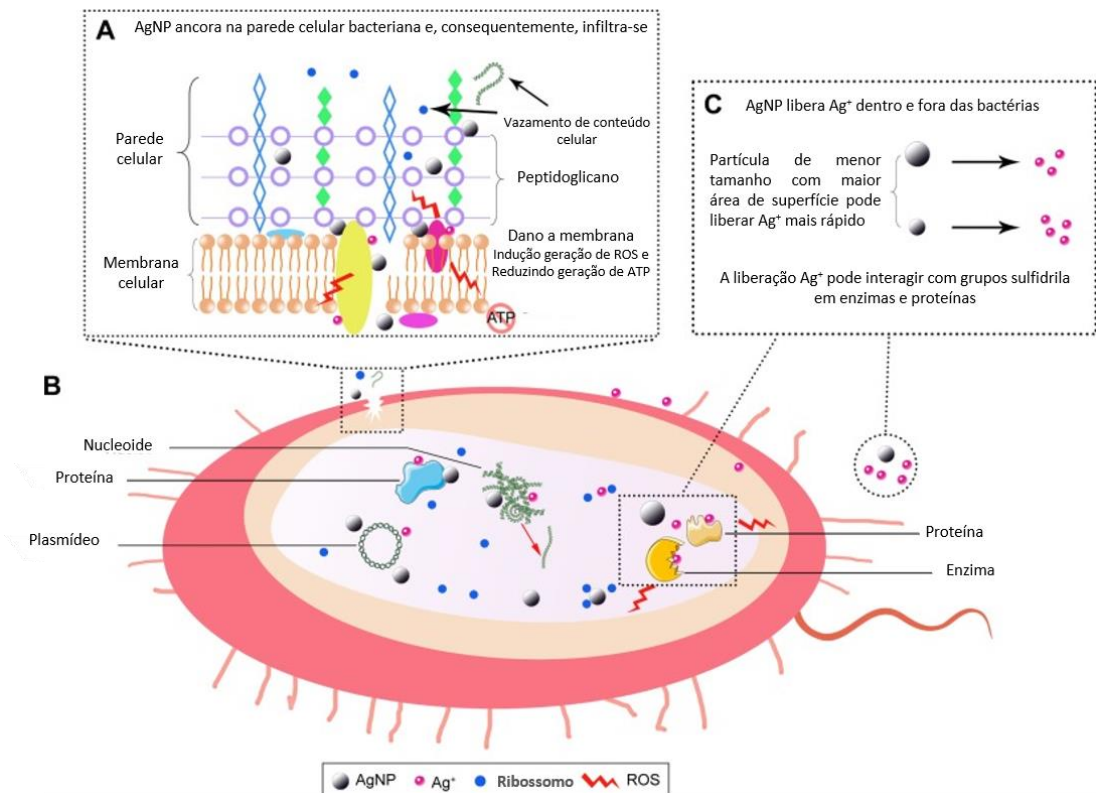
AgNPs podem se ancorar na parede celular bacteriana e, conseqüentemente, infiltrar-se nela (**Figura 6A**). Essa ação causará alterações físicas na membrana bacteriana, como o dano à membrana, que pode levar ao vazamento do conteúdo celular e morte bacteriana (SEONG & LEE, 2017).

A atividade antibacteriana das AgNPs em bactérias Gram-negativas é mais evidente do que em bactérias Gram-positivas. Essa diferença pode ser explicada pelas características estruturais da parede celular de bactérias Gram-positivas (30 nm) e bactérias Gram-negativas (3-4 nm), as quais são compostas principalmente por peptidoglicano (CHATTERJEE *et al.*, 2015).

A atividade antibacteriana pode ser aumentada alterando a carga superficial de AgNPs para alcançar uma força de atração mais forte (**Figura 6C**). Diferenças nos valores de potencial zeta entre as bactérias e AgNPs pode desencadear uma melhor internalização das partículas. A carga positiva confere atração eletrostática entre as AgNPs e carrega negativamente a membrana celular dos microrganismos, facilitando assim a fixação de AgNPs nas membranas celulares (ABBASZADEGAN *et al.*, 2015; MANDAL *et al.*, 2015). AgNPs podem causar a

morte bacteriana pela produção de altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies de radicais livres (**Figura 6B**), tais como peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, radical hidroxila, ácido hipocloroso e oxigênio (QUINTEROS *et al.*, 2016).

**Figura 6 - Mecanismos antibacterianos de AgNPs.**



FONTE: QING *et al.*, 2018

AgNPs menores possuem uma maior área de superfície em contato com as células bacterianas e podem atingir o citoplasma com mais frequência do que as nanopartículas maiores (**Figura 6B**). No citoplasma, podem interagir com proteínas, lipídios e DNA levando à disfunção bacteriana e morte. A interação do AgNP com os ribossomos leva à sua desnaturação, causando a inibição da tradução e da síntese de proteínas (QING *et al.*, 2018).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade inibitória e bactericida de nanopartículas de prata e de extratos de própolis obtidos por diferentes metodologias sobre *C. pseudotuberculosis*, bem como suas capacidades de inibição de formação de biofilme e ruptura de biofilme formado.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a formação de biofilme em cepas referências e isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis*;
- b) Determinar a atividade antibiofilme de extrato etanólico de própolis verde, extrato supercrítico de própolis vermelha e nanopartículas de prata em biofilmes consolidados de *C. pseudotuberculosis*;
- c) Avaliar a capacidade de interferência de extrato etanólico de própolis verde, extrato supercrítico de própolis vermelha e nanopartículas de prata na formação de biofilme por *C. pseudotuberculosis*;
- d) Avaliar a morfologia e ação antibiofilme de nanopartículas de prata através da microscopia eletrônica de varredura.

#### **4 HIPÓTESE**

Extratos de própolis e nanopartículas de prata biogênicas tem atividade de inibição de formação e disrupção de biofilmes de *C. pseudotuberculosis*.

## **CAPÍTULO 1**

**Propolis: types, composition, biological activities, and  
veterinary product patent prospecting**

**Artigo submetido ao Journal of the Science of Food and  
Agriculture**

**(QUALIS CAPES A2, Fator de Impacto JCR 2.463)**

**doi 10.1002/jsfa.10024**

# Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting

Laerte M Santos,<sup>a</sup> Máisa S Fonseca,<sup>b</sup> Ana R Sokolonski,<sup>b</sup>  
 Kathleen R Deegan,<sup>c</sup> Roberto PC Araújo,<sup>b</sup> Marcelo A Umsza-Guez,<sup>d</sup>  
 Josiane DV Barbosa,<sup>e</sup> Ricardo D Portela<sup>a\*</sup> and Bruna AS Machado<sup>e</sup>

## Abstract

Propolis is a resinous substance composed of a mixture of different plant parts and molecules secreted by bees. Chemically, it is defined as a complex matrix containing biologically active molecules with antibacterial, antifungal, antiviral, antiparasitic, hepatoprotective, and immunomodulatory activities. It is widely employed in cosmetic formulations and pharmaceutical products and is one of the most widely used natural products. However, the effects and strength of these biological activities depend on the chemical profile and composition of each propolis type. This composition is associated with the diversity of local flora, the place and period of collection, and the genetics of the bees. In this context, the objective of this review was to investigate the biological, chemical, and microbiological properties of propolis. A technological prospectation was also performed on patents for products designed to be used in animal health. Our investigation shows that the literature contains diverse studies dedicated to comparing and describing the composition and therapeutic properties of propolis. These studies demonstrate the potential biological use of propolis in veterinary medicine, showing the applications of propolis extracts in different formulations. However, there are a low number of propolis-based veterinary products with a registered patent. Thus, the development of products based on propolis is a promising market to be exploited.

© 2019 Society of Chemical Industry

**Keywords:** *Apis mellifera*; antimicrobial drugs; propolis; intellectual property; patent prospectation; phytotherapeutics

## INTRODUCTION

The global market for plant-derived products is estimated to be US\$83 billion per year and is an expanding field.<sup>1</sup> The World Health Organization<sup>1</sup> estimates that between 70% and 95% of the developing countries population use natural products as a therapeutic alternative. The development of new products from natural origins is encouraged as only 15% of approximately 300 000 plant species around the world have had their pharmacological potential evaluated.<sup>2</sup> Most commercial medical compounds are derived from plant species, and research in this area shows enormous potential for the discovery of new compounds.<sup>3</sup>

Propolis is a balsamic and resinous product with a complex and variable chemical composition, and it is considered to be a matrix with high biotechnological potential. Various studies have shown different biological properties of propolis extracts, such as antioxidant,<sup>4</sup> antimicrobial,<sup>5</sup> antiviral,<sup>6</sup> antiparasitic,<sup>7</sup> antitumor,<sup>8</sup> immunomodulatory,<sup>9</sup> anti-inflammatory,<sup>10</sup> and hepatoprotective properties.<sup>11</sup> This range of biological properties suggests its potential for its application in the development of products for use in human and animal health.<sup>12,13</sup>

Brazilian propolis is highly valued in the international market due to its beneficial effects on health and it is increasingly gaining commercial importance.<sup>14,15</sup> Several researchers have already

investigated the chemical composition and biological properties of different kinds of propolis. In this context, this review identifies recent studies assessing the use, biotechnological potential, and benefits of propolis in veterinary medicine and describes the main potential markets and technological evolution of propolis-based products by carrying out a prospective study on patent databases.

\* Correspondence to: RD Portela, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador 40110-100, BA, Brazil.  
 E-mail: rportela@ufba.br

a Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

b Programa de Pós-graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

c Serviço de Animais Silvestres, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

d Departamento de Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

e Instituto de Tecnologias da Saúde, Centro Universitário SENAI CIMATEC, Salvador, Brazil

## METHODOLOGICAL ASPECTS

Information gathering was performed from scientific papers and the patent data bank. Scientific papers and patents related to propolis and veterinary medicine were selected, and the information was organized in a text and tables format. Patents were analyzed using the following criteria: application area, filing date, and country of origin.

### Database search for scientific reports

Scientific report searches were performed using the following databases: Science Direct, Wiley Online Library, PLOS One, and Scientific Electronic Library Online (SciELO), using a keyword combination covering the proposed theme of this review (propolis, veterinary medicine, animal health, animal model, fungi, bacteria, neoplasia, antioxidant, wound healing, and inflammation). Papers with descriptions of the biological properties and chemical composition of propolis extracts, or that demonstrated some potential application in veterinary medicine products were included in this review.

### Database search for patent data

The search for patent documents of products containing propolis or its formulation was performed using the Thomson Innovation® tool through the 'Smart Search-Topic®' option. The keywords used to filter documents in the databases were propolis, animals, formulations, veterinary, cytotoxic, antimicrobial, activity, antioxidant, pharmaceutical, therapeutic, and medicine. The search was limited to the presence of the listed keywords in the titles and / or abstracts of the documents from the selected databases.

Graphical images were obtained using the Thomson Innovation® platform. Data gathering was performed in September 2018. The World Intellectual Property Organization (WIPO) determines whether patent applications, in general, are published 18 months after the filing date. Thus, the patents accessed in this study had documents submitted 18 months before September 2018.

Analysis of the patent documents was performed by separating documents by year of deposit, inventors and applicants, country of origin, and the Patent Cooperation Treaty (PCT) code. The PCT is part of the International Patent System and helps applicants obtain international protection for their inventions.<sup>16</sup> In this review, the term 'patent document' includes both submitted and granted patents. The relevant information found in each document was extracted and discussed in this review.

## PROPOLIS

### Definition and historic use of propolis

Propolis is a resinous substance that has a waxy aspect and is produced by bees (*Apis mellifera*) using different plant exudates.<sup>17</sup> Propolis production begins with bees breaking off parts of plants with their mandibles to obtain the plant resin. After this, bees manipulate this resin with their forelegs and pack it in the hind legs.<sup>18</sup> Once in the hive, the resin is mixed with bees' saliva and is partially hydrolyzed by its enzymes.<sup>19–21</sup> Propolis is then cemented in the hives and mixed with beeswax.<sup>18</sup> This complex compound is then used by bees to protect them against other insects and microorganisms and to repair hives.<sup>22</sup> Indeed, the word propolis originates from Greek ('pro' – 'in front' or 'in the entrance', and 'polis' – 'community' or 'city'), in reference to its main function in hive protection.<sup>23,24</sup> Because of this process, raw propolis consists

of 50% to 60% resins and balsams, 30% to 40% of beeswax, and 5% to 10% of essential oils.<sup>23,25–28</sup>

For centuries, humanity has noted the production of propolis by bees and has learned to use this resinous substance.<sup>29</sup> Egyptians, Greeks, and Romans reported the biological properties of propolis for lesion healing and corpse embalming.<sup>30</sup> Aristotle, Pliny, and Galen described some of the medicinal properties of propolis and its use as an antiseptic and wound-healing agent. In the medieval period, propolis was mainly used by Arabian physicians. New World civilizations, such as the Incas, used propolis as an antipyretic. Since the 18th century, the London pharmacopeia has listed propolis as an official drug. Between, the 17th and 20th centuries, propolis became very popular in Europe due to its antibacterial activity. During the Second World War, propolis was used as an antimicrobial and anti-inflammatory agent.<sup>19,31,32</sup>

This resinous matrix is actually used in cosmetics, food, and pharmaceutical product formulations, and it is one of the more widely known and used natural products.<sup>33,34</sup> Propolis can be found in capsules, mouthwash, lotions, throat pastilles, and in wax-free products to improve manipulation and use.<sup>35</sup>

Recently, considering the veterinary medicine field, propolis has been used in many different applications, such as a cicatrizing promoter in horses<sup>36</sup> and dogs,<sup>37</sup> to enhance the total digestibility of dry matter in dairy cows' rumen,<sup>38</sup> to inhibit the growth of buffalo rumen's ciliate protozoas,<sup>39,40</sup> to increase milk quality of cows as a food supplementation,<sup>41,42</sup> and to protect mammary bovine epithelial cells against pathogens.<sup>43</sup> This varied list of propolis applications supports its classification as a functional food, not only for humans but also for animals, and justifies its high commercial value.

### Propolis types

In Brazil, 14 types of propolis are described and classified according to their botanic origin, physical–chemical properties, and geographic localization.<sup>44–46</sup> The main botanic source of green propolis is *Baccharis dracunculifolia* DC, popularly known as 'wild rosemary', a plant from the Asteraceae family. *Apis mellifera* africanized bees are described as capable of fragmenting and manipulating sprouts and leaves of wild rosemary, obtaining a green resinous substance as the final product.<sup>47</sup>

Brown propolis is found in several Brazilian and Cuban regions.<sup>48–52</sup> Its botanic source is highly variable, originating from *Luehea* sp. (Malvaceae), *Piptadenia falcate* Benth (Fabaceae), *Tabebuia* spp. (Bignoniaceae), *Tabebuia caraiba* (Mart.) Bureau (Bignoniaceae), *Vernonia* spp. (Asteraceae), and *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae).<sup>53</sup>

Red propolis was recently discovered in northeastern Brazil and has also been reported in Cuba,<sup>54,55</sup> Mexico,<sup>56</sup> China,<sup>57</sup> and Venezuela.<sup>58</sup> Bees collect red resinous exudates at the surface and the branch orifice of *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Fabaceae). Red propolis is found in bee hives localized in evergreen and woody shrubs near the sea shore and river banks in Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, and Paraíba Brazilian states.<sup>45</sup> Another colored propolis type, yellow propolis, is found in Brazil.<sup>44,48</sup> Cuban yellow propolis was classified according to its secondary metabolites.<sup>59</sup>

The high diversity of propolis types found in Brazil has resulted in a large number of scientific reports written by Brazilian researchers on the composition and biological activities of propolis, as will be seen throughout this review. Therefore, it is expected that the easier access that Brazilian researchers have to different propolis



**Table 1.** Some phenolic compounds found in different propolis types and their main associated biological activities

Molecule	Propolis type	Geographical origin	Biological action	Reference
1,1-dimethylallylcaffeate (DMAC)	EEP	Italy	Antioxidant	75
2,2-dimethyl-6-carboxyethenyl-2H-1-benzopyran	EEP	Brazil	Anti-trypanosomal	76
3-(4-hydroxy-3-(oxo-butenyl)-phenylacrylic acid			Antibacterial	
3,5-diphenyl-4-hydroxycinnamic acid derivative 4			Antibacterial	
p-Coumaric acid	EEP	Brazil	Anti-trypanosomal	76
			Anticancer	77
	EE-GP; Dichloromethane-Fr	Brazil	Antifungal	69
Artepillin C	MEP	Brazil	Antioxidant	78
Caffeic acid	EEP	Brazil	Antibacterial	76
			Anti-trypanosomal	
			Anticancer	77
	EE-GP; Dichloromethane-Fr		Antifungal	69
	EEP	Italy	Antioxidant	75
Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)	EEP	Italy	Antioxidant	75
	MEP	Mexico	Anti- <i>Giardia lamblia</i>	79
	EE-GP; Dichloromethane-Fr	Brazil	Antifungal	69
Dicaffeoylquinic acid 3	EEP	Brazil	Anti-trypanosomal	76
			Antibacterial	
Dihydrocinnamic acid	EEP	Brazil	Anticancer	77
Ferulic acid	EE-GP; Dichloromethane-Fr	Brazil	Antifungal	69
Isoliquiritigenin	EE-RP	Brazil	Antifungal	69
Monocaffeoylquinic acid 2	EEP	Brazil	Antibacterial	77

EE, ethanolic extract; EEP, ethanolic extract of propolis; GP, green propolis; MEP, methanolic extract of propolis; RP, red propolis.

**Table 2.** Some flavonoids found in different propolis types and their main associated biological activities

Molecule	Propolis type	Geographical origin	Biological action	Reference
Apigenin	EEP	Italy	Antioxidant	75
Chrysin	EEP	Italy	Antioxidant	75
Formononetin	EE-RP	Brazil	Antifungal	69
				80
Hesperetin	MEP	Mexico	Anti- <i>Giardia lamblia</i>	79
Kaempferol	EEP	Italy	Antioxidant	75
	EE-GP; Dichloromethane-Fr	Brazil	Antifungal	69
Medicarpin	EE-RP; Hex-Fr	Brazil	Antifungal	69
Naringenin	EEP	Italy	Antioxidant	75
	MEP	Mexico	Anti- <i>Giardia lamblia</i>	79
Neovestiol	EE-RP	Brazil	Antibacterial	81
			Anti-inflammatory	
Pinocembrin	EEP	Italy	Antioxidant	75
	MEP	Mexico	Anti- <i>Giardia lamblia</i>	79
Quercetin	EEP	Italy	Antioxidant	75
	EE-GP; Dichloromethane-Fr	Brazil	Antifungal	69
Vestitol	EE-RP	Brazil	Antibacterial	81
			Anti-inflammatory	
			Antifungal	69

EE, ethanolic extract; EEP, ethanolic extract of propolis; GP, green propolis; MEP, methanolic extract of propolis; Hex-Fr, hexane fraction; RP, red propolis.

extract sources may result in various propolis-related scientific articles and patent applications.

### Chemical composition

As propolis is a complex mixture of different molecules, the chemical analysis of propolis is difficult. Moreover, its composition varies

within the flora of each region and according to the time of the year when the collection is made, and it also depends on the bee's genetic background.<sup>33,60</sup> For example, it was observed that Brazilian propolis from different regions has different amounts of total flavonoids and phenolic compounds.<sup>48</sup> An analysis of the phenolic and flavonolic content in different propolis extracts collected

**Table 3.** Some molecules from xanthone and terpenoid classes found in different propolis types and their main associated biological activities

Molecule	Propolis type	Geographical origin	Biological action	Reference
<b>Xanthenes</b>				
1,3,7-trihydroxy-2,8-di-(3-methylbut-2-enyl) xanthone	EEP	Nigeria	Anti-trypanosomal	82
1,3,7-trihydroxy-4,8-di-(3-methylbut-2-enyl) xanthone				
1,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)-3-(methylbut-2-enyloxy) xanthone				
<b>Terpenoids</b>				
$\alpha$ -amyrin	EEP	Nigeria	Anti-trypanosomal	82
$\beta$ -amyrin trimethylsilyl ether	EE-RP; Hex-Fr	Brazil	Antifungal	69
Ambonic acid	EEP	Nigeria	Anti-trypanosomal	82
Lup-20(29)-En-3-Yl acetate	EE-RP; Hex-Fr	Brazil	Antifungal	69
Mangiferonic acid	EEP	Nigeria	Anti-trypanosomal	82

EE, ethanolic extract; EEP, ethanolic extract of propolis; Hex-Fr, hexane fraction; RP, red propolis.

from East European countries also demonstrated a variation in the concentration of these molecules.<sup>27</sup>

Studies on propolis are focused on aqueous and ethanolic extracts because they are widely used in therapeutic applications.<sup>61</sup> In general, the propolis content includes 55% resins and balsams, 30% wax, and 10% pollen.<sup>62,63</sup> Propolis is considered to comprise some of the most heterogeneous natural substances, and it has already been identified and / or characterized to be composed of more than 300 molecules.<sup>33</sup> From these 300 components, it the presence of fatty and phenolic acids, esters, phenolic esters, flavonoids, terpenes,  $\beta$ -steroids, aromatic aldehydes and alcohols, sesquiterpenes, and naphthalene has already been identified.<sup>24,30,64</sup>

Green and red propolis are the most studied types of propolis and present some differences in their chemical profiles. In green propolis,<sup>11</sup> phenolic compounds, such as *p*-coumaric acid, phenilic acid, caffeic acid, kaempferol, quercetin, and artepillin C, were identified.<sup>65,66</sup> Green propolis contains sesquiterpenes as its predominant components and it is a compound of high interest due to its cytotoxic properties.<sup>33</sup> Artepillin C or 3,5-diprenil-4-hydroxycinnamic (DHCA) was first isolated<sup>67</sup> from green propolis extracts and presents antimicrobial, anticancer, and antioxidant activities.<sup>68</sup> Fourteen phenolic compounds have been described in red propolis, such as isoflavanoids, medicarpin, vestitol, formononetin, isoliquiritigenin,<sup>69</sup> and benzophenones.<sup>70,71</sup> Recent studies on red propolis have reported the presence of vitexin and luteolin in its composition.<sup>72</sup>

Brown propolis presents several phenolic compounds, such as nemosone, a polyisoprenylated benzophenone found in the resin of *Clusia rosea* (Clusiaceae) flowers. Another compound found in brown propolis, chlorogenic acid, indicates the use of *Citrus* (Rutaceae) plants in brown propolis production.<sup>64</sup> Acetophenones and diterpenes have also been identified in brown propolis, which is found in the *Araucaria* genus (Araucariaceae).<sup>23</sup>

Regarding yellow propolis, few studies assessing the chemical composition of this propolis have been performed. Cuban yellow propolis is rich in triterpenic alcohols, polimetoxilated flavonoids, lanosterol, germanicol, lupeol, and cycloartenol according to a qualitative and quantitative study performed using gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS).<sup>73</sup> Brazilian yellow propolis has a chemical profile similar to Cuban yellow propolis.<sup>48,74</sup>

Descriptions of the main molecules found in different types of propolis and their respective biological activities are given in Tables 1, 2, and 3. The analysis of the data listed in this table reinforces propolis as a complex natural product with a variety of applications in human and veterinary medicine. But it is important not only to analyze the activity of each compound alone, but also to consider the interactions between them. Indeed, it was previously seen that the antimicrobial action of propolis should be evaluated by the interaction between various compounds with this type of activity.<sup>83</sup> In addition, most of the molecules present in propolis composition that had its biological activity described are flavonoids and phenolic compounds, followed by xanthenes and terpenoids, which are extremely stable molecules with a wide range of biological activities.

## BIOLOGICAL ACTIVITIES

### Antibacterial properties

The antimicrobial activity of propolis has been described by several researchers and is characterized by its bacteriostatic and bactericidal effects in different bacterial species, including those demonstrating resistance to conventional antimicrobial drugs. In Tables 4 and 5, several studies are listed that reported the susceptibility or resistance of gram-positive and gram-negative bacteria to different propolis extracts. The propolis extracts listed in these tables have been obtained using different solvents, such as ethanol, methanol, and acetates. It is noteworthy that many of them were obtained using eco-friendly technologies, such as supercritical fluid extraction.

The findings listed in Tables 4 and 5 point to the fact that propolis has a greater antimicrobial effect on gram-positive bacteria than gram-negative bacteria. This can be concluded because not only there are more scientific reports with gram-positive bacteria but also because of the lower minimum inhibitory concentration values obtained when different propolis extracts were tested in susceptibility assays using this type of microorganism. It should also be noted that most of the studies listed here report not only bacteriostatic but also bactericidal action, i.e. propolis (mainly red and green propolis) is capable of both inhibiting growth and killing bacteria. This situation is crucial for an adequate therapeutic approach of infectious disease as the therapeutic agent will be able both to inhibit the spread of the

**Table 4.** Biological activity of different propolis extracts against Gram-positive bacterial species of veterinary interest. AcEOt-Fr – acetate fraction; EE – ethanolic extract; EEP – ethanolic extract of propolis; Hex-Fr – hexane fraction; MeOH-Fr – methanolic fraction; GP – green propolis; HE – hexanic extract; MBC – minimal bactericidal concentration; MIC – minimal inhibitory concentration; RP – red propolis.

Bacterial Species	Propolis Extract Types	Geographic Origin	Biological Activity	Reference
<i>Clostridium difficile</i> <i>Clostridium parapatrificum</i> <i>Clostridium perfringens</i>	EEP	South Korea	Bacteriostatic MIC: 1840 µg/mL Bacteriostatic MIC: 14700 µg/mL	84
<i>Enterococcus faecalis</i>	EEP	Brazil South Africa	Bacteriostatic MIC: 49 to 1563 µg/mL Bactericide MBC: 49 to 6250 µg/mL	85
<i>Listeria monocytogenes</i>	EE-GP	Taiwan	Bacteriostatic MIC: 40 µg/mL	17
<i>Ruminococcus albus</i> <i>Ruminococcus flavefaciens</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	EEP	Brazil	Bacteriostatic	86
	EEP	Brazil South Africa	Bacteriostatic MIC: 6 to 1563 µg/mL Bactericide MBC: 6 to > 6250 µg/mL	85
	EE-RP	Brazil	Bacteriostatic MIC: 100 to 200 µg/mL Bactericide MBC: 200 to 400 µg/mL	81
	EE-RP; Hex-Fr; AcEOt-Fr, MeOH-Fr	Brazil	Bacteriostatic MIC: 256 to 1024 µg/mL	80
	EE-GP	Taiwan	Bacteriostatic MIC: 10 to 20 µg/mL	17
		Brazil	Bacteriostatic MIC: 123 to 369 µg/mL	87
			Bacteriostatic	88
	HE-GP	Brazil	Bacteriostatic MIC: 78 to 392 µg/mL	87
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	EE-RP; Hex-Fr; AcEOt-Fr, MeOH-Fr	Brazil	Bacteriostatic MIC: 128 to 1024 µg/mL	80
<i>Streptococcus bovis</i>	EEP	Brazil	Bacteriostatic	86
<i>Streptococcus mutans</i>	EE-RP	Brazil	Bacteriostatic MIC: 100 to 200 µg/mL Bactericide MBC: 100 to 200 µg/mL	81

AcEOt-Fr – acetate fraction; EE – ethanolic extract; EEP – ethanolic extract of propolis; Hex-Fr – hexane fraction; MeOH-Fr – methanolic fraction; GP – green propolis; HE – hexanic extract; MBC – minimal bactericidal concentration; MIC – minimal inhibitory concentration; RP – red propolis.

pathogen and to help the host's immune system to eliminate the bacteria.

#### Antifungal activities

Propolis use as an alternative therapy against fungi is being considered as a promising therapeutic approach. There is a low number of available commercial antifungal drugs, an increase in the resistance presented by many clinical isolates to these compounds, and there is a significantly high cost associated with the long treatment and adverse effects of commercial antifungals.<sup>87,90</sup>

Tables 6 and 7 present information on the antifungal activity (fungicide or fungistatic) of different propolis extracts in different non-filamentous and filamentous fungi species frequently isolated in the veterinary clinical routine, such as *Malassezia pachydermatis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Microsporum canis*, and others. These studies used different types of propolis extraction solvents, such as ethanol,<sup>5,60</sup> dimethyl sulfoxide (DMSO),<sup>90</sup> propylene glycol,<sup>94</sup> and methanol.<sup>96</sup> As an example of a molecule with high antifungal activity, formononetin, one of the main compounds



**Table 5.** Biological activity of different propolis extracts against gram-negative bacterial species of veterinary interest

Bacterial species	Propolis extract types	Geographic origin	Biological activity	Reference
<i>Escherichia coli</i>	EE-GP	Taiwan	Bacteriostatic MIC: > 0.640 g L <sup>-1</sup>	17
	EEP	Brazil	Bacteriostatic	88
		Brazil	Bacteriostatic	85
		South Africa	MIC: 0.391 to 1.563 g L <sup>-1</sup> Bactericide MBC: 1.563 to > 6.250 g L <sup>-1</sup>	
		South Korea	Bacteriostatic MIC: 1.840 g L <sup>-1</sup>	84
<i>Proteus vulgaris</i>	EE-RP	Brazil	Bacteriostatic	89
	RP AcEOT-Fr		Bacteriostatic MIC: < 1.000 g L <sup>-1</sup>	
	RP Hex-Fr		Bacteriostatic MIC: 1.000 g L <sup>-1</sup>	
	RP CHCl <sub>3</sub> -Fr		Bacteriostatic MIC: < 0.200 g L <sup>-1</sup>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EEP	Brazil South Africa	Bacteriostatic MIC: 0.195 to 0.781 g L <sup>-1</sup> Bactericide MBC: 1.563 to > 6.250 g L <sup>-1</sup>	85
	EE-RP; Hex-Fr; AcEOT-Fr; MeOH-Fr	Brazil	Bacteriostatic MIC: 0.128 to 1.024 g L <sup>-1</sup>	80
<i>Salmonella typhimurium</i>	EEP	South Korea	Bacteriostatic MIC: 14.700 g L <sup>-1</sup>	84
<i>Shigella flexneri</i>	EE-RP	Brazil	Bacteriostatic	89
	RP AcEOT-Fr		Bacteriostatic MIC: < 0.100 g L <sup>-1</sup>	
	RP Hex-Fr		Bacteriostatic MIC: < 0.100 g L <sup>-1</sup>	
	RP CHCl <sub>3</sub> -Fr		Bacteriostatic MIC: 0.100 g L <sup>-1</sup>	

AcEOT-Fr, acetate fraction; EE, ethanolic extract; EEP, ethanolic extract of propolis; Hex-Fr, hexane fraction; MeOH-Fr, methanolic fraction; GP, green propolis; HE, hexanic extract; MBC, minimal bactericidal concentration; MIC, minimal inhibitory concentration; RP, red propolis.

from red propolis,<sup>100</sup> was capable of inhibiting *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *Cryptococcus neoformans* growth in a concentration of 0.025 g L<sup>-1</sup>.<sup>80</sup>

As previously seen for bacterial species, red and green propolis had both fungistatic and fungicidal actions against different non-filamentous and filamentous fungi, indicating that propolis is active for the control of fungal pathogens with different morphological characteristics. These findings together indicate the possibility of the development of new antifungal therapies, which would meet a pent-up demand for new antifungals, associated with the need to face the increasing development of resistance to drugs that are currently available commercially.

#### Wound healing and anti-inflammatory activities

The inflammatory process is complex and presents different mechanisms in its acute or chronic phase. Artepillin C is the main component of Brazilian green propolis and showed anti-inflammatory effects in mice<sup>65</sup> and in microglial cells.<sup>101</sup> Other inflammatory parameters, such as macrophage and neutrophil recruitment and TNF production, were inhibited after a 4-day treatment with a green propolis extract rich in caffeic acid esters.<sup>102</sup> An increase in the macrocytic efficiency was observed in mice experimentally infected with *Leishmania amazonensis* after a 30-day treatment using Brazilian propolis and a nitric oxide donor.<sup>103</sup>

Artepillin C was described to regulate the activation of the innate immune system-mediated inflammatory process<sup>10</sup> and

this situation could be observed in microglial cells after treatment with green propolis ethanolic extracts.<sup>101</sup> Daily ingestion of propolis (6.7 or 20 g kg<sup>-1</sup> diet) significantly decreased arthritis clinical scores in a murine model.<sup>104</sup> Propolis daily ingestion also decreased the production of the proinflammatory cytokine, interleukin-17.<sup>104</sup> This work shows that propolis is still active when orally administered.

