

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Identificação de microrganismos isolados da própolis verde, vermelha e verde da Caatinga e antagonismo das bactérias ao *Colletotrichum falcatum*

Almir Moreira Gonçalves Júnior

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2024

Almir Moreira Gonçalves Júnior
Bacharel em Engenharia Agrônoma

Identificação de microrganismos isolados da própolis verde, vermelha e verde da
Caatinga e antagonismo das bactérias ao *Colletotrichum falcatum*

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr6018 de 2011

Orientadora:

Profª Drª **SIMONE POSSELENTE DE LIRA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Gonçalves Júnior, Almir Moreira

Identificação de microrganismos isolados da própolis verde, vermelha e verde da Caatinga e antagonismo das bactérias ao *Colletotrichum falcatum* / Almir Moreira Gonçalves Júnior - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr6018 de 2011. - - Piracicaba, 2024.

126 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

1. *Baccharis dracunculifolia* 2. *Dalbergia ecastophyllum* 3. *Mimosa tenuiflora* 4. Própolis brasileira 5. Podridão vermelha I. Título

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre se fazer presente, me ajudar, guiar os meus passos e possibilitar a realização dos meus objetivos.

À minha família, começando por meus pais, Almir Gonçalves da Silva e Adiva Moreira Gonçalves, por todo incentivo, amor e compreensão durante o mestrado. Às minhas irmãs, Crislei Saionara e Indira Cristiane, por toda palavra de apoio, amor e carinho recebido ao longo da minha vida, principalmente nesse período em que estive longe de casa, às minhas sobrinhas, Cecília, Celina e Helena por sempre serem fonte de alegria, à minha tia Atelma e aos meus avós, Orlandina e José (Zequinha) por toda ajuda nesses anos. Agradeço a vocês por sempre me lembrarem que tenho um lugar pra voltar independente do que aconteça e que estarão ao meu lado nos melhores e piores momentos. Amo vocês demais.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Simone Possedente de Lira, por todo ensinamento, orientação, dedicação e paciência para comigo.

Aos meus colegas de laboratório: Aline, Juan, Lucianne, Gabriel, Naydja, Mário, Gislene e Juliana, por sempre estarem dispostos a me ajudar. À estagiária Ana Volpato, por todo auxílio, amizade, conversas e risadas no período em que trabalhamos juntos. Ao pós-doutorando Jairo Quintana, por toda paciência e ajuda na parte de extração dos metabólitos e explicações quanto ao estudo de metabolômica. Como também aos técnicos Felipe e Janaina por todo auxílio na condução dos experimentos dessa dissertação.

Aos apicultores Carlota e Celso por possibilitarem coletarmos a própolis verde e os brotos de alecrim-do-campo em sua propriedade. Ao Márcio Ágora e ao apicultor Márcio por possibilitarem a coleta da própolis vermelha e a resina da planta rabo de bugio. E ao apicultor Henrique Breyer por disponibilizar sua propriedade para coletarmos a própolis verde da Caatinga e os brotos da jurema-preta.

Ao prof. Dr. Severino Alencar e ao prof. Dr. Alan Sartori por auxiliar na coleta dos três tipos de própolis e suas respectivas resinas de origem, e otimizar questões de viagem, passagem e transporte.

Ao Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento do Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas por ceder seu laboratório para o processamento inicial das amostras da própolis vermelha e de sua resina de origem.

À Prof^a. Dr^a. Aline Cesar por ceder seu laboratório e equipamentos para extração, purificação e quantificação do DNA e suas alunas de doutorado Simara e Izali, e a pós-doutoranda Cris por sempre me acompanhar nessa etapa e tirar dúvidas quando necessário.

À pós-doutoranda Josy Lazarini por toda ajuda na extração, purificação e extração de DNA, pelas conversas, amizade e companheirismo nessa etapa que deu tanto trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Berlinck por ceder o UPLC para análise química e à Karin Bandeira por auxiliar com essa análise.

Ao Prof. Dr. Marcelo Alves por autorizar a utilização da centrífuga em seu laboratório.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo n° 2019/17721-9) pelo auxílio financeiro para a condução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da ESALQ|USP por possibilitar fazer um mestrado na área de concentração que possuo grande interesse.

Ao Departamento de Ciências Exatas – ESALQ por toda estrutura, equipamentos e espaço para a condução dos experimentos.

Aos amigos do Nordeste: Livia, Ismael e Luan, pelas conversas, pelos momentos de desabafo, se preocuparem com o meu bem estar e se fazerem presentes na minha vida, mesmo estando a mais de dois mil quilômetros de distância.

Aos amigos que Piracicaba me apresentou: Daniel, Wesley, Bruna, Hegla, Rafael, Enoc, Cecília, Camila, Erika, Matheus Beraldo, Kleiton, Giovana e Matheus Medeiros por me receberem tão bem em Piracicaba, por todas as caronas, me apoiarem em momentos de dificuldade, compartilhar momentos de alegria e me fazerem sentir em casa.

A todos vocês meu muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Própolis.....	17
2.1.1. Própolis verde.....	19
2.1.2. Própolis vermelha.....	20
2.1.3. Própolis verde da Caatinga.....	22
2.2. Metabólitos secundários bioativos produzidos por bactérias	23
2.3. <i>Colletotrichum falcatum</i> e a cultura da cana-de-açúcar	26
3. HIPÓTESE	29
4. OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo geral	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5.1 Coleta da própolis verde.....	33
5.2 Coleta da própolis vermelha.....	33
5.3 Coleta da própolis verde da Caatinga.....	34
5.4 Isolamento dos microrganismos	35
5.5 Identificação dos isolados.....	37
5.5.1 Extração de DNA e PCR das bactérias.....	37
5.5.2 Extração de DNA e PCR dos fungos.....	38
5.6 Screening por ensaio antagônico	38
5.7 Cultivo em meio líquido e extração dos metabólitos	40
5.8 Fracionamento	40
5.9 Ensaio biológico de incorporação em meio de cultivo.....	41
5.10 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC – MS/MS).....	42
5.11 Análise de redes moleculares clássicas (<i>Classical Molecular Networking</i>).....	43

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6.1 Isolamento dos microrganismos.....	45
6.2 Identificação dos microrganismos	50
6.2.1 Identificação dos microrganismos da própolis verde e da resina de <i>B. dracunculifolia</i>	50
6.2.2 Identificação dos microrganismos da própolis vermelha e da resina de <i>D. ecastophyllum</i>	54
6.2.3 Identificação dos microrganismos da própolis verde da Caatinga e da resina de <i>M. tenuiflora</i>	58
6.2.4 Comparação entre microrganismos isolados nos três tipos de própolis e suas respectivas resinas de origem.....	61
6.3 Interação antagônica	67
6.4 Avaliação da inibição do crescimento micelial do fungo <i>C. falcatum</i> por metabólitos produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ISP2 R REM 7).....	77
6.5 Estudo químico dos metabólitos secundários produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ISP2 R REM 7).....	80
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
8. CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS.....	91
ANEXOS	107

RESUMO

Identificação de microrganismos isolados da própolis verde, vermelha e verde da Caatinga e antagonismo das bactérias ao *Colletotrichum falcatum*

No Brasil são classificados 13 tipos de própolis, sendo que as própolis verde e vermelha se destacam por sua importância socioeconômica e atividades biológicas. Para essas própolis, a fonte botânica relacionada são a *Baccharis dracunculifolia* e a *Dalbergia ecastophyllum* respectivamente. Recentemente foi descoberto um novo tipo de própolis, ainda não classificada, a própolis verde da Caatinga, onde a planta *Mimosa tenuiflora* é sua principal origem botânica. Ressalta-se que esses três tipos de própolis apresentam compostos bioativos com relatos na literatura de atividade antifúngica, e pouco se sabe sobre a influência de microrganismos associados à própolis sobre as atividades biológicas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar microrganismos associados à própolis verde, vermelha e verde da Caatinga e de suas respectivas resinas de origem e avaliar o potencial antagônico das bactérias isoladas frente ao fungo *Colletotrichum falcatum*, agente causal da podridão vermelha na cana-de-açúcar. Adicionalmente, foi selecionada uma bactéria para estudo do potencial antifúngico dos seus metabólitos secundários. Para isso, as própolis verde, vermelha e verde da Caatinga e as respectivas resinas foram coletadas e os microrganismos isolados utilizando de técnicas de diluição seriada e plaqueamento. Após purificação, a identificação dos microrganismos foi realizada através da extração, amplificação e sequenciamento do DNA. Em seguida, avaliou-se o potencial antagônico das bactérias frente ao *C. falcatum* e foi selecionada uma bactéria para estudo metabólico. Ao todo, foram isoladas 150 bactérias e 14 fungos. Os gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pantoea* estiveram presentes em todos os materiais amostrados e o gênero *Penicilium* presente nas amostras da própolis verde e verde da Caatinga. Quanto aos ensaios antagônicos, foi observado que 56 bactérias apresentaram potencial antagônico ao *C. falcatum*, com destaque para as espécies *Pseudomonas aeruginosa* (ISP2 R REM 7) que foi cultivada e foi possível anotar compostos relatados na literatura com atividade antifúngica, como rhamnolipídeo (Rha-Rha-C10-C10), 1-hidroxi-fenazina e o ácido fenazina-1-carboxílico. Dessa maneira, conclui-se que existem bactérias associadas à própolis verde, vermelha e verde da Caatinga que possuem o potencial inibitório ao *C. falcatum*.

Palavras-chave: *Baccharis dracunculifolia*, *Dalbergia ecastophyllum*, *Mimosa tenuiflora*, Própolis brasileira, Antifúngica, Podridão vermelha

ABSTRACT

Identification of microorganisms isolated from green, red and green propolis from the Caatinga and antagonism of bacteria to *Colletotrichum falcatum*

In Brazil, 13 types of propolis are classified, with green and red propolis standing out for their socio-economic importance and biological activities. For these propolis, the related botanical sources are *Baccharis dracunculifolia* and *Dalbergia ecastophyllum* respectively. Recently, a new type of propolis was discovered, which has not yet been classified: green propolis from the Caatinga, where the plant *Mimosa tenuiflora* is its main botanical source. It should be noted that these three types of propolis have bioactive compounds with antifungal activity reported in the scientific literature, and little is known about the influence of microorganisms associated with propolis on biological activities. Therefore, the aim of this work was to isolate and identify microorganisms associated with green, red and green propolis from the Caatinga and their respective originating resins and to evaluate the antagonistic potential of the isolated bacteria against the fungus *Colletotrichum falcatum*, the causal agent of red rot in sugarcane. In addition, one bacterium was selected to study the antifungal potential of its secondary metabolites. For this purpose, green, red and green propolis from the Caatinga and the respective resins were collected and the microorganisms were isolated using serial dilution and plating techniques. After purification, the microorganisms were identified through DNA extraction, amplification and sequencing. We then evaluated the antagonistic potential of the bacteria against *C. falcatum* and selected one bacterium for metabolomic study. A total of 150 bacteria and 14 fungi were isolated. The genera *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pantoea* were present in all the materials sampled and the genus *Penicillium* was present in the green and Caatinga propolis samples. As for the antagonistic tests, we found that 56 bacteria showed antagonistic potential to *C. falcatum*. The species *Pseudomonas aeruginosa* (ISP2 R REM 7) promoted the highest antagonistic effect, and we noted compounds reported in the literature with antifungal activity, such as rhamnolipid (Rha-Rha-C10-C10), 1-hydroxyphenazine and phenazine-1-carboxylic acid. Therefore, we conclude that there are bacteria associated with green, red and green propolis from the Caatinga that have the potential to inhibit *C. falcatum*.

Keywords: *Baccharis dracunculifolia*, *Dalbergia ecastophyllum*, *Mimosa tenuiflora*, Brazilian propolis, Antifungic, Red rot

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Compostos químicos encontrados na própolis verde.....	20
Figura 2. Compostos químicos encontrados na própolis vermelha.....	21
Figura 3. Compostos químicos encontrados na própolis verde da Caatinga.....	23
Figura 4. Material coletado para isolamento dos microrganismos da própolis verde. A) Colmeia onde foi retirado o sarrafo (coletor) com a própolis verde; B) Sarrafo com a própolis verde; C) Em destaque brotos de alecrim-do-campo usados para remoção de resinas e produção de própolis pelas abelhas.	33
Figura 5. Material coletado para isolamento dos microrganismos da própolis vermelha. A) Colmeia onde foi retirado o sarrafo (coletor) com a própolis vermelha; B) Sarrafo com a própolis vermelha; C) Ferida no tronco de <i>D. ecastaphyllum</i> para exsudação da resina.	34
Figura 6. Brotos jovens que contém a resina que dá origem à própolis verde da Caatinga.	35
Figura 7. Representação do ensaio antagônico das bactérias isoladas frente ao fungo <i>Colletotrichum falcatum</i>	39
Figura 8. Exemplos de alguns morfotipos de microrganismos isolados da própolis verde e resina de <i>B. dracunculifolia</i> . As bactérias estão cultivadas em meio TSA e os fungos em meio BDA ou meio com própolis.....	46
Figura 9. Morfotipos de microrganismos isolados das própolis vermelha e verde da Caatinga, como também de suas resinas de origem no meio TSA e BDA.....	49
Figura 10. Diagrama de veen com a identificação a nível de gênero dos microrganismos isolados da própolis verde, vermelha e verde da Caatinga (com suas respectivas resinas de origem).	63
Figura 11. Diagrama de veen com a identificação a nível de espécie dos microrganismos isolados da própolis verde, vermelha e verde da Caatinga (com suas respectivas resinas de origem).	66
Figura 12. Inibição do crescimento micelial de <i>C. falcatum</i> frente a microrganismos isolados da própolis verde e resina de <i>B. dracunculifolia</i> . Códigos seguidos de (') representam o verso da placa.	71
Figura 13. Inibição do crescimento micelial de <i>C. falcatum</i> frente a microrganismos isolados da própolis vermelha e resina de <i>D. ecastaphyllum</i> . Códigos seguidos de (') representam o verso da placa.	74
Figura 14. Inibição do crescimento micelial de <i>C. falcatum</i> frente a microrganismos isolados da própolis verde da Caatinga e resina de <i>M. tenuiflora</i> . Códigos seguidos de (') representam o verso da placa.	76

Figura 15. Ensaio de incorporação em meio de cultura BDA com a fração metanólica após o *clean up*: frações geradas a partir da coluna sep-Pak C₁₈ e fungicidas Piori e Fox na concentração de 250 µg ml⁻¹ contra o fungo *Colletotrichum falcatum*. 79

..... 81

Figura 16. Análise das redes moleculares clássicas para a fração metanólica (após o *clean up*) e as frações geradas em cromatografia em coluna C₁₈ (água:metanol (75:25), água:metanol (50:50), água:metanol (25:75) e metanol 100% metanol). *Features* que apresentam a cor vermelha representa compostos encontrados na fração após o *clean up*; a cor verde representa a *features* presentes na fração ativa água:metanol (50:50); a cor azul representa *features* na fração ativa água:metanol (27:75). *Features* em cinza representam as frações não ativas água:metanol (27:75) e metanol 100 %. 81

Figura 17. Estrutura química dos compostos químicos anotados na análise de molecular network que apresentam atividade antifúngica relatada. 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Microrganismos isolados da Própolis verde e de <i>B. dracunculifolia</i>	45
Tabela 2. Microrganismos isolados da Própolis Vermelha e de <i>D. ecastophyllum</i>	47
Tabela 3. Microrganismos isolados da Própolis Verde da Caatinga e de <i>M. tenuiflora</i>	48
Tabela 4. Identificação dos microrganismos isolados da própolis verde e da sua fonte botânica, a resina de <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC. (alecrim-do-campo) coletados em Guaranésia - MG.	51
Tabela 5. Identificação dos microrganismos isolados da própolis vermelha e da sua fonte botânica a resina de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> (L.) (rabo-de-bugio) coletados em Marechal Deodoro – AL.	55
Tabela 6. Identificação dos microrganismos isolados da própolis verde da Caatinga e sua fonte botânica, a resina de <i>Mimosa tenuiflora</i> (jurema preta) coletados em Remanso - BA. ..	58
Tabela 7. Percentual de inibição do fungo <i>Colletotrichum falcatum</i> em teste antagônico com microrganismos isolados da própolis verde e da resina de <i>B. dracunculifolia</i>	68
Tabela 8. Percentual de inibição do fungo <i>Colletotrichum falcatum</i> em teste antagônico com microrganismos isolados da própolis vermelha e da resina de <i>D. ecastophyllum</i>	72
Tabela 9. Percentual de inibição do fungo <i>Colletotrichum falcatum</i> em teste antagônico com microrganismos isolados da própolis verde da Caatinga e da resina de <i>M. tenuiflora</i>	75
Tabela 10. Anotações das amostras com as livrarias do GNPS	82

1. INTRODUÇÃO

O termo própolis deriva de duas palavras gregas, “pro” e “polis”, que significam “defesa” e “cidade” respectivamente, e está diretamente relacionado com uma de suas funções na colmeia, que é a de proteção, pois forma uma barreira protetora contra agentes ambientais e invasores externos (lagartos, insetos e ratos) (SIMONE-FINSTROM; SPIVAK 2010).

No Brasil são classificados 13 (treze) tipos de própolis, sendo as mais estudadas e economicamente importantes, a própolis verde e a própolis vermelha. Atenção especial foi dada à essas própolis devido ao potencial de descoberta de novas moléculas bioativas e ao valor agregado ser relativamente alto no mercado em todo o mundo (ALENCAR et al., 2007; FIGUEIREDO-RINHEL et al., 2013; FREIRES; ALENCAR; ROSALEN 2016). Um outro tipo de própolis recentemente descoberta no Brasil, é a própolis verde da Caatinga, trata-se de uma própolis quimicamente diferente das demais própolis brasileiras, mas que também tem chamado a atenção devido aos metabólitos secundários bioativos encontrados nesse tipo de própolis (FERREIRA et al., 2017).

A própolis é um material resinoso que apresenta diversos compostos bioativos, conferindo várias atividades biológicas, como atividade anti-inflamatória, antioxidante, citotóxica a células tumorais, anti-viral, antiparasitária, antibiótica e antifúngica (ŽIŽIĆ et al., 2013; BUENO-SILVA et al., 2017; PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI 2019; YORSI et al., 2021).

Até o momento, a maioria dos estudos relativos ao potencial biológico dos compostos presentes nas própolis, partem da premissa de que esses compostos bioativos são levados pela abelha e depositados diretamente na própolis baseado exclusivamente a partir da sua origem botânica. Nesse raciocínio, existe uma linha científica pouco abordada até o momento, sobre o papel dos microrganismos na produção dos metabólitos secundários e o ambiente em que estão inseridos. As abelhas, durante a coleta das resinas, pólen, entre outros produtos, provavelmente coletam microrganismos (fungos e bactérias) endofíticos que estão presentes nas plantas e levam até a colmeia para depositar na própolis (IÓCA et al., 2014). O cenário complexo de elaboração da própolis pela abelha, levando em consideração a presença de microrganismos que podem metabolizar e transformar compostos, como também produzir metabólitos secundários bioativos não foi considerado previamente com o objetivo de entender a produção dos compostos bioativos da própolis.

Várias técnicas, reunindo conhecimentos em microbiologia, biologia molecular química e bioquímica, têm sido utilizadas para aprimorar o uso de microrganismos no isolamento de novos princípios ativos. Nos últimos anos a utilização de novos meios de

cultura e novas condições de cultura, permitiu o enriquecimento do repertório bacteriano através do isolamento de novas espécies bacterianas. Isto mostra que os meios de cultura continuam a ser uma ferramenta fundamental para os bacteriologistas para o isolamento de microrganismos. Na verdade, embora existam muitos meios de cultura enriquecidos, cada bactéria é única e tem requisitos específicos (BONNET et al., 2020).

Em relação à produção de compostos bioativos, como os metabólitos secundários, os microrganismos são uma fonte de interesse para prospectar tais compostos, visto que são de fácil cultivo e produção quando comparado com as plantas (NARAYANAN; GLICK 2021). O interesse no emprego de microrganismos, mais especificamente dos seus metabólitos bioativos, em práticas agrícolas aumentou significativamente nos últimos anos, onde estudos metabolômicos revelaram que os microrganismos podem atuar como reservatórios de novos metabólitos secundários bioativos, incluindo alcaloides, flavonoides, xantonas, terpenóides, compostos fenólicos e muitas outras subclasses. Desse modo, os microrganismos representam um recurso promissor de novos produtos naturais com atividades biológicas importantes, como atividades antimicrobianas e antifúngicas, por exemplo (GUPTA et al., 2020).

Novas estratégias da pesquisa em produtos naturais microbianos, envolvendo a busca de substâncias em microrganismos pouco explorados e a utilização de ferramentas genômicas para o acesso a novos produtos naturais, podem acelerar o processo de descoberta de novos produtos bioativos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO 2010), extremamente importantes num cenário de rápido desenvolvimento de resistência por fungos aos tratamentos convencionais de controle na agricultura. As bactérias correspondem a um grupo de microrganismos de elevada diversidade metabólica, têm a capacidade de se adaptar a parâmetros extremos, como também à diversas condições ambientais, o que pode resultar em populações ecologicamente adaptadas residindo em habitats geográficos distintos. Nesse sentido, ambientes pouco estudados, como a própolis, ou extremos têm a capacidade potencial de ser uma fonte de novas fontes de produtos naturais bioativos (RIEDLINGER et al., 2004; ANDRIANASOLO et al, 2009; MCDOUGALD et al., 2011).

Essa busca por compostos naturais bioativos com atividade antifúngica, pode contribuir com novas moléculas ativas para favorecer o controle de diversas doenças causadas por fungos, inclusive fungos fitopatogênicos. Esses produtos naturais podem ser utilizados no controle do *Colletotrichum falcatum*, por exemplo, agente causal da podridão vermelha na cultura da cana-de-açúcar. Esse é um patógeno causa diversos prejuízos para a cana, principalmente pela inversão da sacarose, e pode levar a perda de 50 a 70 % da sacarose em

colmos, e a situação fica ainda mais grave quando há o ataque simultâneo pela broca da cana (*Diatrea saccharalis*) (AMORIM et al., 2016). Outro fator que justifica a busca por alternativas ao controle químico contra esse patógeno, é que o *C. falcatum* facilmente torna-se tolerante à variedades resistentes, dificultando o manejo dessa doença em campo (HASSAN; AFGHAN; HAFEEZ 2010).

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar microrganismos da própolis verde, vermelha e verde da Caatinga e de suas respectivas resinas botânicas de origem e avaliar o potencial das bactérias isoladas na inibição do crescimento do fungo *Colletotrichum falcatum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Própolis

A própolis é uma mistura de substâncias resinosas constituída, principalmente, por ceras e resinas de várias fontes vegetais, como botões florais e exsudatos de várias partes da planta, entretanto sempre existe uma espécie botânica predominante associada a cada tipo de própolis. A própolis é utilizada por abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) como estrutura de construção, reparação e proteção das colmeias em que vivem (CIFTCI-YILMAZ et al., 2017; DAMODARAN, 2021).

Acredita-se que a utilização da própolis funcione também como uma maneira das colônias manter a homeostase do ambiente da colmeia, impedindo o fluxo de ar descontrolado para dentro do ninho, como também impermeabilizando as paredes contra umidade externa (SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2011). Dessa maneira, essa substância resinosa torna-se uma ferramenta importante de proteção nas colmeias num contexto em que esses ambientes são ricos em nutrientes e por este motivo são hospedeiros de uma ampla variedade de fungos saprofíticos, além de também atuarem impedindo a entrada de parasitas no ninho (NIU; JHONSON; BERENBAUM, 2010).

A própolis bruta geralmente é encontrada no estado sólido (15 °C a 30 °C) e maleável a partir dos 30 °C. Suas propriedades físicas, como cor, odor e faixa de fusão (60 °C a 70 °C) variam de um tipo para outro. Alguns solventes como éter, etanol, acetona, tolueno e tricloroetileno, permitem a dissolução de muitos dos seus constituintes (PEREIRA, et al., 2015; SALGUEIRO; CASTRO, 2017).

A composição química de cada tipo de própolis varia de acordo com a região geográfica onde está inserida a colmeia, época de coleta do material, como também da espécie vegetal que é utilizada como matéria prima para produzir cada tipo de própolis (PAVLOVIC et al., 2020; DAMODARAN, 2021). Essas diferenças resultam na diversidade da composição química e conseqüentemente observa-se um vasto potencial na atividade biológica, tais como anti-inflamatória (SFORCIN; BANKOVA, 2011;), antibacteriana, antifúngica, anticâncer, entre outros (ALENCAR et al., 2007; SILVEIRA et al., 2021).

As própolis brasileiras são classificadas em 13 tipos (tipos 1 a 13) de acordo com sua origem botânica, localização, cor e época de coleta (ALENCAR et al., 2007; OLDONI et al., 2015). Devido ao clima brasileiro, as abelhas coletam a resina que dá origem à própolis o ano

todo, e este é um país que se destaca por possuir diversos tipos de própolis com diferentes origens botânicas (PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019).

Entre os tipos de própolis encontradas no Brasil, pode-se citar a própolis verde, cuja resina de origem vem de brotos jovens não expandidos de *Baccharis dracunculifolia* (TEIXEIRA et al., 2005), a própolis vermelha, onde a árvore *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub atua como fonte da resina para esta própolis (DAUGSCH et al., 2008) e um novo tipo de própolis foi descoberta nos últimos anos (e portanto não classificada dentre os 13 tipos), a própolis verde da Caatinga, onde a *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir configura como a principal fonte de resinas para essa própolis (FERREIRA et al., 2017; SON et al., 2022).

Existem muitos trabalhos que tratam das propriedades biológicas *in vitro* e *in vivo* da própolis (MACHADO et al., 2016; YUAN, et al., 2020; CONTE et al., 2021). Esta ampla gama de bioatividade e a descoberta contínua de novos compostos, tornam a própolis um potencial candidato à descoberta de fármacos que podem ser úteis em diversos cenários clínicos (SILVA-CARVALHO et al., 2015).

Percebe-se também que poucos são os trabalhos que estudam os microrganismos presentes na própolis, havendo trabalhos de metagenômica (SAELAO et al., 2020) e outros no âmbito do isolamento e cultivo de microrganismos da própolis da Itália (CASALONE et al., 2020); e fungos da própolis da Bahia (FERREIRA et al., 2021) e de Porto Rico (SALLEMI et al., 2022).

Até o momento, a maioria dos estudos relativos ao potencial biológico dos compostos presentes nas própolis partem da premissa de que esses compostos bioativos são levados pela abelha, e formaram a própolis exclusivamente a partir da sua origem botânica. Nesse raciocínio, existe uma linha científica pouco abordada até o momento, sobre o papel dos microrganismos na produção dos metabólitos secundários e no ambiente em que estão inseridos (IÓCA et al., 2014).

Muitos fatores contribuem para a alta diversidade na composição e estrutura do microbioma da colmeia, como a disponibilidade de alimentos durante a estação de forrageamento das abelhas, vegetação, tratamentos fitossanitários em culturas agrícolas próximas às colmeias, como também a localização geográfica que a colmeia está instalada (LIU et al., 2020a; MUÑOZ-COLMERENO et al., 2020; NOWAK et al., 2021).

Nesse sentido, no melhor do nosso conhecimento, não há trabalhos de isolamento e identificação de microrganismos, por técnicas dependentes de cultivo e nem estudos utilizando métodos independentes de cultivo para as própolis verde, vermelha e a verde da

Caatinga. Por isso, com este trabalho, visou-se isolar e identificar os microrganismos presentes nestes três tipos de própolis, como também a partir de suas resinas de origem.

2.1.1. Própolis verde

A resina que dá origem a própolis verde é proveniente, principalmente, de brotos jovens não expandidos de *Baccharis dracunculifolia* DC (alecrim-do-campo). Essa espécie botânica é distribuída na América do Sul: Argentina, Bolívia, Paraguai, Peru, Uruguai e Brasil (Sul, Sudeste e Centro-Oeste). Está presente em diversos tipos de vegetação, ocorrendo tanto nos campos do planalto quanto nas restingas costeiras, e a sua origem fitogeográfica são a Mata Atlântica, o Cerrado e o Pampa (HEIDEN, 2022; MINTEGUIAGA et al., 2021).

Estudos indicam que são as substâncias voláteis presentes nos brotos que atraem as abelhas para a coleta de resina. Esse tipo de própolis é encontrado, principalmente, na região sudeste brasileira, nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (ALENCAR et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005).

Compostos frequentemente encontrados na própolis verde são os mono e sesquiterpenos, responsáveis por seu característico odor resinoso e contribuindo para a atividade antimicrobiana, como o farnesol (1) (Figura 1) que demonstrou afetar o acúmulo e o conteúdo de polissacarídeos de *Streptococcus mutans* (HAYACIBARA et al., 2003). Essa própolis é tradicionalmente usada para tratar processos inflamatórios e distúrbios hepáticos e estomacais (ZHANG et al., 2017).

Análises fitoquímicas de partes aéreas e subterrâneas de *B. dracunculifolia* indicaram a presença de óleos, ácidos fenólicos: artepillin C (2) e p-cumárico (3), flavonóides: naringenina (4) e acacetina(5) (Figura 1), diterpenos, triterpenos e glicosídeos. Esses compostos isolados de extratos da planta e também encontrados na própolis verde garantem propriedades anti-ulcerogênico, antioxidante, atividade antimicrobiana, como também aplicações para o tratamento de pacientes oncológicos, ou que possuem diabetes, hipertensão e também são utilizadas na redução de células inflamadas (ZHANG et al., 2017; GAZIM et al., 2022; MINTEGUIAGA et al., 2022; OKAMURA et al., 2022).

O composto químico encontrado em maior concentração na própolis verde é o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepillin C). Essa substância apresenta atividade antitumoral, antibacteriana, antiviral e também, mesmo aplicado em baixas concentrações, apresenta atividade analgésica e anti-inflamatória (PAULINO et al., 2008; SZLISZKA et al., 2013; TORETI et al., 2013).

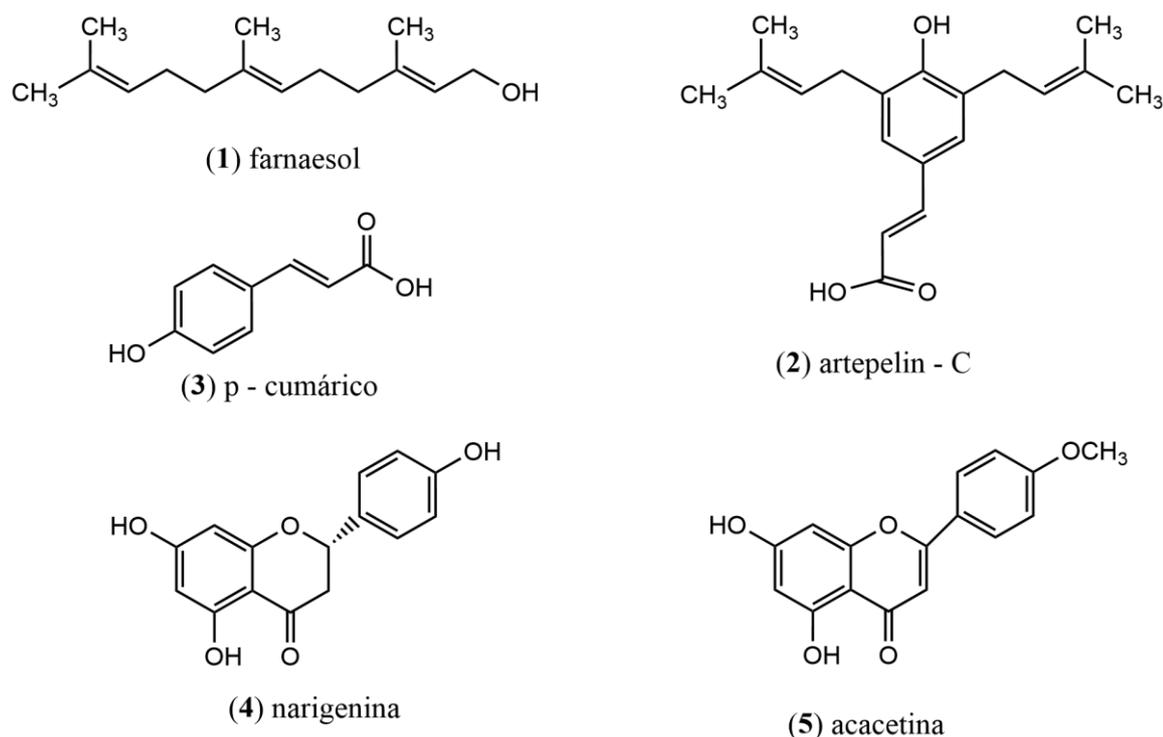


Figura 1. Compostos químicos encontrados na própolis verde.

Em consequência da atividade antimicrobiana, a própolis verde é capaz de inibir o crescimento de fungos e bactérias (BASTOS et al., 2008; PAZIN et al., 2019). Estudos têm mostrado que compostos fitoquímicos como os encontrados na própolis verde podem interagir e modificar a estrutura das biomembranas das células-alvo, levando as proteínas de membrana a perderem suas funções e refletindo um grande repertório de efeitos biológicos (REMPE et al. 2017). E devido a esses motivos, a própolis verde vem sendo cada vez mais utilizada na medicina e na indústria farmacêutica (MARUYAMA et al., 2009).

2.1.2. Própolis vermelha

A própolis vermelha, encontrada no nordeste brasileiro provém da resina de *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub, popularmente conhecida como rabo de bugio, espécie encontrada principalmente nos estados da Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe e a sua ocorrência é quase sempre associada a manguezais e áreas de restinga, reunindo um emaranhado de raízes, ramos e caules que auxiliam na fixação da areia (DAUGSCH et al., 2007; MATA et al., 2014). Foi possível identificar que esta planta é a que fornece a resina que

dá origem à própolis vermelha através da comparação química de compostos presentes na resina e na própolis (DAUGSCH et al., 2007; JAIN et al., 2014).

Como exemplo dos compostos químicos na própolis vermelha, pode-se citar as chalconas, isoflavonas e pterocarpanos (BANKOVA et al., 2019). No entanto, sua composição está fortemente influenciada pela localização e as condições meteorológicas da época da coleta da própolis (BUENO-SILVA et al., 2017; BANKOVA et al., 2019).

Entre os compostos químicos em comum na própolis vermelha e na planta *D. ecastophyllum*, pode-se citar os flavonoides: isoliquiritigenina (6), liquiritigenina (7), naringenina (8) e os isoflavonoides: formononetina (9) e mucronulatol (10) (Figura2) (DAUGSCH et al., 2007; PICCINELLI et al., 2011).

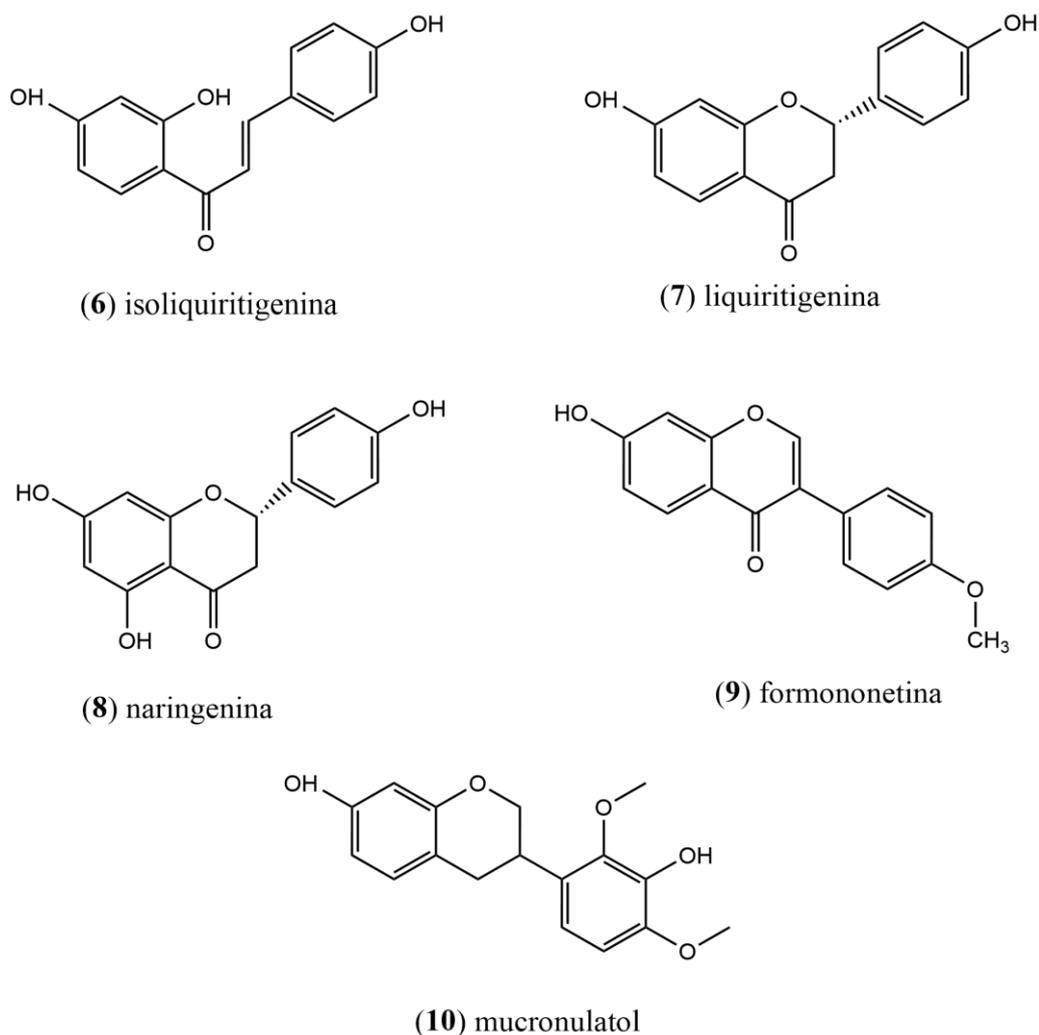


Figura 2. Compostos químicos encontrados na própolis vermelha

Devido à sua composição química complexa e distinta das demais própolis brasileiras, a própolis vermelha apresenta diversas propriedades biológicas, destacando-se sua atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena. Por este motivo, a própolis vermelha é promissora no desenvolvimento de pesquisas em saúde, agregando benefícios clínicos e comerciais (PONTES et al., 2018; SANTOS et al., 2019).