Red propolis has neovestitol in its composition, which is able to inhibit neutrophil migration and leukocyte adhesion during the inflammatory acute phase.<sup>105</sup> In the same study, neovestitol reduced the clinical symptoms of arthritis after a 0.010 g kg<sup>-1</sup> daily administration. On the other hand, a study on mice showed that treatment with an ethanolic extract rich in artepillin C was able to reduce IL-17-producing lymphocytes in the chronic inflammatory phase.<sup>104</sup> Another red propolis compound, formononetin, showed anti-inflammatory activity and inhibited the inflammation-associated pain sensation in animal models.<sup>106</sup> But the mode of action of propolis in inflammation is still to be elucidated because more studies are needed to verify the different propolis activities in the acute and chronic phases of the inflammatory process.

Regarding the wound-healing process, mice treated with a green propolis-based ointment showed a faster reepithelization of experimentally induced lesions.<sup>107</sup> Thus, propolis-based therapeutics that can be topically administered can be faced as promising products for use in veterinary medicine. An example of

**Table 6.** Biological activity of different propolis extracts against yeast species of veterinary interest

Fungi species	Propolis extract types	Geographic origin	Biological activity	Reference
<i>Candida albicans</i>	EE-RP	Brazil	Fungistatic	80
			MIC: 0.256 g L <sup>-1</sup>	69
	EEP	Iran	Fungistatic	91
			MIC: 0.002 g L <sup>-1</sup>	
			MFC: 0.250 g L <sup>-1</sup>	
	DMSO EP	Czech Republic	Fungistatic	90
	EE-RP	Brazil	MIC: 0.049 g L <sup>-1</sup>	
	RP AcEOT-Fr		Fungistatic	89
	RP Hex-Fr		MIC: < 0.100 g L <sup>-1</sup>	
	RP CHCl <sub>3</sub> - Fr		Fungistatic	
		MIC: < 0.400 g L <sup>-1</sup>		
EE-GP		MIC: < 0.200 g L <sup>-1</sup>		
		Fungistatic	92	
		Fungistatic	69	
		MIC: 0.004 g L <sup>-1</sup>		
		Fungicide		
		MFC: > 0.500 g L <sup>-1</sup>		
<i>Candida dubliniensis</i>	EE-GP	Brazil	Fungistatic	87
			MIC: 0.004 g L <sup>-1</sup>	69
		Fungicide		
		MFC: 0.500 g L <sup>-1</sup>		
<i>Candida glabrata</i>	EE-RP		Fungistatic	
			MIC: 0.001 g L <sup>-1</sup>	
			Fungicide	
<i>Candida glabrata</i>	RP Hex-Fr	Brazil	MFC: 0.250 g L <sup>-1</sup>	93
			Fungistatic	
			MIC: 0.003906 to 0.007813 g L <sup>-1</sup>	
<i>Candida glabrata</i>	EE-GP		Fungistatic	69
			MIC: 0.0078 g L <sup>-1</sup>	
			Fungicide	
<i>Candida glabrata</i>	EE-RP		MFC: 0.250 g L <sup>-1</sup>	
			Fungistatic	
			MIC: 0.0078 g L <sup>-1</sup>	
<i>Candida glabrata</i>	EE-GP		Fungistatic	
			MIC: 0.0078 g L <sup>-1</sup>	
			Fungicide	
<i>Candida parapsilosis</i>	EE-GP		MFC: 0.250 g L <sup>-1</sup>	92
	EE-GP	Brazil	Fungistatic	92
			Fungistatic	69
			MIC: 0.0313 g L <sup>-1</sup>	
			Fungicide	
			MFC: > 0.500 g L <sup>-1</sup>	
<i>Candida parapsilosis</i>	EE-RP		Fungistatic	
			MIC: 0.004 g L <sup>-1</sup>	
			Fungicide	
<i>Candida parapsilosis</i>	RP Hex-Fr		MFC: 0.250 g L <sup>-1</sup>	
			Fungistatic	93
			MIC: 0.015625 g L <sup>-1</sup>	
<i>Candida spp.</i>	GIIE-GP	Brazil	Fungistatic and Fungicide	94

Table 6. (Continued)

Fungi species	Propolis extract types	Geographic origin	Biological activity	Reference
<i>Candida tropicalis</i>	EE-GP	Brazil	Fungistatic MIC: 0.0313 g L <sup>-1</sup> Fungicide MFC: > 0.500 g L <sup>-1</sup>	69
	EE-RP		Fungistatic MIC: 0.002 g L <sup>-1</sup> Fungicide MFC: 0.500 g L <sup>-1</sup>	
	EE-GP		Fungistatic MIC: 0.256 g L <sup>-1</sup>	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	EE-RP	Brazil	Fungistatic MIC: 0.256 g L <sup>-1</sup>	80
<i>Malassezia pachydermatis</i>	EEP	Brazil	Fungistatic MIC: 0.002400 g L <sup>-1</sup>	92
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ME-RP	Brazil	Inhibitor of enzymatic activity	80

AcEOT-Fr, acetate fraction; DMSO, dimethylsulfoxide; CHCl<sub>3</sub>-Fr, chloroform fraction; EE, ethanolic extract; EEP, ethanolic extract of propolis; Hex-Fr, hexane fraction; GlIE, glycolic extract; GP, green propolis; HE, hexanic extract; MFC, minimal fungicide concentration; ME, methanolic extraction; MIC, minimal inhibitory concentration; RP, red propolis.

a scientific approach that can be conducted in the development of such products is the study of silver nanoparticle-based ointment for surgical wound healing in small ruminants, with successful results.<sup>108</sup>

#### Antitumor activity

The antitumor activity of propolis has been studied widely. Three propolis types are known to contain different anticancer compounds: caffeic acid phenethyl ester (CAPE), present in propolis from Europe, the Far East and New Zealand; artemillin C, from green Brazilian propolis,<sup>109</sup> and benzophenone, found in red Brazilian propolis.<sup>70,109</sup>

Angiogenesis is the process of blood-vessel formation and is crucial for tumor growth. The administration of green propolis with large amounts of caffeic acid showed angiostatic effects in a murine model.<sup>110</sup> Angiogenesis suppression promoted by artemillin C has already been described.<sup>111</sup> In chicken embryos, angiogenesis inhibition was also observed,<sup>102</sup> and vasculogenesis regulation was observed after treatment with aqueous and hydro-alcoholic propolis extracts.<sup>112</sup> Ethanolic extracts of red propolis were also able to exert cytotoxic effects and to induce apoptosis in different tumoral lines.<sup>113,114</sup> The polyphenols caffeic acid and *p*-coumaric acid are frequently found in several propolis extracts<sup>44,115</sup> and were capable of inducing apoptosis in human tongue squamous carcinoma cells.<sup>116</sup>

Propolis therapy has been considered to be a safe alternative treatment. No toxic effects of green propolis ethanolic extracts, such as mutagenic activity,<sup>117,118</sup> histopathological changes in long-time use,<sup>117</sup> and genotoxic potential<sup>30,118</sup> were observed until now. However, more studies with different cell types are needed to ensure that the *in vivo* administration of propolis would not cause toxic effects in different body tissues.

## TECHNOLOGICAL PROSPECTION

Propolis is commonly used in human and animal medicine, cosmetic production, and food preservation, and it is a high-valued

product. General products that use propolis in their formulation were reviewed and a high number of scientific reports (3800 publications) were observed compared with the number of patent documents (2884 filed patents).<sup>119</sup> These authors also observed that the number of registered patents increased considerably after the year 2000. The present prospective study analyzed 533 patent documents of products containing propolis in their formulation with potential use in veterinary medicine (Fig. 1). Our results showed that the first patent with this characteristic was filed in 1992 and that the number of patent filings reached a peak in 2011. In 2001, 2002, 2012, and 2014, a significant number of patent filings occurred. However, an irregularity in the filing of patents for veterinary use is observed, which was a situation not observed in patents filed for propolis-based products for human medicine.<sup>120</sup> This situation can be explained by a more intense focus by researchers and companies on human health. In this way, the veterinary medicine field is open to be exploited regarding applications of propolis.

Figure 2 presents the year of expiration of patent documents according to the protection period of each country. Of 533 patent documents, the expiration years of 160 patents were unable to be determined through our search methodology, mainly because of the unavailability of data. However, of the 473 patent document records accessed, 2015, 2017, and 2022 were the years with more loss of exclusivity rights. Loss of the exclusivity of product rights generates disadvantages to patent-filing companies, such as productivity declines in research and development, increases in commercialization costs, and decreases in gains. However, loss of exclusivity stimulates the price reduction of drugs and innovation for the development of new products.<sup>121</sup>

The number of patent documents classified by the country or international organization of filing was also evaluated (Fig. 3). These results showed that China possesses the majority of patent filings, with 198 patents, representing 37% of all the filed patents analyzed. Propolis consumption around the world is estimated to be 700 to 800 tons per year, and China is considered the major global propolis producer, followed by Russia and Brazil.<sup>122</sup>

**Table 7.** Biological activity of different propolis extracts against filamentous fungi species of veterinary interest

Fungi species	Propolis extract types	Geographic origin	Biological activity	Reference
<i>Aspergillus fumigatus</i>	DMSO EP	Central Bohemia and Czech Republic	Fungistatic MIC: 0.246 g L <sup>-1</sup>	90
<i>Microsporum canis</i>	DMSO EP	Czech Republic	Fungistatic MIC: 0.492 g L <sup>-1</sup>	90
<i>Microsporum gypseum</i>	DMSO EP	Czech Republic	Fungistatic MIC: 0.049 g L <sup>-1</sup>	90
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	-	Brazil	Antiseptic MIC: 0.0625 to >0.500 g L <sup>-1</sup> MFC: 1.000 to >2.000 g L <sup>-1</sup>	97
	EPP	Turkey	Fungistatic MIC: 0.0001 to 0.0008 g L <sup>-1</sup>	98
	EE-GP	Brazil	Fungistatic MIC: 0.128 to 1.024 g L <sup>-1</sup> Fungicide MFC: 0.512 g L <sup>-1</sup>	99
<i>Trichophyton rubrum</i>	-	Brazil	Antiseptic MIC: 0.00781 to 2.000 g L <sup>-1</sup> MFC: 1.000 to >2.000 g L <sup>-1</sup>	97
	EP-GP	Brazil	Fungistatic MIC: 0.064 to 0.512 g L <sup>-1</sup> Fungicide MFC: 1.024 g L <sup>-1</sup>	99
	EE-RP		Fungistatic MIC: 0.008 to 0.128 g L <sup>-1</sup> Fungicide MFC: 0.128 to 0.256 g L <sup>-1</sup>	98
<i>Trichophyton tonsurans</i>	EEP	Turkey	Fungistatic MIC: 0.000025 to 0.0004 g L <sup>-1</sup>	98
	EE-GP	Brazil	Fungistatic MIC: 0.128 to 1.024 g L <sup>-1</sup> Fungicide MFC: 1.024 g L <sup>-1</sup>	99
	EE-RP		Fungistatic MIC: 0.032 to 0.128 g L <sup>-1</sup> Fungicide MFC: 0.128 to 1.024 g L <sup>-1</sup>	
	EE-RP		Fungistatic MIC: 0.016 to 0.128 g L <sup>-1</sup> Fungicide MFC: 0.256 to 0.512 g L <sup>-1</sup>	

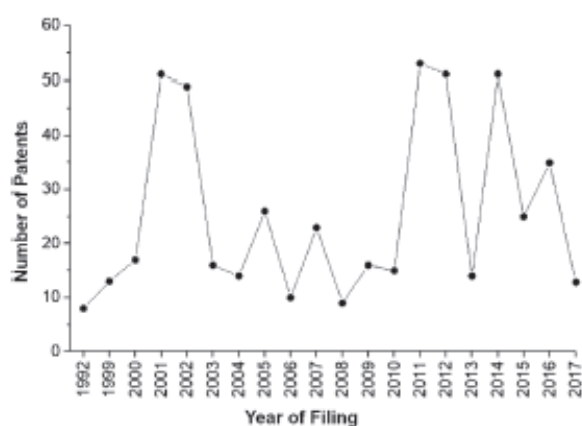
DMSO, dimethylsulfoxide; EE, ethanolic extract; EEP, ethanolic extract of propolis; GP, green propolis; MFC, minimal fungicide concentration; MIC, minimal inhibitory concentration; RP, red propolis.

This high propolis production, associated with the authorization of propolis use in human medicine and its inclusion in the Chinese Pharmacopeia,<sup>123</sup> probably contributes to this Chinese preponderance in patent filings of products containing propolis.

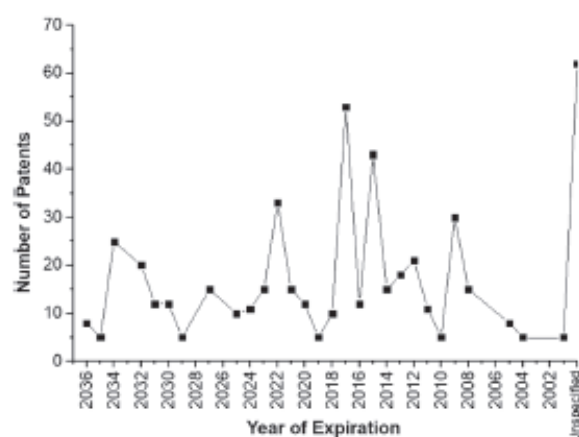
The country with the second highest number of patents is the USA, with 101 patents (19%). However, another study<sup>119</sup> found that China, Russia and Japan were the three countries with the highest number of patent documents for propolis products (not specific for veterinary products). A study observed that this high number of American propolis-based products

can be related to the high value and optimal commercial conditions of the biopharmaceutical companies from the USA.<sup>124</sup> Thus, the status of the USA as one of the main patent filing countries could be explained by the innovation-related success of many American pharmaceutical companies, as a high number of registered patents were from wealthy companies.<sup>124</sup> Another important factor is the growing pet market in the USA, because according to the American Pet Products Manufacturers Association,<sup>125</sup> 68% of US residences have a pet, which results in approximately 89.7 million cats and 94.8 million dogs in that country.





**Figure 1.** Number of filed patents for propolis-based products for use in animal health, between 1992 and 2017. These data were obtained through a search with the Smart Search-Topic option of the Thomson Innovation® tool.



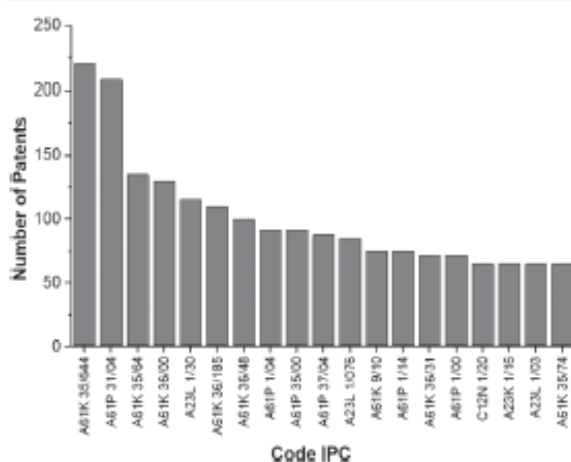
**Figure 2.** Number of filed patents for propolis-based products for use in animal health, according to patent expiration year. All of the documents used in this study were found using the 'Smart Search-Topic' option of the Thomson Innovation® tool. Of the 533 patents documents evaluated, the expiration year could not be determined for 160.

Brazil is one of the pre-eminent propolis producers in the world, mainly of green and red propolis, with green propolis as a product that is very well considered in the Japanese market.<sup>44</sup> However, Brazil is not included in the list of the countries with the highest number of patent filings for products based on propolis (Fig. 3). This low number of Brazilian patents could be explained by the absence of a law that regulates innovation, a situation that lasted until 2004. In this year, a law was promulgated that established the basis for technical innovation in Brazil (Lei de Inovação, 10.973/04), and only after this was passed, did the Brazilian Research Centers create the Technological Innovation Nucleus at Brazilian universities and research centers. It is expected that this innovation law, in the long-term, will increase the association between universities, research centers, and companies for the development of new products, also focusing on the increase in the number of patent filings.

An analysis comparing the number of patent documents and their classification codes showed that the majority of the patent documents were registered in the A61K35/644 subclass, which includes medicinal preparations containing material or products composed of bees' wax, propolis, royal jelly, and honey (Fig. 4). The subclass with the second highest number of patents is represented by patent documents registered with the classification code A61P31/04, which contains products with specific therapeutic activity against bacterial agents. The A61K35/64 and A61k66/00 codes describe medicinal preparations containing insect products or materials (for example, from bees, wasps, or fleas) and medicinal preparations with an undetermined constitution containing algae, lichen, fungi, or plant material or its derivate products, respectively. The antimicrobial action is the main biological activity of propolis included in the animal



**Figure 3.** Number of filed patents for propolis-based products for use in animal health, according to the country where the patent was filed. All 533 documents used in this study were found using the 'Smart Search-Topic' option of the Thomson Innovation® tool. EP – European Patent Organization; WO – World Intellectual Property Organization.



**Figure 4.** Number of filed patents for propolis-based products for use in animal health, according to its classification code. All 533 documents used in this study were found using the 'Smart Search-Topic' option of the Thomson Innovation® tool. Classification codes corresponded to: A61K 35/644 – medicinal preparations containing materials or reaction products originated from beeswax, propolis, royal jelly and honey; A61P 31/04 – specific therapeutic activity of chemical compounds or medicinal preparations of antibacterial agents; A61K 35/64 – medicinal preparations containing materials or reaction products from insects; A61K 36/00 – medicinal preparations of undetermined constitution containing material from algae, lichens, fungi or plants; A23L 1/30 – foods or foodstuffs not covered by sub-classes a23b to a23j containing additives for modifying nutritive qualities; e.g., vitamins or minerals; their preparation; A61K 38/185 – medicinal preparations containing growth factors; growth regulators, nerve growth factor (NGF), brain derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), glial derived neurotrophic factor (GDNF), neurotrophins, (e.g., NT-3); A61K 36/48 – medicinal preparations of undetermined constitution containing material from Fabaceae or Leguminosae, Caesalpiniaceae, Mimosaceae, Papilionaceae; A61P 1/04 – drugs for disorders of the alimentary tract or the digestive system, such as ulcers, gastritis or reflux esophagitis (e.g., antacids, inhibitors of acid secretion, mucosal protectants); A61P 35/00 – antineoplastic agents; A61P 37/04 – drugs for immunologic or allergic disorders, immunosuppressors (e.g., drugs for graft rejection); A23L 1/076 – foods or foodstuffs, their preparation or treatment of products from apiculture (e.g., royal jelly or pollen); A61K 9/10 – medicinal preparations characterized by special physical form (dispersions; emulsions); A61P 1/14 – drugs for disorders of the alimentary tract or the digestive system, prodigestives (e.g., acids, enzymes, appetite stimulants, antidiarrhetics, tonics, antifatulents); A61K 36/31 – medicinal preparations of undetermined constitution containing material from Brassicaceae or Cruciferae (e.g., broccoli, cabbage, or kohlrabi); A61P 1/00 – drugs for disorders of the alimentary tract or the digestive system; C12N 1/20 – microorganisms, compositions, processes of propagating, maintaining or preserving microorganisms or compositions, processes of preparing or isolating a composition containing a microorganism, culture media therefor of bacteria; A23K 1/00 – animal feedstuffs; A23K 1/16 – animal feedstuffs supplemented with accessory food factors, salt blocks; and A23L 1/03 – foods or foodstuffs containing additives.

health research area, including antibiotic<sup>126</sup> and antifungal<sup>169</sup> activities.

The prospection results reveal that, although propolis has been studied widely by many researchers, the number of patents describing propolis products and processes in the animal health area is very low when compared with the quantity of scientific reports. This situation points to the fact that the development of propolis-based products is a field to be exploited. The *in vivo* and *in vitro* experimental approaches described here show that propolis can be used in the development of products and processes to be used in several aspects of veterinary medicine, from

the treatment of neoplastic and infectious diseases to surgical wound management. Limitations, such as the standardization of the composition of different propolis extracts, new extraction methodologies using less toxic solvents, and cytotoxicity studies using different cell types, should be considered in depth in new scientific reports and in the development of veterinary products.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível PESSOAL (CAPES) for the postdoctoral fellowship for MSF.

## REFERENCES

- World Health Organization, *The World Traditional Medicines Situation 2011, Traditional medicines: Global Situation, Issues and Challenges*. World Health Organization, Geneva (2011) Available: <http://digicollection.org/hss/documents/s18063en/s18063en.pdf>. [30 July 2019].
- De Luca V, Salim V, Atsumi SM and Yu F, Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making. *Science* **336**:1658–1661 (2012).
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, Anvisa (2011).
- Zhao L, Pu L, Wei J, Li J, Wu J, Xin Z *et al.*, Brazilian green propolis improves antioxidant function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Environ Res Public Health* **13**:498 (2016).
- Massaro CF, Simpson JB, Powell D and Brooks P, Chemical composition and antimicrobial activity of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) propolis from subtropical eastern Australia. *Naturwissenschaften* **102**:68 (2015).
- Bankova V, Galabov AS, Antonova D, Vilhelmova N and Di Perri B, Chemical composition of propolis extract ACP® and activity against herpes simplex virus. *Phytomedicine* **21**:1432–1438 (2014).
- da Silva SS, Mizokami SS, Fanti JR, Miranda MM, Kawakami NY, Teixeira FH *et al.*, Propolis reduces *Leishmania amazonensis*-induced inflammation in the liver of BALB/c mice. *Parasitol Res* **115**:1557–1566 (2016).
- Chan GC, Cheung KW and Sze DM, The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin Rev Allergy Immunol* **44**:262–273 (2013).
- Gao W, Wu J, Wei J, Pu L, Guo C, Yang J *et al.*, Brazilian green propolis improves immune function in aged mice. *J Clin Biochem Nutr* **55**:7–10 (2014).
- Hori JI, Zamboni DS, Carrão DB, Goldman G and Berretta AA, The inhibition of inflammasome by Brazilian propolis (EPP-AF). *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**:1–11 (2013).
- Babatunde IR, Abdulbasit A, Oladayo MI, Olasile OI, Olamide FR and Gbolahan BW, Hepatoprotective and pancreatoprotective properties of the Ethanolic extract of Nigerian propolis. *J Intercult Ethnopharmacol* **4**:102–108 (2015).
- Pereira DS, Freitas CIA, Freitas MO, Maracajá PB, Silva JBA, Silva RA *et al.*, Histórico e principais usos da própolis apícola. *Revista ACSA* **11**:01–21 (2015).
- Lustosa SR, Galindo AB, Nunes ICC, Randau KP and Neto PJR, Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Ver bras farmacogn* **18**:447–454 (2008).
- Salatino A, Fernandes-Silva CC, Righi AA and Salatino MLF, Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat Prod Rev* **28**:925–936 (2011).
- Machado BAS, Pereira CG, Nunes SB, Padilha FF and Umsza-Guez MA, Supercritical fluid extraction using CO<sub>2</sub>: main applications and future perspectives. *Sep Sci Technol* **48**:2741–2760 (2013).
- World Intellectual Property Organization, *PCT – The Patent Cooperation Treaty*. World Intellectual Property Organization, Geneva (2018) Available: <https://www.wipo.int/pct/en/> [02 September 2018].
- Chen YW, Ye SR, Ting C and Yu YH, Antibacterial activity of propolis from Taiwanese green propolis. *J Food Drug Anal* **26**:761–768 (2018).
- Meyer W, Propolis bees and their activities. *Bee World* **37**:25–36 (1956).



- 19 Ghisalberti EL, Propolis: a review. *Bee World* **60**:59–84 (1979).
- 20 Pontoh J and Low NH, Purification and characterization of beta-glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochem Mol Biol* **32**:679–690 (2002).
- 21 Zhang CP, Zheng HQ and Hu FL, Extraction, partial characterization, and storage stability of  $\beta$ -glucosidase from propolis. *J Food Sci* **76**:C75–C79 (2011).
- 22 Rufatto LC, Santos DAS, Marinho F, Henriques JAP, Ely MR and Moura S, Red propolis: chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pac J Trop Biomed* **7**:591–598 (2017).
- 23 Bankova VS, de Castro SL and Marcucci MC, Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* **31**:3–15 (2000).
- 24 Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova VS, de Castro SL, Dantas AP et al., Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* **74**:105–112 (2001).
- 25 Marcucci MC, Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* **26**:83–99 (1995).
- 26 Negri G, Marcucci MC, Salatino A and Salatino MFL, Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil. *Apidologie* **29**:305–314 (1998).
- 27 Popova MP, Bankova VS, Bogdanov S, Tsvetkova I, Naydenski C, Marcuzzan GL et al., Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie* **38**:306–3011 (2007).
- 28 Eroglu N, Akkus S, Yaman M, Asci B and Silici S, Amino acid and vitamin content of propolis collected by native caucasian honeybees. *J Apic Sci* **60**:101–110 (2016).
- 29 Oryan A, Alemzadeh E and Moshiri A, Potential role of propolis in wound healing: biological properties and therapeutic activities. *Biomed Pharmacother* **98**:469–483 (2018).
- 30 Sforzin JM, Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol* **113**:1–14 (2007).
- 31 Castaldo S and Capasso F, Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* **73**:S1–S6 (2002).
- 32 Franchin M, Freires IA, Lazarini JG, Nani BD, Cunha MG, Colón DF et al., The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chem* **153**:49–55 (2018).
- 33 Costa AS, Machado BAS, Umsza-Guez MA, Cirqueira MG, Nunes SB and Padilha FF, Survey of studies with propolis produced in the state of Bahia, Brazil. *Sitientibus Ser Ci Biol* **13**:1–7 (2013).
- 34 Machado BAS and Padilha FFO, O processo de proteção das Indicações Geográficas no Brasil, in *Desenvolvimento e perspectivas da propriedade intelectual no Brasil*, ed. by Santos FL. Editora UFRB, Cruz das Almas, pp. 105–120 (2014).
- 35 Wagh VD, Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv Pharmacol Sci* **2013**:1–11 (2013).
- 36 Ribeiro G, Silva MAG, Martins CB, Borges VP and Lacerda-Neto JC, Associação fitoterápica no tratamento de feridas cutâneas induzidas em equinos. *Arq Bras Med Vet Zootec* **65**:1427–1433 (2013).
- 37 Abu-Seida AM, Effect of propolis on experimental cutaneous wound healing in dogs. *Vet Med Int* **2015**:1–4 (2015).
- 38 Aguiar SC, Paula EM, Yoshimura EH, Santos WBR, Machado E, Valero MV et al., Effects of phenolic compounds in propolis on digestive and ruminal parameters in dairy cows. *Rev Bras Zootec* **43**:197–206 (2014).
- 39 Rispoli TB, Rodrigues IL, Martins-Neto RG, Kazama R, Prado OPP, Zeoula LM et al., Ruminal ciliate protozoa of cattle and buffalo fed on diet supplemented with monensin or extracts from propolis. *Pesq Agropec bras* **44**:92–97 (2009).
- 40 de Paula EM, Samensari RB, Machado E, Pereira LM, Maia FJ, Yoshimura EH et al., Effects of phenolic compounds on ruminal protozoa population, ruminal fermentation, and digestion in water buffaloes. *Livest Sci* **185**:136–141 (2016).
- 41 Aguiar SC, Cottica SM, Boeing JS, Samensari RB, Santos GT, Visentainer JV et al., Effect of feeding phenolic compounds from propolis extracts to dairy cows on milk production, milk fatty acid composition, and the antioxidant capacity of milk. *Anim Feed Sci Technol* **193**:148–154 (2014).
- 42 Santos NW, Yoshimura EH, Machado E, Matumoto-Pintro PT, Montaner PF, Visentainer JV et al., Antioxidant effects of a propolis extract and vitamin E in blood and milk of dairy cows fed diet containing flaxseed oil. *Livest Sci* **191**:132–138 (2016).
- 43 Wang K, Jin XL, Shen XG, Sun LP, Wu LM, Wei JQ et al., Effects of Chinese propolis in protecting bovine mammary epithelial cells against mastitis pathogens-induced cell damage. *Mediators Inflamm* **2016**:1–12 (2016).
- 44 Park YK, Alencar SM and Aguiar CL, Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem* **50**:2502–2506 (2002).
- 45 Dausch A, Moraes CS, Fort P and Park YK, Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med* **5**:435–441 (2008).
- 46 Ferreira JM, Fernandes-Silva CC, Salantino A, Negri G and Message D, New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. *J Sci Food Agric* **97**:3552–3558 (2017).
- 47 Teixeira EW, Negri G, Meira RM, Message D and Salatino A, Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evid Based Complement Alternat Med* **2**:85–92 (2005).
- 48 Machado BAS, Dantas-Silva RP, Barreto GA, Costa SS, Silva DF, Brandão HN et al., Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PLoS One* **11**:e0145954 (2016).
- 49 Waller SB, Peter CM, Hoffmann JF, Picoli T, Osório LD, Chaves F et al., Chemical and cytotoxic analyses of brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its *in vitro* activity against itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis*. *Microb Pathog* **105**:117–121 (2017).
- 50 Fernandes FH, Guterres ZR, Violante IMP, Lopes TFS, Garcez WS and Garcez FR, Evaluation of mutagenic and antimicrobial properties of brown propolis essential oil from the Brazilian Cerrado biome. *Toxicol Rep* **2**:1482–1488 (2015).
- 51 Popolo A, Piccinelli LA, Morello S, Cuesta-Rubio O, Sorrentino R, Rastrelli L et al., Antiproliferative activity of brown Cuban propolis extract on human breast cancer cells. *Nat Prod Commun* **4**:1711–1716 (2009).
- 52 Sawaya ACHF, Cunha IBS, Marcucci MC, Aidar DS, Silva ECA, Carvalho CAL et al., Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis of native Brazilian stingless bees. *Apidologie* **38**:93–103 (2007).
- 53 Gomes MFF, Itavo CCBF, Leal CRB, Itavo LCV and Lunas RC, Atividade antibacteriana *in vitro* da propolis marrom. *Pesqui Vet Bras* **36**:279–282 (2016).
- 54 Campo-Fernández MC, Cuesta-Rubio O, Rosado-Perez A, Porto RMO, Márquez-Hernández I, Piccinelli AL et al., GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. *J Agric Food Chem* **56**:9927–9932 (2008).
- 55 Piccinelli AL, Lotti C, Campone L, Cuesta-Rubio O, Campo-Fernandez M and Rastrelli L, Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography / photodiode array detection / electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **59**:6484–6491 (2011).
- 56 Lotti C, Campo-Fernandez M, Piccinelli AL, Cuesta-Rubio O, Márquez-Hernández I and Rastrelli L, Chemical constituents of red Mexican Propolis. *J Agric Food Chem* **58**:2209–2213 (2010).
- 57 Izuta H, Shimazawa M, Tsuruma K, Araki Y, Mishima S and Hara H, Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Complement Altern Med* **9** (2009). <https://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-9-45>.
- 58 Trusheva B, Popova M, Naydenski H, Tsvetkova I, Rodriguez JG and Bankova V, New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapia* **75**:683–689 (2004).
- 59 Cuesta-Rubio O, Piccinelli AL, Fernandez MC, Hernández IM, Rosado A and Rastrelli L, Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *J Agric Food Chem* **55**:7502–7509 (2007).
- 60 Quiroga EN, Sampietro DA, Soberón JR, Sgariglia MA and Vattuone MA, Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *J Appl Microbiol* **101**:103–110 (2006).
- 61 Machado BAS, Cruz LS, Nunes SB, Umsza-Guez MA and Padilha FF, Estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes depositados no Brasil. *Revista GEINTEC* **2**:221–235 (2012).
- 62 Matsuno T, A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. *Zeitschrift für Naturforschung c* **50**:93–97 (1995).
- 63 Miyataka H, Nishiki M, Matsumoto H, Fujimoto T, Matsuka M and Satoh T, Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol Pharm Bull* **20**:496–501 (1997).



- 64 Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ and Hu FL, Recent advances in the chemical composition of Propolis. *Molecules* **19**:19610–19632 (2014).
- 65 Paulino N, Abreu SRL, Uto Y, Koyama D, Nagasawa H, Hori H *et al*, Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *Eur J Pharmacol* **587**:296–301 (2008).
- 66 Park YK, Paredes-Guzman JF, Aguiar CL, Alencar SM and Fujiwara FY, Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *J Agric Food Chem* **52**:1100–1103 (2004).
- 67 Aga H, Shibuya T, Sugimoto T, Kurimoto M and Nakajima S, Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**:945–946 (1994).
- 68 Guzmán JFP, Avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas das propolis produzidas no Peru [dissertation]. [Campinas (BR)]: Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas UNICAMP (2005).
- 69 Freires IA, Queiroz VCPP, Furlletti VF, Ikegaki M, de Alencar SM, Duarte MCT *et al*, Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. *J Mycol Med* **26**:122–132 (2016).
- 70 Fasolo D, Bergold AM, Von Poser G and Teixeira HF, Determination of benzophenones in lipophilic extract of Brazilian red propolis, nanotechnology-based product and porcine skin and mucosa: analytical and bioanalytical assays. *J Pharm Biomed Anal* **124**:57–66 (2016).
- 71 Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL *et al*, Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* **3**:249–254 (2006).
- 72 Regueira-Neto MS, Tintino SR, Silva ARP, Costa MDS, Boligon AA, Matias EFF *et al*, Seasonal variation of Brazilian red propolis: antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food Chem Toxicol* **107**:572–580 (2017).
- 73 Márquez-Hernández I, Cuesta-Rubio O, Campo-Fernández M, Rosado-Pérez A, Porto RMO, Piccinelli AL *et al*, Studies on the constituents of yellow Cuban propolis: GC-MS determination of triterpenoids and flavonoids. *J Agric Food Chem* **58**:4725–4730 (2010).
- 74 da Silveira CC, Fernandes LM, Silva ML, Luz DA, Gomes AR, Monteiro MC *et al*, Neurobehavioral and antioxidant effects of ethanolic extract of yellow propolis. *Oxid Med Cell Longev* **2016**:1–14 (2016).
- 75 Gregoris E and Stevanato R, Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of venetian propolis. *Food Chem Toxicol* **48**:76–82 (2010).
- 76 Salomão K, Pereira PRS, Campos LC, Borba CM, Cabello PH, Marcucci MC *et al*, Brazilian Propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evid Based Complement Alternat Med* **5**:317–324 (2008).
- 77 da Silva LM, Frídn-Herrera Y, Bartolomeu AR, Gorgulho CM and Sforzin JM, Mechanisms involved in the cytotoxic action of Brazilian propolis and caffeic acid against HEP-2 cells and modulation of P-glycoprotein activity. *J Pharm Pharmacol* **69**:1625–1633 (2017).
- 78 Shimizu K, Ashida H, Matsuura Y and Kanazawa K, Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. *Arch Biochem Biophys* **424**:181–188 (2004).
- 79 Alday-Provencio S, Diaz G, Rascon L, Quintero J, Alday E, Robles-Zepeda R *et al*, Sonoran propolis and some of its chemical constituents inhibit *in vitro* growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *Planta Med* **81**:742–747 (2015).
- 80 das Neves MVM, Silva TMS, Lima EO, Cunha EVL and Oliveira EJ, Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. *Braz J Microbiol* **47**:159–166 (2016).
- 81 Bueno-Silva B, Alencar SM, Koo H, Ikegaki M, Silva GVJD, Napimoga MH *et al*, Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *J Agric Food Chem* **61**:4546–4550 (2013).
- 82 Omar R, Igoli JO, Zhang T, Gray AI, Ebiloma GU, Clements CJ *et al*, The chemical characterization of Nigerian propolis samples and their activity against *Trypanosoma brucei*. *Sci Rep* **7**:923 (2017).
- 83 Cabral FA, Pavianni LC, Saito E, Dariva C, Marcucci MC and Sánchez-Camargo AP, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of raw propolis and its dry ethanolic extract. *Braz J Chem Eng* **29**:243–251 (2012).
- 84 Wang X, Sankarapandian K, Cheng Y, Woo SO, Kwon HW, Perumalsamy H *et al*, Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Complement Altern Med* **16**:65 (2016).
- 85 Suleman T, Vuuren SV, Sandasi M and Viljoen AM, Antimicrobial activity and chemometric modelling of South Africa propolis. *J Appl Microbiol* **119**:981–990 (2015).
- 86 de Aguiar SC, Zeoula LM, Franco SL, Peres LP, Arcuri PB and Forano E, Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria *in vitro*. *World J Microbiol Biotechnol* **29**:1951–1959 (2013).
- 87 Dota KFD, Consolaro MEL, Svidzinski TIE and Bruschi ML, Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. *Evid Based Complement Alternat Med* **2011**:1–8 (2011).
- 88 Farnesi AP, Aquino-Ferreira R, Jong DD, Bastos JK and Soares AEE, Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genet Mol Res* **8**:635–640 (2009).
- 89 Bispo-Junior W, Miranda EO, Alvino V, Araujo B, Silva DW and Porfírio Z, Antimicrobial activity of red propolis from Alagoas, Brazil. *Seminária Ciênc Biol Saúde* **33**:3–10 (2012). <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2012v33n1p3>.
- 90 Netiková L, Bogusch P and Heneberg P, Czech ethanol-free propolis extract displays inhibitory activity against a broad spectrum of bacterial and fungal pathogens. *J Food Sci* **78**:M1421–M1429 (2013).
- 91 Haghdoost NS, Salehi TZ, Khosravi A and Sharifzadeh A, Antifungal activity and influence of against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of *Candida albicans*. *J Mycol Med* **26**:298–305 (2016).
- 92 Sawaya ACHF, Palma AM, Caetano FM, Marcucci MC, Silva-Cunha IB, Araujo CEP *et al*, Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Lett Appl Microbiol* **35**:203–207 (2002).
- 93 Pippi B, Lana AJD, Moraes RC, Gúez CM, Machado M, de Oliveira LFS *et al*, *In vitro* evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. *J Appl Microbiol* **118**:839–850 (2015).
- 94 Capistrano HM, Assis EM, Leal RM, Alvarez-Leite ME, Brenner S and Bastos EMAF, Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**:1–6 (2013).
- 95 Cardoso RL, Maboni F, Machado G, Alvez SH and Vargas AC, Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase* positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Vet Microbiol* **142**:432–434 (2010).
- 96 Lotti C, De Castro GMM, De Sá LFR, Da Silva BAFS, Tassis AC, Piccinelli AL *et al*, Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Pdr5p by a natural compound extracted from Brazilian red propolis. *Rev bras farmaco-cogn* **21**:901–907 (2011).
- 97 Soares MMSR and Cury AE, *In vitro* activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with *tinea pedis*. *Braz J Microbiol* **32**:130–134 (2001).
- 98 Koc AN, Silici S, Ayangil D, Ferahbas A and Çankaya S, Comparison of *in vitro* activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. *Mycoses* **48**:205–210 (2005).
- 99 Siqueira ABS, Gomes BS, Cambuim I, Maia R, Abreu S, Souza-Motta CM *et al*, *Trichophyton* species susceptibility to green and red propolis from Brazil. *Lett Appl Microbiol* **48**:90–96 (2009).
- 100 López BC, Schimidt EM, Eberlin MN and Sawaya AC, Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chem* **146**:174–180 (2014).
- 101 Wu Z, Zhu A, Takayama F, Okada R, Liu Y, Harada Y *et al*, Brazilian green propolis suppresses the hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF- $\kappa$ B activation in microglia. *Oxid Med Cell Longev* **2013**:1–10 (2013).
- 102 Lima LDC, Andrade SP, Campos PP, Barcelos LS, Soriani FM, Moura SAL *et al*, Brazilian green propolis modulates inflammation, angiogenesis and fibrogenesis in intraperitoneal implant in mice. *BMC Complement Altern Med* **14**:177 (2014).
- 103 Miranda MM, Panis C, Cataneo AH, da Silva SS, Kawakami NY, Lopes LG *et al*, Nitric oxide and Brazilian propolis combined accelerates tissue repair by modulating cell migration, cytokine production and collagen deposition in experimental leishmaniasis. *PLoS One* **10**:e0125101 (2015).
- 104 Tanaka M, Okamoto Y, Fuku T and Masuzawa T, Suppression of interleukin 17 production by Brazilian propolis in mice with collagen-induced arthritis. *Inflammopharmacology* **20**:19–26 (2012).
- 105 Franchin M, Colón DF, da Cunha MG, Castanheira FV, Saraiva AL, Bueno-Silva B *et al*, Neovestitol, an isoflavonoid isolated from



- Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. *Sci Rep* **6**:36401 (2016).
- 106 Cavendish RL, Santos JS, Neto RB, Paixão AO, Oliveira JV, Araújo ED et al., Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *J Ethnopharmacol* **173**:127–133 (2015).
  - 107 Batista LL, Campesatto EA, Assis ML, Barbosa AP, Grillo LA and Dornelas CB, Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. *Rev Col Bras Cir* **39**:515–520 (2012).
  - 108 Santos LM, Stanic D, Menezes UJ, Mendonça MA, Barral TD, Seyffert N et al., Biogenic silver nanoparticles as a post-surgical treatment for *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in small ruminants. *Front Microbiol* **10**:1–11 (2019).
  - 109 Messerli SM, Ahn MR, Kunimasa K, Yanagihara M, Tatefuji T, Hashimoto K et al., Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. *Phytother Res* **23**:423–427 (2009).
  - 110 Chikaraishi Y, Izuta H, Shimazawa M, Mishima S and Hara H, Angiostatic effects of Brazilian green propolis and its chemical constituents. *Mol Nutr Food Res* **54**:566–575 (2010).
  - 111 Nguyen BC, Taira N, Maruta H and Tawata S, Artepillin C and other herbal PAK1-blockers: effects on hair cell proliferation and related PAK1-dependent biological function in cell culture. *Phytother Res* **30**:120–127 (2016).
  - 112 Li H, Kapur A, Yang JX, Srivastava S, McLeod DG, Paredes-Guzman JF et al., Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *Int J Oncol* **31**:601–606 (2007).
  - 113 Begnini KR, Moura de Leon PM, Thurow H, Schultze E, Campos VF, Martins-Rodrigues F et al., Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med* **2014**:639856 (2014). <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2014/639856/>.
  - 114 Awale S, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tezuka Y and Kadota S, Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorg Med Chem* **16**:181–189 (2008).
  - 115 Bankova V, Dylugorov A, Popov S and Marekov A, GC/MS study of the propolis phenolic constituents. *Z Naturforsch C* **42**:147–151 (1987).
  - 116 Celinska-Janowicz K, Zareba I, Lazarek U, Teul J, Tomczyk M, Pałka J et al., Constituents of Propolis: chrysin, caffeic acid, p-coumaric acid, and ferulic acid induce PRODH/POX-dependent apoptosis in human tongue squamous cell carcinoma cell (CAL-27). *Front Pharmacol* **9**:336 (2018).
  - 117 Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, Doi K, Gi M and Wanibuchi H, Ethanol-extracted Brazilian propolis exerts protective effects on tumorigenesis in wistar Hannover rats. *Plos One* **11**:e0158654 (2016).
  - 118 Roberto MM, Jamal CM, Malaspina O and Marin-Morales MA, Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the *Allium cepa* test system. *Genet Mol Biol* **39**:257–269 (2016).
  - 119 Toreti VC, Sato HH, Pastore GM and Park YK, Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**:1–13 (2013).
  - 120 Suárez D, Zayas D and Guisado F, Propolis: patents and technology trends for health applications. *J bus chem* **2**:119–125 (2005).
  - 121 Song CH and Han JW, Patent cliff and strategic switch: exploring strategic design possibilities in the pharmaceutical industry. *Springerplus* **5**:692 (2016).
  - 122 Paviani LC, Dariva C, Marcucci MC and Cabral FA, Supercritical carbon dioxide selectivity to fractionate phenolic compounds from the dry ethanolic extract of propolis. *J Food Process Eng* **33**:15–27 (2010).
  - 123 State Pharmacopoeia Commission of the PRC, *Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 1* (2005). People's Medical Publishing House, Beijing (2005).
  - 124 Sotome C, Nakaya Y and Abe S, Patent production is a prerequisite for successful exit of a biopharmaceutical company. *Drug Discov Today* **21**:406–409 (2016).
  - 125 American Pet Products Manufacturers Association (USA), *APPA National Pet Owners Survey 2017–2018*. American Pet Products Manufacturers Association (USA), Stamford, CT (USA) (2018) Available: [https://americanpetproducts.org/Uploads/MemServices/GPE2017\\_NPOS\\_Seminar.pdf](https://americanpetproducts.org/Uploads/MemServices/GPE2017_NPOS_Seminar.pdf) [02 April 2019].
  - 126 Bryan J, Redden P and Traba C, The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. *Lett Appl Microbiol* **62**:192–198 (2016).

**CAPÍTULO II**  
**AÇÃO DE EXTRATOS ETANÓLICOS E SUPERCRÍTICOS DE PRÓPOLIS EM**  
**BIOFILME DE *Corynebacterium pseudotuberculosis***

(Artigo a ser submetido ao periódico *Frontiers in Veterinary Science*, Qualis A2, Fator de Impacto JCR 2019 2.2)

**Laerte Marlon Santos<sup>1</sup>, Daniela Méria Rodrigues<sup>1</sup>, Gabriela Abreu Barreto<sup>2</sup>, Maurício Alcântara Kalil<sup>1</sup>, Vasco Azevedo<sup>3</sup>, Roberto Meyer<sup>1</sup>, Marcelo Andres Umsza-Guez<sup>4</sup>, Bruna Aparecida Machado<sup>2</sup>, Ricardo Wagner Portela<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

<sup>2</sup>CIMATEC-SENAI, Salvador, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Genética Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

\* **Correspondence:** Ricardo Wagner Portela, [rwportela@ufba.br](mailto:rwportela@ufba.br)

## Resumo

Atualmente, a maioria das estratégias de remediação de biofilme envolve o desenvolvimento de agentes inibidores da formação e disrupção do mesmo. Nesse contexto, a própolis surge como um agente antibiofilme graças ao seu alto potencial antibacteriano conferido pelos seus compostos bioativos. Este estudo objetivou avaliar a atividade antibiofilme de extratos de própolis verde e vermelha em *C. pseudotuberculosis*. Para isso, foram utilizadas quatro cepas de referência e isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis* produtores de biofilme, os quais foram tratados em sua forma planctônica e de biofilme com diferentes extratos de própolis. O extrato etanólico de própolis verde foi eficaz na disrupção do biofilme consolidado de *C. pseudotuberculosis*, com maior atividade para a cepa CAPJ4 e os isolados clínicos. A atividade antimicrobiana em biofilme consolidado do extrato supercrítico de própolis vermelha foi inferior a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis verde, porém encontramos atividade antibiofilme significativa na maior concentração testada contra o isolado 96. Os extratos de própolis foram eficazes em interferir na formação de biofilme de *C. pseudotuberculosis*, com porcentagem de inibição superior a 50% e impedindo a formação inicial do biofilme da maioria dos isolados. Em suma, os extratos etanólico de própolis verde e supercrítico de própolis vermelha podem ser considerados como agentes alternativos no tratamento de biofilme bacteriano, visto que foi capaz de causar disrupção e controlar a formação do biofilme de *C. pseudotuberculosis*.

**Palavras-chave:** compostos naturais, linfadenite caseosa, extração supercrítica

## Introdução

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença crônica e infecciosa que comumente infecta caprinos e ovinos. A doença causa inflamação do nódulo linfático, resultando na formação de material caseoso nos nos gânglios linfáticos superficiais e internos, bem como nos órgãos internos (1). *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico da LC. Este microrganismo é um patógeno intracelular obrigatório, pleomórfico, Gram-positivo e produz uma potente exotoxina, conhecida como fosfolipase D, que é considerada o principal fator de virulência (2). Acredita-se também que a gravidade desta enfermidade esteja associada à formação de biofilme do organismo causador (3).

A formação de biofilmes microbianos é uma razão importante para o fracasso da terapia antimicrobiana. Os biofilmes estão tipicamente envolvidos em infecções crônicas persistentes e representam uma das principais ameaças da medicina moderna (4). Atualmente, a maioria das estratégias de remediação de biofilme envolve o desenvolvimento de agentes inibidores de biofilme, destinados a prevenir os estágios iniciais da formação de biofilme, ou agentes de dispersão de biofilme, destinados a interromper a comunidade de células de biofilme (5).

Nesse contexto, a própolis surge como um agente antimicrobiano graças ao seu alto potencial biológico conferido pelos seus compostos bioativos, como os compostos fenólicos, flavonoides, aldeídos e álcoois aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno (6,7). Sendo assim, com este estudo objetivou avaliar a atividade antibiofilme de extratos de própolis verde e vermelha em *C. pseudotuberculosis*.

## Material e Métodos

### Definição dos extratos de própolis para ensaio de determinação da concentração inibitória mínima de biofilme (MBIC)

A escolha dos extratos de própolis do presente estudo está baseada nos resultados da atividade antibacteriana de extratos etanólicos e supercríticos de própolis vermelha, verde e marrom em cepas de *C. pseudotuberculosis* (8). Quando comparada a ação antibacteriana dos extratos supercríticos e etanólicos de própolis, o extrato etanólico de própolis verde e o extrato supercrítico de própolis vermelha apresentaram melhores atividades antibacterianas contra as cepas de *C. pseudotuberculosis* (**Tabela Suplementar 1 e Figura Suplementar 1**). A partir

deste resultado, utilizamos os melhores extratos para realização dos testes de concentração inibitória mínima de biofilme e interferência na formação de biofilme.

### **Obtenção, processamento e caracterização das amostras de própolis**

A obtenção, processamento e caracterização das amostras de própolis brasileira do presente estudo foram descritas por Machado et al. (9). A amostra de própolis vermelha (RAL) foi originada do estado de Alagoas, enquanto a amostra de própolis verde (GPR) foi originada do estado do Paraná. Aproximadamente 700-1000g de amostras de própolis foram doadas pela empresa Apis Nativa Produtos Naturais (Prodapys-Santa Catarina-Brasil), no período de julho a setembro de 2013. As amostras de própolis foram trituradas em um moedor (Cadence-Brasil) e posteriormente peneiradas (malha 60) para obter uma granulometria adequada (aproximadamente 0,250 mm), aumentando assim a área superficial, e homogeneizada para iniciar os processos de extração. Os teores de umidade, proteína, conteúdo de cinzas, lipídios totais, conteúdo mineral e a quantificação da atividade da água são descritos nas **Tabelas 1 e 2**. **Na Tabela 3** são apresentados os resultados da composição química dos extratos de própolis vermelha e verde.

**Tabela 1 - Determinação do teor de umidade, sólidos totais e cinzas totais de amostras de própolis vermelha e verde coletadas em diferentes regiões do Brasil.** RAL – própolis vermelha de Alagoas; GPR – própolis verde do Paraná.

<b>Amostras</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Sólidos Totais (%)</b>	<b>Cinzas Totais (%)</b>
RAL	7.03±0.42	92.97±0.42	0.96±0.03
GPR	7.13±0.12	92.87±0.12	3.15±0.03

Fonte: Adaptado de MACHADO et al. (9).

**Tabela 2 - Determinação do teor de proteína bruta, lipídios totais, fibras brutas e atividade da água (aw) de amostras de própolis vermelha e verde coletadas em diferentes regiões do Brasil.** RAL – própolis vermelha de Alagoas; GPR – própolis verde do Paraná.

Amostras	Proteína (%)	Lipídios (%)	Aw (%)	Fibra (%)
RAL	2.30±0.05	66.33±0.01	0.689±0.01	7.66±0.90
GPR	9.98±0.83	48.72±1.29	0.688±0.02	20.89±1.39

Fonte: Adaptado de MACHADO et al. (9).

**Tabela 3 - Determinação do teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/g), flavonóides (mg EQ/g), atividade antioxidante por DPPH (IC<sub>50</sub>) e ABTS (%) dos extratos de diferentes amostras de própolis brasileiras obtidas por extração etanólica (EtOH) e por SFE (SCO<sub>2</sub>).** RAL SCO<sub>2</sub>– extrato supercítico de própolis vermelha de Alagoas; GPR EtOH – extrato etanólico de própolis verde do Paraná.

Amostras	Compostos fenólicos totais (mg EAG/g)	Flavonóides (mg EQ/g)	DPPH(IC <sub>50</sub> )	ABTS (%) (Trolox 1 mg.ml <sup>-1</sup> )
RAL SCO <sub>2</sub>	157.16±0.01	40.65±0.01	183.11±0.31	82.80±3.50
GPR EtOH	179.52±0.01	39.90±0.01	157.39±0.26	89.90±1.80

Fonte: Adaptado de MACHADO et al. (9).

### Extração etanólica de própolis verde

O extrato de própolis foi preparado de acordo Machado et al. (9). Foram adicionados 15 ml de etanol (80%) em 2 g de própolis. A extração ocorreu em uma temperatura de 70°C durante 30 minutos sob agitação constante em uma incubadora Shaker (MA 420 / MARCONI-Brasil), com rotação de 710 x g. Em seguida, centrifugou-se o extrato (Centrifuga SIGMA 2-16 KL) a 8800 x g durante 11 min a 5 ° C. No final da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um recipiente de 50 ml e foram adicionados 10 ml de etanol (80%) ao resíduo do tubo, onde a centrifugação foi repetida. Os sobrenadantes foram homogeneizados e mantidos a 50 ° C até estarem completamente secos. Em seguida, os extratos foram armazenados em tubos cobertos

com folha de alumínio em condições atmosféricas inertes (N<sub>2</sub>), a fim de evitar a degradação do material.

### **Metodologia de extração de própolis vermelha com fluido supercrítico (CO<sub>2</sub>) utilizando etanol como co-solvente**

A extração foi realizada na unidade de Extração Supercrítica (Supercritical Fluids SFT-110) do SENAI CIMATEC. A unidade é equipada com bomba para dióxido de carbono líquido, rotâmetro, cilindro de CO<sub>2</sub> (99% de pureza), totalímetro e uma célula de extração de 100 mL. A amostra de própolis vermelha foi extraída a 40°C, pressão de 300 bar, S / F de 110 (massa de CO<sub>2</sub> [solvente] / massa de própolis [soluto]), 1% de co-solvente (etanol m / m), fluxo de CO<sub>2</sub> de 6 g / min e tempo total de extração de aproximadamente 2 h 30 min (9).

### **Cepas Bacterianas**

Para a análise *in vitro* da susceptibilidade bacteriana aos extratos de própolis, foram utilizadas quatro cepas de referência de *C. pseudotuberculosis* : a cepa 1002, que é utilizada como referência no projeto do genoma da bactéria (10) e já teve seu todo genoma sequenciado (GenBank CP001809.2); a cepa VD57, que é uma cepa altamente virulenta isolada de uma lesão de LC de caprino (11), que possui genoma sequenciado (GenBank CP009927.1); a cepa N1, que é uma cepa viscerotrópica isolada de uma lesão pulmonar de LC de ovelha (12), com genoma sequenciado (CP013146); ; e a cepa CAPJ4 (13), que é uma cepa produtora de biofilme e possui o genoma sequenciado (CP026499). Todas as cepas de *C. pseudotuberculosis* aqui utilizadas pertencem ao biovar *ovis*. Também foram adicionados ao experimento isolados oriundos de amostras caseosas coletadas de ovinos submetidos à excisão da lesão de LC (1).

### **Ensaio de formação de biofilme**

A análise semi-quantitativa da produção de biofilme seguiu a metodologia descrita por Kalil et al. (1). Isolados de *C. pseudotuberculosis* foram inoculados em 3 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubados a 37 °C até obtenção de densidade óptica (DO) de 0.2 (aproximadamente 3 x 10<sup>8</sup> UFC/mL de *E. coli*) por espectroscopia de absorção UV-vis (λ = 595

nm). Em seguida, 200  $\mu$ L dessa suspensão bacteriana foram transferidos para microplacas estéreis e incubados a 37 ° C por 48 h. Após a incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado e os poços foram lavados duas vezes com 200  $\mu$ L de PBS 0,01 M pH 7,2. As bactérias que permaneceram aderidas foram fixadas com 200  $\mu$ L de metanol e deixadas na incubadora até a secagem. Os poços foram então corados com 200  $\mu$ L de uma solução de violeta cristal a 2% por 5 min e depois lavados com água destilada. O corante impregnado nas células bacterianas aderentes foi então eluído com 160  $\mu$ L de uma solução de ácido acético a 33%. Como controle negativo para este teste, utilizamos poços com TSB e sem inóculo. A cepa CAPJ4 de *C. pseudotuberculosis* foi utilizada como cepa controle formadora de biofilme. A DO de cada poço foi medida em um comprimento de onda de 595 nm. Para caracterizar a intensidade de formação do biofilme, foram utilizadas as seguintes equações, onde ODI indica a densidade óptica do isolado e ODNC representa a densidade óptica do controle negativo:  $ODI \leq ODNC$  = nenhum desenvolvimento de biofilme;  $ODI / ODNC \leq 2$  = formação fraca de biofilme;  $ODI / ODNC \leq 4$  = capacidade moderada de produção de biofilme;  $ODI / ODNC > 4$  = forte capacidade de produção de biofilme [15].

#### **Determinação da concentração inibitória mínima em biofilme (MBIC)**

O ensaio de ação antibiofilme dos extratos de própolis seguiu a metodologia de Nostro et al.(14), com adaptações. Os isolados de *C. pseudotuberculosis* foram inoculados em 3 mL de TSB e incubados a 37 °C por 48 horas. Após esse período, as suspensões bacterianas foram padronizadas em caldo TSB com DO de 0.2 em comprimento de onda de 595 nm, e 200  $\mu$ L destas suspensões foram transferidas para os poços das microplacas e incubadas a 37 °C por 48h. Após a consolidação do biofilme, levando em consideração concentrações sub-ótimas (1, 2 e 4 mg/mL) obtidas anteriormente em ensaios de concentração inibitória mínima (MIC) em *C. pseudotuberculosis* planctônico, 200 $\mu$ L dos extratos de própolis foram inoculados nos poços com biofilme consolidado. Em seguida, as microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 48 horas. A DO, mensurada em 595 nm, foi determinada logo após a adição do antimicrobiano (DO0h), em 24h (DO24h) e 48h (DO48h) após o experimento. A MBIC foi definida como a concentração mais baixa do antimicrobiano em que não houve aumento dependente do tempo no número médio de células viáveis do biofilme quando um tempo de exposição precoce foi comparado com um tempo de exposição posterior (15).



### Ensaio de interferência na formação de biofilme

Para avaliar a ação dos extratos de própolis na interferência na formação de biofilme, os isolados de *C. pseudotuberculosis* foram inoculados em 3 mL de TSB e incubados a 37 °C por 48 horas. Após esse período, as suspensões bacterianas foram padronizadas em caldo TSB com DO de 0.2 em comprimento de onda de 595 nm. Em seguida, 100 µL das suspensões bacterianas padronizadas e 100 µL dos extratos de própolis, em diferentes concentrações (8, 4, 2 e 1 mg/mL), foram inoculados nos poços de uma microplaca estéril e incubados a 37 °C por 48 h. O biofilme formado foi detectado após 48 horas e a porcentagem de inibição da produção do biofilme foi calculada considerando as suspensões bacterianas controle que não foram incubadas com extratos (1).

### Microscopia Eletrônica de Varredura

Os biofilmes consolidados expostos e não expostos aos extratos de própolis foram fixados sequencialmente em dois fixadores: (i) glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 1-2 h, seguido por três lavagens com o mesmo tampão; (ii) tetróxido de ósmio 1% em cacodilato de sódio 0,1 M por 1 h em temperatura ambiente, e lavado três vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4. Após a fixação, os biofilmes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (de 30%, 50%, 70, 90% e álcool absoluto) e secos em equipamento Ponto Crítico Leica CPD 030 com CO<sub>2</sub> como meio de transição. Os biofilmes foram examinados pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL (JSM-6390LV), operando em 15kV.

### Análise estatística

A porcentagem de inibição do biofilme foi calculada pela seguinte fórmula (16):

$$\% \text{ inibição de biofilme} = 1 - \frac{\text{OD}_{595} \text{ de } C. \text{ pseudotuberculosis} \text{ tratada com extrato}}{\text{OD}_{595} \text{ de } C. \text{ pseudotuberculosis} \text{ não tratado}} \times 100$$

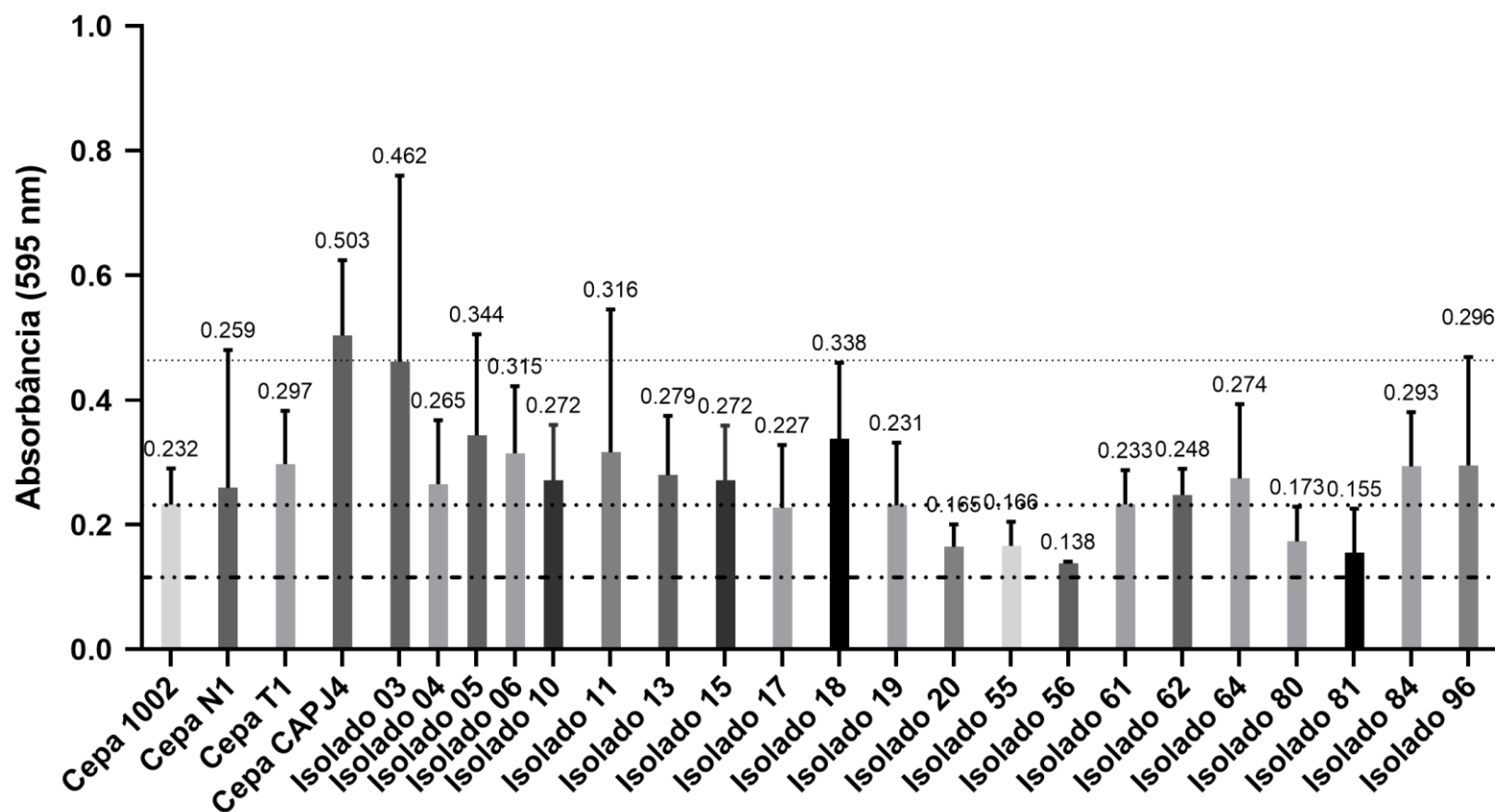
Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados foram analisados por meio do teste *t* e análise de variância (ANOVA), com nível de significância estatística de 95% ( $p < 0,05$ ). O *software* utilizado para a análise foi o *GraphPad Prism 8*.