2.1.3. Própolis verde da Caatinga

Para a produção de própolis verde da Caatinga, as abelhas coletam material resinoso de plantas da espécie *Mimosa tenuiflora* (Jurema-Preta) (FERREIRA et al., 2017; SON et al., 2022). A semelhança dos perfis químicos (através de análises cromatográficas) da própolis e dos ápices vegetais demonstram fortes evidências indicando que a jurema-preta é uma das principais fontes de resina da própolis verde do Nordeste (FERREIRA et al., 2017).

Popularmente conhecida como “Jurema-Preta”, *M. tenuiflora* pertence à família Fabaceae e ocorre nos domínios fitogeográficos da Caatinga e Cerrado. A *M. tenuiflora* é caracterizada pela presença de espinhos nos galhos e a floração ocorre durante a estação chuvosa do ano, geralmente, três a cinco meses no ano (de janeiro a maio) (SANTISTEBAN et al., 2019; WALTER et al., 2020).

Uma peculiaridade do perfil químico das amostras analisadas da própolis verde da Caatinga é o teor relativamente alto de chalconas. Tais metabólitos são precursores biossintéticos de outras classes de flavonoides e devido a isso, essa própolis tem perspectivas promissoras no mercado apícola (FERREIRA et al., 2017).

Mendonça et al. (2021) identificaram pela primeira vez os compostos mais abundantes presentes na própolis verde da Caatinga, como os sesquiterpenos: β -cariofileno (**11**), 7-epi- α -selineno (**12**) e δ -cadineno (**13**) (Figura 3).

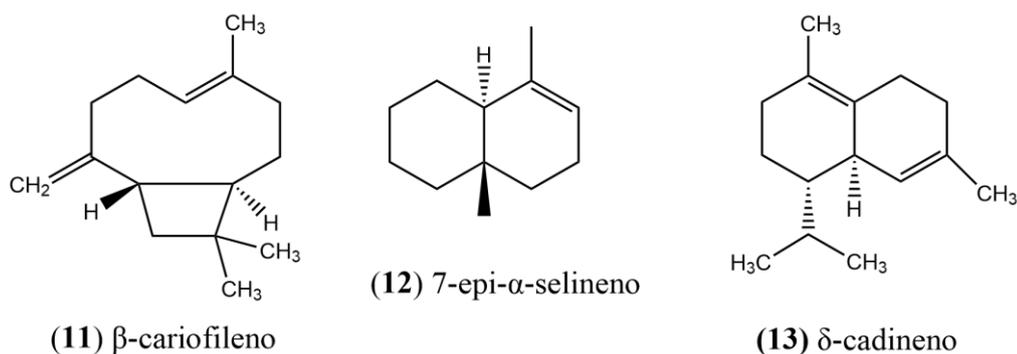


Figura 3. Compostos químicos encontrados na própolis verde da Caatinga.

Para este tipo de própolis, escassos são os estudos relativos à sua atividade biológica. Mas, mediante análises cromatográficas de análise, salienta-se que a composição química da própolis verde da Caatinga é diferente dos demais tipos de própolis encontradas no Brasil (FERREIRA et al., 2017).

Apesar dos diversos estudos referentes às composições químicas e atividades biológicas das própolis pouco se conhece sobre a microbiota associada própolis e suas funções, ou seja, se os microrganismos teriam algum papel nestas atividades ou se seriam exclusivas dos compostos de plantas.

2.2. Metabólitos secundários bioativos produzidos por bactérias

Os metabólitos secundários são moléculas orgânicas bem diversificadas estruturalmente de baixo peso molecular (menores de 2.000 Da) que desempenham diversas funções nos organismos produtores, como auxiliar na competição por espaço, luz e nutrientes, atração, estimulação, agentes de transporte de metais, agentes de comunicação entre microrganismos, plantas, nematóides e insetos, como também defesa contra predadores, através da produção de antibióticos e antifúngicos (DEEPIKA; MURALI; SATYAMOORTHY 2016; MEIJ et al., 2017; SAMUELS; MATTOSO; MOREIRA, 2013).

Qualquer que seja o papel biológico dos metabólitos secundários na natureza, eles são importantes para os organismos que as sintetizam, uma vez que uma quantidade significativa de recursos celulares, incluindo moléculas de construção do metabolismo primário e energia na forma de ATP e NADPH são necessários para sua biossíntese. Aparentemente, as vias biossintéticas dos metabólitos secundários evoluíram ao longo de milhões de anos para gerar estruturas químicas que interagem com alvos biológicos específicos, seja no próprio organismo produtor ou naqueles presentes no ambiente

circundante. Consequentemente, pode-se presumir que a maioria, senão todos, os metabólitos secundários têm atividades biológicas, embora talvez ainda não se tenham ensaios para detectá-los (SEKUROVA; SCHNEIDER; ZOTCHEV et al, 2019).

Os microrganismos representam uma importante e diversa fonte de produtos naturais farmacologicamente ativos para tratar diversas doenças, infecções e até mesmo câncer. Salienta-se que mais de 50 % de todos os medicamentos farmacêuticos utilizados atualmente no mercado são diretamente derivados ou inspirados em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Avanços recentes em técnicas de engenharia metabólica desvendaram novos métodos para superar as limitações associadas com síntese em larga escala de metabólitos importantes e tornam os microrganismos consideráveis produtores de vários agentes químicos valiosos. A obtenção de moléculas bioativas a partir de microrganismos abre uma nova área de pesquisa para o uso desses metabólitos como uma fonte alternativa viável e não controversa de fitoquímicos importantes. Dessa maneira, estará atendendo uma crescente necessidade da indústria, seja ela voltada para a saúde humana, animal ou agrícola, que é desenvolver, sintetizar ou descobrir novas moléculas bioativas potentes que sejam seguras e eficazes contra fungos e bactérias multirresistentes (DEEPIKA; MURALI; SATYAMOORTHY 2016; WANG et al., 2016).

As bactérias são, talvez, os produtores microbianos mais prolíficos de produtos naturais bioativos. As novas estratégias para explorar a diversidade microbiana, incluindo o cultivo *in situ*, a mineração do genoma e do metagenoma, auxiliam na investigação do seu potencial químico e contribuem para expandir a compreensão de como os microrganismos interagem entre si e com outros organismos presentes em determinado nicho ecológico. Tudo isso associado com novos métodos e ferramentas para avaliar o potencial biossintético das bactérias facilita a descoberta de novas moléculas bioativas (STRACHAN ; DAVIES, 2016; METELEV et al., 2017).

O extenso estudo do perfil metabólico de bactérias revelou produtos naturais estruturalmente únicos (GONTANGET al., 2010). A descoberta dessas novas moléculas é favorecida quando se explora microrganismos de ambientes anteriormente pouco explorados, inóspitos ou com propriedades antimicrobianas (como a própolis). Explorar esses ambientes é de extrema importância, visto que há relatos de que o ambiente tem um impacto importante na capacidade de uma mesma espécie bacteriana de biossintetizar ou não metabólitos

secundários bioativos (ZIEMERTET al., 2014; SEKUROVA; SCHNEIDER; ZOTCHEV, 2019).

Uma abordagem utilizada para estudar metabólitos de baixo peso molecular e as vias metabólicas, é a metabolômica (WU et al., 2015; TURI et al., 2018). Essa abordagem vem sendo conduzida em diversos ambientes, como em universidades, hospitais universitários, grandes organizações públicas de pesquisa e em laboratórios de grandes empresas multinacionais para descobrir biomarcadores, medicamentos. É uma ferramenta utilizada na nutrigenômica, na metabolômica e para estudar a interação dos organismos com o meio ambiente, na área de ecologia e ecofisiologia. Além disso, as tecnologias de metabolômicas podem ser utilizadas para a descoberta e identificação de marcadores de plantas doentes e estressadas, bem como para acompanhar modificações genéticas e elucidar efeitos biológicos (CRIGHTON et al., 2016; HU; XU 2014; MATTOLI; GIANNI; BURICO, 2023).

A metabolômica microbiana concentra-se na análise de metabólitos primários intracelulares ou extracelulares, moléculas sinalizadoras, hormônios e metabólitos secundários, além de contribuir para avanços na descoberta de vias metabólicas únicas, como também no entendimento do comportamento dos microrganismos no ambiente. O progresso na metabolômica microbiana encontra desafios principalmente devido à elevada complexidade e diversidade de metabólitos microbianos, que geralmente são difíceis de identificar. Contudo, com o rápido desenvolvimento de novas técnicas analíticas, a metabolômica microbiana tem atraído cada vez mais atenção porque não apenas elucidada a rede de várias vias metabólicas, mas também expõe a mecanismos subjacentes às interações entre microrganismos e hospedeiros (XU et al., 2014; YE et al., 2022).

Alguns fatores contribuem para a urgência em se obter novas moléculas bioativas, entre esses fatores podemos citar o aumento da população, a dificuldade em acessar alimentos de qualidade por muitos e o surgimento de novos patógenos multirresistentes aos tratamentos químicos que são os desafios enfrentados pelo mundo em desenvolvimento, e por essas razões, há uma demanda cada vez maior por novas moléculas eficazes e mais seguras para combater doenças em humanos, em animais e vegetais (PATIL; PATIL; MAHESHWARI 2016).

A utilização de metabólitos bioativos produzidos por bactérias contribui para uma agricultura mais sustentável, visto que podem diminuir a utilização de defensivos químicos e permitir a sanidade da lavoura, garantindo assim a sua produtividade. A utilização desses metabólitos na cultura da cana-de-açúcar pode contribuir para controlar o agente causal da podridão vermelha, o fungo *Colletotrichum falcatum*, visto que esse é um patógeno que

desenvolve rápida resistência frente a princípios ativos químicos utilizado para controlá-lo, como também desenvolve estratégias evolutivas para infectar variedades que foram desenvolvidas para serem resistentes a esse patógeno. E essas são algumas das principais razões que contribuem para a necessidade de se utilizar vias alternativas para garantir a sanidade das culturas (DORNELES et al., 2018).

2.3. *Colletotrichum falcatum* e a cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) pertence à família Poaceae é uma das mais importantes culturas do setor agroindustrial e trata-se de uma cultura amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Essa cultura é utilizada para produção de açúcar, açúcar mascavo, melaço, bioetanol, ração para gado e xaropes (PATEL et al., 2018).

No Brasil, a cultura da cana-de-açúcar no ano de 2022, ultrapassou a marca de 724 milhões de toneladas, com uma área colhida de aproximadamente 9 milhões de hectares (IBGE, 2022). No estado de São Paulo, estado com maior produção de cana-de-açúcar no país, a quantidade produzida ultrapassou a marca de 420 milhões de toneladas com uma área plantada superior a 5 milhões de hectares produzida, segundo o último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), liberado em 2022. Ainda segundo o IBGE (2022) na cidade de Piracicaba, interior de São Paulo, a quantidade produzida foi de 3,12 milhões de toneladas, com uma área colhida de 48 mil hectares no referido ano. Assim, nota-se a importância socioeconômica dessa cultura para o país, estado de São Paulo e a região Piracicabana.

Em condições de campo, a cana-de-açúcar é suscetível a muitas doenças bacterianas, virais e fúngicas, mas entre elas as infecções fúngicas são as mais críticas, pois podem afetar todas as partes da planta, esse é o caso do fungo *Colletotrichum falcatum*, agente causal do complexo da doença da podridão vermelha (PATEL et al., 2018).

Os inóculos desse fungo sobrevivem no solo e são disseminados pela irrigação, água da chuva e pela broca da raiz da cana-de-açúcar, causando infecções primárias e secundárias. A doença é inicialmente transmitida pelo solo, a propagação subsequente é devida aos danos causados no caule por práticas culturais inadequadas e principalmente pela broca que faz galerias no caule da cana-de-açúcar, como também ocorre a transmissão deste patógeno por outros vetores (HASSAN; AFGAN; HAFEEZ 2010).

O patógeno pode atacar qualquer parte da cana-de-açúcar, como o colmo, folha, brotos ou raiz. O *C. falcatum* completa seu ciclo de vida na folha da cana-de-açúcar e geralmente o dano à folha não representa um sério ameaça à cana ou causa muitos danos à planta. A fase mais prejudicial da podridão vermelha ocorre quando o patógeno ataca o colmo (DUTTAMAJUMDAR, 2008).

As plantas apresentam sintomas característicos de descoloração, ressecamento e manchas avermelhadas nas folhas, expandindo-se em direção às nervuras das folhas. No colmo observa-se podridão interna avermelhada, intercalada com manchas brancas, o que provoca perda de qualidade e quantidade de biomassa (COSTA et al., 2021). Além disso, a inversão da sacarose pode ocorrer em colmos infectados pelo fungo, reduzindo a quantidade total de açúcar recuperável da planta, como também a redução da concentração e pureza da sacarose e açúcares redutores (PRIHASTUTI et al., 2010; THANGAMANIL et al., 2013; SHARMA et al., 2015).

Várias práticas de manejo devem ser amplamente praticadas para o controle dessa doença, como o desenvolvimento de variedades resistentes ao patógeno, material propagativo livre do patógeno e a utilização de princípios ativos com atividade fungicida (KUMAR; RAJ, 2002; HASSAN; AFGAN; HAFEEZ 2010). Contudo, o fungo *C. falcatum* é de rápida evolução, se reproduz muito rápido, o que contribui para a formação de novas cepas virulentas, dessa maneira, as variedades recém liberadas resistentes a esse patógeno, muitas vezes, tornam-se suscetíveis ao ataque do fungo, complicando o desenvolvimento de cultivares resistentes à podridão vermelha que permaneçam no mercado por alguns anos (HASSAN; AFGAN; HAFEEZ 2010; AMORIM et al., 2016). Outro fator que dificulta o tratamento químico deste fitopatógeno com fungicidas são fatores relacionados à própria cana-de-açúcar, pois devido à natureza impermeável das cascas e os nós fibrosos, não permitem absorção suficiente dos fungicidas, diminuindo então a sua eficiência (AGNIHOTRI, 1990).

Um outro desafio a ser enfrentado é de que os fungicidas não são ecológicos, podem se acumular no solo, corpos d'água e tecidos vegetais e se utilizados de maneira indevida, podem acarretar efeito deletério ao homem, ambiente, afetar espécies da fauna e flora, além de aumentar a possibilidade do surgimento de patógenos resistentes aos princípios ativos (SANTOS et al., 2014; SILVA et al., 2020; HURTADO; ROMERO; LÓPEZ, 2021; BHATI; SHOUCHE 2019), criando problemas para toda a cadeia produtiva da cana-de-açúcar.

Por esses motivos, há investimento massivo na tentativa de diminuir o impacto social e ambiental causados pelos fungicidas atualmente disponíveis, e pesquisadores têm procurado

por compostos naturais bioativos que agem de maneira diferente de antifúngicos comumente conhecidos e que não apresentam os mesmos efeitos nocivos ao ambiente e ao homem, tornando, assim, uma alternativa para o controle biológico de fitopatógenos na agricultura e contribuem para aumentar a produtividade das culturas de interesse agrícola (PAZIN et al., 2018; MILANI; OLIVEIRA; MORALES 2020).

3. HIPÓTESE

Existem fungos e bactérias associados à própolis verde, vermelha e a verde da Caatinga e as bactérias isoladas desses materiais possuem potencial antagonista a fungo fitopatogênico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi isolar, caracterizar o morfotipo (quanto a coloração das células bacterianas) e identificar os microrganismos associados à própolis verde, vermelha e verde da Caatinga e de suas respectivas resinas de origem botânica. Adicionalmente, avaliar as bactérias isoladas quanto ao seu potencial antagônico ao fungo *Colletotrichum falcatum* (agente causal da mancha vermelha na cana-de-açúcar) e estudar os possíveis metabólitos bioativos com atividade antifúngica.

4.2 Objetivos específicos

1. Coletar própolis verde, vermelha e verde da Caatinga e suas respectivas resinas botânicas de origem;
2. Isolar fungos e bactérias desses materiais biológicos;
3. Caracterizar o morfotipo desses microrganismos quanto a cor das células bacterianas, do micélio aéreo (se fungos), cor que os microrganismos apresentavam no verso da placa e produção de pigmento solúvel;
4. Identificar os microrganismos por técnicas moleculares com amplificação da região 16S para bactérias e ITS para fungos;
5. Avaliar o potencial antagônico das bactérias ao fungo fitopatogênico *Colletotrichum falcatum*;
6. Selecionar um isolado promissor e avaliar seu perfil químico quanto à produção de metabólitos bioativos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta da própolis verde

Amostras da própolis verde e da espécie botânica *Baccharis dracunculifolia* DC foram coletadas na cidade de Guaranésia, distrito Santa Cruz da Prata, Minas Gerais (S 21°20'61,67''; W 46°75'51,66''), no apiário Taquaruçu, no dia 27 de outubro de 2022. A coleta aconteceu em três colmeias, e de cada colmeia (Figura 4A) foi retirado um coletor conhecido por sarrafo com a própolis.

Para o estudo dos microrganismos associados à própolis por técnicas dependente de cultivo, de cada coletor/sarrafo foram geradas três réplicas. Cada réplica tinha três gramas e foram imediatamente acondicionadas em tubo falcon estéril com 27 mL da solução salina Phosphate – Buffered – Saline (PBS) (8 g L⁻¹ NaCl, 0,2 g L⁻¹ KCl, 1,44 g L⁻¹ Na₂HPO₄, 0,24 g L⁻¹ KH₂PO₄, pH 7,4).

Em paralelo, foram coletados brotos não expandidos de três indivíduos de *B. dracunculifolia* alecrim-do-campo (Figura 4C) nas proximidades do apiário, com o auxílio de um bisturi estéril, que foram armazenados em tubos eppendorf. No caso dos brotos, a quantidade de solução PBS adicionada foi até cobrir o broto.



Figura 4. Material coletado para isolamento dos microrganismos da própolis verde. A) Colmeia onde foi retirado o sarrafo (coletor) com a própolis verde; B) Sarrafo com a própolis verde; C) Em destaque brotos de alecrim-do-campo usados para remoção de resinas e produção de própolis pelas abelhas.