## Resultados

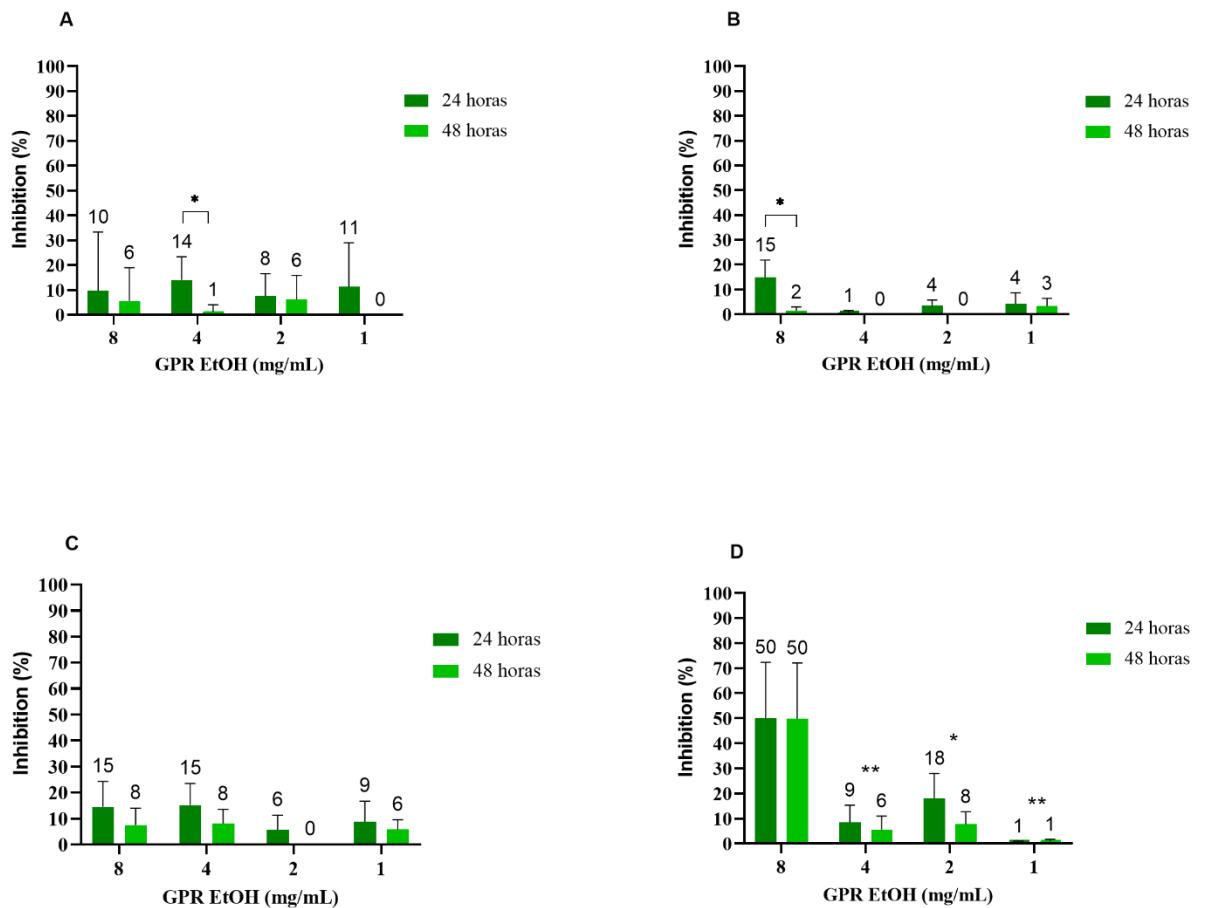
O teste de determinação da capacidade de produção de biofilme (**Figura 1**) classificou todas as bactérias como formadoras de biofilme. As cepas 1002, N1 e VD57 foram caracterizadas como produtoras moderadas de biofilme. A cepa CAPJ4 foi caracterizada como forte produtora de biofilme, enquanto os isolados clínicos tiveram diferentes comportamentos: 5 em 21 (23,8 %) foram fracas produtoras de biofilme, 15 em 21 (71,4 %) tinham um perfil moderado de produção de biofilme, e 1 em 21 (4,8 %) era forte produtora de biofilme.

Os resultados da atividade antibiofilme do extrato etanólico de própolis verde indicam que houve disrupção do biofilme consolidado de *C. pseudotuberculosis*. Foi observada uma diferença na ação antibiofilme do extrato nas primeiras 24 horas ( $p < 0,02$ ) para as cepas 1002 e N1 em comparação ao período total de avaliação de 48 horas. Uma ação antibiofilme moderada foi encontrada para a cepa de referência para produção de biofilme CAPJ4 ( $p < 0,006$ ) e para os isolados clínicos 06 e 15 ( $p = 0,009$ ) na concentração de 8mg/mL. O extrato foi mais eficaz na disrupção do biofilme do isolado 96 ( $p < 0,0001$ ), com redução do biofilme igual ou superior a 65% na concentração de 8mg / mL em até 48 horas (**Figuras 2 e 3**).

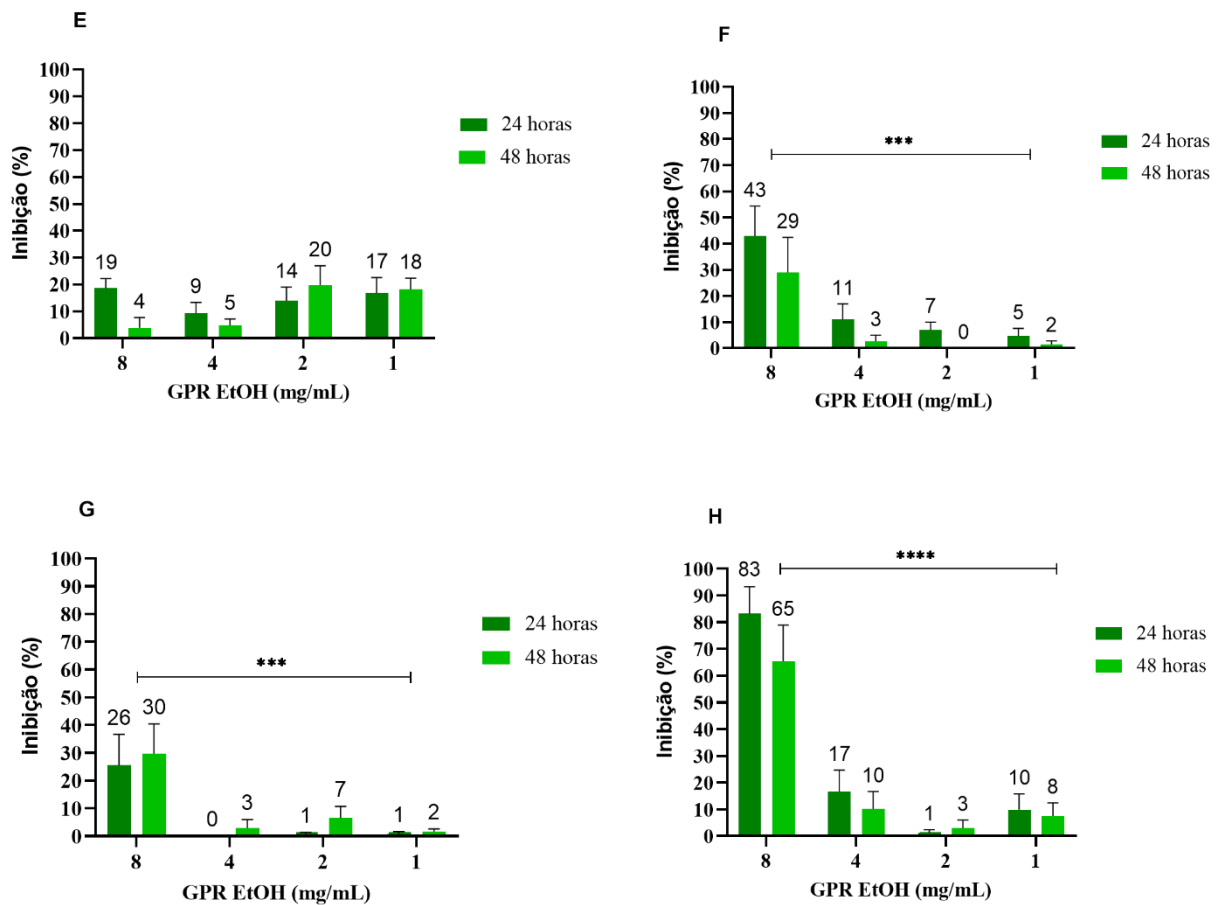
Em relação aos resultados de inibição do extrato supercrítico de própolis vermelha (**Figura 4 e 5**), ficou evidente que atividade antibiofilme em *C. pseudotuberculosis* foi inferior ao extrato etanólico de própolis verde. As porcentagens de inibição entre as cepas de referência e os isolados clínicos atingiram no máximo 39 % no microrganismo mais sensível, o isolado 96. Encontramos também uma atividade antibiofilme significativa ( $p < 0,03$ ) na concentração de 8 mg/ mL entre todas as concentrações testadas frente o isolado clínico 15.



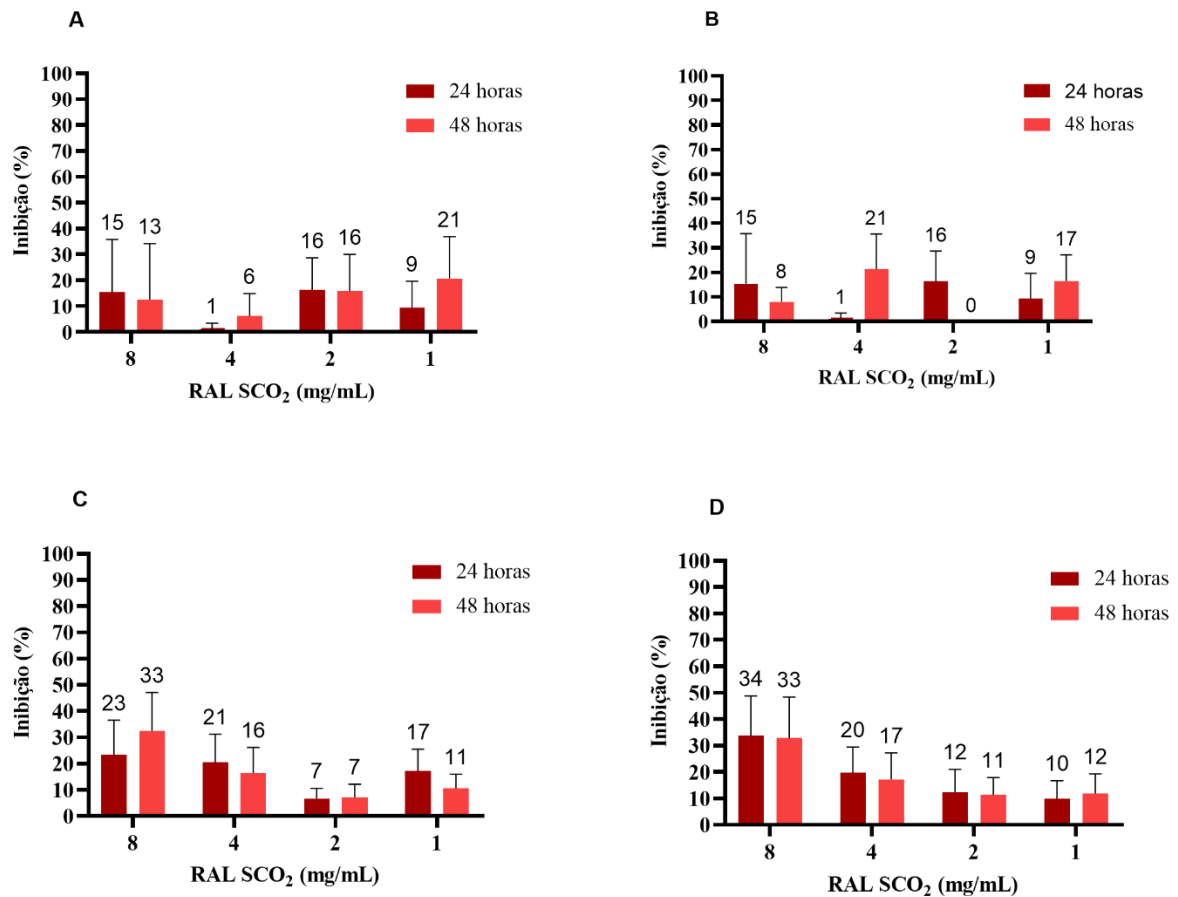
**Figura 1.** Semi-quantificação de biofilme de cepas de referência e isolados clínicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A linha tracejada indica o valor de médio do controle negativo ( $DO_{595} < 0,116$ ), fraco produção de biofilme ( $DO_{595}$  entre 0,116 e 0,232), moderado produção de biofilme ( $DO_{595}$  entre 0,232 e 0,464) e forte produção de biofilme ( $DO_{595} > 0,464$ ). As barras indicam o desvio padrão de dois experimentos independentes.



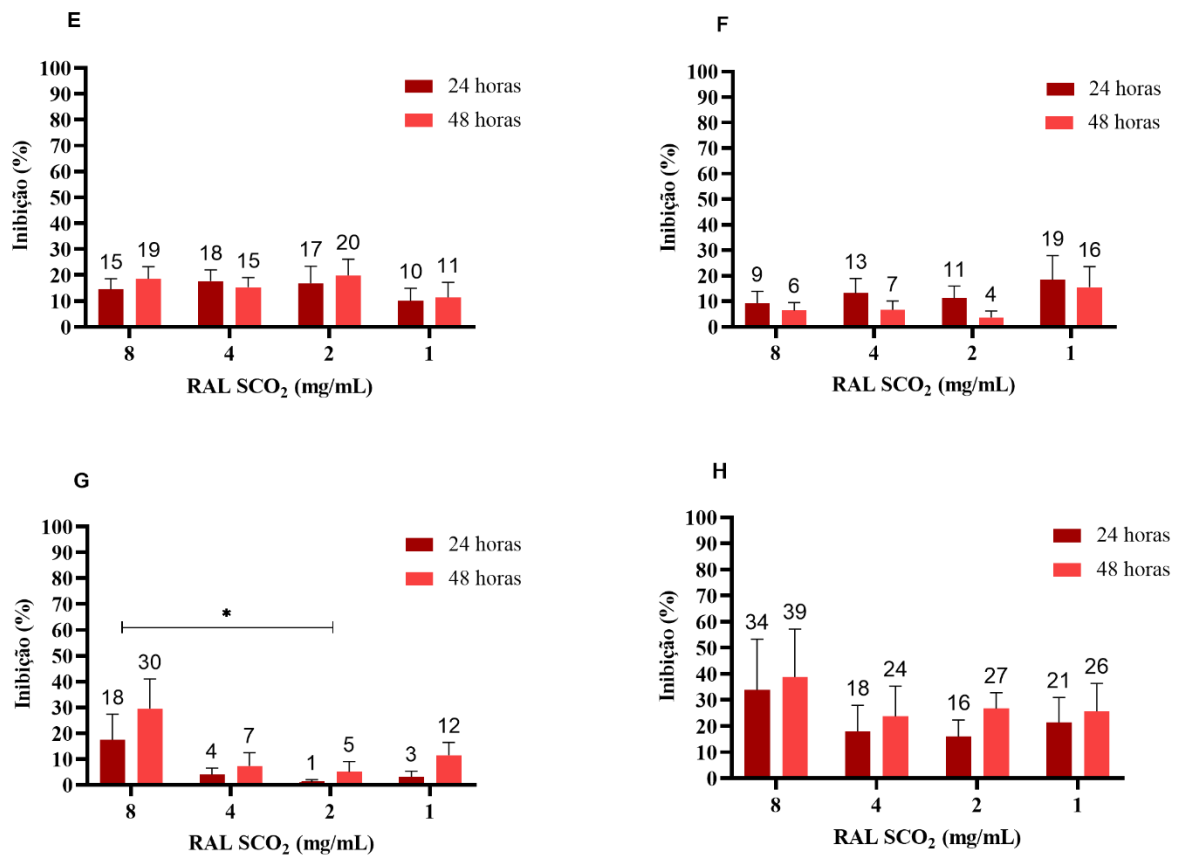
**Figura 2. Atividade antibiofilme do extrato etanólico de própolis verde (GPR EtOH) em biofilme consolidado de *C. pseudotuberculosis*. Cepas 1002 (A), N1 (B), VD57 (C) e CAPJ4 (D).** As barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. Os valores acima das barras representam o valor médio de disrupção de biofilme consolidado (%). Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre as células bacterianas tratadas com diferentes concentrações de extratos de própolis e em diferentes tempos, analisadas por meio de análise de variância (one-way ANOVA) e teste *t*. \* $p = 0,02$ ; \*\* $p \leq 0,006$ .



**Figura 3. Atividade antibiofilme do extrato etanólico de própolis verde (GPR EtOH) em biofilme consolidado de *C. pseudotuberculosis*. Isolados clínicos 05 (E), 06 (F), 15 (G) e 96 (H).** As barras representam o desvio padrão da porcentagem de inibição dos isolados. Os valores acima das barras representam o valor médio de disrupção de biofilme consolidado (%). Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre as células bacterianas tratadas com diferentes concentrações de extratos de própolis e em diferentes tempos, analisadas por meio de análise de variância (one-way ANOVA) e teste *t*. \*\*\* $p = 0,009$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .



**Figura 4. Atividade antibiofilme do extrato supercrítico de própolis vermelha (RAL SCO<sub>2</sub>) em biofilme consolidado de *C. pseudotuberculosis*. Cepas 1002 (A), N1 (B), VD57 (C) e CAPJ4 (D).** As barras representam o desvio padrão da porcentagem de inibição dos isolados. Os valores acima das barras representam o valor médio de ruptura de biofilme consolidado (%). Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre as células bacterianas tratadas com diferentes concentrações de extratos de própolis e em diferentes tempos, analisadas por meio de análise de variância (one-way ANOVA) e teste *t*.



**Figura 4. Atividade antibiofilme do extrato supercrítico de própolis vermelha (RAL SCO<sub>2</sub>) em biofilme consolidado de *C. pseudotuberculosis*. Isolados clínicos 05 (E), 06 (F), 15 (G) e 96 (H). As barras representam o desvio padrão da porcentagem de inibição dos isolados. Os valores acima das barras representam o valor médio de interrupção de biofilme consolidado (%). Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre as células bacterianas tratadas com diferentes concentrações de extratos de própolis e em diferentes tempos, analisadas por meio de análise de variância (one-way ANOVA) e teste *t*. \**p* < 0,03;**

O extrato etanólico de própolis verde foi eficaz na interferência da formação de biofilme de *C. pseudotuberculosis*, com interferência superior a 50% na maioria das cepas de referência e isolados clínicos, exceto para a cepa 1002 (Tabela 4).

**Tabela 4. Interferência por extrato etanólico de própolis verde na formação de biofilme de *C. pseudotuberculosis*.** Os resultados são expressos em porcentagem de redução de formação de biofilme (%) e desvio padrão, e correspondem à média de três experimentos independentes.

Cepa de <i>C. pseudotuberculosis</i>	Concentração de extrato etanólico de própolis verde (mg/mL)			
	8	4	2	1
<b>1002</b>	53 ± 33	48 ± 19	60 ± 24	48 ± 24
N1	44 ± 30	46 ± 20	45 ± 21	30 ± 18
<b>VD57</b>	80 ± 24	67 ± 17	74 ± 12	61 ± 18
<b>CAPJ4</b>	82 ± 16	75 ± 20	71 ± 31	53 ± 42
<b>Isolado 05</b>	79 ± 7	76 ± 7	79 ± 9	78 ± 6
<b>Isolado 06</b>	40 ± 22	64 ± 14	51 ± 24	42 ± 27
<b>Isolado 15</b>	74 ± 13	84 ± 10	86 ± 8	83 ± 9
<b>Isolado 96</b>	83 ± 7	86 ± 8	86 ± 7	76 ± 10

O extrato supercrítico de própolis vermelha também mostrou ser eficaz na interferência da formação de biofilme de *C. pseudotuberculosis* com redução maior que 50% entre a maioria dos isolados, exceto para a cepa 1002 (**Tabela 5**).

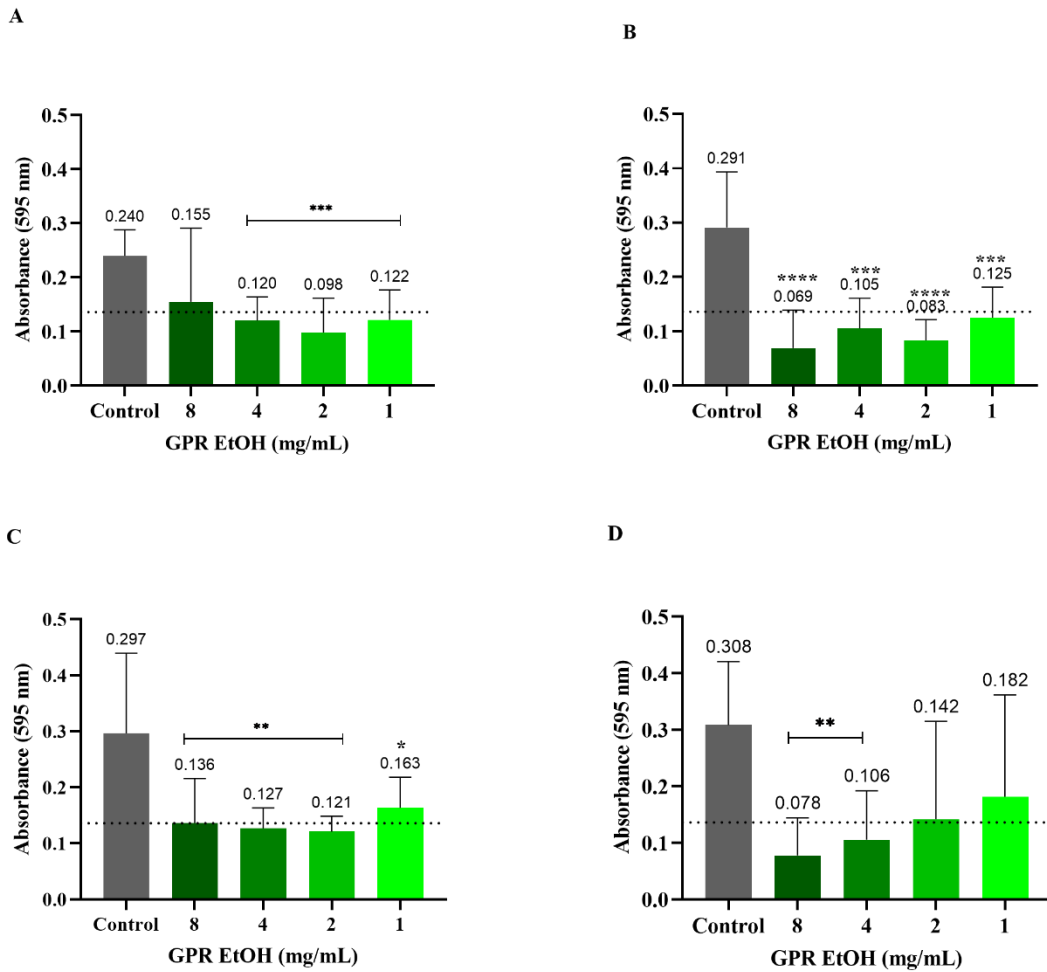
A ação de interferência na formação de biofilme também é visualizada pela redução da DO<sub>595</sub> dos isolados após 48 horas sob ação dos extratos de própolis. O extrato etanólico de própolis verde impediu a formação de biofilme entre a maioria dos isolados nas maiores concentrações testadas (4, 2 e 1 mg/mL). Entretanto, é possível observar uma fraca formação de biofilme no isolado clínico 05 em todas as concentrações. As cepas N1 e CAPJ4 e o isolado 05 formaram um fraco biofilme nas menores concentrações de extrato (**Figuras 6 e 7**).



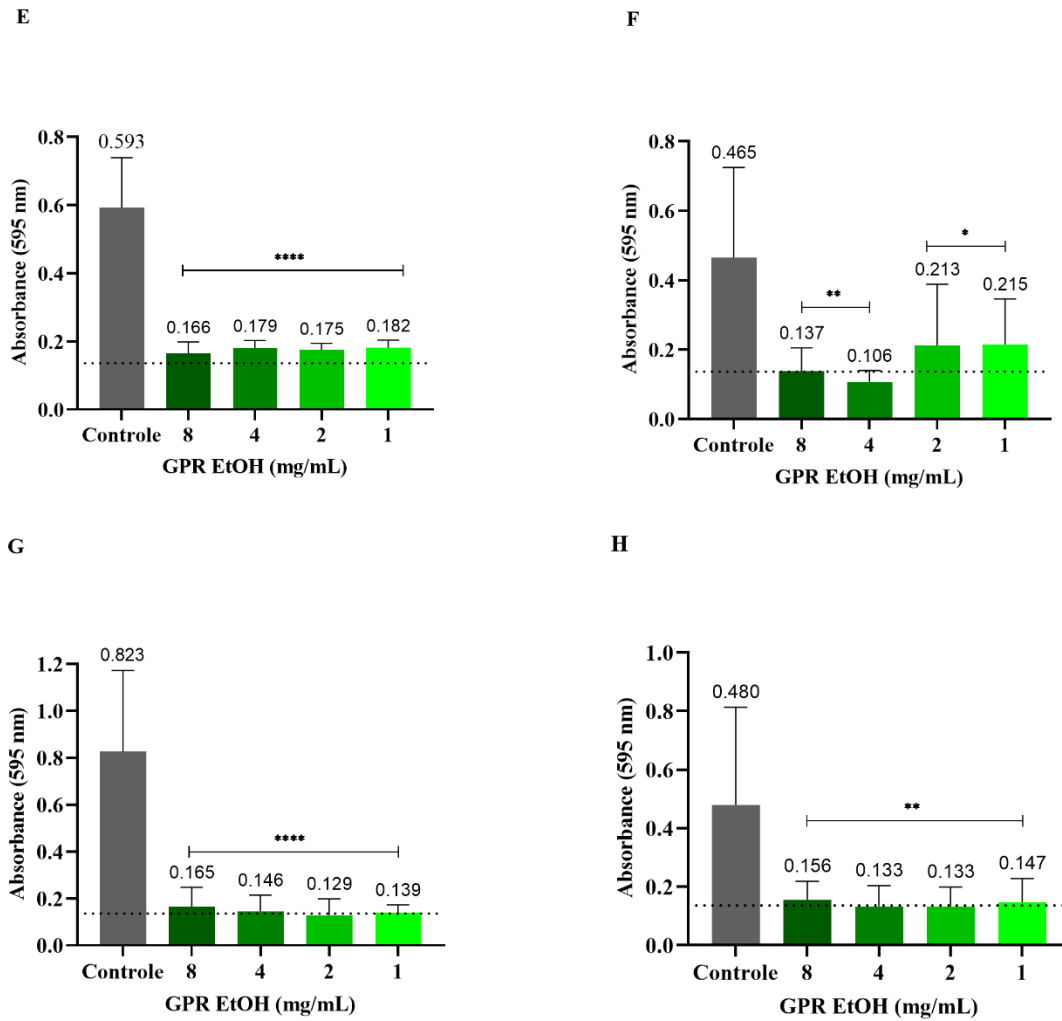
**Tabela 5. Interferência por extrato supercrítico de própolis vermelha na formação de biofilme de *C. pseudotuberculosis*.** Os resultados são expressos em porcentagem de redução de formação de biofilme (%) e desvio-padrão, e correspondem à média de três experimentos independentes.

Cepa de <i>C. pseudotuberculosis</i>	Concentração de extrato supercrítico de própolis vermelha (mg/mL)			
	8	4	2	1
<b>1002</b>	21 ± 14	36 ± 17	34 ± 31	48 ± 33
<b>N1</b>	49 ± 9	59 ± 10	43 ± 16	46 ± 19
<b>VD57</b>	87 ± 7	80 ± 8	73 ± 3	65 ± 17
<b>Cepa CAPJ4</b>	68 ± 8	80 ± 7	82 ± 9	79 ± 17
<b>Isolado 05</b>	77 ± 8	79 ± 8	75 ± 15	73 ± 16
<b>Isolado 06</b>	39 ± 16	79 ± 11	61 ± 24	74 ± 10
<b>Isolado 15</b>	70 ± 11	83 ± 7	81 ± 7	75 ± 6
<b>Isolado 96</b>	86 ± 6	85 ± 5	84 ± 10	85 ± 14

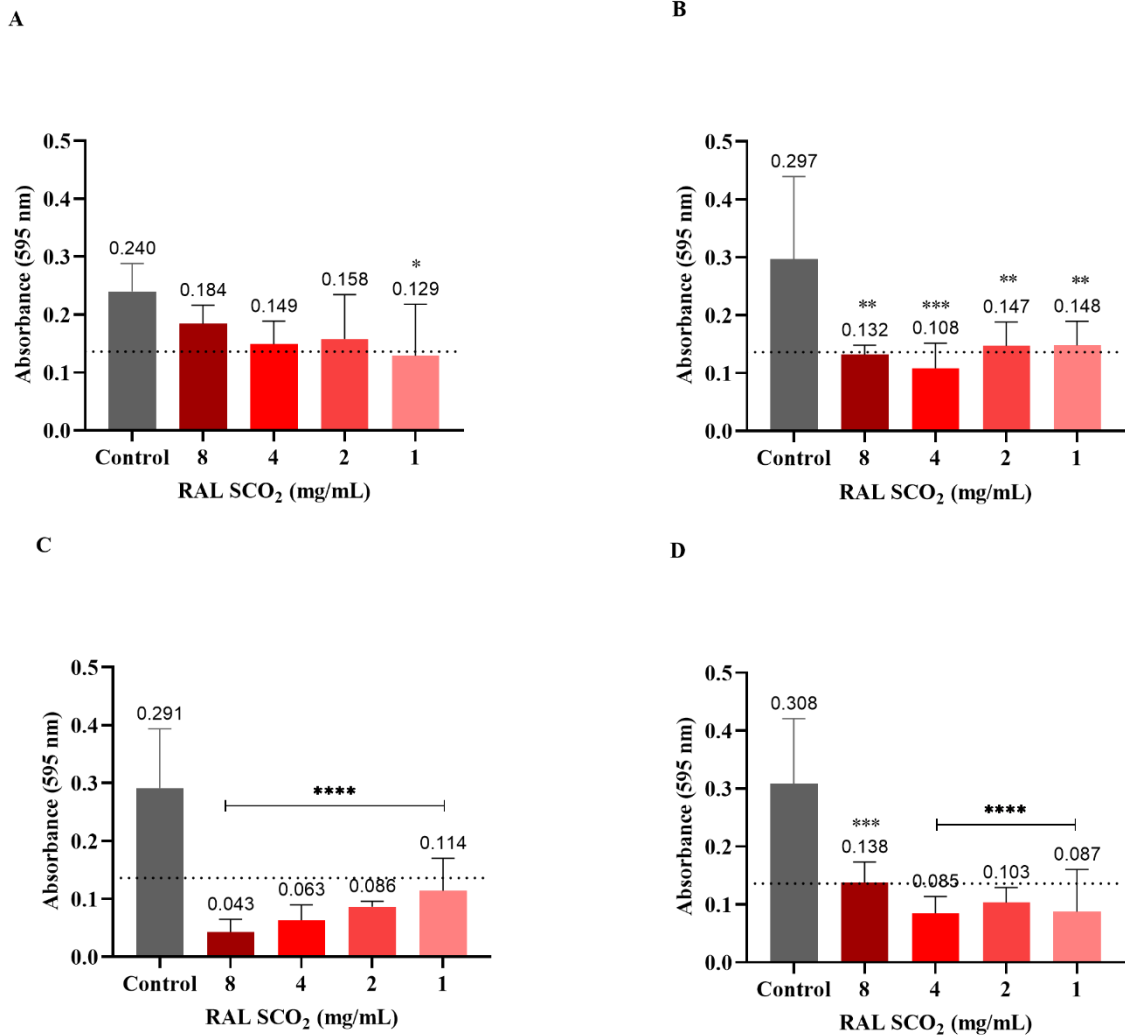
O extrato supercrítico de própolis vermelha impediu a formação de biofilme entre a maioria dos isolados nas maiores concentrações testadas (4, 2 e 1 mg/mL) semelhante ao extrato etanólico verde. Porém, menor ação antibiofilme do extrato supercrítico vermelho foi observada na cepa 1002 em todas as concentrações. Uma fraca formação de biofilme também é observada na cepa N1 e no isolado 05 na concentração de 1 mg/mL (**Figura 8 e 9**).



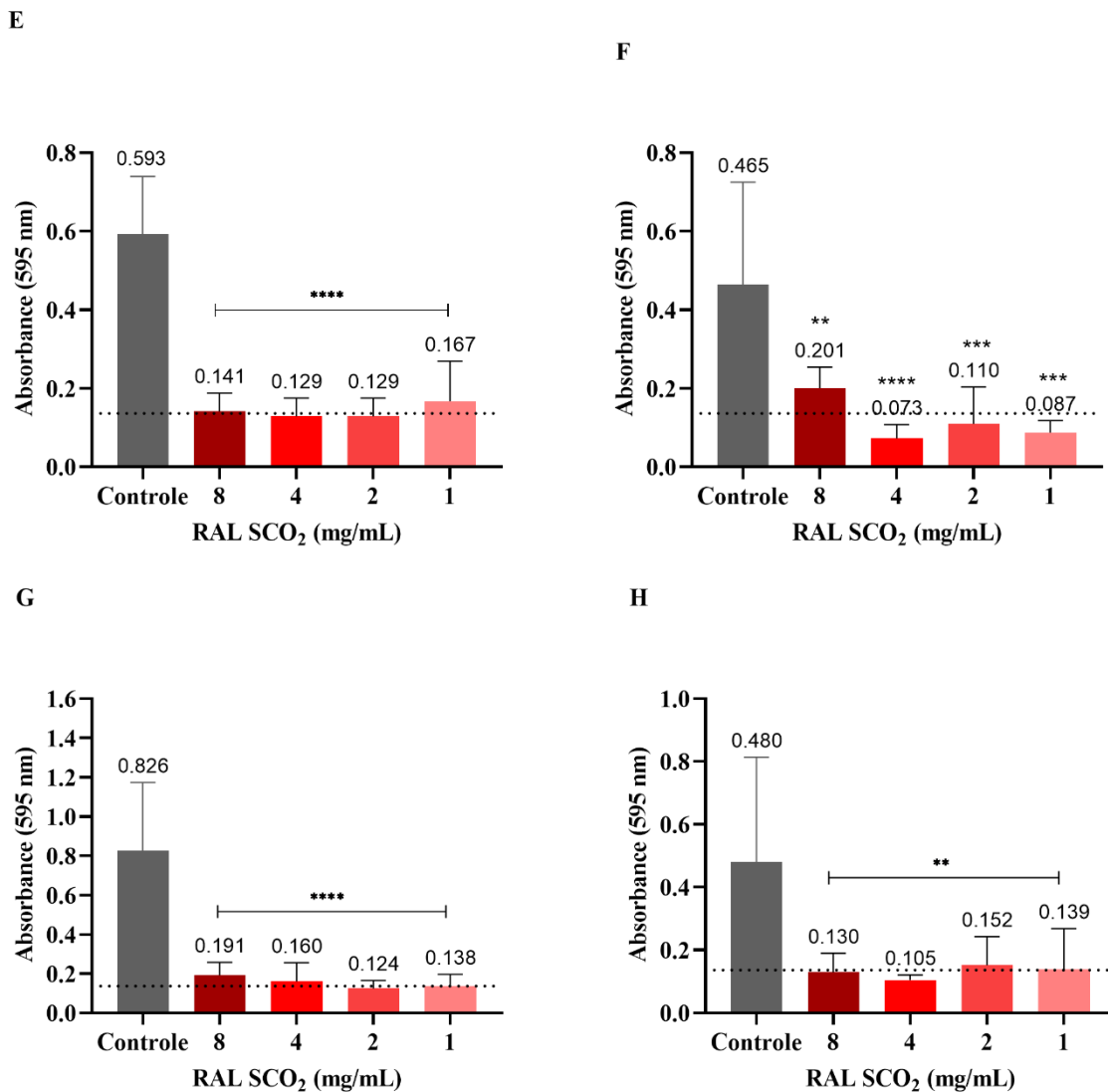
**Figura 6. Interferência na formação de biofilme do extrato etanólico de própolis verde em cepas referências de *C. pseudotuberculosis*. Cepas 1002 (A), N1 (B), VD57 (C) e CAPJ4 (D).** As barras representam o desvio padrão da  $DO_{595}$ . A linha tracejada indica o valor de médio do controle negativo ( $DO_{595} = 0.136$ ). Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre as células bacterianas não tratadas e tratadas com diferentes concentrações de própolis, analisadas por meio de análise de variância (one-way ANOVA). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,04$ ; \*\*\* $p \leq 0,003$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



**Figura 7. Interferência na formação de biofilme do extrato etanólico de própolis verde em isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis*. Cepas 1002 (A), N1 (B), VD57 (C) e CAPJ4 (D).** As barras representam o desvio padrão da  $DO_{595}$ . A linha tracejada indica o valor de médio do controle negativo ( $DO_{595} = 0.136$ ). Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre as células bacterianas não tratadas e tratadas com diferentes concentrações de própolis, analisadas por meio de análise de variância (one-way ANOVA). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,04$ ; \*\*\* $p \leq 0,003$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



**Figura 8. Interferência na formação de biofilme do extrato supercrítico de própolis vermelha em cepas referência de *C. pseudotuberculosis*. Cepas 1002 (A), N1 (B), VD57 (C) e CAPJ4 (D).** As barras representam o desvio padrão da DO<sub>595</sub>. A linha tracejada indica o valor de médio do controle negativo (DO<sub>595</sub>= 0.136) e de *C. pseudotuberculosis* com fraca produção de biofilme (DO<sub>595</sub>> 0.136) após o tratamento. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre as células bacterianas não tratadas e tratadas com diferentes concentrações de própolis, analisadas por meio de análise de variância (one-way ANOVA). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,02$ ; \*\*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

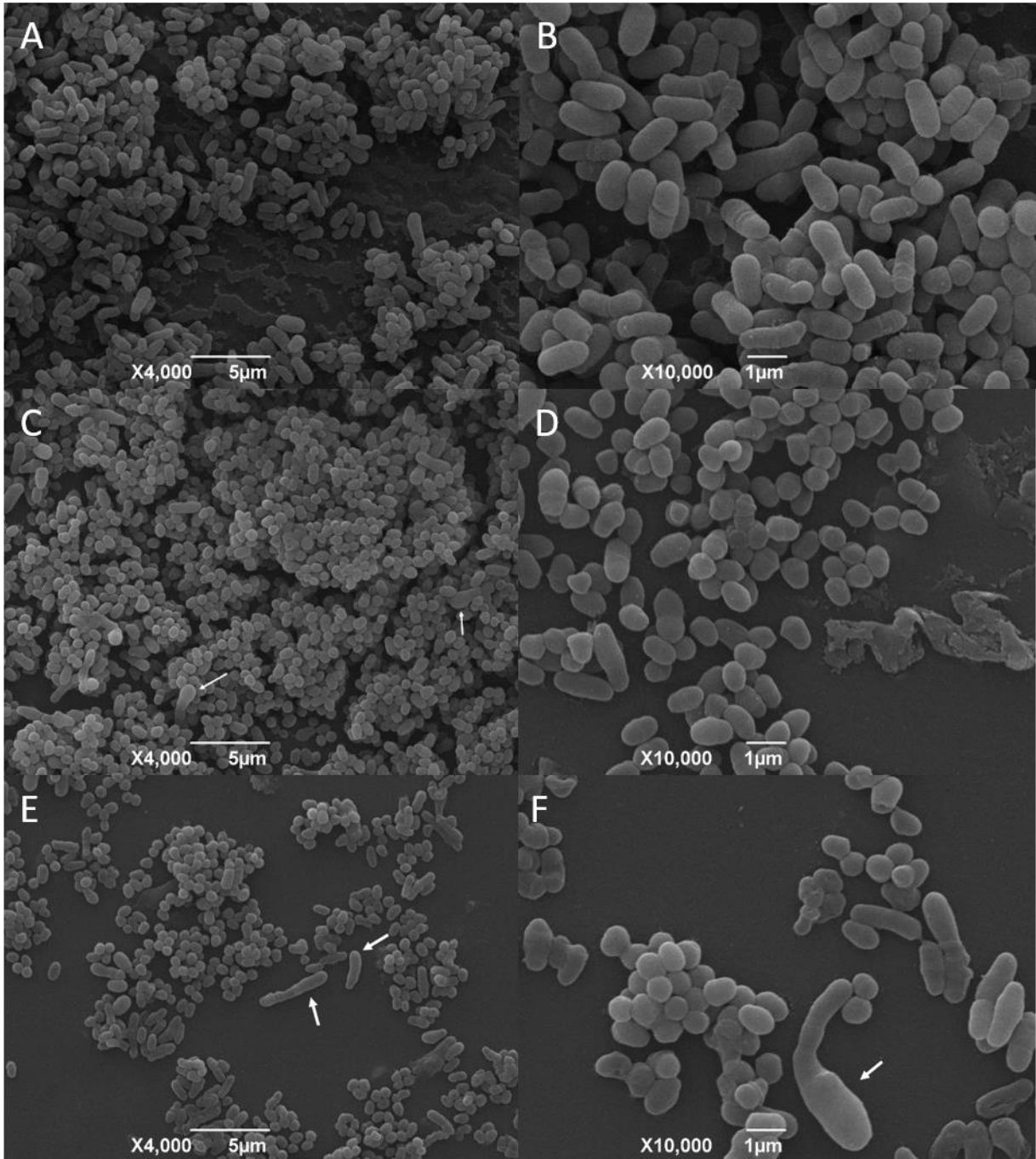


**Figura 9. Interferência na formação de biofilme do extrato supercrítico de própolis vermelha em isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis*. Isolados clínicos 05 (E), 06 (F), 15 (G) e 96 (H).** As barras representam o desvio padrão da DO<sub>595</sub>. A linha tracejada indica o valor de médio do controle negativo (DO<sub>595</sub>= 0.136) e de *C. pseudotuberculosis* com fraca produção de biofilme (DO<sub>595</sub>> 0.136) após o tratamento. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre as células bacterianas não tratadas e tratadas com diferentes concentrações de própolis, analisadas por meio de análise de variância (one-way ANOVA). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,02$ ; \*\*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

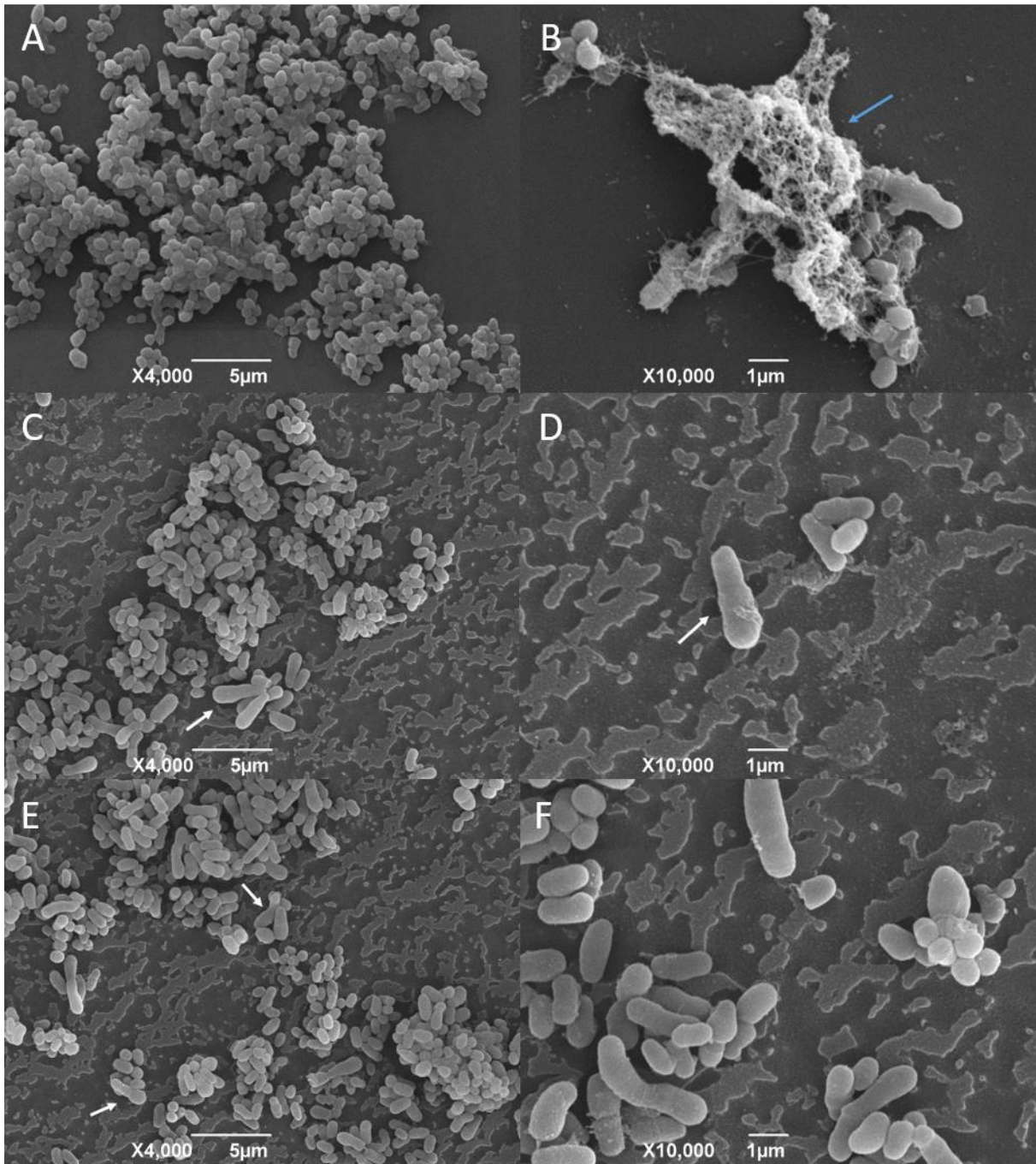
O biofilme de *C. pseudotuberculosis* cultivado por 48 horas apresentou uma morfologia celular semelhante às células planctônicas, exibindo formas pleomórficas, como cocos e bastonetes, e tamanhos variados (Figura 10A, 10B e 11A). Foi possível notar a presença de

macrocolônias de biofilme maduro (Figura 11 B), cuja principal característica é a formação de uma matriz exopolissacarídea amorfa.

O efeito dos extratos etanólico de própolis verde e supercrítico de própolis vermelha em biofilme consolidado é mostrado nas Figuras 1 e 2. Nenhuma mudança significativa foi observada quanto a disrupção do biofilme de *C. pseudotuberculosis*. O biofilme apresentou mudanças significativa apenas na morfologia, com predominância de formas de cocos e ausência de uma matriz extracelular amorfa que outrora foi encontrado nos biofilmes não tratados. Alterações na morfologia celular foi observada em algumas células bacterianas, que apresentaram aumento de tamanho e deformidade. Portanto, foi evidente que os extratos de própolis apresentaram atividade antibiofilme contra os biofilmes consolidados de *C. pseudotuberculosis*.



**Figura 10.** Micrografias representativas de microscopia eletrônica de varredura da estrutura de biofilmes maduros de *C. pseudotuberculosis* não expostos (A e B) e expostos ao extrato etanólico de própolis verde (C, D, E e F). As setas brancas indicam deformidades celulares.



**Figura 11.** Micrografias representativas de microscopia eletrônica de varredura da estrutura de biofilmes maduros de *C. pseudotuberculosis* não expostos (A e B) e expostos ao extrato supercrítico de própolis vermelha (C, D, E e F). A seta azul indica a presença da matriz de exopolissacarídeo em uma macrocolônia de biofilme maduro. As setas brancas indicam deformidades celulares.



## Discussão

Neste estudo investigamos a formação de biofilme em superfície abiótica por cepas de referência e isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis*. Em geral, as características bacterianas que determinam o grau de fixação a tais superfícies são de natureza físico-química (17), tais como temperatura, pH e força iônica e mais notadamente a hidrofobicidade, que é determinada pela composição geral da superfície bacteriana (18). De Souza et al. (19) relatam a forte aderência da cepa 1987/I-MDR de *C. striatum* em superfície do cateter de poliuretano, vidro e em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços carregada negativamente. Em isolados fecais de *Rhodococcus equi*, a glicose parece ser um substrato importante para a formação de biofilme em placas de microtitulação de 96 poços (20), enquanto que em *C. pseudotuberculosis*, os carboidratos fornecem a estrutura para biofilmes, permitindo a estratificação da população bacteriana e a troca de nutrientes e resíduos (3).

Com base em perfis metabolômicos globais, bactérias com fraca e forte formação de biofilme apresentam-se como dois grupos distintos. Bactérias com fraca formação de biofilme produzem mais metabólitos do que bactérias com forte produção de biofilme. A fraca formação de biofilme produz uma quantidade maior e mais diversa de metabólitos, indicando atividades metabólicas endógenas mais altas (especialmente o metabolismo lipídico), com as bactérias apresentando uma maior tendência de permanecer em seu estado planctônico, de flutuação livre, do que bactérias com forte produção de biofilme (21). Tais resultados podem justificar os perfis distintos da produção de biofilme entre os isolados de *C. pseudotuberculosis*.

Bactérias com produções de biofilme de fraca a forte aderência podem apresentar fenótipos MDR (multirresistência) e esta característica pode desempenhar um papel vital nos processos patológicos por um longo período ao resistir ao efeito dos mecanismos de defesa imunológica e de agentes antimicrobianos (22). A princípio, não foi possível observar uma associação entre a formação de biofilme dos isolados clínicos do nosso estudo e o caráter crônico da LC, pois não houve diferenças significativas nos parâmetros clínicos dos animais e nem efeito sobre os níveis da resposta humoral específica para *C. pseudotuberculosis* notados em estudo anterior (1).

Produtos naturais derivados de plantas possuem atividades antimicrobiana e antibiofilme *in vitro*. Os principais efeitos antibiofilme de produtos naturais baseiam-se principalmente na inibição da formação da matriz exopolimérica, na supressão da adesão e fixação celular, interrupção da geração de matriz extracelular e diminuição da produção de fatores de virulência,

bloqueando assim a rede *quorum sensing* e o desenvolvimento do biofilme (23). A própolis tem sido alvo de diversos estudos por ser uma fonte promissora de compostos bioativos, como os compostos fenólicos, flavonoides, isoflavonoides, triterpenóides, benzofenonas preniladas, ácido caféico, ácido elágico, ácido *p*- cumárico, vitexina, luteolina, rutina, quercetina e apigenina, que conferem principalmente atividades antibacterianas e antifúngicas (24). Observamos uma menor eficácia dos extratos de própolis em biofilmes consolidados de algumas cepas de referência e isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis*, muito provavelmente porque bactérias em biofilmes são inerentemente mais tolerantes ao tratamento antimicrobiano quando comparadas diretamente às células planctônicas da mesma cepa (5), e as concentrações aqui utilizadas para os ensaios se basearam em valores de MIC obtidos para as células planctônicas.

Diversos estudos descrevem a atividade antibiofilme de extratos de própolis contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. De Marco et al. (25) concluíram que os extratos de própolis e resina *Populus nigra* foram capazes de inibir a formação de biofilme de *P. aeruginosa*. Os extratos etanólicos de própolis utilizados por Grecka et al. (26) eliminaram efetivamente o biofilme de *S. aureus*, bem como as células planctônicas com valores de concentração de erradicação de biofilme (MBEC<sub>50</sub>) de até 128 µg / mL. Deve-se considerar que a atividade dos extratos de própolis em biofilme consolidado pode estar associada às características do próprio microrganismo, principalmente quando o mecanismo de ação dos extratos está relacionado a seu efeito na permeabilidade da membrana celular e rompimento da parede celular. Isto é evidente quando se observa que a atividade antibacteriana da própolis é maior em bactérias Gram-negativas do que Gram-positivas devido à estrutura espécie-específica da membrana externa das bactérias Gram-negativas e pela produção de enzimas hidrolíticas que quebram os ingredientes ativos da própolis (27,28). A maioria das espécies do gênero *Corynebacterium* são caracterizadas por uma arquitetura complexa da parede celular, cuja camada externa de ácidos micólicos é funcionalmente equivalente à membrana externa de bactérias Gram-negativas, e na camada superior é encontrado material de superfície externa composto de polissacarídeos, glicolipídios e proteínas livres, incluindo proteínas da camada S, pili e outras proteínas (29).

De todo modo, nossos resultados são promissores, visto que há um progresso recente em pesquisas utilizando produtos naturais com o objetivo de enfrentar a resistência e tolerância a antibióticos, que são atuais problemas globais (30). Isso se torna mais evidente quando estudos recentes, como descrito por Rampacci *et al.* (31), demonstrou experimentalmente que o aumento das concentrações de MIC (10x) de azitromicina e rifampicina sozinhas e combinadas não erradicou o biofilme pré-formado de *Rhodococcus equi*, enquanto que um isolado resistente à

rifampicina produziu uma matriz extracelular excepcionalmente abundante. Em biofilme de *C. diphtheriae*, todas as cepas aumentaram a formação de biofilme no vidro após o tratamento com concentrações subMICs de eritromicina, enquanto apenas uma cepa aumentou a aderência ao vidro após o cultivo na presença de concentrações subMICs penicilina. Tais resultados indicam que a formação de biofilme induzida por esses antibióticos podem contribuir para o insucesso da terapia antimicrobiana contra infecções por *C. diphtheriae* (32), o que difere dos nossos dados onde as concentrações subinibitória dos extratos de própolis demonstraram alguma eficácia frente aos biofilmes consolidados de *C. pseudotuberculosis*.

Sabe-se que a extração com etanol obtém extratos de própolis pobre em cera e ricos em compostos biologicamente ativos, enquanto que com a extração com fluido supercrítico, é possível obter compostos lipofílicos que, do ponto de vista qualitativo, apresentam uma composição diferente de moléculas bioativas em comparação com os extratos obtidos por técnicas convencionais (27,33). Entretanto, quando comparamos os dois métodos de extração de própolis, etanólico e supercrítico, não observamos diferenças significativas na atividade antibacteriana para a inibição dos biofilmes de *C. pseudotuberculosis*.

Os extratos de própolis foram mais eficientes na prevenção a colonização e redução da fixação de *C. pseudotuberculosis* na superfície da microplaca. Tais resultados indicam que os extratos própolis também podem ser úteis em estratégias de intervenção na formação de biofilme, as quais têm sido adotadas quando há resistência inerente dos biofilmes consolidados aos agentes antimicrobianos (34,35). De fato, diversos estudos com extratos de diferentes locais revelam a capacidade que os extratos de própolis possuem na interferência da formação de biofilme bacteriano. O extrato própolis verde brasileira é capaz de inibir o crescimento de biofilme dentário de *Streptococcus mutans* (36), enquanto o extrato de etanólico de própolis albanesa reduz de forma significativa (81%) a formação precoce de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (37).

Investigamos o mecanismo de ação dos extratos etanólico de própolis verde e supercrítico de própolis contra cepas de *C. pseudotuberculosis* protegidas por um biofilme maduro. As micrografias obtidas através do microscópio eletrônico de varredura corroboram com os achados obtidos pelo teste de quantificação em microplaca, revelando a capacidade de formação de biofilme dos isolados bacterianos.

Conforme as imagens de MEV, a sobrevivência de bactérias em biofilme pode ser afetada por diferentes tratamentos com própolis. Quando um biofilme de *S. epidermidis* é tratado com extrato etanólico e acetato de etila de própolis a redução da sobrevivência é de apenas 10%. Por

outro lado, a ação de nanopartículas de quitosana-própolis reduz a sobrevivência em 70%, resultando em ruptura do biofilme e diminuição do número de bactérias (38). Bryan et al. (39) observaram que os biofilmes de *S. aureus* foram mais suscetíveis ao extrato etanólico de própolis Russa (3% p/v) em comparação aos biofilmes de *E. coli*. Apenas o tratamento de própolis a 20% p/v resultou em inativação completa dos biofilmes bacterianos, indicado que a atividade antibiofilme é dependente da quantidade extrato. De tal modo, podemos concluir que a concentração máxima utilizada no nosso estudo deve ser considerada como subótima devido a sobrevivência e alterações encontradas nos biofilmes de *C. pseudotuberculosis*.

## Conclusão

Observamos que uma atividade antibiofilme dos extratos de própolis em uma comunidade microbiana séssil e já estruturada de cepas de referência e isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis*. Os biofilmes consolidados da cepa de referência CAPJ4 e do isolado clínico 96 apresentaram uma maior sensibilidade frente aos extratos etanólico e supercríticos de própolis. Os resultados trabalho também indicam que os extratos de própolis foram mais eficazes como um agente capaz de interferir na formação do biofilme bacteriano de *C. pseudotuberculosis*.

Embora os estudos de biofilme de *C. pseudotuberculosis* sejam recentes, acreditamos que futuras investigações através da análise metabolômica e proteômica possam ajudar na elucidação da formação e consolidação do biofilme, bem como o mecanismo de resistência aos antimicrobianos deste patógeno.

## Referências

1. Kalil MA, Santos LM, Barral TD, Rodrigues DM, Pereira NP, Sá M da CA, Umsza-Guez MA, Machado BAS, Meyer R, Portela RW. Brazilian Green Propolis as a Therapeutic Agent for the Post-surgical Treatment of Caseous Lymphadenitis in Sheep. *Front Vet Sci* (2019) **6**:1–10. doi:10.3389/fvets.2019.00399
2. Dorella FA, Pacheco LGC, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res* (2006) **37**:713–722. doi:10.1051/vetres
3. Yaacob MF, Murata A, Hidayah N, Nor M, Firdaus F, Jesse A, Fakharul M, Raja Z. Journal of King Saud University – Science Biochemical composition, morphology and antimicrobial susceptibility pattern of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biofilm. *J King Saud Univ - Sci* (2020)101225. doi:10.1016/j.jksus.2020.10.022

4. Satpathy S, Sen SK, Pattanaik S, Raut S. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatal Agric Biotechnol* (2016) **7**:56–66. doi:10.1016/j.bcab.2016.05.002
5. Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Front Chem* (2019) **7**:1–17. doi:10.3389/fchem.2019.00824
6. Meto A, Colombari B, Meto A, Boaretto G, Pinetti D, Marchetti L, Benvenuti S, Pellati F, Blasi E. Propolis affects pseudomonas aeruginosa growth, biofilm formation, eDNA release and phenazine production: Potential involvement of polyphenols. *Microorganisms* (2020) **8**: doi:10.3390/microorganisms8020243
7. Santos LM, Fonseca MS, Sokolonski AR, Deegan KR, Araújo RPC, Umsza-Guez MA, Barbosa JDV, Portela RD, Machado BAS. Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *J Sci Food Agric* (2020) **100**:1369–1382. doi:10.1002/jsfa.10024
8. Santos LM. Atividade de extratos etanólicos e supercríticos de própolis marrom, vermelha e verde sobre *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Diss Mestr* (2017)78. Available at: <https://ejournal.poltektegal.ac.id/index.php/siklus/article/view/298%0Ahttp://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jana.2015.10.005%0Ahttp://www.biomedcentral.com/1471-2458/12/58%0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&P>
9. Machado BAS, Silva RPD, Barreto GDA, Costa SS, Da Silva DF, Brandão HN, Da Rocha JLC, Dellagostin OA, Henriques JAP, Umsza-Guez MA, et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PLoS One* (2016) **11**:1–26. doi:10.1371/journal.pone.0145954
10. Mariano DCB, Sousa T de J, Pereira FL, Aburjaile F, Barh D, Rocha F, Pinto AC, Hassan SS, Saraiva TDL, Dorella FA, et al. Whole-genome optical mapping reveals a mis-assembly between two rRNA operons of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain 1002. *BMC Genomics* (2016) **17**:1–7. doi:10.1186/s12864-016-2673-7
11. Almeida S, Tiwari S, Mariano D, Souza F, Jamal SB, Coimbra N, Raittz RT, Dorella FA, Carvalho AF de, Pereira FL, et al. The genome anatomy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* VD57 a highly virulent strain causing Caseous lymphadenitis. *Stand Genomic Sci* (2016) **11**:1–8. doi:10.1186/s40793-016-0149-7
12. Loureiro D, Portela RW, Sousa TJ, Rocha F, Pereira FL, Dorella FA, Carvalho AF, Menezes N, Macedo ES, Moura-Costa LF, et al. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* viscerotropic strain N1. *Genome Announc* (2016) **4**:15–16. doi:10.1128/genomeA.01673-15
13. Sá MCA, Oliveira SAS, Dantas EM, Gouveia G V., Gouveia JJS, Veschi JLA, Costa MM. Resistance of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in the Brazilian semiarid environment. *Pesqui Vet Bras* (2018) **38**:1091–1096. doi:10.1590/1678-5150-PVB-4960
14. Nostro A, Roccaro AS, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, Cioni PL, Procopio F, Blanco AR. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol* (2007) **56**:519–523. doi:10.1099/jmm.0.46804-0
15. Macià MD, Rojo-Moliner E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-

- growing bacteria. *Clin Microbiol Infect* (2014) **20**:981–990. doi:10.1111/1469-0691.12651
16. Siddique MH, Aslam B, Imran M, Ashraf A, Nadeem H, Hayat S, Khurshid M, Afzal M, Malik IR, Shahzad M, et al. Effect of Silver Nanoparticles on Biofilm Formation and EPS Production of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Biomed Res Int* (2020) **2020**:9. doi:10.1155/2020/6398165
  17. Ponomareva AL, Buzoleva L, Bogatyrenko E. Abiotic Environmental Factors Affecting the Formation of Microbial Biofilms. *Biol Bull Vol* (2018) **45**:277–288. doi:10.1134/S106235901805014X
  18. Joo H-S, Otto M. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem Biol J* (2012) **19**:1503–1513. doi:10.1016/j.chembiol.2012.10.022.Molecular
  19. de Souza C, Faria YV, Sant'Anna L de O, Viana VG, Seabra SH, de Souza MC, Vieira VV, Júnior RH, Moreira L de O, de Mattos-Guaraldi AL. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2015) **110**:242–248. doi:10.1590/0074-02760140373
  20. Gressler LT, de Vargas AC, da Costa MM, Sutili FJ, Schwab M, Pereira DIB, Sangioni LA, Botton S de A. Biofilm formation by *Rhodococcus equi* and putative association with macrolide resistance. *Pesqui Vet Bras* (2015) **35**:835–841. doi:10.1590/s0100-736x2015001000003
  21. Wong EHJ, Ng CG, Goh KL, Vadivelu J, Ho B, Loke MF. Metabolomic analysis of low and high biofilm-forming *Helicobacter pylori* strains. *Sci Rep* (2018) **8**:1–9. doi:10.1038/s41598-018-19697-0
  22. Diriba K, Kassa T, Alemu Y, Bekele S. In Vitro Biofilm Formation and Antibiotic Susceptibility Patterns of Bacteria from Suspected External Eye Infected Patients Attending Ophthalmology Clinic, Southwest Ethiopia. *Int J Microbiol* (2020) **2020**:12. doi:10.1155/2020/8472395
  23. Lu L, Hu W, Tian Z, Yuan D, Yi G, Zhou Y, Cheng Q, Zhu J, Li M. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese Med (United Kingdom)* (2019) **14**:1–17. doi:10.1186/s13020-019-0232-2
  24. Neto MSR, Tintino SR, da Silva ARP, Costa M do S, Boligon AA, Matias EFF, de Queiroz Balbino V, Menezes IRA, Melo Coutinho HD. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food Chem Toxicol* (2017) **107**:572–580. doi:10.1016/j.fct.2017.03.052
  25. De Marco S, Piccioni M, Pagiotti R, Pietrella D. Antibiofilm and Antioxidant Activity of Propolis and Bud Poplar Resins versus *Pseudomonas aeruginosa*. *Evidence-based Complement Altern Med* (2017) **2017**:11. doi:10.1155/2017/5163575
  26. Grecka K, Kuś PM, Okińczyc P, Worobo RW, Walkusz J, Szweda P. The anti-staphylococcal potential of ethanolic Polish propolis extracts. *Molecules* (2019) **24**:1–24. doi:10.3390/molecules24091732
  27. Machado BAS, De Abreu Barreto G, Costa AS, Costa SS, Silva RPD, Da Silva DF, Brandao HN, Da Rocha JLC, Nunes SB, Umsza-Guez MA, et al. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. *PLoS One* (2015) **10**:1–26.