5.2 Coleta da própolis vermelha

A própolis vermelha e sua espécie botânica relacionada *D. ecastaphyllum* foram coletadas na cidade de Marechal Deodoro, Alagoas, em um apiário fornecedor de própolis bruta com indicação geográfica localizado a cerca de 500 metros do mangue (S 9° 73'09,66'';

W 35° 88'58,33''), em 11 de janeiro de 2023. Sarrafos contendo própolis foram coletados de sete colmeias do mesmo apiário (Figura 5) e transportados brevemente para o laboratório do Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento, do Instituto de Ciências Farmacêuticas da UFAL. Neste laboratório de apoio ocorreu o processamento inicial, em ambiente estéril, onde foram geradas sete réplicas, uma de cada colmeia. Cada réplica foi representada por três gramas de própolis em 27 ml de solução PBS.

No mangue, pedaços de tronco de *D. ecastaphyllum* com feridas exsudando a resina vermelha usada pelas abelhas para produzir a própolis, também foram coletados com um bisturi estéril e acondicionadas em tubos falcon contendo a solução PBS e levados ao laboratório.



Figura 5. Material coletado para isolamento dos microrganismos da própolis vermelha. A) Colmeia onde foi retirado o sarrafo (coletor) com a própolis vermelha; B) Sarrafo com a própolis vermelha; C) Ferida no tronco de *D. ecastaphyllum* para exsudação da resina.

5.3 Coleta da própolis verde da Caatinga

A terceira coleta foi a da própolis verde da Caatinga e os brotos não expandidos da sua espécie botânica relacionada *Mimosa tenuiflora* (Jurema Preta) (Figura 6), a qual ocorreu na cidade de Remanso, Bahia (S 9° 57'11,74'', W 2° 11'69,42''), em 14 de janeiro de 2023. Foram visitados dois apiários localizados a cerca de 100 metros um do outro. Nas proximidades das colmeias, não há aplicação de defensivos agrícolas para controle de pragas e doenças em culturas agrícolas e por isso, essa própolis é considerada orgânica. Como as colmeias não continham sarrafos ou coletores formados, a própolis foi retirada das tampas das colmeias por raspagem. Foram obtidas própolis de três colmeias do primeiro apiário e duas colmeias do segundo apiário.



Figura 6. Brotos jovens que contém a resina que dá origem à própolis verde da Caatinga.

Para os procedimentos de preparo e armazenamento das amostras, foi empregado os mesmos parâmetros para as outras própolis. E salienta-se que todas as amostras foram colocadas em caixas de isopor contendo bolsas de gelo e transportadas até os laboratórios da ESALQ/USP.

5.4 Isolamento dos microrganismos

No laboratório de microbiologia e produtos naturais na ESALQ|USP as amostras de própolis e de suas respectivas resinas de origem foram homogeneizadas, e retiradas uma alíquota de 1 mL de cada uma das réplicas biológicas, transferidas para um tubo falcon, homogeneizadas (para formar uma amostra composta) e realizada a diluição seriada, até 10^{-6} para bactérias e 10^{-4} para fungos. Para a etapa de plaqueamento, alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas (placa de Petri 90 x 15 mm) em triplicata e cultivadas com diferentes meios de cultura para o crescimento e isolamento dos microrganismos.

Para crescimento de fungos, foram utilizados os meios Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e meio Mártin (MA); para crescimento das bactérias, foi utilizado os meios de cultura Ágar Nutriente (AN), Ágar Triptona de Soja (TSA); Agar Extrato Glicose Triptona (TGE); Ágar e sais minerais com baixo teor de nutrientes (LNMS), Sais minerais, amido e ágar caseína (MSSC) e *International Project Streptomyces 2* (ISP2). As descrições detalhadas dos meios utilizados encontram-se no anexo 1. Como antibiótico, utilizou-se tetraciclina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) no meio BDA, e estreptomicina no meio Mártin segundo a recomendação de preparo do meio.

Como antifúngico, a nistatina ($1\mu\text{l mL}^{-1}$) foi utilizada nos meios AN, TSA e TGE. Para os meios LNMS, MSSC e ISP2, foi utilizado a tetraciclina e nistatina nas concentrações supracitadas. Própolis adicional foi coletada para produção de meio de cultura com própolis, onde foi utilizada na concentração de 5 % e meio com glicerol (CCA), sem adição de antibióticos ou antifúngicos. Esses dois últimos meios foram desenvolvidos para isolamento de fungos e bactérias visando proporcionar condições nutricionais semelhantes às do seu ambiente.

As placas foram incubadas a 28 °C e inspecionadas diariamente e conforme os microrganismos foram ficando visíveis foram sendo transferidos para novas placas até a purificação total dos isolados. Após purificação foram codificados e novamente transferidos para novas placas com meio de cultura de TSA para bactérias, meio BDA para fungos e meio ISP2 para actinobactérias.

Em seguida foi realizada a caracterização do morfotipo desses microrganismos, avaliando a cor das colônias bacterianas, do micélio aéreo (se fungo), reverso (cor que o isolado produz no fundo da placa), se houve ou não a produção de pigmento solúvel. Para a determinação das cores foi utilizado o código RAL (2015). Quanto à coloração de Gram para as bactérias, foi utilizado o protocolo proposto por Gram (1884) e as células bacterianas foram analisadas em microscópio eletrônico LEICA ICC50 W com câmara acoplada. Nesse mesmo aparelho foi verificado as estruturas fúngicas coradas com azul de lactofenol.

Quando se obteve as culturas puras dos microrganismos, as bactérias foram criopreservadas (com 20% de glicerol) e os fungos foram preservadas pelo método de Castellani (CASTELLANI 1939) e então receberam códigos alfanuméricos, identificando de qual meio de cultura cada microrganismo foi isolado e de qual tipo de própolis ou respectiva origem botânica, como por exemplo a bactéria AN P REM 1, onde o AN representa o meio no qual a bactéria foi isolada, neste caso o meio ágar nutriente, o P refere-se que o microrganismo foi isolado da própolis, o REM faz referência à cidade que o microrganismo foi isolado, neste exemplo refere-se à Remanso e o número representa o número do isolado.

5.5 Identificação dos isolados

5.5.1 Extração de DNA e PCR das bactérias

Para a identificação das bactérias, esses microrganismos foram cultivados em meio sólido TSA por 24 horas, após esse período foi realizada uma suspensão dessas bactérias direto da placa de Petri com solução salina (NaCl 0,85%) e 1 mL dessa suspensão foi transferida para um eppendorf estéril para dar início à extração.

Para tal procedimento, foi utilizado o kit de extração InstaGene™ Matrix e seguido os seguintes passos: a) O eppendorf com a suspensão salina foi centrifugado a 12.000 rpm por três minutos para decantação das células bacterianas e o sobrenadante foi descartado; b) As células foram ressuspensas em 1 mL de água Milli-Q e então centrifugadas a 12.000 rpm por três minutos e o sobrenadante foi descartado; c) foi adicionado ao pellet (células decantadas) 200 µL de InstaGene™, homogeneizado em vórtex por 10 segundos e incubado por 30 minutos a 56 °C; d) as amostras foram agitadas por 10 segundos em vórtex e então incubadas por 8 minutos a uma temperatura de 100 °C; e) e por último as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e centrifugadas a 12.000 rpm por três minutos, e assim foi finalizada a extração. Para confirmar a qualidade e a integridade da extração de DNA, correu-se um gel de agarose 1 % corado com azul de bromofenol e Gel Red nas condições de 2 µl e 0,3 µl respectivamente por amostra em uma voltagem de 85 V por trinta minutos. Ao final da corrida o gel foi visualizado em luz UV e fotodocumentador (BioRad).

Confirmada a extração de DNA, seguiu-se para a amplificação da região 16S V3/V4 das bactérias utilizando os primers 341F (5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCA G-3') e 785R (5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGCAGGACTAGHVGGGTATC TAATCC-3') (KLINDWORTH et al., 2013). A reação de PCR foi realizada utilizando 22 µl de H₂O DNA e RNA free, 20µl de PCR Bio 2x, 2 µl do primer 341F e 2 µl do primer 785R, dessa forma totalizando um volume final de 50 µl. O ciclo utilizado para a amplificação foi de 95 °C por cinco minutos, seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 51 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos e para finalizar 72 °C por 10 minutos. Para confirmar a qualidade da PCR, foi realizada mais uma corrida em gel de agarose a 1,5 % nas condições já mencionadas, seguidas de purificação realizando o procedimento operacional padrão do kit *EasyPure® PCR Purification*, quantificação em Nanodrop e depois as amostras foram enviadas para sequenciamento em empresa especializada.

5.5.2 Extração de DNA e PCR dos fungos

Para a extração de DNA dos fungos, eles foram cultivados em meio BDA por 4 dias, após esse período, com o auxílio de um bisturi estéril, o micélio fúngico foi raspado e transferido para um eppendorf também estéril. Para a extração do DNA dos fungos foi utilizado o PowerSoil pro kit seguindo as recomendações do fabricante. Para a confirmação da extração do DNA, correu-se um gel de agarose a 1 % corado com azul de bromofenol e Gel Red nas condições de 2 µl e 0,3 µl respectivamente por amostra em uma voltagem de 85 V por trinta minutos. Ao final da corrida o gel foi visualizado em luz UV e fotodocumentador (BioRad).

Para a amplificação da região de interesse, foi utilizado a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) amplificando a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) utilizando os iniciadores ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) e ITS2R (GCTGCGTTCTTCATCG ATGC) (WHITE et al., 1990). A reação de PCR foi realizada utilizando 22 µl de H₂O DNA e RNA free, 20µl de PCR Bio 2x, 2 µl do primer ITS1F e 2 µl do primer ITS2R, dessa forma totalizando um volume final de 50 µl. O ciclo utilizado para a amplificação foi de 94 °C por três minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 52 °C por um minuto e 72 °C por 90 segundos e para finalizar 72 °C por 10 minutos (BOKULICH; MILLS 2013; HOGGARD et al., 2018). Para confirmar a qualidade da PCR, foi realizada mais uma corrida em gel de agarose a 1,5 % nas condições já mencionadas, seguidas de purificação realizando o procedimento operacional padrão do kit *EasyPure*® PCR *Purification*, quantificação em Nanodrop e depois as amostras foram enviadas para sequenciamento em empresa especializada.

Em posse das sequências dos pares de base obtidas dos fungos e das bactérias, comparamos essas sequências com as que foram depositadas no banco de dados público *GenBank* do NCBI (National Center for Biotechnology Information), através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

5.6 Screening por ensaio antagônico

Após a obtenção de culturas puras dos microrganismos isolados, foi realizado um screening através teste de cultivo antagônico *in vitro* das bactérias frente ao crescimento do *Colletotrichum falcatum*, um fungo de importância agrícola para o cultivo de cana-de-açúcar, e relevância para o Brasil e principalmente para o estado de São Paulo e a região de

Piracicaba-SP. Foi utilizado apenas as bactérias devido ao fato de serem prolíficas produtoras de metabólitos secundários e por serem a maioria predominante de microrganismos isolados neste trabalho.

Para essa avaliação, o fungo *C. falcatum* foi cultivado em meio BDA por cinco dias a 28 °C, em seguida, discos (7 mm de diâmetro) contendo os micélios do fungo foram inoculados no centro de uma placa de Petri (90 x 15 mm), também com BDA, por um período de 24 horas (quando o fungo já demonstrava crescimento).

Após esse período, na mesma placa foram inoculadas duas bactérias em posição frontal ao fungo com um centímetro de distância da borda e cada estria com cerca de um centímetro (Figura 7) e mantidas em BOD a 28 °C por cinco dias, período em que o controle (placas somente com o fungo) cresceu por toda a placa.

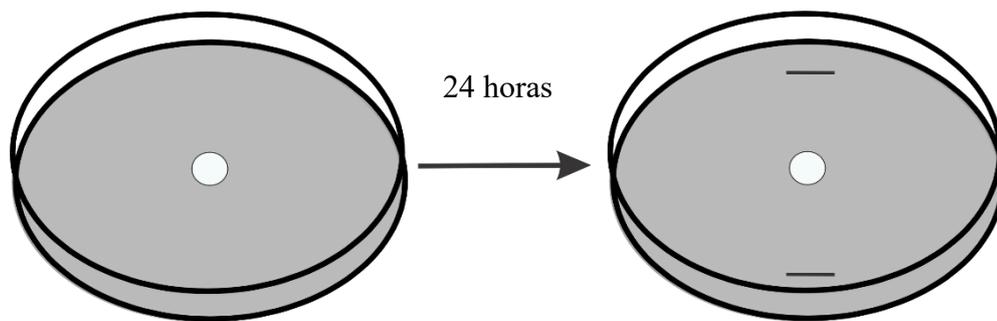


Figura 7. Representação do ensaio antagônico das bactérias isoladas frente ao fungo *Colletotrichum falcatum*.

Nos ensaios iniciais, foram utilizadas duas bactérias contra o fungo por placa. Após a seleção das bactérias com potencial de inibição de crescimento do fungo, foi utilizado uma bactéria contra o fungo por placa (cada bactéria representava um tratamento).

Para calcular os percentuais de inibição do crescimento do fungo *Colletotrichum falcatum* foi utilizada a equação: $((DM - dm) / DM) \times 100$, onde DM = diâmetro médio das colônias do fitopatógeno das quatro réplicas do controle e dm = diâmetro médio das colônias do patógeno das quatro réplicas do ensaio de cultura dupla (WALUNJ; ABHANG; JOHN, 2015).

Esse ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições e o tratamento controle. Salienta-se que o percentual de inibição foi calculado utilizando o software ImageJ e os resultados foram submetidos a análises de variância (ANOVA) a 5 % de significância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando o software Speed Stat (CARVALHO et al., 2020).

5.7 Cultivo em meio líquido e extração dos metabólitos

A seleção da bactéria para estudo químico foi realizada com base no desempenho desse microrganismo em inibir o fungo *C. falcatum*.

Para a produção dos possíveis metabólitos secundários ativos, inicialmente a bactéria foi repicada em meio TSA e cultivada por três dias, posteriormente, 1 µL da bactéria foi inoculada em 100 mL do meio TSB por três dias a 28 °C com agitação de 125 rpm. Em sequência, foi retirada uma alíquota de 3 ml e transferida para cada um dos três Erlenmeyers com meio TSB (para atingir um volume final de 300 mL cada Erlenmeyer) e cultivada por 7 dias (à 28 °C e 125 rpm).

Após esse período, a suspensão bacteriana foi centrifugada por 12 min a uma velocidade de 8000 rpm para a decantação das células. A etapa seguinte consistiu na partição líquido-líquido do sobrenadante com o solvente orgânico. Para a escolha do solvente, foi separada uma alíquota de dois mL da fração aquosa e transferida para um tubo e adicionado solventes orgânicos (na proporção 1:1) com diferentes graus de polaridade e imiscíveis com a água do meio metabólico, a saber, N-Butanol, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila. A extração mais eficiente foi considerada aquela que melhor extraiu os metabólitos (extraiu o pigmento e não formou emulsão) no caso, o diclorometano.

O sobrenadante do meio metabólico foi submetido à partição líquido-líquido com o solvente orgânico diclorometano na proporção (grau analítico, marca Êxodo Científica) 1:1 por duas vezes. O extrato orgânico (diclorometano) foi concentrado em evaporador rotativo da marca IKA® RV 10 digital, que em seguida foi devidamente identificado, pesado em balança analítica e armazenado a 4 °C. Para as próximas etapas deste trabalho, foi utilizado o extrato orgânico, o extrato aquoso foi descartado por ser considerado um extrato que contém predominantemente resíduos de meios de cultivo.

5.8 Fracionamento

O extrato orgânico diclorometânico foi submetido a um *clean up*. Para isso, foi utilizado uma coluna aberta do tipo Sepak com fase estacionária de sílica derivatizada com grupos octadecilsilino- C₁₈, marca Discovery® DSC de 1 g, e como eluente iniciou-se em 10 mL 100% água ultrapura Milig e depois 10 mL metanol 100 % grau P. A. A fração metanólica foi seca, pesada e armazenada a 4 °C, enquanto que a fração aquosa foi descartada.

Em seguida, a fração metanólica foi re-solubilizada em metanol em quantidade mínima à qual foi adicionada Celite® para formar uma pasta homogênea. A etapa seguinte foi secar essa pasta (que estava em tubo de cintilação) em rotaevaporador e então submetido a uma cromatografia em coluna de extração em fase sólida SPE (*Solid Phase Extraction*) com fase estacionária C₁₈ – Discovery® DSC–18 de 5 g. Foram coletadas as frações eluídas em modo gradiente da seguinte composição: 60 mL de água 100 %; água:metanol (75:25); água:metanol (50:50); água:metanol (25:75) e 100% metanol. A água utilizada foi a ultrapura Milliq e os solventes orgânicos graus P.A.

As frações foram secas, e após preparada uma alíquota na concentração de 1 mg ml⁻¹ para análise de espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-MS/MS) e outra alíquota reservada para o bioensaio de incorporação no meio de cultivo.

5.9 Ensaio biológico de incorporação em meio de cultivo

A avaliação da atividade antifúngica das frações foi realizada com o teste de inibição do crescimento micelial proposto por Rios, Recio & Villar (1988) com algumas modificações. Este método baseia-se na dispersão homogênea da amostra em um meio de cultura para avaliação de crescimento de microrganismos na presença de compostos.

Primeiro, as frações foram ressuspensa em solução de DMSO e água destilada esterilizada (1:9) e em seguida incorporadas ao meio BDA (quando a temperatura estava próxima ao ponto de solidificação do meio) na concentração final de 250 µg mL⁻¹. Os controles positivos utilizados foram os fungicidas Fox® e Priori Xtra®, com os princípios ativos Proticonazol e Azoxistrobina, respectivamente, testados na mesma concentração das frações, e como controle negativo foi utilizada uma solução de DMSO a 10 %, além do controle somente com o fitopatógeno. Esse ensaio foi realizado em placas de 24 poços com 6 mL de meio de cultivo em cada poço. Para condução do experimento, plugs de 2 mm de diâmetro contendo micélio do *C. falcatum* foram adicionados ao centro dos poços das placas e foram incubadas em BOD a 28 °C por um período em que o controle negativo crescesse por todo o poço, o que levou quatro dias. O crescimento radial do fungo nas placas foi mensurado a partir da borda do plug até a distância máxima atingida pela colônia no poço. A inibição do crescimento observada nos tratamentos, em relação ao controle, foi calculada de acordo com Gamliel: Katan: Cohen (1989), segundo a equação:

$$\text{Porcentagem de Inibição de crescimento (PIC)} = 100 - [(R^2/r^2) \times 100]$$

Onde R e r representam respectivamente, os raios das colônias do fungo nos tratamentos e no controle. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições e então realizado a análise de variância utilizando o software Speed Stat (CARVALHO et al., 2020). A porcentagem de inibição das frações foi avaliada utilizando o programa Image Processing and Analysis in Java (ImageJ).