- doi:10.1371/journal.pone.0134489
28. Sforcin JM. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phyther Res* (2016) **30**:894–905. doi:10.1002/ptr.5605
  29. Burkovski A. Cell Envelope of Corynebacteria: Structure and Influence on Pathogenicity. *ISRN Microbiol* (2013) **2013**:1–11. doi:10.1155/2013/935736
  30. Abouelhassan Y, Garrison AT, Yang H, Chávez-Riveros A, Burch GM, Huigens RW. Recent Progress in Natural-Product-Inspired Programs Aimed To Address Antibiotic Resistance and Tolerance. *J Med Chem* (2019) **62**:7618–7642. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00370
  31. Rampacci E, Marenzoni ML, Giovagnoli S, Passamonti F, Coletti M, Pietrella D. Phenotypic Characterization of *Rhodococcus equi* Biofilm Grown In Vitro and Inhibiting and Dissolving Activity of Azithromycin/Rifampicin Treatment. *Pathogens* (2019) **8**:284. doi:10.3390/pathogens8040284
  32. Gomes DLR, Peixoto RS, Barbosa EAB, Napoleão F, Sabbadini PS, dos Santos KRN, Mattos-Guaraldi AL, Hirata R. SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *J Med Microbiol* (2013) **62**:754–760. doi:10.1099/jmm.0.052373-0
  33. De Zordi N, Cortesi A, Kikic I, Moneghini M, Solinas D, Innocenti G, Portolan A, Baratto G, Dall'Acqua S. The supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from Propolis: A central composite design approach. *J Supercrit Fluids* (2014) **95**:491–498. doi:10.1016/j.supflu.2014.10.006
  34. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* (2002) **15**:167–193. doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
  35. Yu MW, Patel R. Understanding Biofilms and Novel Approaches to the Diagnosis, Prevention, and Treatment of Medical Device-Associated Infections. *Infect Dis Clin North Am* (2018) **32**:915–929. doi:10.1016/j.idc.2018.06.009.Understanding
  36. Cardoso JG, Iorio NLP, Rodrigues LF, Couri MLB, Farah A, Maia LC, Antonio AG. Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and *Streptococcus mutans*' count in dental biofilm. *Arch Oral Biol* (2016) **65**:77–81. doi:10.1016/j.archoralbio.2016.02.001
  37. Meto A, Colombari B, Meto A, Boaretto G, Pinetti D, Marchetti L, Benvenuti S, Pellati F, Blasi E. Propolis affects *Pseudomonas aeruginosa* growth, biofilm formation, eDNA release and phenazine production: Potential involvement of polyphenols. *Microorganisms* (2020) **8**: doi:10.3390/microorganisms8020243
  38. Ong TH, Chitra E, Ramamurthy S, Ling CCS, Ambu SP, Davamani F. Cationic chitosan-propolis nanoparticles alter the zeta potential of *S. epidermidis*, inhibit biofilm formation by modulating gene expression and exhibit synergism with antibiotics. *PLoS One* (2019) **14**:e0213079. doi:10.1371/journal.pone.0213079
  39. Bryan J, Redden P, Traba C. The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. *Lett Appl Microbiol* (2016) **62**:192–198. doi:10.1111/lam.12532

## Material suplementar

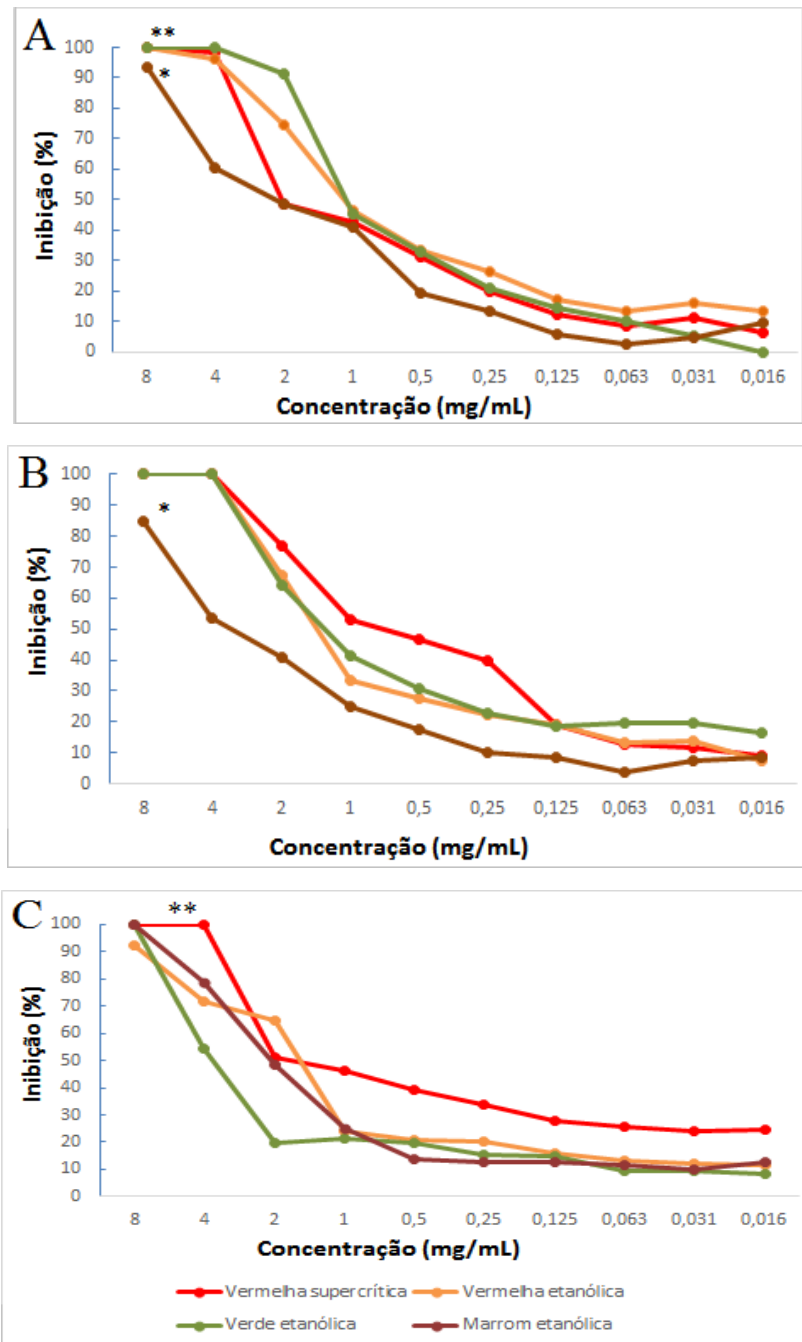
**Tabela suplementar 1 –MICs e MBCs de extrato supercrítico de própolis vermelha e extratos etanólicos de própolis vermelha, verde e marrom frente aos isolados de *C. pseudotuberculosis* pelo método de microdiluição em caldo.** Os números representam a média de dois experimentos independentes.

Amostras	Intervalo (mg)	1002		VD57		N1	
		MIC (mg)	MBC (mg)	MIC (mg)	MBC (mg)	MIC (mg)	MBC (mg)
RAL SCO2	0.016 – 8	≥ 4	≥ 8	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4
RAL EtOH	0.016 – 8	≥ 4	≥ 8	≥ 8	≥ 8	≥ 4	≥ 4
GPR EtOH	0.016 – 8	≥ 2	≥ 4	≥ 8	≥ 8	≥ 4	≥ 4
BSC EtOH	0.016 – 8	> 8	> 8	≥ 8	≥ 8	> 8	> 8



**Figura Suplementar 1. Atividade antimicrobiana dos extratos etanólico e supercrítico de própolis vermelha, verde e marrom sobre *C. pseudotuberculosis*, cepa 1002 (A), N1 (B) e VD57 (C). Os resultados são expressos como médias de dois experimentos diferentes cada.**

\*Diferença estatística significativa com  $p < 0,05$  no de Wilcoxon signed-rank quando comparados o extrato de própolis marrom e todos os extratos testados, e \*\* Diferença estatística significativa com  $p < 0,05$  entre os extratos de própolis vermelha supercrítica e verde etanólica.



### CAPÍTULO III

## **Ação antimicrobiana de nanopartículas de prata biogênicas em *Corynebacterium pseudotuberculosis* e seus impactos no biofilme**

(Artigo a ser submetido ao periódico *Frontiers in Microbiology*,  
Qualis A1, Fator de Impacto JCR 2019 4.235)

**Laerte Marlon Santos<sup>1\*</sup>, Danijela Stanisic<sup>2\*</sup>, Daniela Méria Rosrigues<sup>1</sup>, Maria da Conceição Sá<sup>1</sup>, Maurício Alcântara Kalil<sup>1</sup>, Vasco Azevedo<sup>3</sup>, Roberto Meyer<sup>1</sup>, Ljubica Tasic<sup>2</sup>, Ricardo Wagner Portela<sup>1‡</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Química Biológica, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Genética Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>‡</sup>**Correspondence:** Ricardo Wagner Portela, [rwportela@ufba.br](mailto:rwportela@ufba.br)

## Resumo

*C. pseudotuberculosis* é um patógeno gram-positivo intracelular facultativo que tem grande importância veterinária por causar a linfadenite caseosa (LC) em pequenos ruminantes. A LC é uma doença crônica caracterizada pelo desenvolvimento de granulomas encapsulados em linfonodos superficiais e viscerais, cujo tratamento clínico é geralmente refratário à terapia antibiótica. Um importante fator de virulência do gênero *Corynebacterium* é a capacidade de produção de biofilme, entretanto pouco se sabe sobre a produção de biofilme em *C. pseudotuberculosis* e resistência a antimicrobianos. As nanopartículas de prata (AgNPs) são consideradas promissores agentes antimicrobianos, que oferecem várias vantagens, tais como a atividade de amplo espectro, menor potencial de indução de resistência e atividade antibiofilme. Diante disso, este estudo objetivou avaliar a ação antibacteriana de AgNPs em *C. pseudotuberculosis*, por meio da determinação de concentração inibitória mínima (MIC), concentração mínima bactericida (MBC), ação de antibiofilme e visualização da morfologia de biofilme tratado e não tratado através da microscopia eletrônica de varredura. Encontramos diferenças entre cepas de referência e isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis* na capacidade de formação biofilme e na resposta após exposição as AgNPs. A solução coloidal de AgNP reduziu de forma significativa os biofilmes consolidados de *C. pseudotuberculosis* em todas as concentrações testadas. As AgNPs agiram durante 48h em *C. pseudotuberculosis* controlando a mudança entre a forma planctônica e sésil, impedindo a fixação e colonização do biofilme em microplaca. As imagens da microscopia eletrônica de varredura mostraram uma ação de AgNP na superfície de biofilmes consolidados. Os resultados do estudo demonstram o potencial das AgNPs para atuar como agentes antibiofilme em *C. pseudotuberculosis*.

**Palavras-chave:** agentes antimicrobianos, linfadenite caseosa, nanotecnologia, pequenos ruminantes

## **Introdução**

*C. pseudotuberculosis* é um patógeno gram-positivo intracelular facultativo que tem grande importância veterinária por causar a linfadenite caseosa (CL) em pequenos ruminantes (Windsor *et al.*, 2016). A CL é caracterizada principalmente pelo desenvolvimento de granulomas encapsulados em linfonodos superficiais e viscerais, como também em diversos órgãos (Oreiby *et al.*, 2014). Sendo o *C. pseudotuberculosis* um agente zoonótico, é importante considerar a CL como um problema de saúde pública, com casos relatados na literatura científica de infecção em humanos em diversos países (Bastos *et al.*, 2012)

O tratamento clínico da LC é geralmente refratário à terapia antibiótica, provavelmente devido à espessa cápsula formada em torno das lesões típicas e à natureza espessa e caseosa do conteúdo contido dentro da cápsula. Também, os antibióticos eliminam apenas o patógeno das lesões superficiais, mas ainda podem existir lesões e/ou abscessos internos (Williamson, 2001; Fontaine & Baird, 2008).

Um importante fator de virulência do gênero *Corynebacterium* é a capacidade de produção de biofilme (Guedes *et al.*, 2015). Essa estrutura é um agregado de microcolônias envoltas por uma matriz de polissacarídeos, formando comunidades organizadas que permitem a comunicação entre si, aderindo a qualquer superfície biológica, o que poderia explicar parte da resistência à ação dos antimicrobianos (Vestby *et al.*, 2020) e biocidas (Sá *et al.*, 2013)

Atualmente, há uma necessidade urgente de buscar novas alternativas para o tratamento e controle de doenças infecciosas, e as nanopartículas de prata (AgNPs) estão sendo consideradas como promissores agentes antimicrobianos, que oferecem várias vantagens, como a atividade de amplo espectro e menor potencial de indução de resistência (Tabaran *et al.*, 2020). Diante disso, com este estudo objetivou avaliar a ação antibacteriana e antibiofilme de AgNPs em cepas de referência e isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis*.

## **Materiais e métodos**

### **Síntese biogênica de AgNP**

A síntese dos AgNPs foi realizada seguindo o procedimento descrito por Ballottin *et al.* (2017). Resumidamente, o fungo *Fusarium oxysporum* foi cultivado em um meio de cultura sólido consistindo em 0,5% de extrato de levedura, 2% de malte, 2% de água e água destilada, e

mantido a 28 °C por uma semana. Após o crescimento, água destilada esterilizada foi adicionada à cultura sob agitação constante até atingir a concentração protéica de 0,1 g/mL e mantida sob agitação por 72 horas. Uma filtração a vácuo foi realizada e então 0,01 mol/L de AgNO<sub>3</sub> foi adicionado ao sobrenadante. A solução foi mantida a 28 °C e selada com folha de alumínio até a formação das nanopartículas. As AgNPs foram caracterizadas e apresentaram tamanhos de 28,0 ± 13,1 nm, polidispersidade de 0,231, potencial zeta de -31,7 ± 2,8 mV e formato esférico (Stanisic et al., 2018).

### **Cepas bacterianas**

Para a análise *in vitro* da suscetibilidade bacteriana aos AgNPs, foram utilizadas quatro cepas de referência de *C. pseudotuberculosis*: a cepa 1002, que é utilizada como referência no projeto do genoma da bactéria (Mariano et al., 2016) e já teve seu genoma sequenciado (GenBank CP001809.2); a cepa N1, que é uma cepa viscerotrópica isolada de uma lesão pulmonar de LC de ovelha (Loureiro et al., 2016) que possui o genoma sequenciado (CP013146); a cepa T1, que é uma cepa atenuada usada como modelo de vacina (Moura-Costa et al., 2008), e possui genoma sequenciado (GenBank CP015100.1); e a cepa CAPJ4 (Sá et al., 2018), que é uma cepa produtora de biofilme e possui o genoma sequenciado (CP026499). Todas as cepas de *C. pseudotuberculosis* aqui utilizadas pertencem ao biovar *ovis*. Também foram adicionados ao experimento isolados clínicos oriundos de amostras caseosas coletadas de ovinos submetidos à excisão da lesão de LC (Kalil et al., 2019).

### **Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima de cepas de referência e isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis***

A metodologia de microdiluição em caldo foi realizada de acordo com Norman et al. (2014), com modificações. A solução de AgNP foi diluída em água milli-Q estéril em concentrações variando de 0,01 a 5 mg/mL. As cepas foram inoculadas em caldo brain heart infusion - BHI (HIMEDIA, Mumbai, Índia) - acrescido de Tween 80 0,1% por 24 h antes do ensaio. Após a incubação, as cepas foram diluídas em 2 × BHI para atingir uma densidade óptica de 0,08–0,10 a 600 nm, que contém aproximadamente 3 × 10<sup>6</sup> UFC/mL da bactéria. Posteriormente, essas suspensões foram diluídas em caldo BHI para obter a concentração de 1 × 10<sup>6</sup> UFC/mL. Após a diluição, 100 µL do inóculo e 100 µL da solução coloidal AgNP foram

inoculados em microplaca de 96 poços. Em seguida, as microplacas foram então incubadas durante 48 h a 37 °C. Dois controles foram usados para cada diluição, um positivo (suspensão bacteriana sem AgNPs) e um negativo (solução coloidal de AgNP sem inoculação bacteriana). A análise foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm e foi estabelecida a concentração mínima capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano (MIC<sub>100</sub>). Após a determinação da MIC<sub>100</sub>, 20 µL de cada poço foi removido e inoculado em placas de ágar BHI e incubadas por 48 h a 37 °C. A concentração bactericida mínima (MBC<sub>100</sub>) foi definida como a concentração mais baixa capaz de matar todas as bactérias.

### **Ensaio de semi-quantificação de formação de biofilme**

A análise semiquantitativa da produção de biofilme seguiu a metodologia descrita por Kalil et al. (2019). *C. pseudotuberculosis* foram inoculados em 3 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubados a 37 °C até obtenção de densidade óptica (DO) de 0,2 (aproximadamente 3 x10<sup>8</sup> UFC/mL de *E. coli*) em comprimento de onda de 595 nm. Em seguida, 200 µL dessa suspensão bacteriana foram transferidos para microplacas estéreis e incubados a 37 °C por 48 h. Após a incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado e os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS 0,01 M pH 7,2. As bactérias que permaneceram aderidas foram fixadas com 200 µL de metanol e deixadas na incubadora até a secagem. Os poços foram então corados com 200 µL de uma solução de violeta cristal a 2% por 5 min e depois lavados com água destilada. O corante impregnado nas células bacterianas aderentes foi então eluído com 160 µL de uma solução de ácido acético a 33%. Como controle negativo para este teste utilizamos poços com TSB e sem inóculo, A cepa CAPJ4 de *C. pseudotuberculosis* foi utilizada como cepa controle formadora de biofilme.

A D.O. de cada poço foi medida em um comprimento de onda de 595 nm. Para caracterizar a intensidade de formação do biofilme, foram utilizadas as seguintes equações, onde ODI indica a densidade óptica do isolado e ODNC representa a densidade óptica do controle negativo: ODI ≤ ODNC = nenhum desenvolvimento de biofilme; ODI / ODNC ≤ 2 = formação fraca de biofilme; ODI / ODNC ≤ 4 = capacidade moderada de produção de biofilme; ODI / ODNC > 4 = forte capacidade de produção de biofilme (Nostro et al., 2007).

### **Determinação da concentração inibitória mínima em biofilme (MBIC)**

O ensaio de ação antibiofilme das AgNPs seguiu a metodologia de Nostro et al. (2007) com adaptações. Os isolados de *C. pseudotuberculosis* foram inoculados em 3 mL de TSB e incubados a 37 °C por 48 horas. Após esse período, as suspensões bacterianas foram padronizadas em caldo TSB com DO de 0.2 em comprimento de onda de 595 nm e 200 µL destas suspensões foram transferidas para os poços das microplacas e incubadas a 37 °C por 48h. Após a consolidação do biofilme, levando em consideração concentrações ótimas obtidas anteriormente em ensaios de concentração inibitória mínima (MIC) em *C. pseudotuberculosis*, 200µL da solução de AgNP foi inoculada nos poços com biofilme consolidado. Em seguida, as microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 48 horas. A DO, mensurada em 595nm, foi determinada logo após a adição do antimicrobiano (DO0h), em 24h (DO24h) e 48h (DO48h) após o experimento. A MBIC foi definida como a concentração mais baixa do antimicrobiano em que não houve aumento dependente do tempo no número médio de células viáveis do biofilme quando um tempo de exposição precoce foi comparado com um tempo de exposição posterior (Maciá *et al.*, 2014).

### **Ensaio de interferência na formação do biofilme**

Para avaliar a ação das AgNPs na interferência na formação de biofilme, os isolados de *C. pseudotuberculosis* foram inoculados em 3 mL de TSB e incubados a 37 °C por 48 horas. Após esse período, as suspensões bacterianas foram padronizadas em caldo TSB com DO de 0.2 em comprimento de onda de 595 nm. Em seguida, 100 µL das suspensões bacterianas padronizadas e 100 µL da solução coloidal de AgNP, em diferentes concentrações (4, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg/mL), foram inoculados nos poços de uma microplaca estéril e incubados a 37 °C por 48 h. O biofilme formado foi detectado após 48 horas e a porcentagem de inibição da produção do biofilme foi calculada considerando as suspensões bacterianas controle que não foram incubadas com extratos (Kalil et al., 2019).

### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Os biofilmes consolidados expostos e não expostos a solução coloidal de AgNP foram fixados sequencialmente em dois fixadores: (i) glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 1-2 h, seguido por três lavagens com o mesmo tampão; (ii) tetróxido de ósmio 1% em cacodilato de sódio 0,1 M por 1 h em temperatura ambiente, e lavado três vezes com

tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4. Após a fixação, os biofilmes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (de 30%, 50%, 70, 90% e álcool absoluto) e secos em equipamento Ponto Crítico Leica CPD 030 com CO<sub>2</sub> como meio de transição. Os biofilmes foram examinados pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL (JSM-6390LV), operando em 15kV.

### **Análise estatística**

A porcentagem de inibição do biofilme foi calculada pela seguinte fórmula (Siddique et al. 2020):

$$\% \text{ inibição de biofilme} = 1 - \frac{\text{OD}_{595} \text{ de } C. \textit{pseudotuberculosis} \text{ tratada com AgNPs}}{\text{OD}_{595} \text{ de } C. \textit{pseudotuberculosis} \text{ não tratado}} \times 100$$

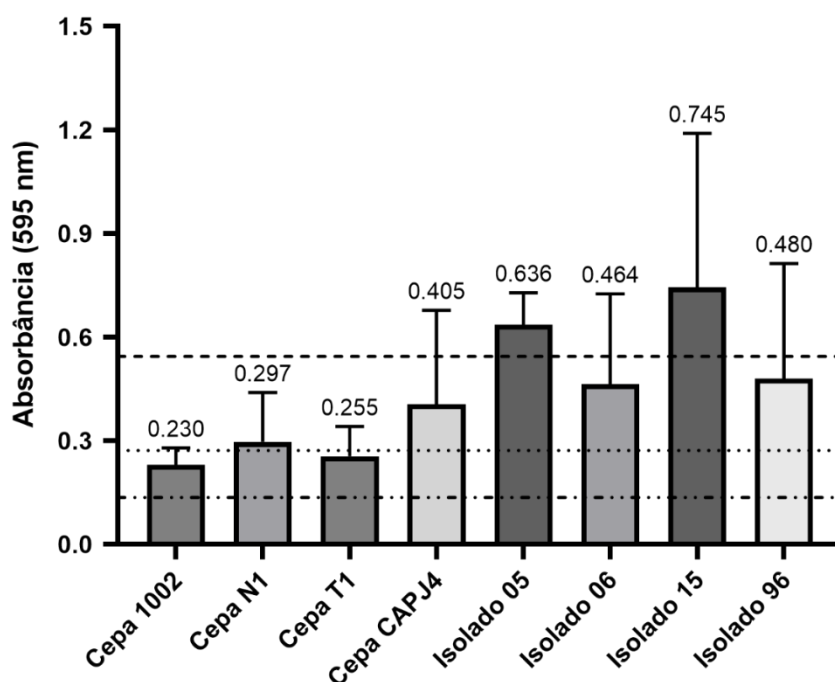
Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados foram analisados por meio do teste *t* e análise de variância (ANOVA), com nível de significância estatística de 95% ( $p < 0,05$ ). O *software* utilizado para a análise foi o *GraphPad Prism 8*.

## **Resultados**

### **Detecção da formação de biofilme em microplaca de cultivo**

Um total de oito isolados de *C. pseudotuberculosis* foram utilizados no experimento e classificados como formadores de biofilme. Para caracterizar a intensidade da formação de biofilme entre as cepas de referência, a OD<sub>595</sub> do controle negativo foi de 0.136. As bactérias com OD<sub>595</sub> entre 0,136 e 0,272 foram consideradas como fracas produtoras de biofilme. Se OD<sub>595</sub> esteve entre 0,272 e 0,544, *C. pseudotuberculosis* foi considerado um isolado com moderada produção de biofilme e, *C. pseudotuberculosis* com OD<sub>595</sub> > 0.544 foram caracterizados como fortes produtores de biofilme pela metodologia descrita por Nostro et al. (2007). Neste experimento, as cepas 1002 e T1 foram caracterizadas como cepas com baixa produção de biofilme. As cepas N1, T1 e CAPJ4, e os isolados clínicos 06 e 96 foram caracterizados como moderados produtores de biofilme, enquanto os isolados clínicos 05 e 15 foram considerados como fortes produtores de biofilme (**Figura 1**).





**Figura 1. Formação de biofilme de cepas de referência e isolados clínicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.** As barras indicam o desvio padrão. A linha tracejada indica o valor de médio do controle negativo ( $DO_{595} = 0.136$ ), fraco produção de biofilme ( $DO_{595} > 0.136$ ), moderado produção de biofilme ( $DO_{595} > 0.272$ ) e forte produção de biofilme ( $DO_{595} = 0.544$ )

### **Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana de células planctônica e de biofilme de *C. pseudotuberculosis***

A avaliação da atividade antimicrobiana de AgNP contra *C. pseudotuberculosis* usando a metodologia de microdiluição em caldo demonstrou uma inibição de crescimento da maioria dos isolados na concentração de 0.156 mg/mL, sendo a menor MIC de 0.08 mg/mL. Resultados semelhantes foram observados entre as cepas de referência para a ação bactericida das AgNPs, com valores de MBC equivalente a 0.156 mg/mL. As AgNPs tiveram uma menor ação bactericida entre os isolados clínicos (**Tabela 1**). Uma curva de MIC foi criada para visualizar a ação antibacteriana de AgNP em diferentes concentrações (**Figura 2 e 3**).

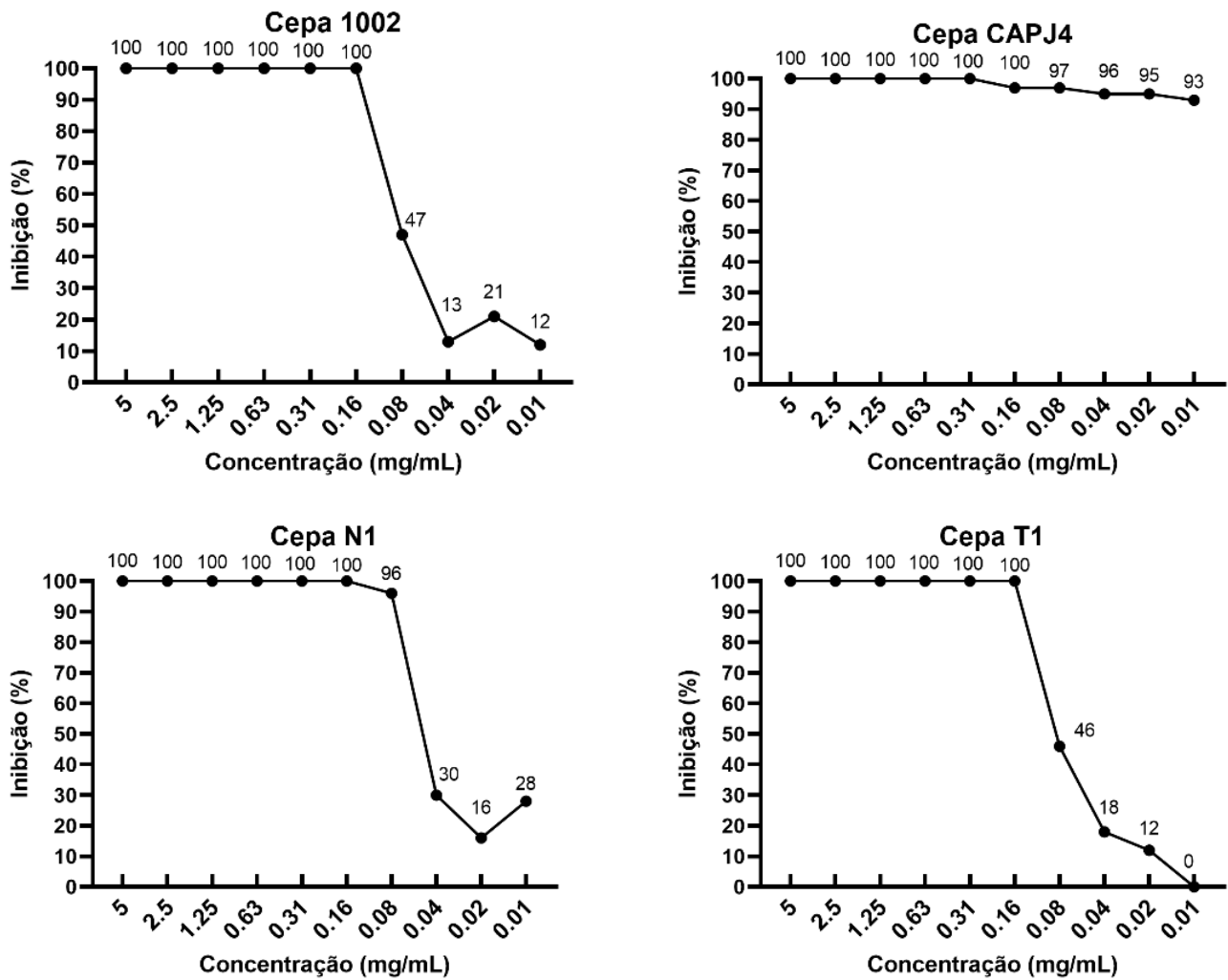
A avaliação da ação antibiofilme de AgNP biofilme consolidado foi mensurada em três tempos: 0h, 24h e 48h. Após a adição da solução coloidal de AgNP nos biofilmes consolidados, todas as bactérias apresentaram reduções no biofilme em 24h e 48h nas diferentes concentrações testadas. As maiores inibições foram observadas nos biofilmes consolidados dos isolados clínicos,

exceto o isolado 06, e na cepa CAPJ4. Os biofilmes consolidados das cepas 1002, N1, VD57 e T1 foram menos sensíveis a ação das AgNPs (**Figura 4**).