5.10 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC – MS/MS)

Análises por cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UPLC) acoplada à espectrometria de massas de alta resolução em tandem (HRMS/MS) das três réplicas biológicas geradas após o *clean up* e as frações obtidas por cromatografia em coluna C₁₈ foram realizadas em um equipamento Waters Acquity UPLC H-class equipado com uma coluna de fase reversa (Waters Acquity UPLC BEH C₁₈, 2,1 x 100 mm, 1,7 µm) acoplado com um espectrômetro de massas de Quadrupolo-Tempo de Voo (Waters Xevo QToF) com interface de electrospray (ESI). Foi utilizado um gradiente linear de água:acetonitrila acidificados com 0,1% de ácido fórmico de 90:10 até 0:100 em 12 minutos, mantido em 100% acetonitrila por 2 minutos, voltando a 90:10 em 0,1 minutos para acondicionar a coluna por 0,9 min para a seguinte injeção, com uma vazão de 0,500 mL min⁻¹. A coluna foi mantida a uma temperatura de 40 °C e as amostras mantidas a 15 °C. As amostras foram solubilizadas em MeOH grau MS e analisadas na concentração de 1 mg mL⁻¹, e o volume de injeção foi de 10 µL.

Os dados brutos de MS/MS foram adquiridos no modo DDA (*Data Dependent Acquisition*) selecionando os 5 íons mais intensos, com taxa de *scan* para MS/MS de 0,2 s⁻¹, exclusão dinâmica de picos de 5 s ou 10 mDa, uma energia de colisão MS/MS com rampa LM CE de 10-30 eV e rampa HM CE 40-60 eV. Os espectros de massas foram adquiridos nos modos positivo e resolução na faixa de 100-2000 Da. A fonte de ionização ESI foi operada com uma voltagem do capilar de 1,2 kV, a voltagem do cone de 30 V, a temperatura da fonte de 100 °C, a temperatura de dessolvatação de 450 °C, e vazão do gás no cone e de dessolvatação de 50 L h⁻¹ cada. Para calibração interna utilizou-se uma solução de leucina-encefalina (Sigma-Aldrich) 200 pg mL⁻¹, infundida pela sonda do lock-mass com vazão de 10,0 µL min⁻¹.

5.11 Análise de redes moleculares clássicas (Classical Molecular Networking)

Como primeira etapa, foi realizada a conversão dos dados do formato '.raw' para o formato '.mzML' utilizando o software MSConvert (ProteoWizard) (CHAMBERS et al., 2012), seguido da correção desses dados utilizando a sequência de passos proposto por Breaud et al. (2020). Essa etapa foi realizada pois o valor m/z do íon precursor não corresponde necessariamente ao íon dos espectros MS1 retidos para a fragmentação.

A rede molecular foi criada usando o fluxo de trabalho para redes moleculares clássicas (*Classical Molecular Networking*) (ARON et al., 2020) da plataforma do GNPS (<http://gnps.uesd.edu>) (WANG et al., 2016). Os dados foram filtrados removendo todos os íons fragmento MS/MS dentro da faixa de ± 17 Da do íon precursor. Os espectros de MS/MS foram filtrados por janela escolhendo apenas os seis íons fragmento mais intensos na janela de ± 50 Da em todo o espectro, e o algoritmo MS-Clustering foi selecionado para a criação dos espectros consenso ou nós. A tolerância da massa tanto dos íons precursores quanto dos íons fragmento, foi de 0,02 Da para ambos. Os espectros tanto do controle negativo do meio de cultivo quanto dos solventes, foram excluídos ativando a opção “filtrar os espectros do grupo G6 como brancos antes da rede molecular”. A rede foi criada, conectando os nodos que tivessem um valor de cosseno (*cosine score*) mínimo de 0,7 e no mínimo cinco íons fragmento compartilhados. Além disso, as arestas entre os dois nós foram mantidas na rede somente se cada um dos nós aparecesse nos respectivos dez nós mais semelhantes. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100 nós e as bordas de pontuação mais baixa foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite. O modo de pesquisa analógico foi usado pesquisando contra espectros MS/MS com uma diferença máxima de 100,0 no valor do íon precursor. Os espectros na rede foram então pesquisados contra as bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre os espectros de rede e espectros de biblioteca precisavam ter uma pontuação acima de 0,70 e pelo menos cinco picos correspondentes. A rede molecular foi visualizada usando o software Cytoscape 3.7.0.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Isolamento dos microrganismos

Após a coleta das amostras foi realizada uma diluição seriada e o plaqueamento da solução contendo as própolis e de suas respectivas resinas botânicas, e com cerca de 24 horas de incubação, foi possível observar o crescimento de bactérias, e a partir de então começou o processo de isolamento que durou até não crescer nenhum microrganismo com morfotipo diferente daqueles que já foram isolados (o que levou cerca de duas semanas). Os Fungos começaram a aparecer uma semana após o plaqueamento, e isso se deve ao metabolismo desses microrganismos ser mais lento quando comparados com o das bactérias.

Para a própolis verde e sua resina foram, ao total, foram isolados 65 microrganismos, 43 da Própolis verde (um fungo e 42 bactérias) e 22 microrganismos (2 fungos e 20 bactérias) dos brotos jovens da planta *B. dracunculifolia*. A tabela 1 apresenta o número de isolados por meio de cultivo utilizado para sua obtenção.

Tabela 1. Microrganismos isolados da Própolis verde e de *B. dracunculifolia*.

Meio de Cultura	Própolis Verde	Broto de <i>Baccharis dracunculifolia</i>
BDA	0	0
MA	0	0
MSSC	0	0
LNMS	4	2
ISP2	4	2
AN	17	3
TGE	4	4
TSA	8	9
Ágar-Água+própolis	2	2
CCA	4	0
TOTAL	43	22

AN: Ágar nutriente; BDA: Batata, Dextrose Ágar; CCA: Glicerol, Peptona e sais; ISP2: International Streptomyces Project 2; LNMS: Ágar, sais minerais com baixo teor de nutrientes; MA: Mártin; MSSC: Sais minerais, amido e ágar caseína; TGE: Ágar Extrato glicose Triptona; TSA: Ágar Triptona de soja;

Observando os morfotipos de todos os isolados (Anexo B), fez-se notório algumas diferenças como cor e produção de pigmentos solúveis, onde as cores marrom e amarelo se

fizeram presentes, produção de cepas amarelas sem pigmento solúvel, além do isolamento de microrganismos com a coloração branca, bege e cinza e produção de pigmento solúvel nas cores amarelas, marrom e bege (Figura 8). Apenas um fungo foi isolado no meio água + ágar + própolis, este expôs micélio cinza esverdeado. As actinobactérias isoladas apresentaram coloração amarela, e uma variação de branco, cinza e marrom (Figura 8).

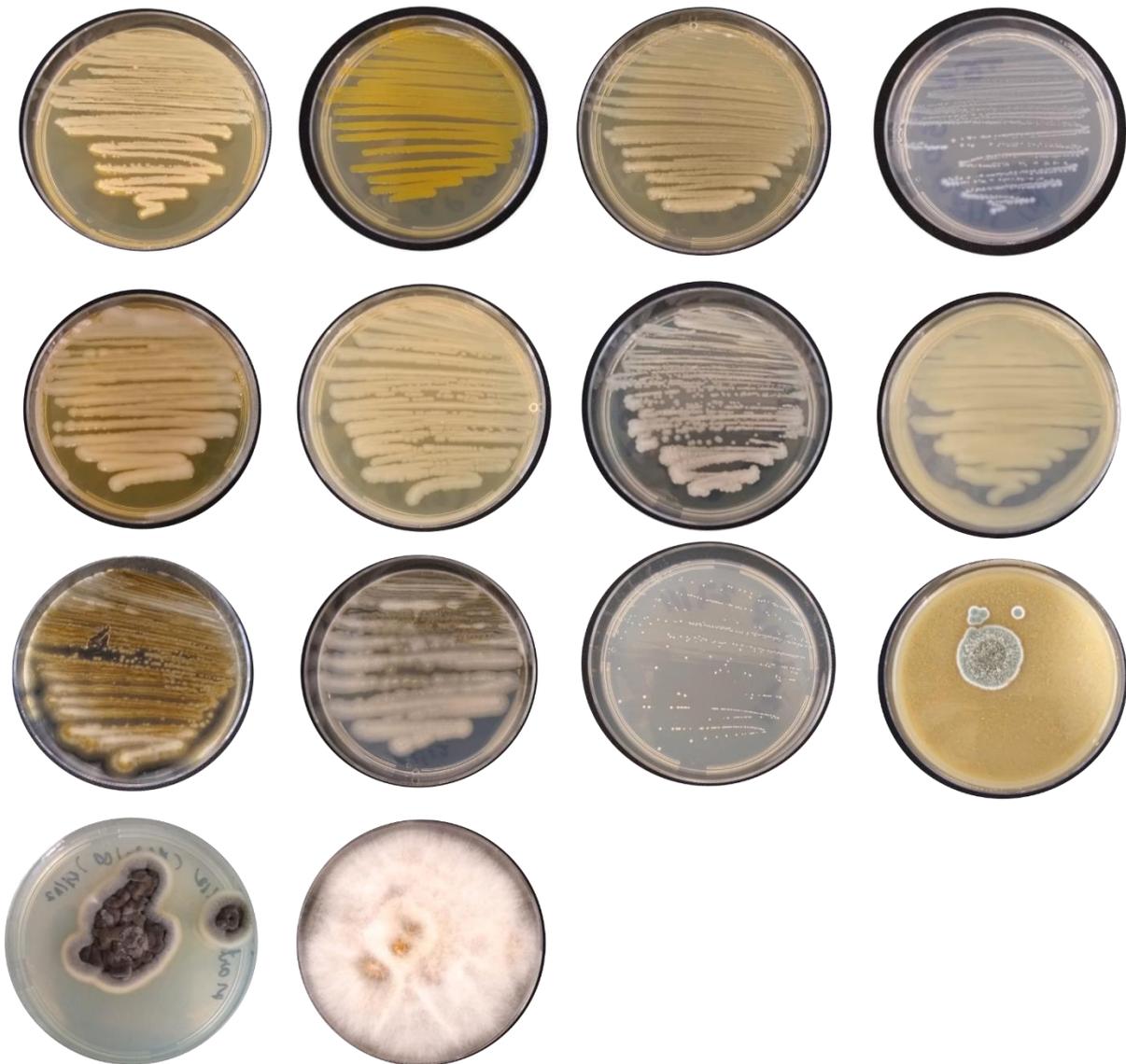


Figura 8. Exemplos de alguns morfotipos de microrganismos isolados da própolis verde e resina de *Baccharis dracunculifolia*. As bactérias estão cultivadas em meio TSA e os fungos em meio BDA ou meio com própolis.

Quanto aos microrganismos isolados da resina de *Baccharis dracunculifolia*, foram isolados microrganismos na cor marrom claro, amarelo, branco e outros. E os dois fungos filamentosos isolados do broto, foram isolados do meio ISP2, um apresentando uma cor cinza

escuro e o outro os micélios são laranja claro (Figura 8). A coloração é influenciada por fatores como pH, temperatura e fonte de nutrientes (AMAL et al., 2011).

A caracterização do morfotipo aliada à utilização de técnicas moleculares para identificação de microrganismos, são passos fundamentais na identificação de novos grupos de táxons, pois características como cor da cepa e produção de pigmento solúvel, podem auxiliar na identificação e se tornam um indicativo da diversidade microbiana presente neste material e indispensáveis para a seleção de estirpes com potencial biotecnológico (CHAGAS JÚNIOR, OLIVEIRA: OLIVEIRA, 2010; BRITO et al., 2015; NAVROSKI et al., 2015; ARAUJO: GAUTER, 2017; INÁCIO et al., 2020).

Ao final do isolamento dos microrganismos da própolis vermelha, foram isolados 47 microrganismos, distribuídos em 32 microrganismos da própolis e 15 da resina de origem (Tabela 2) e da própolis verde da Caatinga um total de 52, com 32 microrganismos isolados da própolis (sendo 14 fungos) e 20 da resina (Tabela 3) (Anexo B).

Tabela 2. Microrganismos isolados da Própolis Vermelha e de *D. ecastophyllum*

Meio de Cultura	Própolis Vermelha	Resina de <i>D. ecastophyllum</i>
BDA	1	0
MA	1	0
MSSC	1	0
LNMS	4	0
ISP2	4	0
AN	6	5
TGE	8	6
TSA	5	3
Ágar-Água+própolis	0	0
CCA	2	1
TOTAL	32	15

AN: Ágar nutriente; BDA: Batata, Dextrose Ágar; CCA: Glicerol, Peptona e sais; ISP2: International Streptomyces Project 2; LNMS: Ágar, sais minerais com baixo teor de nutrientes; MA: Mártin; MSSC: Sais minerais, amido e ágar caseína TGE: Ágar Extrato glicose Triptona; TSA: Ágar Triptona de soja;

Tabela 3. Microrganismos isolados da Própolis Verde da Caatinga e de *M. tenuiflora*

Meio de Cultura	Própolis Vermelha	Broto de <i>M. tenuiflora</i>
BDA	3	0
MA	5	0
MSSC	3	1
LNMS	4	0
ISP2	2	7
AN	7	2
TGE	1	4
TSA	5	5
Ágar-Água+própolis	0	0
CCA	2	1
TOTAL	32	20

AN: Ágar nutriente; BDA: Batata, Dextrose Ágar; CCA: Glicerol, Peptona e sais; ISP2: International Streptomyces Project 2; LNMS: Ágar, sais minerais com baixo teor de nutrientes; MA: Martin; MSSC: Sais minerais, amido e ágar caseína TGE: Ágar Extrato glicose Triptona; TSA: Ágar Triptona de soja.

Diferentes morfotipos foram isolados das amostras da própolis vermelha (ANEXO C) e da verde da Caatinga (ANEXO D) como também nas resinas de origem. Foram observadas bactérias apresentando as cores: branca, amarelo, cinza, marrom, bege e rosa; e com fungos apresentado a cor preta, branca, preta e branca, marrom e cinza (Figura 9).

Os fungos filamentosos produzem uma gama de pigmentos que incluem diversas classes químicas, como carotenoides, melaninas, flavinas, fenazinas, quinonas e, mais especificamente, monascinas, violaceína ou índigo e podem ser utilizados como matéria prima com fonte de pigmentos e corantes naturais e dessa maneira substituir os sintéticos, visto que com a atual preferência dos consumidores por corantes naturais de qualidade alimentar está associada à imagem de saudável e de boa qualidade a busca por corantes naturais está cada vez maior (CARO et al., 2012; DUFOSSÉ et al., 2014).

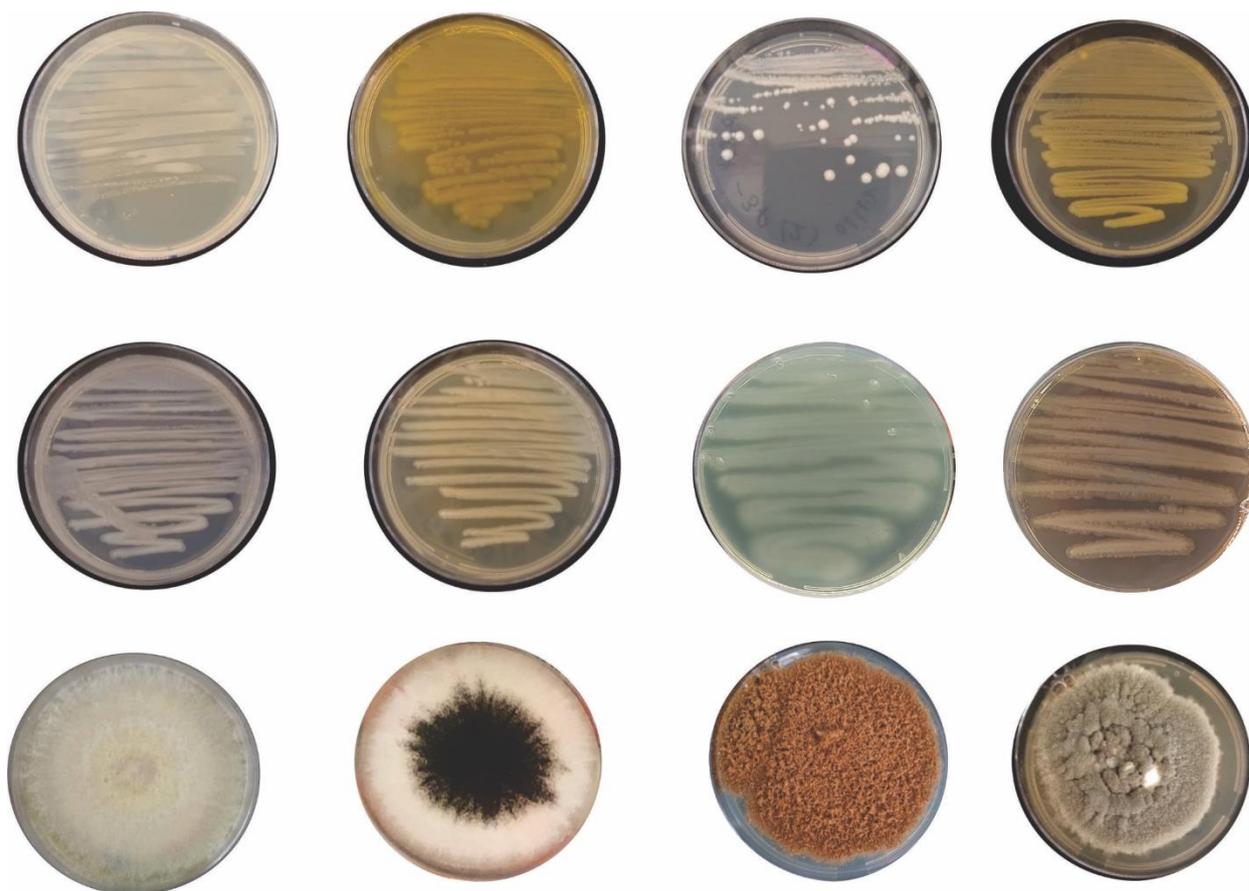


Figura 9. Morfotipos de microrganismos isolados das própolis vermelha e verde da Caatinga, como também de suas resinas de origem no meio TSA e BDA.

Entre as moléculas que apresentam cor produzidas pelas bactérias encontram-se os carotenoides, melaninas, flavinas, fenazinas, quinonas, bacterioclorofilas, monascinas, violaceína, prodigiosina e o índigo (DUFOSSE, 2016).

Muitos pigmentos têm importância industrial. O sucesso de qualquer produto pigmentar fabricado por fermentação depende da sua aceitabilidade no mercado, da aprovação regulamentar e da dimensão do investimento de capital necessário para a sua produção (VENIL; ZACARIA; AHAMAD, 2013).

No campo dos corantes naturais, os pigmentos à base de bactérias estão atualmente sendo pesquisados como uma alternativa potencialmente viável aos pigmentos orgânicos devido aos múltiplos benefícios que proporcionam em termos de estabilidade de cor, acessibilidade e tecnologia de cultivo. Isso ocorre porque os pigmentos à base de bactérias oferecem aos corantes naturais uma opção mais ecológica e econômica (MUHAMMAD et al., 2024).

A presença de microrganismos Gram positivos esteve apenas na própolis verde, com três isolados (ISP2 P GRN 2, ISP2 P GRN 3 e ISPE P GRN 4), as demais bactérias isoladas são Gram negativas, enquanto que para as outras própolis, todas as bactérias são Gram negativas. Sugerindo que a própolis é um ambiente mais propício a bactérias Gram negativas em comparação com as Gram-positivas. A coloração de Gram é um método importante e bastante utilizado na bacteriologia e sua finalidade é a classificação de microrganismos com base em suas características tintoriais, tamanho, forma e arranjo celular (FREITAS; PICOLI, 2007).

A partir desse isolamento, percebemos que há fungos e bactérias associados às própolis coletadas e às resinas de origem que apresentam diversos tipos de morfotipo, variando nas cores, produção de pigmento solúvel e à coloração de Gram a qual pertencem.

6.2 Identificação dos microrganismos

As sequências dos pares de base dos microrganismos isolados foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados GenBank, no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) utilizando a ferramenta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) para identificar os microrganismos. Alguns microrganismos não foram identificados, pois com a quantidade de pares de bases sequenciadas não foi suficiente para comparar com outras sequências no banco de dados. Para a própolis verde e a resina de *Baccaris dracunculifolia* 12 microrganismos não foram identificados; para a própolis vermelha, uma bactéria não foi identificada; para a própolis verde da Caatinga e sua resina de *Mimosa tenuiflora*, não foram identificados sete microrganismos.

6.2.1 Identificação dos microrganismos da própolis verde e da resina de *B. dracunculifolia*

Dos 65 microrganismos isolados da própolis verde e sua respectiva resina de origem, sendo 62 bactérias e três fungos, foram identificados 37 microrganismos da própolis e 16 da resina de *Baccaris dracunculifolia*, totalizando 53 microrganismos identificados. Desses, 48 microrganismos foram identificados com porcentagem de similaridade superior a 99 %, os demais isolados tiveram o percentual de similaridade variando entre 96,37 e 98,5 % (Tabela

4). A tabela 4 está organizada com a primeira coluna identificando se o microrganismo foi isolado da própolis verde ou da resina de *B. dracunculifolia*, seguido de qual meio de cultura o microrganismo foi isolado, a terceira coluna indicando qual código cada isolado recebeu, a quarta coluna com a identificação de cada isolado e a quinta coluna, indica o percentual de identificação dos microrganismos.

Tabela 4. Identificação dos microrganismos isolados da própolis verde e da sua fonte botânica, a resina de *Baccharis dracunculifolia* DC. (alecrim-do-campo) coletados em Guaraniésia - MG.

Material Isolado¹	Meio de Cultura²	Isolado³	Identificação⁴	% de identificação⁵
Própolis verde	AN	AN P GRN 1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	100
		AN P GRN 2	<i>Enterobacter sp.</i>	97
		AN P GRN 3	<i>Enterobacter sp.</i>	99,53
		AN P GRN 4	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99,76
		AN P GRN 5	<i>Enterobacter asburiae</i>	98,20
		AN P GRN 6	<i>Kosakonia cowanii</i>	99,53
		AN P GRN 7	<i>Enterobacter sp.</i>	100
		AN P GRN 8	<i>Enterobacter cloacae</i>	99,07
		AN P GRN 9	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99,30
		AN P GRN 10	<i>Kosakonia cowanii</i>	100
		AN P GRN 11	<i>Kosakonia cowanii</i>	99,53
		AN P GRN 12	<i>Enterobacter sp.</i>	99,53
		AN P GRN 13	<i>Atlantibacter hermannii</i>	99,30
		AN P GRN 14	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99,76
		AN P GRN 15	<i>Kosakonia cowanii</i>	99,53
		AN P GRN 16	<i>Enterobacter sp.</i>	100
		AN P GRN 17	<i>Enterobacter gallinarum</i>	98,50
Própolis verde	CCA	CCA P GRN 1	<i>Enterobacter sp.</i>	99,53
		CCA P GRN 2	<i>Enterobacter sp.</i>	99,53
		CCA P GRN 3	<i>Enterobacter sp.</i>	99,53
		CCA P GRN 4	<i>Enterobacter cloacae</i>	99,53
Própolis verde	ISP2	ISP2 P GRN 1	<i>Enterobacter sp.</i>	99,52
		ISP2 P GRN 2	Não identificado	-
		ISP2 P GRN 3	Não identificado	-
		ISP2 P GRN 4	Não identificado	-

Própolis verde	LNMS	LNMS P GRN 1	<i>Bacillus pumilus</i>	100
		LNMS P GRN 2	Não identificado	-
		LNMS P GRN 3	Não identificado	-
		LNMS P GRN 4	Não identificado	-
Própolis verde	Meio com própolis	P GRN 1	<i>Penicillium corylophilum.</i>	99,00
		P GRN 2	<i>Pantoea septica</i>	99,02
Própolis verde	TGE	TGE P GRN 1	<i>Lactococcus lactis</i>	99,76
		TGE P GRN 2	<i>Enterobacter cloacae</i>	99,07
		TGE P GRN 3	<i>Kasokania sp</i>	100
		TGE P GRN 4	<i>Salmonella sp.</i>	99,07
Própolis verde	TSA	TSA P GRN 1	<i>Enterococcus gallinarum</i>	100
		TSA P GRN 2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	100
		TSA P GRN 3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99,76
		TSA P GRN 4	<i>Enterobacter cloacae</i>	99,76
		TSA P GRN 5	<i>Enterobacter sp.</i>	99,77
		TSA P GRN 6	<i>Enterobacter cloacae</i>	98,12
		TSA P GRN 7	<i>Pantoea agglomerans</i>	100
		TSA P GRN 8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,76
Resina <i>B. dracunculifolia</i>	AN	AN R GRN 1	<i>Enterobacter cloacae</i>	99,52
		AN R GRN 2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99,77
		AN R GRN 3	<i>Atlantibacter hermannii</i>	99,76
Resina <i>B. dracunculifolia</i>	ISP2	ISP2 R GRN 1	Não identificado	-
		ISP2 R GRN 2	Não identificado	-
Resina <i>B. dracunculifolia</i>	LNMS	LNMS R GRN 1	<i>Pantoea agglomerans</i>	96,37
		LNMS R GRN 2	Não identificado	-
Resina <i>B. dracunculifolia</i>	Meio com própolis	R GRN 1	<i>Enterobacter cloacae</i>	97
		R GRN 2	<i>Enterobacter cloacae</i>	99,76
Resina <i>B. dracunculifolia</i>	TGE	TGE R GRN 1	<i>Salmonella sp.</i>	99,07
		TGE R GRN 2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99,53
		TGE R GRN 3	<i>Enterobacter cloacae</i>	99,77
		TGE R GRN 4	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99,30
Resina <i>B. dracunculifolia</i>	TSA	TSA R GRN 1	<i>Kosakonia cowanii</i>	99,53
		TSA R GRN 2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99,77
		TSA R GRN 3	Não identificado	-

TSA R GRN 4	<i>Enterobacter cloacae</i>	99,54
TSA R GRN 5	<i>Enterobacter cloacae</i>	99,76
TSA R GRN 6	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	99,29
TSA R GRN 7	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	99,53
TSA R GRN 8	Não identificado	-
TSA R GRN 9	Não identificado	-

AN: Ágar nutriente; CCA: Glicerol, Peptona e sais; ISP2: International Streptomyces Project 2; LNMS: Ágar, sais minerais com baixo teor de nutrientes; TGE: Ágar Extrato glicose Triptona; TSA: Ágar Triptona de soja; P: Própolis; R: Resina; GRN: Guaranésia.

¹ material que o microrganismo foi isolado; ² meio de cultura utilizado no isolamento; ³ código de cada microrganismo; ⁴ identificação do microrganismo; ⁵ percentual de identificação dos microrganismos comparados com o banco de dados utilizado.

Foi identificado que entre os microrganismos isolados da própolis verde e sua resina há 17 espécies distribuídos em 11 gêneros (tabela 4). Entre esses microrganismos, há cinco espécies em comum entre a própolis verde e a resina de *B. dracunculifolia*, que são: *Klebsiella oxytoca*, *Kasokania cowanii*, *Enterobacter cloacae*, *Atlantibacter hermanii*, *Pantoea agglomerans* e bactérias identificadas como *Salmonellas sp.*, totalizando 27 cepas em comum. Enquanto que *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter gallinarum*, *Pantoea septica*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus pumillus*, *Klebsiela pneumoniae* e *Penicillium corylophilum* foram isoladas apenas da própolis verde. As espécies *Enterobacter ludwigii*, *Acinetobacter radiresistens* e *Enterococcus casseliflavus* foram identificadas apenas na resina. Assim, verificamos que há microrganismos em comum para a própolis verde e sua resina de origem, como também microrganismos específicos para cada material. No melhor do nosso conhecimento, não há outros trabalhos isolando e identificando microrganismos da própolis verde e nem da resina de *B. dracunculifolia*, e por isso a discussão será feita comparando com outras própolis no tópico 6.2.4.

Ao analisar os microrganismos isolados da própolis verde e sua resina de origem (tabela 4), foi observado que no meio Agar Nutriente (AN) foram isoladas 7 espécies: *Klebsiella oxytoca*, *Kasokania cowanii*, *Enterobacter sp.*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaecheii* e *Atlantibacter hermanii*, sendo que as cepas *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaecheii* e *Atlantibacter hermanii* foram identificadas apenas nesse meio. As cepas *Lactococcus lactis*, *Enterobacter ludwigii* e *Salmonella sp.* foram isoladas apenas no meio TGE, enquanto que *Enterobacter gallinarum*, *Klebsiela pneumoniae*, *Acinetobacter radioresistens* e *Enterococcus casseliflavus* foram

identificadas apenas no meio TSA. Enquanto que a bactéria *Bacillus pumilus* cresceu apenas no meio LNMS. Por outro lado, foi observado que os meios BDA, Martín e MSSC não cresceu microrganismo. Assim, foi possível notar a importância de utilizar diferentes meios de cultura, que apresentam diferentes condições nutricionais e pH, para prospectar e isolar microrganismos. Devido às diversas exigências nutricionais que os microrganismos apresentam, têm sido usados variados meios de cultura que, geralmente, são ricos em nutrientes, possibilitando o crescimento de uma grande variedade de microrganismos (BONNET et al., 2019).

O fungo *Penicillium corylophilum*, chama a atenção por ter sido o único isolado que cresceu no meio com própolis. Esse é um fungo que também pode ser isolado em outros ambientes, como associado a cereais (cevada, arroz em casca, trigo), farinha, nozes, frutas e bolos congelados, laticínios, frutas, água, suco de frutas, cosméticos (PITT; HOCKING 2009), e agora neste trabalho foi identificado na própolis verde. Esse fungo é conhecido por produzir metabólitos secundários com ação antifúngica, antibiótica e por ser um fungo entomopatogênico, dessa maneira, pode contribuir para as propriedades antimicrobianas da própolis e repelir possíveis insetos parasitas (SILVA et al., 2004; COSTA; MORAES; OLIVEIRA, 1998; COSTA; MORAES; GALVÃO 2003).

Uma bactéria que destacamos é a identificada como *Bacillus pumillus*, espécie comumente encontrada associada a intestinos de insetos, como na filosfera de plantas, possui atividade relatada na literatura contra os insetos *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi*, *Amrasca biguttula* e larvas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann), como também com atividade fungicida, capaz de inibir o crescimento *in vitro* e *in vivo* dos fungos fitopatogênico *Mycosphaerella fijiensis* e *Pseudocercospora fijiensis*. O gênero *Bacillus* é conhecido por ter uma gama de espécies entomopatogênicas e são agentes naturais utilizados no controle biológico de pragas invertebradas e são a base de muitos inseticidas comerciais (MOLINA et al., 2010; SIVAKUMAR et al., 2016; CRUZ-MARTÍN et al., 2017; RAGUVARAN et al., 2022 CRUZ-MARTÍN et al., 2023)

6.2.2 Identificação dos microrganismos da própolis vermelha e da resina de *D. ecastophyllum*

Das 47 bactérias isoladas da própolis vermelha e sua resina de origem, foram identificadas 46 bactérias, e apenas uma bactéria não foi identificada. Apenas uma

identificação apresentou percentual de similaridade menor que 99 %, que foi o isolado AN R MAC 2 com 98,84 % de similaridade com a bactéria do gênero *Enterobacter* (tabela 5). A tabela 5 está organizada com a primeira coluna identificando se o microrganismo foi isolado da própolis vermelha ou da resina de *D. ecastophyllum*, seguido de qual meio de cultura o microrganismo foi isolado, a terceira coluna indicando qual código cada isolado recebeu, a quarta coluna com a identificação de cada isolado e a quinta coluna, indica o percentual de identificação dos microrganismos.

Tabela 5. Identificação dos microrganismos isolados da própolis vermelha e da sua fonte botânica a resina de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) (rabo-de-bugio) coletados em Marechal Deodoro – AL.

Material Isolado¹	Meio de Cultura²	Isolado³	Identificação⁴	% de identificação⁵
Própolis vermelha	AN	AN P MAC 1	<i>Enterobacter asburiae</i>	99,07
		AN P MAC 2	<i>Enterobacter sp.</i>	99,53
		AN P MAC 3	<i>Enterobacter bugandensis</i>	99,30
		AN P MAC 4	<i>Pantoea cypripedii</i>	99,07
		AN P MAC 5	<i>Atlantibacter hermannii</i>	99,53
		AN P MAC 6	<i>Enterobacter asburiae</i>	99,07
Própolis vermelha	BDA	BDA P MAC 1	<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	99,53
Própolis vermelha	CCA	CCA P MAC 1	<i>Enterobacter sp.</i>	99,77
		CCA P MAC 2	<i>Pantoea agglomerans</i>	99,76
Própolis vermelha	ISP2	ISP2 P MAC 1	<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	99,54
		ISP2 P MAC 2	<i>Brucella intermedia</i>	99,25
		ISP2 P MAC 3	<i>Pluralibacter gergoviae</i>	99,53
		ISP2 P MAC 4	<i>Brucella intermedia</i>	99,25
Própolis vermelha	LNMS	LNMS P MAC 1	<i>Enterobacter sp.</i>	99,07
		LNMS P MAC 2	<i>Pantoea dispersa</i>	99,53
		LNMS P MAC 3	<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	99,30
		LNMS P MAC 4	<i>Pantoea agglomerans</i>	99,76
Própolis vermelha	MA	MÁRTIN P MAC 1	<i>Pantoea agglomerans</i>	99,76
Própolis vermelha	MSSC	MSSC P MAC 1	<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	99,53
Própolis vermelha	TGE	TGE P MAC 1	<i>Enterobacter asburiae</i>	99,52
		TGE P MAC 2	<i>Enterobacter asburiae</i>	99,52
		TGE P MAC 3	<i>Enterobacter asburiae</i>	99,76

		TGE P MAC 4	<i>Pantoea dispersa</i>	99,76
		TGE P MAC 5	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99,53
		TGE P MAC 6	<i>Pantoea agglomerans</i>	99,76
		TGE P MAC 7	<i>Enterobacter sp.</i>	99,53
		TGE P MAC 8	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99,52
Própolis vermelha	TSA	TSA P MAC 1	<i>Enterobacter sp.</i>	99,30
		TSA P MAC 2	<i>Enterobacter sp.</i>	96,57
		TSA P MAC 3	<i>Enterobacter sp.</i>	96,88
		TSA P MAC 4	<i>Enterobacter sp.</i>	96,57
		TSA P MAC 5	Não identificado	-
Resina <i>D. ecastophyllum</i>	AN	AN R MAC 1	<i>Enterobacter sp.</i>	99,53
		AN R MAC 2	<i>Enterobacter sp.</i>	98,84
		AN R MAC 3	<i>Cronobacter dublinensis</i>	99,30
		AN R MAC 4	<i>Enterobacter bugandensis</i>	99,53
		AN R MAC 5	<i>Klebsiella aerogenes</i>	99,54
Resina <i>D. ecastophyllum</i>	CCA	CCA R MAC 1	<i>Pseudocitrobacter faecalis</i>	99,30
Resina <i>D. ecastophyllum</i>	TGE	TGE R MAC 1	<i>Pantoea dispersa</i>	99,53
		TGE R MAC 2	<i>Enterobacter sp.</i>	99,76
		TGE R MAC 3	<i>Enterobacter sp.</i>	99,23
		TGE R MAC 4	<i>Citrobacter braakii</i>	99,07
		TGE R MAC 5	<i>Enterobacter cloacae</i>	99,07
		TGE R MAC 6	<i>Citrobacter braakii</i>	99,30
Resina <i>D. ecastophyllum</i>	TSA	TSA R MAC 1	<i>Enterobacter sp.</i>	99,53
		TSA R MAC 2	<i>Pantoea dispersa</i>	99,52
		TSA R MAC 3	<i>Enterobacter sp.</i>	99,53

AN: Ágar nutriente; BDA: Batata, Dextrose, Ágar; CCA: Glicerol, Peptona e sais; ISP2: International Streptomyces Project 2; LNMS: Ágar, sais minerais com baixo teor de nutrientes; MSSC: Sais minerais, amido e ágar caseína; TGE: Ágar Extrato glicose Triptona; TSA: Ágar Triptona de soja; P: Própolis; R: Resina; MAC: Marechal Deodoro.

¹ material que o microrganismo foi isolado; ² meio de cultura utilizado no isolamento; ³ código de cada microrganismo; ⁴ identificação do microrganismo; ⁵ percentual de identificação dos microrganismos comparados com o banco de dados utilizado.

Dos microrganismos isolados da própolis vermelha e também sua respectiva resina de origem, foram identificadas 16 espécies distribuídas em 10 gêneros (tabela 5), havendo duas espécies em comum na própolis e sua resina de origem, a *Pantoea dispersa* e *Enterobacter bugandensis* totalizando 6 cepas em comum, e algumas bactérias identificadas

apenas ao nível do gênero *Enterobacter* também foram encontradas em comum com a própolis vermelha e sua resina, totalizando 13 cepas. Enquanto que as espécies *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Atlantibacter hermanii*, *Luteibacter rhizovicius*, *Brucella intermedia*, *Pluralibacter gergoviae*, *Pantoea agglomerans* e *Pantoea cypripedii* foram isoladas apenas na própolis e as espécies *Cronobacter dublinensis*, *Klebsiela aerogenes*, *Pseudocitrobacter faecalis*, *Citrobacter braakii* e *Enterobacter cloacae* foram isoladas apenas na resina de *D. ecastophyllum*. No melhor do nosso conhecimento, não há outros trabalhos isolando e identificando microrganismos da própolis vermelha, e por isso a discussão será feita comparando com outras própolis no tópico 6.2.4, nesse tópico abordaremos alguns microrganismos com atividade biológica relatada na literatura.