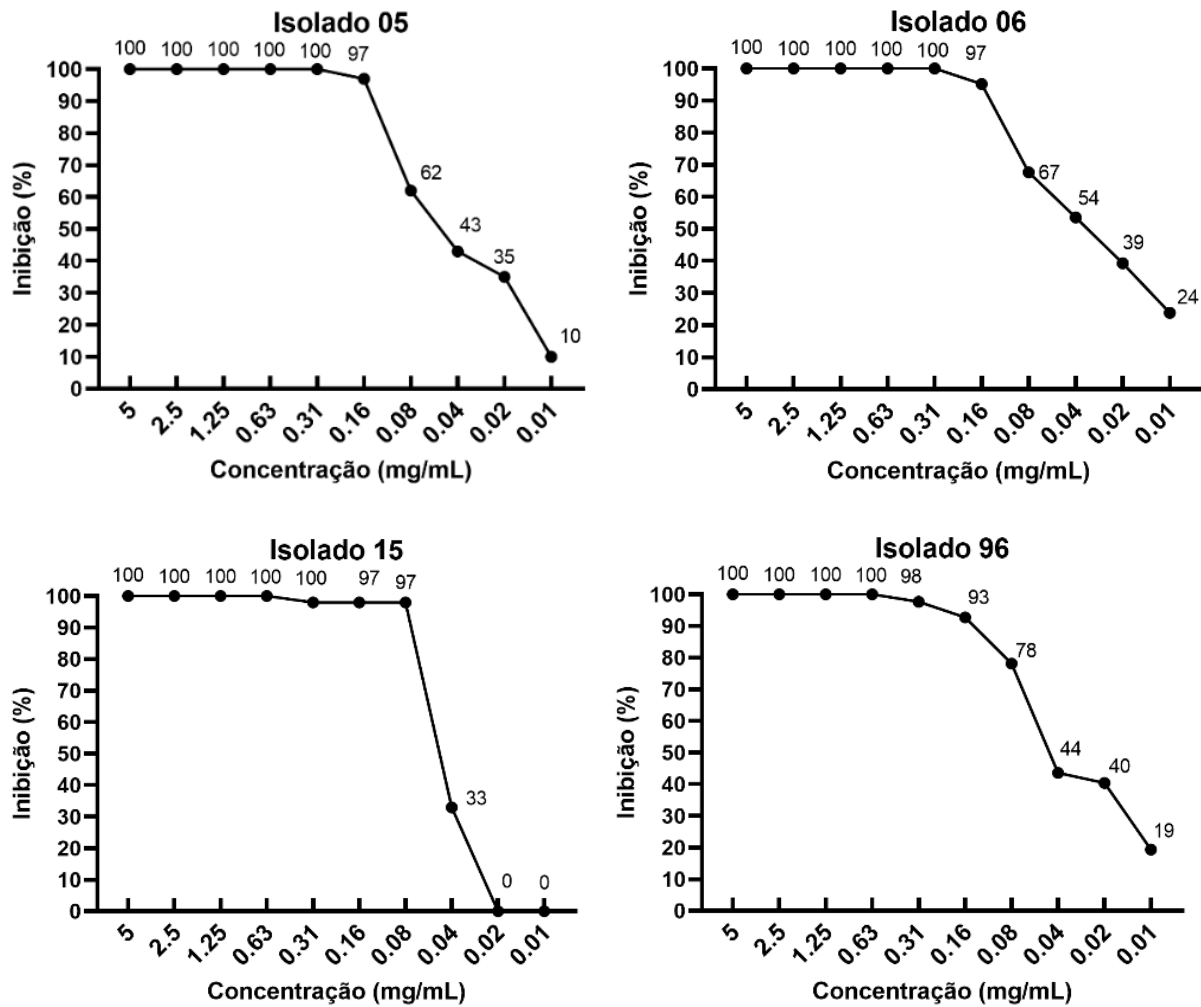
**Tabela 1 – Perfil de sensibilidade de cepas de referência e isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis* a AgNPs.**

<b>Cepa de <i>C. pseudotuberculosis</i></b>	<b>MIC<sub>100</sub> (mg/mL)</b>	<b>MBC<sub>100</sub> (mg/mL)</b>
<b>1002</b>	0.156	0.156
<b>N1</b>	0.156	0.156
<b>T1</b>	0.156	0.156
<b>CAPJ4</b>	0.08	0.156
<b>Isolado 05</b>	0.312	0.312
<b>Isolado 06</b>	0.156	0.312
<b>Isolado 15</b>	0.08	0.312
<b>Isolado 96</b>	0.156	0.312

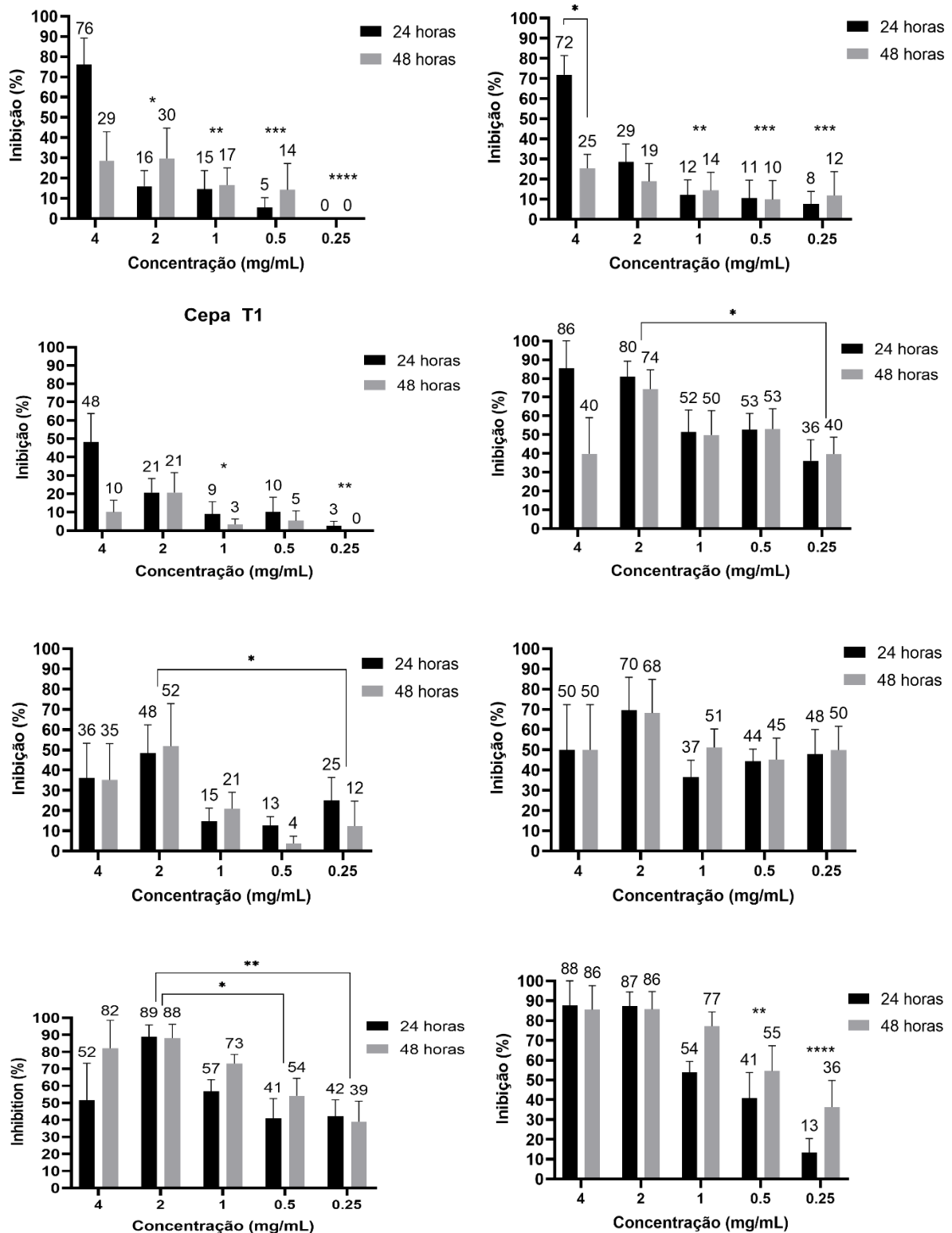
O teste de interferência na formação de biofilme em 48 horas de incubação constatou que as AgNPs foram capazes de interferir de forma significativa, com valores de interferência superior a 80% na concentração de 4 mg/mL, nas cepas de referência N1 e CAPJ4. O percentual de interferência na formação do biofilme é mostrado na Tabela 2.



**Figura 2.** Curva de inibição de crescimento de cepas de referências de *C. pseudotuberculosis* expostas a diferentes concentrações de AgNP. Os resultados expressão a média da inibição do crescimento, em porcentagem, de dois experimentos independentes.



**Figura 3.** Curva de inibição de crescimento de isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis* expostos a diferentes concentrações de AgNP. Os resultados expressão a média da inibição do crescimento, em porcentagem, de dois experimentos independentes.



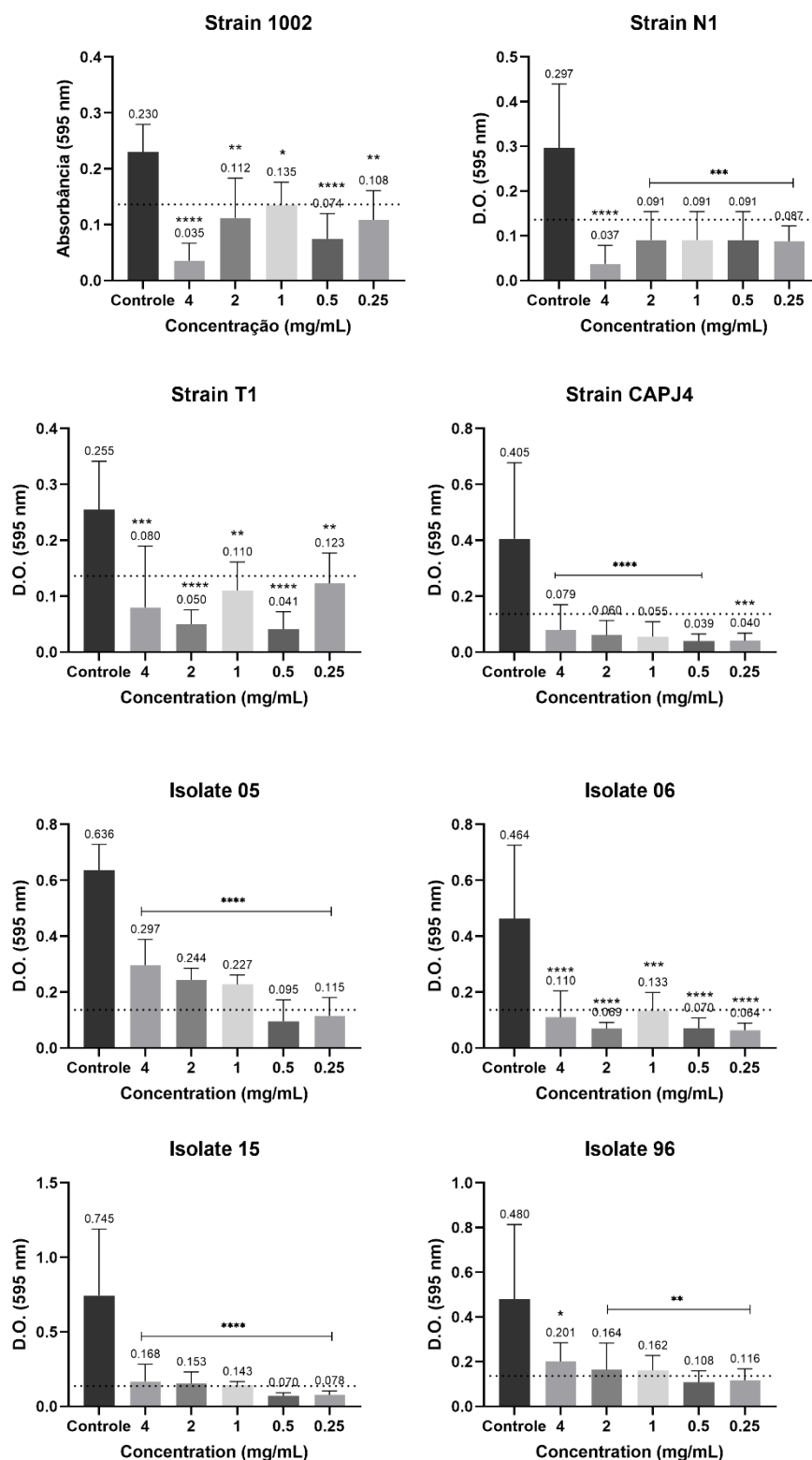
**Figura 4.** Atividade de AgNP sobre biofilme consolidado de *C. pseudotuberculosis* após 24 e 48 horas de tratamento. As barras representam o desvio padrão da porcentagem de inibição dos isolados de resultados de dois experimentos independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre as células bacterianas tratadas com diferentes concentrações de solução coloidal

de AgNP e em diferentes tempos, analisadas por meio de análise de variância (one-way ANOVA) e teste *t*. \* $p \leq 0,03$ , \*\* $p \leq 0,005$ , \*\*\* $p \leq 0,0009$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

**Tabela 2. Interferência de AgNP na formação de biofilme de *C. pseudotuberculosis*.** Os resultados expressam a porcentagem de inibição e o desvio-padrão de formação de biofilme após 48 horas de incubação com as AgNPs, sendo médias de dois experimentos independentes, com seus respectivos desvios padrões.

Cepa de <i>C. pseudotuberculosis</i>	Concentração de AgNP (mg/mL)				
	4	2	1	0.5	0.25
<b>1002</b>	78 ± 19	53 ± 29	49 ± 17	68 ± 20	52 ± 23
<b>N1</b>	86 ± 16	65 ± 24	48 ± 17	59 ± 17	68 ± 12
<b>T1</b>	75 ± 34	84 ± 8	66 ± 16	87 ± 10	62 ± 17
<b>CAPJ4</b>	91 ± 11	86 ± 12	83 ± 10	90 ± 5	89 ± 4
<b>Isolado 05</b>	59 ± 22	71 ± 14	71 ± 8	80 ± 9	79 ± 9
<b>Isolado 06</b>	66 ± 29	79 ± 6	59 ± 20	79 ± 11	81 ± 8
<b>Isolado 15</b>	73 ± 18	79 ± 12	77 ± 4	89 ± 4	88 ± 4
<b>Isolado 96</b>	78 ± 9	83 ± 12	83 ± 7	88 ± 6	87 ± 6

A inibição da formação de biofilmes por *C. pseudotuberculosis* pode ser observada pela redução da DO<sub>595</sub> após 48h. As AgNPs foram capazes de impedir a formação de biofilme entre as cepas VD57 e T1 em todas as concentrações testadas. Uma redução na formação de biofilme foi observada em todos os isolados nas concentrações testadas (Figura 5).



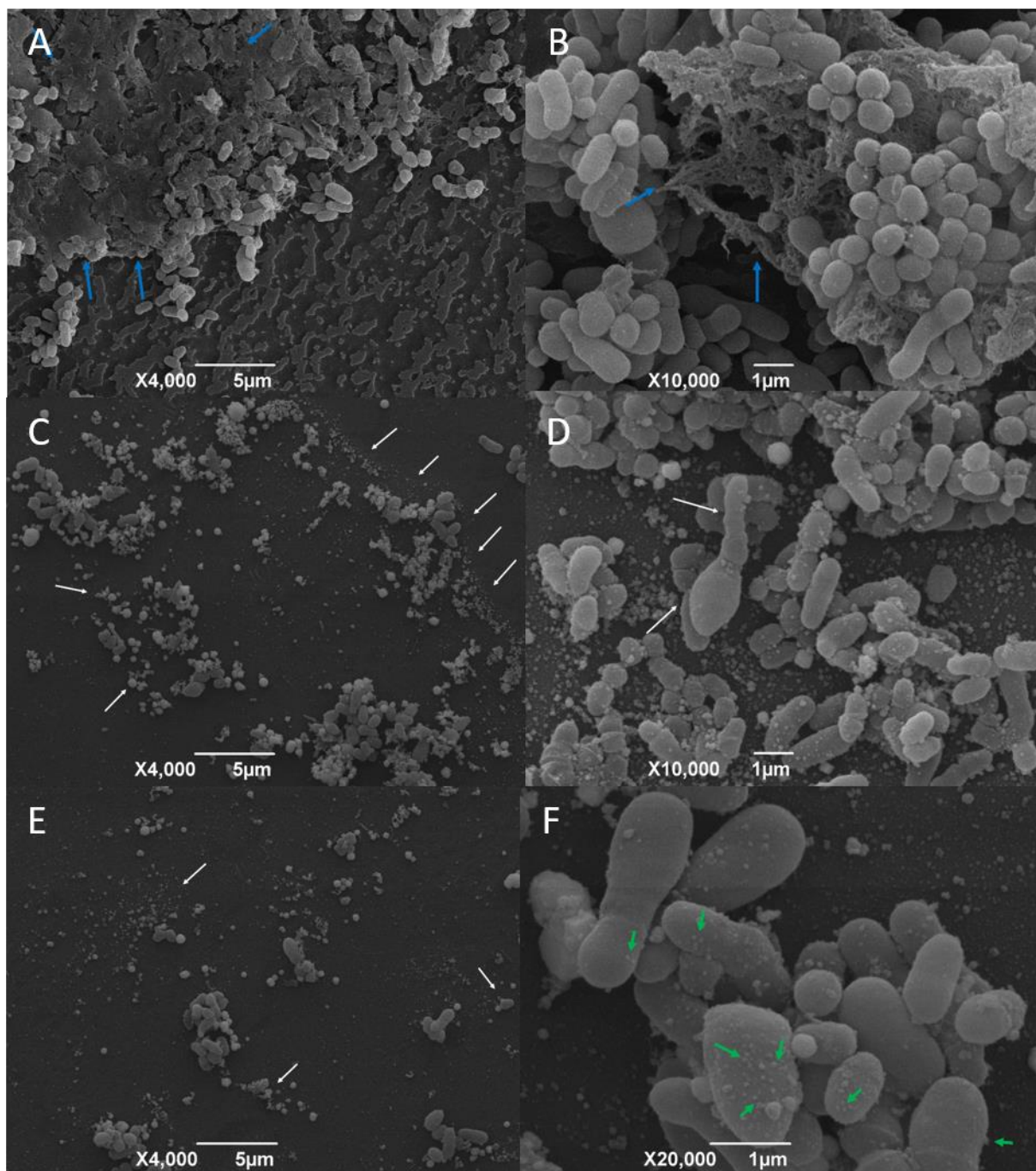
**Figura 5. Interferência de AgNP na formação de biofilme por *C. pseudotuberculosis*.** As barras representam o desvio padrão. A linha tracejada indica o valor de médio do controle negativo ( $DO_{595} = 0.136$ ) e de *C. pseudotuberculosis* com fraca produção de biofilme ( $DO_{595} > 0.136$ ) após o tratamento. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre as células bacterianas não tratadas e tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas, analisadas por meio de análise de variância (one-way ANOVA). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,0003$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### **Avaliação da formação de biofilme por MEV**

As micrografias de MEV obtidas de biofilmes de *C. pseudotuberculosis* não expostos e expostos a AgNP são mostradas na figura abaixo. Como mostrado na figura 6A e 6B, *C. pseudotuberculosis* não tratados se apresentaram tipicamente como cocos ou cocobacilos, com parede celular lisa e íntegra coberta por uma matriz exopolissacarídica amorfa.

Após a exposição a uma solução coloidal de AgNP durante 48 horas, a quantidade de biofilme de *C. pseudotuberculosis* reduziu de forma significativa, com interrupção por completo do biofilme bacteriano, alterações na parede celular, grande quantidade de debris e materiais depositados sobre a superfície bacteriana. Algumas bactérias que se mantiveram intactas apresentaram vesículas na superfície (Figura 6F), indicando aumento da permeabilidade da membrana plasmática e liberação de componentes intracelulares.





**Figura 6.** Micrografias representativas de microscopia eletrônica de varredura da estrutura de biofilmes maduros de *C. pseudotuberculosis* não expostos (A e B) e expostos a AgNPs (C, D, E e F). As setas azuis indicam a presença da matriz de exopolissacarídeo em biofilme maduro. As setas brancas indicam deformidades e debris celulares. As setas verdes apontam para a presença de vesículas na superfície bacteriana.

## Discussão

O presente estudo objetivou avaliar o efeito antibacteriano de AgNP sintetizada a partir do fungo *Fusarium oxysporum* (Ballottin et al., 2017). Para uma análise completa da ação de AgNP em *C. pseudotuberculosis*, foram determinados as concentrações inibitórias mínimas, as concentrações bactericidas mínimas e os efeitos do antimicrobiano em biofilme.

Os resultados do teste de sensibilidade pela metodologia de microdiluição em caldo demonstraram a eficácia de AgNPs em cepas de referência e isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis*. Este resultado está de acordo com estudos que mostram a atividade antibacteriana de AgNPs obtidas pelo método de síntese verde contra *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* e *S. enteritidis* (Loo et al., 2018). Punjabi et al. (2018) concluíram que as AgNP obtidas pela síntese extracelular a partir de *Pseudomonas hibiscicola* apresentaram elevada eficiência contra todos os microrganismos testados e isolados clínicos multirresistentes (MDR) de MRSA, VRE, ESBL e *M. tuberculosis*, com MIC variando entre 0.6-1.5 mg/mL. Além disso, esses resultados comprovaram o potencial antimicrobiano de AgNP contra cepas resistentes isoladas de hospitais. Os testes de inibição bacteriana também mostram que a eficácia das AgNPs é dependente do tamanho e da forma, sendo as AgNPs esféricas e de menor tamanho mais eficientes (Raza et al., 2016), semelhante as nanopartículas sintetizadas e utilizadas contra *C. pseudotuberculosis* no nosso estudo.

Poucos estudos relatam a ação de antimicrobianos em biofilme de *C. pseudotuberculosis*. Sá et al. (2013) analisaram a eficácia de desinfetantes na interferência da formação de biofilme e em biofilme consolidado. Nas análises com biofilme consolidado, os desinfetantes não tiveram eficácia. Entretanto, o iodo reduziu a formação do biofilme em 33% dos isolados e a amônia quaternária evitou que 28% dos isolados formassem biofilme. Este foi o primeiro trabalho que estudou a ação de AgNP em biofilme de *C. pseudotuberculosis*. No entanto, os mecanismos antibiofilmes das nanopartículas de prata não são totalmente conhecidos, e dependem do tipo de microrganismo e das propriedades físico-químicas das nanopartículas (Duran et al., 2016).

Os resultados do presente estudo indicaram que os biofilmes consolidados de *C. pseudotuberculosis* sofreram ação de AgNP em diferentes concentrações, conseguindo a erradicação nas maiores concentrações testadas. Compostos naturais, como os compostos extracelulares de fungos podem constituir agentes estabilizadores mais eficazes para prevenir a agregação e aumentar atividade antimicrobiana de AgNPs, aumentando a morte bacteriana em biofilme e reduzindo a citotoxicidade das nanopartículas (Liu et al., 2019). De acordo com Estevez

et al. (2020), a produção de AgNPs a partir de extratos extracelulares de células de *Phanerochaete chrysosporium* (PchNPs) e sua atividade como agentes antimicrobianos e antibiofilmes exibem atividade de interrupção e erradicação de biofilmes de *E. coli* e *C. albicans*. Siddique et al. (2020) concluíram que a porcentagem de inibição de biofilme por AgNP em *K. pneumoniae* MDR cepa MF953600 foi de 64% e para a cepa MF953599 foi de 84% na concentração de 100 mg/mL. A produção de substância exopolimérica diminuiu após o tratamento com AgNP, enquanto o vazamento de proteína celular aumentou devido as taxas mais elevadas de ruptura da membrana celular por AgNPs

Tamanho, forma, propriedades de superfície e interiores de NPs são fatores importantes a serem considerados no controle de biofilme (Liu et al., 2019). O tamanho das NP é crucial para sua penetração nos biofilmes e deve não exceder as dimensões dos canais de água em biofilmes. Como o tamanho dos canais de água em biofilmes são difíceis de estimar, o tamanho ideal de NPs para ação em biofilme deve variar entre 5 e 100-200 nm (Peulen & Wilkison, 2011). Em contrapartida, a baixa sensibilidade de alguns biofilmes consolidados de *C. pseudotuberculosis* pode estar relacionada a uma menor difusão e adsorção do antimicrobiano na matriz exopolimérica, que permitiu apenas o transporte de nutrientes e metabólicos residuais pelos canais de água e dificultou o transporte do antimicrobiano, que provavelmente alcançou apenas as bactérias presentes na parte externa do biofilme (Koo et al., 2017).

A diferença de ação das AgNPs em biofilmes de cepas de referência e isolados clínicos pode ser atribuída a constante manutenção das cepas de referência no laboratório nos meios de cultivo utilizados nos experimentos. Tal resultado foi semelhante ao estudo realizado por Djais et al. (2020) na avaliação do efeito do extrato de própolis na formação do biofilme de *Streptococcus mutans*. Os autores acreditam que o aumento de DO em isolados de crescimento precoce e tardio sob ação do extrato de própolis deve-se a presença da sacarose e outros polissacarídeos presentes no meio TSB. A sacarose pode ser utilizada por estreptococos orais para produzir polissacarídeos extracelulares em biofilmes dentais. O glucano desempenha um papel na formação da placa dentária e facilita a fixação da bactéria na superfície do dente, e o frutano contribui para a virulência do biofilme, agindo como um sítio de ligação para a adesão de *S. mutans* (Djais et al., 2020).

O teste de interferência de na formação do biofilme é uma das estratégias adotadas para controlar os estágios de desenvolvimento de biofilme. O objetivo do teste de interferência é inibir a fixação inicial de bactérias em superfícies formadoras de biofilme, reduzindo assim as chances

de desenvolvimento de biofilme (Subhadra et al., 2018). Estratégias de controle de formação de biofilme tem sido amplamente utilizada na área biomédica com a utilização de cateteres revestidos de antibióticos (Ramos et al., 2011) ou utilização de materiais com texturas superhidrofóbicas capazes de retardar a adesão e a produção de biofilme bacteriano (Falde et al., 2016). A inibição da fixação inicial de biofilme por biomateriais também é uma estratégia útil para controle da formação do biofilme. As AgNPs biogênicas do presente estudo mostraram ser eficientes não apenas impedindo o crescimento bacteriano, mas reduzindo de forma significativa a formação de biofilme em todos os isolados de *C. pseudotuberculosis*.

A fixação inicial das células às superfícies formadoras de biofilme ocorre em média nos primeiros 2 dias de formação do biofilme (Subhara et al., 2018). As AgNPs agiram durante 48h em *C. pseudotuberculosis* controlando a mudança entre a forma planctônica e sésil. Esse controle de mudança entre a forma planctônica e sésil foi observada em cocos Gram-positivos por ação de pequenas moléculas conhecidas como aril rodaninas (Opperman et al., 2009) e em *Vibrio cholerae* por ação de pequenas moléculas que inibem a indução do di-GMP cíclico (Connera et al., 2017). Saising et al. (2012) descobriram que a galidermina foi capaz de inibir completamente a formação de biofilme em concentrações de 4-8 µg/mL. Além disso, os níveis de transcrição dos genes *atl*, envolvido na adesão primária, e *ica*, uma adesina intercelular envolvida na produção de exopolissacarídeo, foram significativamente diminuídos na presença do antimicrobiano. Provalvemente, o efeito antibiofilme deve-se a repressão desses genes. Peptídeos antimicrobianos também são conhecidos por interferir na formação de biofilme em diferentes patógenos bacterianos. O peptídeo antibiofilme 1018 funcionou bloqueando ppGpp, pequenos nucleotídeos de sinalização conhecido por desempenhar um papel importante na formação de biofilme. O tratamento com peptídeos preveniu completamente a formação de biofilme e levou à erradicação de biofilmes maduros em *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* resistente à *meticilina*, *S. Typhimurium* e *Burkholderia cenocepacia* (Fuente-Núñez et al., 2014).

Como confirmação da formação de biofilme utilizando a placa de cultivo de 96 poços, examinamos a formação do biofilme por microscopia eletrônica de varredura. De acordo com os resultados do ensaio em microplaca, as cepas de *C. pseudotuberculosis* demonstraram a capacidade de formação de biofilmes maduros. Tais resultados mostram que a formação de biofilme é uma característica existente entre nossas cepas.

Os biofilmes de *C. pseudotuberculosis* tratados com AgNP apresentaram severa destruição celular e ruptura do biofilme. A exposição a AgNP confere adesão das nanopartículas na parede celular e na membrana, causando alterações morfológicas significativas, como encolhimento do citoplasma, deslocamento da membrana e ruptura celular (Dakal et al., 2016). As imagens de MEV de biofilme de *P. aeruginosa* mostraram poucos agregados bacterianos e menos bactérias viáveis após 24 horas de exposição a nanopartículas (Mu et al., 2016). A exposição de biofilme de *S. aureus* a nanopartículas de Catequina-Cobre por 3 horas danificou drasticamente a forma e o tamanho das células, com parede celular enrugada e fixação de muitos materiais na superfície bacteriana (Li et al., 2015), tal como encontrado nas nossas imagens.

A formação de vesículas na superfície celular de *C. pseudotuberculosis* é consistente com o aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática e vazamento de compostos celulares (Diao et al., 2004). Resultado semelhante foi encontrado por Zhang *et al.* (2011) após exposição de *P. aeruginosa* ao ozônio. O aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática e a desestabilização de estruturas celulares e biomoléculas são mecanismos de ação comuns entre AgNP e ozônio (Singh et al 2014, Habash et al., 2015, Dakal et al., 2016).

Encontramos diferenças entre cepas de referência e isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis* na capacidade de formação biofilme e na resposta após exposição as AgNPs. Embora os estudos de formação de biofilme em *C. pseudotuberculosis* sejam recentes, futuras investigações através da análise metabolômica (Wong et al., 2018) e análise proteômica (Bottagisio et al., 2019) do patógeno crescendo na forma planctônica e sésil ajudarão na compreensão da formação do biofilme, patogênese e transmissão da infecção por *C. pseudotuberculosis* (Sá et al., 2018).

### **Declaração de conflito de interesses**

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

### **Contribuição dos autores**

DS, LS, MS e MK realizaram os experimentos. LS e RP realizaram a análise dos dados. VA, LT, RM e RP projetaram os experimentos. RP e LS escreveram o manuscrito. VA, RM e LT revisaram

criticamente o manuscrito. Todos os autores contribuíram com a revisão do manuscrito, leram e aprovaram a versão submetida.

## Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a Unidade de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/Bahia pela contribuição científica deste trabalho

## Referências

Ballottin, D., Fulaz, S., Cabrini, F., Tsukamoto, J., Durán, N., Alves, O. L., et al. (2017). Antimicrobial textiles: Biogenic silver nanoparticles against *Candida* and *Xanthomonas*. *Mater. Sci. Eng. C* 75, 582–589. doi:10.1016/j.msec.2017.02.110.

Bottagisio, M., Soggiu, A., Piras, C., Bidossi, A., Greco, V., Pieroni, L., et al. (2019). Proteomic analysis Reveals a Biofilm-Like Behavior of Planktonic Aggregates of *Staphylococcus epidermidis* Grown Under Environmental Pressure/Stress. *Front. Microbiol.* 10, 1–17. doi:10.3389/fmicb.2019.01909.

Bastos, B. L.; Portela, R.W.; Dorella, F. A.; Ribeiro, D.; Seyffert, N.; Paula, T. L. De.; Azevedo, V. (2012) *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *J Clin Immunol Cellular*, 84, 15.

Connera, J. G., Zamorano-Sánchez, D., Park, J. H., Sondermannb, H., and Yildiza, F. H. (2017). The ins and outs of cyclic di-GMP signaling in *Vibrio cholerae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 36, 20–29. doi:10.1016/j.mib.2017.01.002.

Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., and Yadav, V. (2016). Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01831.

Diao, H. ., Li, X. ., Gu, J. ., Shi, H. ., and Xie, Z. . (2004). Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction. *Process Biochem.* 39, 1421–1426. doi:10.1016/S0032-9592(03)00274-7.

- Djais, A. A., Putri, N., Jemmy, Putri, A. R., Darwita, R. R., and Bachtiar, B. M. (2019). Effect of propolis on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Pesqui. Bras. Odontopediatria Clin. Integr.* 19, 1–9. doi:10.4034/PBOCI.2019.191.138.
- Durán, N., Durán, M., de Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávaro, W. J., and Nakazato, G. (2016). Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 12, 789–799. doi:10.1016/j.nano.2015.11.016.
- Estevez, M. B., Raffaelli, S., Mitchell, S. G., Faccio, R., and Alborés, S. (2020). Biofilm eradication using biogenic silver nanoparticles. *Molecules* 25. doi:10.3390/molecules25092023.
- Falde, E. J., Stefan, T. Y., Colson, Y. L., and Grinstaff, M. W. (2017). Superhydrophobic materials for biomedical applications. *Biomaterials* 104, 69–81. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.06.050. Superhydrophobic.
- Fontaine, M. C., and Baird, G. J. (2008). Caseous lymphadenitis. *Small Rumin. Res.* 76, 42–48. doi:10.1016/j.smallrumres.2007.12.025.
- Fuente-Núñez, C. de la, Reffuveille, F., Haney, E. F., Straus, S. K., and Hancock, R. E. W. (2014). Broad-Spectrum Anti-biofilm Peptide That Targets a Cellular Stress Response. *PLoS Pathog.* 10. doi:10.1371/journal.ppat.1004152.
- Guedes, M. T., Souza, B. C., Sousa, T. J., Loureiro, D., Moura-Costa, L. F., Azevedo, V., et al. (2015). Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: Aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos. *Pesqui. Vet. Bras.* 35, 701–708. doi:10.1590/s0100-736x2015000800001.
- Habash, M. B., Park, A. J., Vis, E. C., Harris, R. J., and Khursigara, C. M. (2014). Synergy of Silver Nanoparticles and Aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5818–5830. doi:10.1128/AAC.03170-14.
- Jafri, H., Banerjee, G., Khan, M. S. A., Ahmad, I., Abulreesh, H. H., and Althubiani, A. S. (2020). Synergistic interaction of eugenol and antimicrobial drugs in eradication of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *AMB Express* 10. doi:10.1186/s13568-020-01123-2.