Analisando os resultados da identificação dos microrganismos da própolis vermelha e a resina proveniente de *Dalbergia ecastophyllum* (L.), nos meios AN e TGE foram identificadas nove espécies em cada meio, havendo bactérias em comum identificadas como *Enterobacter asburiae*, como também algumas identificadas ao nível do gênero *Enterobacter*. No meio ISP2, foram identificadas duas bactérias que não cresceram em mais nenhuma condição, as bactérias *Brucella intermedia* e *Pluralibacter gergoviae*. E ainda o meio CCA, isolando microrganismos da resina, identificamos uma bactéria com a espécie *Pseudocitrobacter faecalis*.

A escolha adequada do procedimento laboratorial para isolamento de microrganismos é um pré-requisito essencial, pois são diversos fatores que podem afetar os resultados de isolamento de microrganismos (ALBUQUERQUE; ITO; MIYJAI, 2000). É possível realizar o isolamento de microrganismos presentes em diferentes habitats simulando, no laboratório, as condições em que se desenvolvem naturalmente, como também oferecer e assegurar condições nutricionais através da utilização de diversos meios de cultura, como também às condições de temperatura e concentração de oxigênio em que esses microrganismos são mantidos. Para distinguir diferentes microrganismos presentes em populações complexas, devem ser empregados meios de cultura seletivos, ou adicionando um antibiótico ou antifúngico, para promoverem o crescimento de determinados microrganismos, em detrimento de outros (BONNET et al., 2020).

6.2.3 Identificação dos microrganismos da própolis verde da Caatinga e da resina de *M. tenuiflora*

Do total de 52 microrganismos isolados da própolis, 39 foram bactérias e 13 fungos. não foi possível identificar 7 microrganismos (seis bactérias e um fungo). Aqui o percentual de similaridade foi o que apresentou maior variação, havendo apenas seis microrganismos identificados com percentual de similaridade acima de 99 %. Para os demais isolados, o percentual de similaridade variou entre 85,96 e 98,58 % (Tabela 6). A tabela 6 está organizada com a primeira coluna identificando se o microrganismo foi isolado da própolis verde da Caatinga ou da resina de *M. tenuiflora*, seguido de qual meio de cultura o microrganismo foi isolado, a terceira coluna indicando qual código cada isolado recebeu, a quarta coluna com a identificação de cada isolado e a quinta coluna, indica o percentual de identificação dos microrganismos.

Tabela 6. Identificação dos microrganismos isolados da própolis verde da Caatinga e sua fonte botânica, a resina de *Mimosa tenuiflora* (jurema preta) coletados em Remanso - BA.

Material Isolado ¹	Meio de Cultura ²	Isolado ³	Identificação ⁴	% de identificação ⁵
Própolis verde da Caatinga	AN	AN P REM 1	<i>Enterobacter asburiae</i>	92,11
		AN P REM 2	<i>Klebsiela aerogenes</i>	95,83
		AN P REM 3	<i>Enterobacter mori</i>	94,26
		AN P REM 4	<i>Klebsiela sp.</i>	96,97
		AN P REM 5	<i>Klebsiella aerogenes</i>	97,11
		AN P REM 6	Não identificado	-
		AN P REM 7	<i>Enterobacter asburiae</i>	92,11
Própolis verde da Caatinga	BDA	BDA P REM 1	Não identificado	-
		BDA P REM 2	<i>Penicillium griseofulvum</i>	99,06
		BDA P REM 3	<i>Aspergillus tamaritii</i>	98,47
Própolis verde da Caatinga	CCA	CCA P REM 1	<i>Enterobacter sp.</i>	97,12
		CCA P REM 2	<i>Pseudomonas putida</i>	98,60
Própolis verde da Caatinga	ISP2	ISP2 P REM 1	<i>Enterobacter sp.</i>	92,16
		ISP2 P REM 2	Não identificado	-
Própolis verde da Caatinga	LNMS	LNMS P REM 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97,67
		LNMS P REM 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,76
		LNMS P REM 3	<i>Aspergillus flavus</i>	97,72

		LNMS P REM 4	<i>Fusarium solani</i>	98,82
Própolis verde da Caatinga	MA	MARTIN P REM 1	<i>Penicillium citrinum</i>	99,53
		MARTIN P REM 2	<i>Aspergillus flavus</i>	97,39
		MARTIN P REM 3	<i>Aspergillus tamarii</i>	97,00
		MARTIN P REM 4	<i>Fusarium solani</i>	98,85
		MARTIN P REM 5	<i>Aspergillus oryzae</i>	96,00
Própolis verde da Caatinga	MSSC	MSSC P REM 1	<i>Fusarium solani</i>	98,00
		MSSC P REM 2	<i>Paecilomyces maximus</i>	98,15
		MSSC P REM 3	<i>Aspergillus flavus</i>	98,48
Própolis verde da Caatinga	TGE	TGE P REM 1	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	98,58
Própolis verde da Caatinga	TSA	TSA P REM 1	<i>Klebsiella sp.</i>	96,08
		TSA P REM 2	<i>Pseudocitrobacter faecalis</i>	95,68
		TSA P REM 3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	94,03
		TSA P REM 4	<i>Klebsiella aerogenes</i>	97,91
		TSA P REM 5	<i>Enterobacter sp.</i>	98,81
Resina <i>M. tenuiflora</i>	AN	AN R REM 1	Não identificado	-
		AN R REM 2	Não identificado	-
Resina <i>M. tenuiflora</i>	CCA	CCA R REM 1	<i>Enterobacter asburiae</i>	97,66
Resina <i>M. tenuiflora</i>	ISP2	ISP2 R REM 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97,91
		ISP2 R REM 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
		ISP2 R REM 3	Não identificado	-
		ISP2 R REM 4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,30
		ISP2 R REM 5	<i>Enterobacter sp.</i>	85,96
		ISP2 R REM 6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98,83
		ISP2 R REM 7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,13
Resina <i>M. tenuiflora</i>	MSSC	MSSC R REM 1	<i>Pantoea dispersa</i>	98,85
Resina <i>M. tenuiflora</i>	TGE	TGE P REM 1	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	98,58
		TGE R REM 2	<i>Pantoea sp.</i>	98,13
		TGE R REM 3	Não identificado	-
		TGE R REM 4	<i>Citrobacter sp.</i>	96,98

		TSA R REM 1	<i>Klebsiela sp.</i>	96,08
		TSA R REM 2	<i>Enterobacter sp.</i>	97,32
Resina <i>M. tenuiflora</i>	TSA	TSA R REM 3	<i>Citrobacter freundii</i>	98,57
		TSA R REM 4	<i>Enterobacter sp.</i>	94,01
		TSA R REM 5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	88,84

AN: Ágar nutriente; BDA: Batata Dextrose Ágar; CCA: Glicerol, Peptona e sais; ISP2: International Streptomyces Project 2; LNMS: Ágar, sais minerais com baixo teor de nutrientes; MSSC: Sais minerais, amido e ágar caseína; TGE: Ágar Extrato glicose Triptona; TSA: Ágar Triptona de soja; P: Própolis; R: Resina; REM: Remanso.

¹ material que o microrganismo foi isolado; ² meio de cultura utilizado no isolamento; ³ código de cada microrganismo; ⁴ identificação do microrganismo; ⁵ percentual de identificação dos microrganismos comparados com o banco de dados utilizado

Quanto à identificação dos microrganismos da própolis verde da Caatinga com a resina coletada da planta *Mimosa tenuiflora* foram identificadas 18 espécies distribuídas em 11 gêneros (tabela 6), onde 3 espécies que repetem: *Enterobacter asburiae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, totalizando 12 cepas, havendo também alguns microrganismos que foram identificados ao nível dos gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* e esses foram 10 microrganismos. Enquanto que as espécies *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter mori*, *Pseudomonas putida*, *Pseudocitrobacter faecalis*, *Leclersia adecarboxylata*, *Penicillium griseofulvum*, *Aspergillus tamarisii*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium solani*, *Penicillium Citrinum* e *Paecilomyces maximus* foram identificadas apenas na própolis verde da Caatinga. Como também as espécies *Pantoea dispersa* e *Citrobacter freundii* foram identificadas apenas na resina de *M. tenuiflora*. No melhor do nosso conhecimento, não há outros trabalhos isolando e identificando microrganismos da própolis verde da Caatinga, e por isso a discussão será feita comparando com outras própolis no tópico 6.2.4.

A identificação dos microrganismos da própolis verde da Caatinga e da sua resina de origem (tabela 5), demonstrou que no meio TSA foi identificado as bactérias *Pseudocitrobacter faecalis* e *Citrobacter freundii*, encontradas somente neste meio de cultura. No meio MSSC houve o crescimento do fungo *Paecilomyces maximus* e não encontramos mais essa espécie de fungo em nenhum outro meio de cultura e as espécies *Aspergillus flavus* e *Fusarium solani*, que também identificamos nos meios LNMS e no meio Martin. Nesse último meio, identificamos os isolados *Penicillium citrinum*, *Aspergillus tamarisii* (também identificado no meio BDA) e a espécie fúngica *Penicillium griseofulvum* cresceu apenas no meio BDA.

Bactérias identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*s já foram identificadas em diversos ambientes, trata-se de um importante patógeno oportunista que causa infecções adquiridas em hospitais, também é comumente encontrada em ambientes agrícolas. Podem ser encontradas em associação com as plantas, seja na rizosfera, filosfera ou como microrganismos endofíticos. Como exemplo de plantas que esses microrganismos estão associados, podemos citar: tomate, beringela, pepino e pimenta, e agora neste trabalho encontramos isolados associados à *Mimosa tenuiflora*. É importante salientar que estirpes associadas a plantas partilham características genéticas e metabólicas semelhantes com a de isolados clínicos (AMBREETHA et al., 2022).

6.2.4 Comparação entre microrganismos isolados nos três tipos de própolis e suas respectivas resinas de origem.

Ao total, foram identificadas 38 espécies bacterianas, distribuídas em 18 gêneros, onde foram atribuídos a dois filos: Proteobactéria (gêneros *Pseudocitrobacter*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kasokania*, *Atlantibacter*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Cromobacter*, *Luteibacter*, *Brucella*, *Curtobacterium*, *Pluralibacter*, *Pantoea* e *Leclercia*) e Firmicutes (gêneros *Bacillus*, *Enterococcus* e *Lactococcus*). Ao isolar e identificar microrganismos da própolis de dois locais em Porto Rico, Matos et al. (2023) também observaram que o filo Proteobactéria continha a maior quantidade de isolados, onde também encontraram bactérias dos filos Actinobactéria, Cianobactéria, Firmicutes, Bacteroidetes e Acidobactéria. Ao comparar os isolados das própolis analisadas neste trabalho e com as coletadas em Porto Rico, foi observado que os gêneros *Enterobacter*, *Curtobacterium* e *Bacillus* são em comum e ao comparar as espécies, somente a espécie *Enterobacter ludwigii* esteve presente na própolis de Porto Rico, como também na própolis verde. Adicionalmente, salienta-se que neste trabalho da literatura não foi trabalhado com a resina correspondente à própolis. Outra espécie encontrada na própolis verde que já foi identificada com própolis de outro país, foi a espécie *Pantoea agglomerans*, também identificada na própolis da Itália, em um trabalho realizado por Casalone et al. (2020).

Ngalimat et al. (2019) isolaram microrganismos da própolis na Malásia e encontraram bactérias distribuídas dos filos Firmicutes, Proteobactéria e Actinobactéria, resultado semelhante ao deste trabalho. No trabalho, Ngalimat et al., (2019) foi verificado o predomínio de bactérias do gênero *Bacillus* na própolis coletada por eles, enquanto que neste trabalho identificamos apenas a espécie *Bacillus pumilus* na própolis verde. Por outro lado,

houve outras espécies que são em comum entre a própolis coletada na Malásia com as deste trabalho, como as espécies *Enterobacter asburiae* (encontrada nas três própolis analisadas), *Enterobacter cloacae* (isolados encontrados na própolis verde e na própolis vermelha) e *Pantoea dispersa* (também identificada na própolis verde e na verde da Caatinga). Dessa forma, nota-se que há filios em comuns das bactérias encontradas na própolis verde, vermelha e verde da Caatinga e suas respectivas resinas de origem com outras própolis ao redor do mundo, como também algumas espécies bacterianas.

Quanto os fungos, as espécies identificadas neste trabalho são do filo Ascomycota, semelhantemente encontrado por Sallemi et al. (2022), onde isolando fungos da própolis em diferentes regiões da Tunísia, encontrou que 97,5 % dos seus isolados pertencem ao filo Ascomycota e os outros 2,5 % pertencem ao filo Basidiomycota. Esses autores identificaram a nível de gênero os fungos, e ao comparar com os fungos isolados da própolis verde e da própolis verde da Caatinga, verificamos a semelhança com os gêneros *Penicillium* e entre a própolis verde da Caatinga os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Ferreira et al. (2021) isolaram e identificaram fungos da própolis da Baía de Iguape (Bahia, Brasil) pertencentes aos filios Ascomycota e Basidiomycota. Quanto a comparação a nível de gênero, os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* se repetem com os isolados identificados por Ferreira e colaboradores. Em relação a nível de espécie, ao comparar com as espécies identificadas nesse trabalho, o fungo identificado como *Penicillium citrinum* esteve presente na própolis verde da Caatinga na própolis de Baía de Iguape.

Ao traçar o perfil das comunidades microbianas da própolis, mel, favos e das abelhas, Grubs et al. (2015) observaram microrganismos amplamente diversificados e metabolicamente ativos associados aos componentes da colmeia, e ainda notaram que a maior riqueza de microrganismos estava presente na própolis.

Os gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pantoea* se apresentaram em todos os materiais coletados, enquanto que o gênero *Penicillium* foi isolado na própolis verde e verde da Caatinga, o gênero *Atlantibacter* foi identificado na própolis vermelha e na verde, enquanto que os gêneros *Pseudocitrobacter* e *Citrobacter* foram identificados na própolis verde da Caatinga e na própolis vermelha (figura 10).

**Própolis verde e resina de
*Baccharis dracunculifolia***

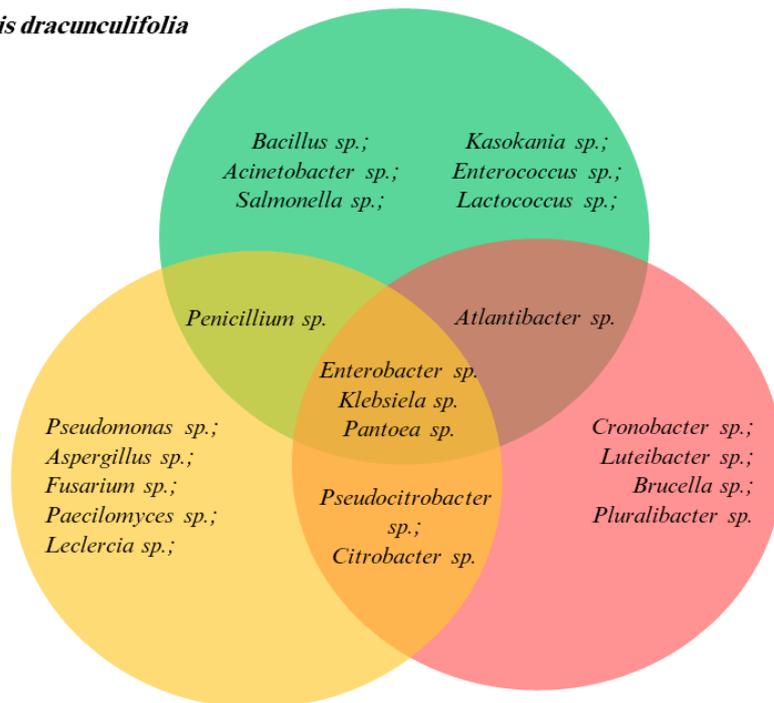


Figura 10. Diagrama de Venn com a identificação a nível de gênero dos microrganismos isolados da própolis verde, vermelha e verde da Caatinga (com suas respectivas resinas de origem).

O gênero *Enterobacter* são representadas por bactérias Gram-negativas, que possuem flagelos, seu crescimento é anaeróbio facultativo, catalase positivo e oxidase negativo e estão associadas a uma variedade de nichos ecológicos, onde podem ser isoladas do solo, da água e também de plantas, pois algumas espécies podem ser consideradas endofíticas ou até mesmo fitopatogênicas, além de fazerem parte da microbiota intestinal animal e humana (MAGAJI et al. 2023, DAVIN-REGLI; LAVIGNE; PAGÈS 2019; SINGH et al., 2018). Ainda mais, algumas espécies apresentam importância biotecnológica, com aptidão agrícola, pois estão associadas a abordagens de bioprocessamento e engenharia metabólica, além de algumas cepas apresentarem o potencial em promover o crescimento vegetal a partir da produção de enzimas antioxidantes e antioxidantes não enzimáticos, como também aumentar a biomassa vegetal, e auxiliar a eficiência de absorção de nutrientes pelas plantas, além de apresentarem o potencial de atenuar o efeito de estresse oxidativo nas plantas na presença de metais pesados (ZHUANG et al., 2011; GUPTA et al., 2019; MAGAJI et al. 2023). Outro exemplo de atividade deste gênero é que a espécie *Enterobacter cloacae* pode produzir grandes quantidades de exopolissacarídeos com ação antitumoral, possuir atividade de regulação

imunológica, atividade antioxidante, anti-inflamatória e antidiabética (XU et al., 2009; JIN et al., 2010; JIN et al., 2012; ZHOU et al., 2014; ZHAO et al., 2015).

Outro gênero presente em todas as própolis coletadas, são as bactérias do gênero *Klebsiella*. Trata-se de um grupo de microrganismos que podem sobreviver em vários nichos ecológicos, tanto de vida livre quanto associados ao hospedeiro. Esses nichos incluem solo, água, uma variedade de espécies de plantas, insetos, pássaros, répteis e muitos mamíferos qual esta bactéria pode ser um organismo comensal ou um potencial patógeno (WYRES; HOLT, 2018). A espécie *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa, imóvel, encapsulado, fermentador de lactose, anaeróbio facultativo, bactéria em forma de bastonete (AL-RUBAYE; KADHIM; HAMEED, 2017). Esse grupo de bactéria pode produzir importantes metabólitos secundários com diversas atividades biológicas, como por exemplos compostos com atividades antioxidante, anti-inflamatória, antibiótica, antifúngica e atividade anticoagulante. Assim, percebe-se que com base na importância do emprego de compostos bioativos em farmácia para produzir medicamentos para o tratamento de muitas doenças, a purificação de compostos produzidos pela *Klebsiella pneumonia* podem ser úteis, porém atenção especial deve ser dada a essa espécie devido ao sua potencial patogenicidade ao ser humano (AL-RUBAYE; KADHIM; HAMEED, 2017).