- Kalil, M. A., Santos, L. M., Barral, T. D., Rodrigues, D. M., Pereira, N. P., Sá, M. da C. A., et al. (2019). Brazilian Green Propolis as a Therapeutic Agent for the Post-surgical Treatment of Caseous Lymphadenitis in Sheep. *Front. Vet. Sci.* 6, 1–10. doi:10.3389/fvets.2019.00399.
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Hall-stoodley, L., Stoodley, P., Health, C. O., et al. (2017). Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 740–755. doi:10.1038/nrmicro.2017.99.
- Li, H., Chen, Q., Zhao, J., and Urmila, K. (2015). Enhancing the antimicrobial activity of natural extraction using the synthetic ultrasmall metal nanoparticles. *Sci. Rep.* 5, 11033. doi:10.1038/srep11033.
- Liu, Y., Shi, L., Su, L., Mei, H. C. Van Der, Jutte, P. C., Ren, Y., et al. (2020). Antimicrobianos baseados em nanotecnologia e sistemas de entrega para controle de infecção por biofilme. *Nanotechnology-based Antimicrob. Deliv. Syst. biofilm-infection Control* 48, 428–446. doi:10.1039/C7CS00807D.
- Loo, Y. Y., Rukayadi, Y., Nor-Khaizura, M. A. R., Kuan, C. H., Chieng, B. W., Nishibuchi, M., et al. (2018). In Vitro antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected Gram-negative foodborne pathogens. *Front. Microbiol.* 9, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2018.01555.
- Loureiro, D., Portela, R. W., Sousa, T. J., Rocha, F., Pereira, F. L., Dorella, F. A., et al. (2016). Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* viscerotropic strain N1. *Genome Announc.* 4, 15–16. doi:10.1128/genomeA.01673-15.
- Mariano, D. C. B., Sousa, T. de J., Pereira, F. L., Aburjaile, F., Barh, D., Rocha, F., et al. (2016). Whole-genome optical mapping reveals a mis-assembly between two rRNA operons of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain 1002. *BMC Genomics* 17, 1–7. doi:10.1186/s12864-016-2673-7.
- Moura-Costa, L. F., Bahia, R. C., Carminati, R., Vale, V. L. C., Paule, B. J. A., Portela, R. W., et al. (2008). Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126, 131–141. doi:10.1016/j.vetimm.2008.06.013.



- Mu, H., Tang, J., Liu, Q., Sun, C., Wang, T., and Duan, J. (2016). Potent Antibacterial Nanoparticles against Biofilm and Intracellular Bacteria. *Sci. Rep.* 6, 18877. doi:10.1038/srep18877.
- Norman, T. E., Batista, M., Lawhon, S. D., Zhang, S., Kuskie, K. R., Swinford, A. K., et al. (2014). In vitro susceptibility of equine-obtained isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* to gallium maltolate and 20 other antimicrobial agents. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2684–2685. doi:10.1128/JCM.01252-14.
- Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., et al. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 56, 519–523. doi:10.1099/jmm.0.46804-0.
- Opperman, T. J., Kwasny, S. M., Williams, J. D., Khan, A. R., Peet, N. P., Moir, D. T., et al. (2009). Aryl rhodanines specifically inhibit staphylococcal and enterococcal biofilm formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4357–4367. doi:10.1128/AAC.00077-09.
- Oreiby, A., Hegazy, Y., Osman, S., Ghanem, Y., Al-Gaabary, M. (2014). Caseous lymphadenitis in small ruminants in Egypt. Clinical, epidemiological, and prophylactic aspects. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 42, 7–8.
- Peulen, T. O., and Wilkinson, K. J. (2011). Diffusion of nanoparticles in a biofilm. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3367–3373. doi:10.1021/es103450g.
- Punjabi, K., Mehta, S., Chavan, R., Chitalia, V., Deogharkar, D., and Deshpande, S. (2018). Efficiency of biosynthesized silver and zinc nanoparticles against multi-drug resistant pathogens. *Front. Microbiol.* 9, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2018.02207.
- Ramos, E. R., Reitzel, R., Jiang, Y., Hachem, R. Y., Chaftari, A. M., Chemaly, R. F., et al. (2011). Clinical effectiveness and risk of emerging resistance associated with prolonged use of antibiotic-impregnated catheters: More than 0.5 million catheter days and 7 years of clinical experience. *Crit. Care Med.* 39, 245–251. doi:10.1097/CCM.0b013e3181feb83e.
- Raza, M. A., Kanwal, Z., Rauf, A., Sabri, A. N., Riaz, S., and Naseem, S. (2016). Size- and shape-dependent antibacterial studies of silver nanoparticles synthesized by wet chemical routes. *Nanomaterials* 6. doi:10.3390/nano6040074.

Sá, M. C. A., Veschi, J. L. A., Santos, G. B., Amanso, E. S., Oliveira, A. S., Veneroni-gouveia, R. A. M. G., et al. (2013). Activity of disinfectants and biofilm production of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Pesq. Vet. Bras.* 33, 1319–1324.

Sá, M. C. A., Oliveira, S. A. S., Dantas, E. M., Gouveia, G. V., Gouveia, J. J. S., Veschi, J. L. A., et al. (2018). Resistance of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in the Brazilian semiarid environment. *Pesqui. Vet. Bras.* 38, 1091–1096. doi:10.1590/1678-5150-PVB-4960.

Saising, J., Dube, L., Ziebandt, A. K., Voravuthikunchai, S. P., Nega, M., and Götz, F. (2012). Activity of gallidermin on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 5804–5810. doi:10.1128/AAC.01296-12.

Siddique, M. H., Aslam, B., Imran, M., Ashraf, A., Nadeem, H., Hayat, S., et al. (2020). Effect of Silver Nanoparticles on Biofilm Formation and EPS Production of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Biomed Res. Int.* 2020, 9. doi:10.1155/2020/6398165.

Singh, B. R., Singh, B. N., Singh, A., Khan, W., Naqvi, A. H., and Singh, H. B. (2015). Mycofabricated biosilver nanoparticles interrupt *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems. *Sci. Rep.* 5, 13719. doi:10.1038/srep13719.

Subhadra, B., Kim, D. H., Woo, K., Surendran, S., and Choi, C. H. (2018). Control of biofilm formation in healthcare: Recent advances exploiting quorum-sensing interference strategies and multidrug efflux pump inhibitors. *Materials (Basel)*. 11. doi:10.3390/ma11091676.

de Souza, C., Faria, Y. V., Sant'Anna, L. de O., Viana, V. G., Seabra, S. H., de Souza, M. C., et al. (2015). Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 242–248. doi:10.1590/0074-02760140373.

Stanisic, D., Fregonesi, N. L., Barros, C. H. N., Pontes, J. G. M., Fulaz, S., Menezes, U. J., et al. (2018). NMR insights on nano silver post-surgical treatment of superficial caseous lymphadenitis in small ruminants. *RSC Adv.* 8, 40778–40786. doi:10.1039/C8RA08218A.

Tăbăran, A. F., Matea, C. T., Mocan, T., Tăbăran, A., Mihaiu, M., Iancu, C., et al. (2020). Silver nanoparticles for the therapy of tuberculosis. *Int. J. Nanomedicine.* 15, 2231–2258. doi:10.2147/IJN.S241183.

Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., and Nesse, L. L. (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics.* 9, 29. doi:10.3390/antibiotics9020059.

Williamson, L.H. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 17, 359-371.

Windsor, P. A.; Bush, R. D. (2016) Caseous lymphadenitis: Present and near forgotten from persistent vaccination? *Small Ruminant Res*, 142, 6–10.

Wong, E. H. J., Ng, C. G., Goh, K. L., Vadivelu, J., Ho, B., and Loke, M. F. (2018). Metabolomic analysis of low and high biofilm-forming *Helicobacter pylori* strains. *Sci. Rep.* 8, 1–9. doi:10.1038/s41598-018-19697-0.

Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., and Chu, C. H. (2020). The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. *Int. J. Nanomedicine* 15, 2555–2562. doi:10.2147/IJN.S246764.

Zhang, Y. Q., Wu, Q. P., Zhang, J. M., and Yang, X. H. (2011). Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1006–1015. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05113.x.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criação de caprinos e ovinos é uma atividade de grande importância para o Nordeste do Brasil, contribuindo para o desenvolvimento socioeconômico da região. Com isso, desenvolver estratégias para o controle e tratamento da linfadenite caseosa garante melhores condições para o crescimento da produção animal na região.

Considerando as propriedades antimicrobianas de diferentes tipos de própolis e nanopartículas, suas aplicações são fundamentais no desenvolvimento de estratégias para o controle da enfermidade e redução da resistência aos antibióticos convencionais. Notavelmente, a pesquisa e a utilização desses agentes antimicrobianos em biofilme são altamente relevantes para a saúde animal e para a saúde pública, pois várias espécies de bactérias que causam infecções em animais possuem um potencial zoonótico.

Em suma, há necessidade de mais pesquisas de biofilme em *C. pseudotuberculosis*, uma vez que os estudos ainda são escassos e preliminares. Além disso, é necessário desenvolver estratégias de prevenção e tratamento da linfadenite caseosa levando em consideração as características do biofilme e sua capacidade de persistência no hospedeiro e no meio ambiente, bem como a prospecção de novos agentes com potenciais antimicrobianos.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (GERAL)

AL-GAABARY, M. H.; OSMAN, S. A.; AHMED, M. S.; OREIBY, A. F. Abattoir survey on caseous lymphadenitis in sheep and goats in Tanta, Egypt. **Small Ruminant Research**, v. 94, n. 1–3, p. 117–124, 2010.

ALMATAR, M. *et al.* The Role of Nanoparticles in the Inhibition of Multidrug-Resistant Bacteria and Biofilms. **Current Drug Delivery**, v. 15, n. 4, p. 470–484, 2018.

ALMUHAYAWI, M. S. Propolis as a novel antibacterial agent. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 11, p. 3079–3086, 2020.

ANDRADE, J. S. L.; AZEVEDO, E. O.; AZEVEDO, S. S.; TELES, J. A. A.; HIGINO, S. S. S. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 116–120, 2012.

ARAÚJO, C. L. DE A.; DIAS, L. M.; VERAS, A. A. O.; et al. Whole-Genome sequence of corynebacterium pseudotuberculosis 262 biovar equi isolated from cow milk. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, p. 4–5, 2016.

ARSENAULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D.; GALARNEAU, J. R.; BOISCLAIR, J.; SIMARD, C.; BÉLANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, n. 1-2, p. 67–81, 2003.

AUAD, JORDANA et al. Humoral immune response of pregnant goats to two *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin formulations. **Austral j. vet. sci.**, Valdivia, v. 50, n. 2, p. 101–105, 2018.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 4, p. 179–210, 2007.

BAPTISTA, P. V.; MCCUSKER, M. P.; CARVALHO, A.; et al. Nano-strategies to fight multidrug resistant bacteria-"A Battle of the Titans". **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–26, 2018.

BARAÚNA, R. A.; RAMOS, R. T. J.; VERAS, A. A. O.; PINHEIRO, K. C.; BENEVIDES, L. J.; VIANA, M. V. C.; GUIMARÃES, L. C.; EDMAN, J. M.; SPIER, S. J.; AZEVEDO, V.; SILVA,

A. Assessing the genotypic differences between strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi through comparative genomics. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–19, 2017.

BARRAL, T. D.; MARIUTTI, R. B.; ARNI, R. K.; et al. A panel of recombinant proteins for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 1313–1323, 2019.

BASTOS, B. L.; MEYER, R.; GUIMARÃES, J. E.; AYRES, M. C.; GUEDES, M. T.; MOURA-COSTA, L. F.; DE BURGHGRAVE, U. S.; SENA, L.; AZEVEDO, V.; PORTELA, R. W. Haptoglobin and fibrinogen concentrations and leukocyte counts in the clinical investigation of caseous lymphadenitis in sheep. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 4, p. 496–503, 2011.

BAYRAM, C.; IŞIKLI, C.; DENKBAŞ, E. B. Nanotechnology in Sports Medicine. *In*: DORAL, M. N.; KARLSSON, J. (Eds.). **Sports Injuries: Prevention, Diagnosis, Treatment and Rehabilitation**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 1–9, 2015.

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS. Supplementum**, n. 136, p. 1–51, 2013.

BEN SAID, M.S.; BEN MAITIGUE, H.; BENZARTI, M.; MESSADI, L.; REJEB, A. A. Epidemiological and clinical studies of ovine caseous lymphadenitis. **Archives Institute Pasteur Tunis**. 79, 51–7, 2002.

BONIFAIT, L.; GRIGNON, L.; GRENIER, D. Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4969–4972, 2008.

BRUM, A. A.; REZENDE, A. de F. S.; BRILHANTE, F. S.; COLLARES, T.; BEGNINE, K.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T. V.; DELLAGOSTIN, O. A.; AZEVEDO, V.; SANTOS, A.; PORTELA, R. W.; BORSUK, S. Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 635–642, 2017.

BUCHER, T. *et al.* Disturbance of the bacterial cell wall specifically interferes with biofilm formation. **Environmental Microbiology Reports**, v. 7, n. 6, p. 990–1004, 2015.

CARMO, F.; GUIMARÃES, A.; PAULETTI, R.; LAGE, A.; GONÇALVES, V.; MEYER, R.; PORTELA, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A.; HEINEMANN, M. Prevalência

de anticorpos contra a linfadenite caseosa em criações comerciais de ovinos no Distrito Federal, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 79, n. 2, p. 293–296, 2012.

ÇETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R.; DE BAERE, T.; VANEECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 75–83, 2002.

CHIRINO-ZÁRRAGA, C.; SCARAMELLI, A.; REY-VALEIRÓN, C. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. **Small Ruminant Research**, v. 65, n. 1–2, p. 170–175, 2006.

CHUDOBOVA, D.; CIHALOVA, K.; KOPEL, P.; et al. Complexes of Metal-Based Nanoparticles with Chitosan Suppressing the Risk of Staphylococcus aureus and Escherichia coli Infections. Elsevier Inc., 2015.

COLOM-CADENA, A.; VELARDE, R.; SALINAS, J.; BORGE, C.; GARCA-BOCANEGRA, I.; SERRANO, E.; GASS, D.; BACH, E.; CASAS-DAZ, E.; LPEZ-OLVERA, J. R.; SANTIAGO, L.; LEN-VIZCANO, L.; MENTABERRE, G. Management of a caseous lymphadenitis outbreak in a new Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) stock reservoir. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56, n. 83, 2014.

COLVIN, K. M.; IRIE, Y.; TART, C. S.; et al. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 1913–1928, 2012.

CORBEIL, L. E.; MORRISSEY, J. F.; LÉGUILLETTE, R. Is corynebacterium pseudotuberculosis infection (pigeon fever) in horses an emerging disease in western Canada? **Canadian Veterinary Journal**, v. 57, n. 10, p. 1062–1066, 2016.

DE MACEDO, L. O. et al. Prevalence and risk factors associated with infection by *Eimeria* spp. in goats and sheep in Northeastern Brazil. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 3, p. 607–612, 2020.

De SOUZA, C.; FARIA, Y. V.; SANT'ANNA, L. DE O.; et al. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 242–248, 2015.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M. A.; DEKKER-NOOREN, T.; MAANEN, K. Van; BODE, C. F.; BAIRD, G.; KAMP, E. M. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 167–175, 2000.

DEVATHA, C. P.; THALLA, A. K. **Green Synthesis of Nanomaterials**. Elsevier Ltd., 2018.

DOMENIS, L.; SPEDICATO, R.; PEPE, E.; ORUSA, R.; ROBETTO, S. Caseous Lymphadenitis Caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Alpine Chamois (*Rupicapra r. rupicapra*): a Review of 98 Cases. **Journal of Comparative Pathology**, v. 161, p. 11–19, 2018. Elsevier Ltd.

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

DORELLA, F. A. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary research**, v. 37, p. 713–722, 2006.

DORELLA, F. a; PACHECO, L. G.; SEYFFERT, N.; PORTELA, R. W.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 205–213, 2009.

DUFOUR, D.; LEUNG, V.; LÉVESQUE, C. M. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. **Endodontic Topics**, v. 22, n. 1, p. 2–16, 2010.

EGGLETON, D. G.; MIDDLETON, H. D.; DOIDGE, C. V.; MINTY, D. W. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Australian veterinary journal**, v. 68, n. 10, p. 317–319, 1991.

ESTEVEZ, M. B.; RAFFAELLI, S.; MITCHELL, S. G.; FACCIO, R.; ALBORÉS, S. Biofilm eradication using biogenic silver nanoparticles. **Molecules**, v. 25, n. 9, 2020.

FARIAS, A. M.; ALVES, J. R. A.; ALVES, F. S. F.; et al. Serological study on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats in the Brazilian Northeast using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-indirect). **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1344–1350, 2018.



FONTAINE, M. C.; BAIRD, G.; CONNOR, K. M.; et al. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24, n. 33–34, p. 5986–5996, 2006.

FURTADO ARAÚJO, J. *et al.* Vertical transmissibility of small ruminant lentivirus. **PLOS ONE**, v. 15, n. 11, p.12, 2020.

GUILGER-CASAGRANDE, M.; LIMA, R. DE. Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. October, p. 1–16, 2019.

GUIMARÃES, A. M. G.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; GUIMARÃES, A. de S.; DO CARMO, F. B.; PAULETTI, R. B.; SEYFFERT, N.; RIBEIRO, D.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Caseous lymphadenitis: Epidemiology, diagnosis, and control. **Veterinary Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 11, 2011.

HAAS, D. J.; DORNELES, E. M. S.; SPIER, S. J.; et al. Molecular epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses in California. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 49, p. 186–194, 2017. Elsevier B.V.

HEGGELUND, L.; GAUSTAD, P.; HÁVELSRUD, O. E.; BLOM, J.; BORGEN, L.; SUNDSET, A.; SORUM, H.; FROLAND, S. S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* pneumonia in a veterinary student infected during laboratory work. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, p. 1–8, 2015.

HØIBY, N. *et al.* Resistência a antibióticos de biofilmes bacterianos. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, pág. 322–332, abr. 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal**, v. 43, p. 1–49, 2015.

IJAZ, M.; ZAFAR, M.; IQBAL, T. Green synthesis of silver nanoparticles by using various extracts: a review. **Inorganic and Nano-Metal Chemistry**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2020. Taylor & Francis.

JADOUN, S.; ARIF, R.; JANGID, N. K.; MEENA, R. K. Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: a review. **Environmental Chemistry Letters**, n. 0123456789, 2020.

IRAVANI, S. Bacteria in Nanoparticle Synthesis: Current Status and Future Prospects. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, p. 1–18, 2014.

JENNINGS, L. K.; STOREK, K. M.; LEDVINA, H. E.; et al. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 36, p. 11353–11358, 2015.

JESKE, J. M.; SPIER, S. J.; WHITCOMB, M. B.; PUSTERLA, N.; GARDNER, I. A. Use of antibody titers measured via serum synergistic hemolysis inhibition testing to predict internal *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 1, p. 86–92, 2013.

KABA, J.; NOWICKI, M.; FRYMUS, T.; et al. Evaluation of the risk factors influencing the spread of caseous lymphadenitis in goat herds. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 14, n. 2, p. 231–237, 2011.

KHANNA, P.; KAUR, A.; GOYAL, D. Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications. **Journal of Microbiological Methods**, v. 163, n. June, p. 105656, 2019. Elsevier.

KOSTAKIOTO, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J.. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. v. 3, 2013.

LATIF, N. A. A.; ABDULLAH, F. F. J.; OTHMAN, A. M.; RINA, A.; CHUNG, E. L. T.; ZAMRI-SAAD, M.; SAHAREE, A. A.; HARON, A. W.; LILA, M. A. M. Isolation and detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in the reproductive organs and associated lymph nodes of non-pregnant does experimentally inoculated through intradermal route in chronic form. **Veterinary World**, v. 8, n. 7, p. 924–927, 2015.

LI, Z.; NAIR, S. K. Quorum sensing: How bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? **Protein Science**, v. 21, n. 10, p. 1403–1417, 2012.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biolims. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, p. 1–11, 2010.

MALONE, F. E.; FEE, S. A.; KAMP, E. M.; et al. A serological investigation of caseous lymphadenitis in four flocks of sheep. **Irish Veterinary Journal**, v. 59, n. 1, p. 19–21, 2006.

MARKOWSKA, K.; GRUDNIAK, A. M.; WOLSKA, K. I. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 4, p. 523–530, 2013.

MARSLIN, G. SELVAKESAVAN, R. K.; FRANKLIN, G.; SARMENTO, B. D, ALBERTO C. P. Antimicrobial activity of cream incorporated with silver nanoparticles biosynthesized from *Withania somnifera*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5955–5963, 2015.

MATTOS-GUARALDI AL, FORMIGA LC. Relação do biotipo e fonte com a hemaglutinação e propriedades adesivas de *C. diphtheriae*. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**. v. 24, n.4, p. 399-406, 1991.

MENZIES, P. I.; HWANG, Y. T.; PRESCOTT, J. F. Comparison of an interferon- $\gamma$  to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 1–2, p. 129–137, 2004.

MCKEAN, S. C.; DAVIES, J. K.; MOORE, R. J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis* is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. **Microbiology**, v. 153, n. 7, p. 2203–2211, 2007.

MISHRA, M.; BYRD, M. S.; SERGEANT, S.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 95–106, 2012.

MOURA-COSTA, L. F. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, the etiological agent of the caseous lymphadenitis in goats. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 105–115, 2002.

MU, H.; TANG, J.; LIU, Q.; et al. Potent Antibacterial Nanoparticles against Biofilm and Intracellular Bacteria. **Scientific Reports**, v. 6, n. November 2015, p. 1–9, 2016. Nature Publishing Group.

MUNIR, S.; SHAH, A. A.; SHAHID, M.; et al. Quorum sensing interfering strategies and their implications in the management of biofilm-associated bacterial infections. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, 2020.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, p. 37, 2016.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 169, n. 2, p. 59–79, 2011. Elsevier B.V.

ORGAD, O.; OREN, Y.; WALKER, S. L.; HERZBERG, M. The role of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* EPS adherence, viscoelastic properties and cell attachment. **Biofouling**, v. 27, n. 7, p. 787–798, 2011.

OLIVEIRA, M.; BARROCO, C.; MOTTOLA, C.; SANTOS, R.; LEMSADDEK, A.; TAVARES, L.; SEMEDO-LEMSADDEK, T. First report of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from caseous lymphadenitis lesions in Black Alentejano pig (*Sus scrofa domestica*). **BMC veterinary research**, v. 10, n. 1, p. 218, 2014.

O'REILLY, K. M.; GREEN, L. E.; MALONE, F. E.; MEDLEY, G. F. Parameter estimation and simulations of a mathematical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmission in sheep. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 83, n. 3–4, p. 242–259, 2008.

O'REILLY, K. M.; MEDLEY, G. F.; GREEN, L. E. The control of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks: A mathematical model of the impact of vaccination, serological testing, clinical examination and lancing of abscesses. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 95, n. 1–2, p. 115–126, 2010.

OREIBY, A.; HEGAZY, Y.; OSMAN, S.; GHANEM, Y.; AL-GAABARY, M. Caseous lymphadenitis in small ruminants in Egypt. Clinical, epidemiological and prophylactic aspects. **Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere**, v. 42, n. 5, p. 7–8, 2014.

OTHMAN, A. M.; ABBA, Y.; JESSE, F. F. A.; ILYASU, Y. M.; SAHAREE, A. A.; HARON, A. W.; LILA, M. A. M. Reproductive Pathological Changes Associated with Experimental Subchronic *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Nonpregnant Boer Does. **Journal of Pathogens**, v. 2016, p. 7, 2016.

OTSUJI, K.; FUKUDA, K.; ENDO, T.; et al. The first fatal case of *Corynebacterium ulcerans* infection in Japan. **JMM Case Reports**, v. 4, n. 8, p. 1–5, 2017.

PALADINI, F & POLLINI, M. Antimicrobial Silver Nanoparticles for Wound Healing Application : Progress and Future Trends. **Materials**, v. 12, n. 16, p. 16, 2019.

PELGRIFT, R. Y.; FRIEDMAN, A. J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 13–14, p. 1803–1815, 2013. Elsevier B.V.

POLKADE, A. V.; MANTRI, S. S.; PATWEKAR, U. J.; JANGID, K. Quorum sensing: An under-explored phenomenon in the phylum Actinobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–13, 2016.

PREDA, V. G.; SĂNDULESCU, O. Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. **Discoveries**, v. 7, n. 3, p. e10, 2019.

RAMLAN M. et al. A comparison for thtection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep na goats between elisa teste and agar gel immunodiffusion. **Malaysian Jornal of Veterinary Research**, v. 1, n. 1, p. 9-18, jul. 2010.

RAMOS, A. P. Biomedical applications of nanotechnology. **Biophysical Reviews**, v. 9, p. 79–89, 2017.

RASAMIRAVAKA, T.; LABTANI, Q.; DUEZ, P.; JAZIRI, M. EL. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms, v. 2015, 2015. Hindawi Publishing Corporation.

REBOUÇAS, M. F.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; MOURA-COSTA, L. F.; HANNA, S. A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.; PORTELA, R. W.; F, A. R. M.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; HANNA, S. A. Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as antigen 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1296–1302, 2013.

SÁ, M. DA C. A. DE; GOUVEIA, G. V.; DA COSTA KREWER, C.; et al. Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 265–268, 2013.

SÁ, M. C. A. *et al.* Resistance of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in the Brazilian semiarid environment. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 6, p. 1091–1096, 2018.

SÁ, M. DA C. A. DE *et al.* Comparative Proteomic Analyses Between Biofilm-Forming and Non-biofilm-Forming Strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolated From Goats Bacterial Strains and Culture Conditions. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. February, p. 1–10, 2021.

SAINI, R.; SAINI, S.; SHARMA, S. Nanotechnology: The future medicine. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, v. 3, n. 1, p. 32, 2010.

SALINA, A.; PEREIRA, V. B. R.; MENOZZI, B. D. Staphylococcus aureus and non-aureus staphylococci isolated from subclinical and clinical bovine mastitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 3, p. 1034–1038, 2020.

SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; SANTOS, V. W. S. dos; RODRIGUES, A. de S.; LIMA, A. M. C.; OLIVEIRA, E. L. de; ALBUQUERQUE, F. H. M. A. R. de. In vivo evaluation of antiseptics and disinfectants on control of Caseous Lymphadenitis: clinical, haematological, serological and microbiological monitoring. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 273–280, 2013.

SANTHOSHKUMAR, J.; RAJESHKUMAR, S.; VENKAT KUMAR, S. Phyto-assisted synthesis, characterization and applications of gold nanoparticles – A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 11, n. May, p. 46–57, 2017. Elsevier B.V.

SANTOS, L. M. Atividade de extratos etanólicos e supercríticos de própolis marrom, vermelha e verde sobre *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2017. p. 78. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia- Universidade Federal da Bahia, 2017.

SANTOS, L. M.; STANISIC, D.; MENEZES, U. J.; MENDONÇA, M.A.; BARRAL, T.D.; SEYFFERT, N.; VASCO, A.; DURÁN, N.; MEYER, R.; LJUBICA, TASIC.; PORTELA, R.W. Biogenic Silver Nanoparticles as a Post-surgical Treatment for *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Small Ruminants. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. apr, p. 1–11, 2019.

SEIL, J. T.; WEBSTER, T. J. Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2767–2781, 2012.

SELLERA, F. P.; GARGANO, R. G.; LIBERA, A. M. M. P. Della; BENESI, F. J.; AZEDO, M. R.; DE S, L. R. M.; RIBEIRO, M. S.; DA SILVA BAPTISTA, M.; POGLIANI, F. C.

Antimicrobial photodynamic therapy for caseous lymphadenitis abscesses in sheep: Report of ten cases. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 120–122, 2016.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A. S.; PACHECO, L. G. C.; PORTELA, R. W.; BASTOS, B. L.; DORELLA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M. G.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 1, p. 50–55, 2010.

SIDDIQUE, M. H.; ASLAM, B.; IMRAN, M.; et al. Effect of Silver Nanoparticles on Biofilm Formation and EPS Production of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 9, 2020.

SINGH, S. *et al.* Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 53–62, 2017.

SINGH, J.; DUTTA, T.; KIM, K. H.; et al. “Green” synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1–24, 2018.

SHANKER, E.; FEDERLE, M. J. Quorum sensing regulation of competence and bacteriocins in *Streptococcus pneumoniae* and *mutans*. **Genes**, v. 8, n. 1, 2017.

SOOD, N. K.; SANDHU, B. S.; GUPTA, K.; et al. Mesenteric caseous lymphadenitis in a cow calf caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*: A case report. **Veterinarni Medicina**, v. 57, n. 7, p. 371–375, 2012.

SOUZA, M. F.; DE CARVALHO, A. Q.; GARINO, F.; RIET-CORREA, F. Linfadenite caseosa em ovinos deslançados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 224–230, 2011.

SOUZA, M. C.; DOS SANTOS, L. S.; SOUSA, L. P.; et al. Biofilm formation and fibrinogen and fibronectin binding activities by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* invasive strains. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 107, n. 6, p. 1387–1399, 2015.

SUBHADRA, B.; KIM, D. H.; WOO, K.; SURENDRAN, S.; CHOI, C. H. Control of biofilm formation in healthcare: Recent advances exploiting quorum-sensing interference strategies and multidrug efflux pump inhibitors. **Materials**, v. 11, n. 9, 2018.

SUN, H. Grand Challenges in Environmental Nanotechnology. **Frontiers in Nanotechnology**, v. 1, n. December, p. 1–3, 2019.

THIRUVENGADAM, M.; RAJAKUMAR, G.; CHUNG, I.-M. Nanotechnology: current uses and future applications in the food industry. **3 Biotech**, v. 8, n. 1, p. 74, 2018.

TRIPATHI, B. N.; KUMAR, J.; SONAWANE, G. G.; KUMAR, R.; DIXIT, S. K. Microbiological and Molecular Investigation of Clinically Suspected Caseous Lymphadenitis Cases in Goats. **Agricultural Research**, v. 5, n. 4, p. 413–419, 2016.

VARIER, K. M.; GUDEPPU, M.; CHINNASAMY, A.; et al. **Nanoparticles: Antimicrobial Applications and Its Prospects**. 2019.

VERDEROSA, A. D.; TOTSIKA, M.; FAIRFULL-SMITH, K. E. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. November, p. 1–17, 2019.

VOIGT, K.; BAIRD, G. J.; MUNRO, F.; MURRAY, F.; BRULISAUER, F. Eradication of caseous lymphadenitis under extensive management conditions on a Scottish hill farm. **Small Ruminant Research**, v. 106, n. 1, p. 21–24, 2012.

WANG, L.; HU, C.; SHAO, L. The-antimicrobial-activity-of-nanoparticles--present-situati. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 1227–1249, 2017.

WASHBURN, K. E.; BISSETT, W. T.; FAJT, V. R.; LIBAL, M. C.; FOSGATE, G. T.; MIGA, J. A.; ROCKEY, K. M. Comparison of three treatment regimens for sheep and goats with caseous lymphadenitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 234, n. 9, p. 1162–1166, 2009.

WASHBURN, K. E.; FAJT, V. R.; LAWHON, S. D.; ADAMS, L. G.; TELL, L. A.; BISSETT, W. T. Caprine abscess model of tulathromycin concentrations in interstitial fluid from tissue chambers inoculated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* following subcutaneous or intrachamber administration. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 12, p. 6295–6304, 2013.

WILLIAMSON LH. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 17, p. 359-371, 2001.

WINDSOR, P. A.; BUSH, R. D. Caseous lymphadenitis: Present and near forgotten from persistent vaccination? **Small Ruminant Research**, v. 142, p. 6–10, 2016.



YAACOB, M. F. *et al.* Journal of King Saud University – Science Biochemical composition, morphology and antimicrobial susceptibility pattern of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biofilm. **Journal of King Saud University - Science**, n. xxxx, p. 101225, 2020.

YANG, L.; HU, Y.; LIU, Y.; *et al.* Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 1705–1717, 2011.

YITAGESU, E. *et al.* Survival Analysis of Clinical Cases of Caseous Lymphadenitis of Goats in North Shoa, Ethiopia. **Veterinary Medicine International**, v. 2020, p. 1–8, 2020.

ZASADA, A. *Corynebacterium diphtheriae* infections currently and in the past. **Przegląd epidemiologiczny**, v.69, p. 439-444, 2015.

ZAVOSHTI, F. R.; KHOOJINE, A. B. S.; HELAN, J. A.; HASSANZADEH, B.; HEYDARI, A. A. Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in an abattoir in Tabriz: Comparison of bacterial culture and pathological study. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, n. 5, p. 667–671, 2012.