O gênero *Pantoea* trata-se de um grupo de eucariotos biologicamente diverso e ecologicamente ativo amplamente distribuído em diversos habitats, são encontrados em ambientes aquáticos, terrestres e em associação com plantas, insetos, humanos e animais, com algumas espécies demonstrando aptidão para promoção de crescimento vegetal através da fixação biológica de nitrogênio, como também podem ser encontrados associados ao intestino de insetos com capacidade em decompor substâncias tóxicas ao hospedeiro (WALTERSON; STAVRINIDES, 2015). A espécie *Pantoea agglomerans* é conhecida como uma bactéria epífita que se desenvolve na superfície das plantas e como organismo endofítico que vive dentro as plantas, que ocorre abundantemente em produtos vegetais e animais, no corpo de artrópodes e outros animais, na água, no solo, na poeira e no ar, e também podem ser encontradas associadas à humanos (VÖLKSCH et al., 2009; QUECINE et al., 2015; WALTERSON; STAVRINIDES 2015).

Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são amplamente difundidos em vários ambientes, incluindo solo, ar e vegetação, e agora na própolis. Indicando que a origem desses fungos também pode estar ligada a materiais vegetais e/ou compostos coletados durante a produção e armazenamento da própolis (SALLEMI et al., 2022).

Fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* possuem algumas espécies de importância econômica que apresentam metabólitos bioativos e enzimas que são de interesse da indústria biotecnológica (HOUBRAKEN et al., 2010), que exercem função biológica benéfica para a indústria farmacêutica e ambiental, todavia algumas espécies são patogênicas. Algumas espécies de *Aspergillus* têm potencial para a produção de aflatoxinas, causando preocupação aos produtores, processadores e comerciantes, devido às perdas econômicas nos produtos infestados (FERREIRA et al., 2021).

Analisando a identificação das espécies dos materiais coletados, foi observado que há espécies em comum para os três tipos de própolis ou em comum com dois tipos (Figura 11). Algumas das bactérias identificadas neste trabalho, foram relatados na literatura como presentes em outros componentes da colmeia, como pólen, mel, néctar e pão de abelha (grãos de pólen que as abelhas coletam e misturam com a secreção das glândulas salivares ou néctar antes de serem preservados e fermentados (DEGRANDI-HOFFMAN; ECKHOLM; HUANG 2013)) ou em insetos. A exemplo dessa afirmação, têm-se a bactéria *Pantoea agglomerans* (presente na própolis verde e vermelha) encontrada em pólen; *Enterobacter cloacae* muito comum em conteúdo intestinal de larvas de insetos; *Enterococcus casseliflavus* encontrada em pão de abelha; *Pantoea septica* encontrada em detritos das colmeias. Bactérias do gênero *Enterococcus* também foram encontradas no pão de abelha. O gênero *Pseudomonas*, encontrada na própolis verde da Caatinga também pode ser encontrado no pão de abelha, pólen, no mel e no intestino das abelhas. Como também bactérias do gênero *Bacillus*, que são um dos componentes do microbioma central do intestino da abelha e também desempenha um papel importante na defesa e conservação do mel. Enquanto que bactérias do gênero *Klebsiella* (gênero presente nas três própolis coletadas) foram relatados também no mel e o mesmo acontece para o gênero *Citrobacter* (presente na própolis vermelha) (SNOWDON; CLIVER 1996; SINACORI et al., 2014; GRABOWSKI; KLEIN 2017; WEN et al., 2017; ANJUM et al., 2021; SCOARIS et al., 2021; LACONI et al., 2022; TSADILA; AMOROSO; MOSSIALOS 2023).

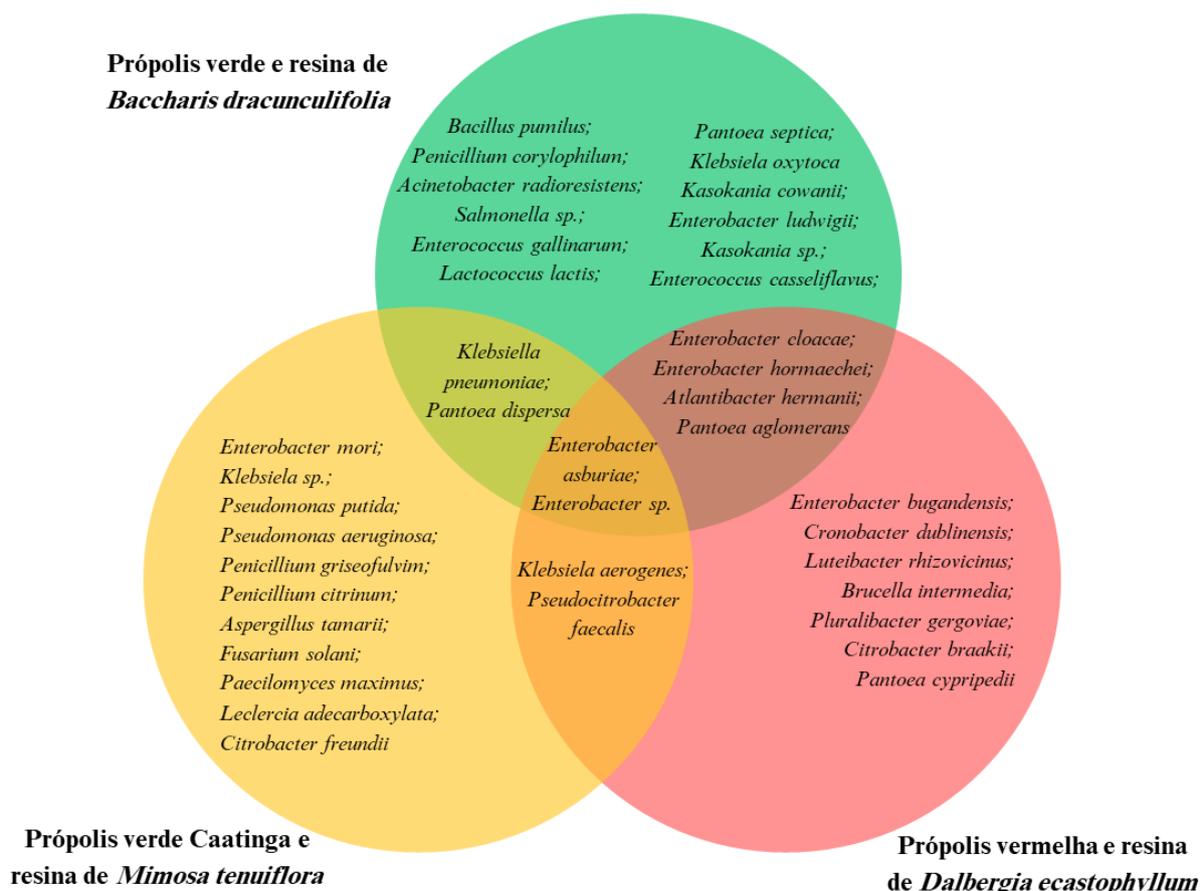


Figura 11. Diagrama de veen com a identificação a nível de espécie dos microrganismos isolados da própolis verde, vermelha e verde da Caatinga (com suas respectivas resinas de origem).

A própolis é um ambiente desafiador para prospectar microrganismos e isso se deve às suas características físicas e químicas. Portanto, sugere-se que a sobrevivência e proliferação de microrganismos na própolis pode ter relação com cadeias respiratórias especializadas que transferem elétrons de doadores de elétrons para aceptores de elétrons via reações redox, um fenômeno biológico complexo que depende de compostos orgânicos como as quinonas (GARCIA-MAZCORRO; KAWAS; MARROQUIN-CARDONA, 2019).

A variação da composição da microbiota de diferentes tipos de própolis pode ser atribuída a vários fatores a qual a própolis se encontra, como condições climáticas a fonte vegetal na qual as abelhas coletam a resina para a formação desse material (DEZMIREAN et al., 2020; VARDAR- ÜNLÜ; SILICI; ÜNLÜ, 2008). Além disso, a acessibilidade aos alimentos durante a época de forrageamento pode mudar as comunidades microbianas vivendo nas colmeias, como também, essa comunidade de fungos e bactérias podem ser

influenciadas pelo manejo agrícola na área ao entorno dos apiários (BLEAU et al., 2020; MUÑOZ-COLMENERO et al., 2020).

A partir desses resultados, observamos que há fungos e bactérias em comum para as três própolis com suas respectivas resinas de origem em comum, como também microrganismos específicos para cada tipo. Observamos também que há semelhança entre os isolados das própolis coletadas nesse trabalho com própolis da Turquia, Porto Rico, Itália e Baía de Iguape (Bahia, Brasil), e que alguns desses microrganismos possuem atividade relatada na literatura semelhante às da própolis, corroborando com a ideia de que esses microrganismos podem influenciar nas propriedades biológicas da própolis. E devido a isso, foi analisado a capacidade das bactérias em inibir o crescimento de um fungo fitopatogênico de elevada importância para a agricultura, o *Colletotrichum falcatum*.

6.3 Interação antagônica

O meio sólido é preferido às culturas líquidas para estudos de ensaio antagônico, pois o meio sólido imita melhor as condições naturais de crescimento dos fungos filamentosos em ambientes aeróbios, além de permitir um melhor desenvolvimento dos microrganismos por se tratar de um suporte sólido para crescimento dos microrganismos. E de uma perspectiva prática, meios de cultura sólidos permitem a visualização do desenvolvimento de colônias de fungos ao longo do tempo experimental (BERTRAND et al., 2013).

No ensaio antagônico realizado utilizando as 64 bactérias isoladas da própolis verde e sua resina de origem com duas bactérias por placa e o fungo fitopatogênico, 28 bactérias apresentaram potencial em inibir o crescimento micelial do *C. falcatum*. Dessa maneira, cada bactéria com potencial de inibir o *C. falcatum* foi testada em quadruplicata. Após análise de variância, foi observado um efeito significativo ($p < 0,05$) dos diferentes isolados em relação ao fungo fitopatogênico, confirmado pelo teste de média Scott-Knott (Tabela 7).

Tabela 7. Percentual de inibição do fungo *Colletotrichum falcatum* em teste antagônico com microrganismos isolados da própolis verde e da resina de *B. dracunculifolia*.

Microrganismo	Identificação	% inibição
AN P GRN 1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	21 d
AN P GRN 2	<i>Enterobacter sp.</i>	24 d
AN P GRN 4	<i>Klebsiella oxytoca</i>	26 d
AN P GRN 5	<i>Enterobacter asburiae</i>	64 a
AN P GRN 6	<i>Kosakonia cowanii</i>	29 d
AN P GRN 8	<i>Enterobacter cloacae</i>	24 d
AN P GRN 9	<i>Enterobacter hormaechei</i>	35 c
AN P GRN 10	<i>Kosakonia cowanii</i>	30 d
AN P GRN 11	<i>Kosakonia cowanii</i>	36 c
AN P GRN 12	<i>Pantoea agglomerans</i>	10 e
AN P GRN 13	<i>Atlantibacter hermannii</i>	21 d
AN R GRN 2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	24 d
AN R GRN 3	<i>Atlantibacter hermannii</i>	22 d
CCA P GRN 1	<i>Enterobacter sp.</i>	47 b
CCA P GRN 3	<i>Enterobacter cloacae</i>	25 d
R GRN 1	<i>Enterobacter cloacae</i>	10 e
R GRN 2	<i>Enterobacter cloacae</i>	12 e
TGE P GRN 2	<i>Enterobacter cloacae</i>	54 b
TGE P GRN 3	<i>Kasokania sp.</i>	50 b
TGE R GRN 2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	42 b
TGE R GRN 4	<i>Enterobacter ludwigii</i>	12 e
TSA P GRN 2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	49 b
TSA P GRN 6	<i>Enterobacter cloacae</i>	40 b
TSA R GRN 1	<i>Kosakonia cowanii</i>	14 e
TSA R GRN 2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	22 d
TSA R GRN 5	<i>Enterobacter cloacae</i>	17 d
TSA R GRN 6	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	07 e
TSA R GRN 7	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	12 e
Controle	-	0

Ensaio realizado em quadruplicada e médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Legenda: AN: Ágar nutriente; CCA: Glicerol, Peptona e sais; ISP2: International Streptomyces Project 2; LNMS: Ágar, sais minerais com baixo teor de nutrientes; TGE: Ágar Extrato glicose Triptona; TSA: Ágar Triptona de soja; P: Própolis; R: Resina; GRN: Guaranésia.

Foi observado que o potencial antifúngico dos microrganismos isolados da própolis verde e de sua resina origem é variável, onde 23 bactérias apresentaram percentual de inibição menor ou igual a 50 % (Figura 12). Foi observado duas bactérias com percentual de inibição superior a 50 %, a cepa AN P GRN 5 com 64 % de inibição, apresentando resultado estatisticamente superior às demais cepas, como também sendo a única cepa identificada como *Enterobacter asburiae* na própolis verde (as outras bactérias identificadas do gênero *Enterobacter* pertencem a outro epíteto específico ou foram identificadas apenas a nível de gênero) e a cepa *Enterobacter cloacae* (TGE P GRN 2) também inibiu o crescimento de *C. falcatum* acima de 50 % com uma inibição de 54 %, onde seguindo a classificação de Bertrand et al. (2013) essas duas linhagens apresentaram inibição à distância. Esse mesmo tipo de interação foi observado para os isolados *Enterobacter sp.* (CCA P GRN 1), *E. cloacae* (TGE P GRN 2), *E. cloacae* (TSA P GRN 6), *Kasokania sp.* (TGE P GRN 3) e *K. oxytoca* (TGE R GRN 2) com % de inibição 47, 40, 54, 50 e 42 % respectivamente.

Por outro lado, a linhagem *Acinetobacter radioresistens* (TSA R GRN 6) foi o que menos inibiu o crescimento do fungo com 7% de inibição seguido dos isolados *Pantoea agglomerans* (AN P GRN 12) e *Enterobacter cloacae* (R GRN 1, R GRN 2) com 10 % de inibição cada, *Enterobacter ludwigii* (TGE R GRN 4), *Enterococcus casseliflavus* (TSA R GRN 7) com 12 % de inibição cada e a cepa *Kosakonia cowanii* (TSA R GRN 1) com 14 % de inibição. Essas cepas foram estatisticamente iguais.

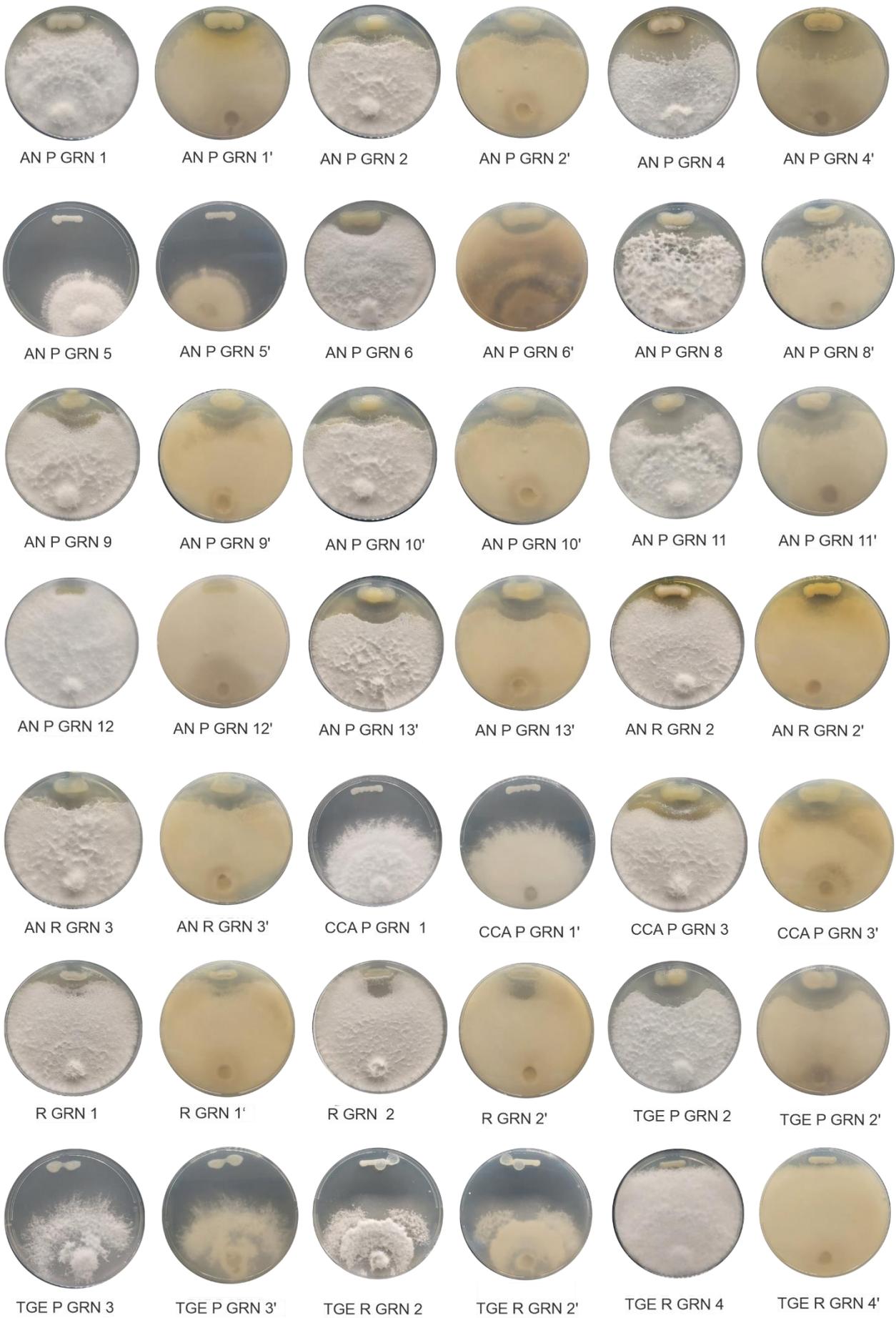




Figura 12. Inibição do crescimento micelial de *C. falcatum* frente a microrganismos isolados da própolis verde e resina de *B. dracunculifolia*. Códigos seguidos de (') representam o verso da placa.

As cepas AN P GRN 1 e AN R GRN 2, ambas identificadas como *Klebsiella oxytoca*, apresentaram um pigmento solúvel no meio, mas foi observado que os micélios do *C. falcatum* cresciam sobre esse pigmento, sugerindo que esse pigmento não apresenta atividade antifúngica. As outras cepas identificadas como *K. oxytoca* foram AN P GRN 1, AN P GRN 4, TGE R GRN 2 e TSA R GRN 2 e não apresentaram o pigmento solúvel, mas apresentaram percentual de inibição de 21, 26, 42 e 22 % respectivamente, onde a linhagem TGE R GRN 2 foi significativamente superior aos demais.

Al-Rubaye; Kadhim; Hameed (2017) identificaram em seu trabalho o composto 4-Dehydroxy-N-(4,5-methylenedioxy-2-nitrobenzylidene) tyram produzido pela bactéria *Klebsiella pneumoniae* e este composto é conhecido por sua atividade antifúngica, onde já demonstrou resultado em suprimir o crescimento de *Aspergillus fumigatus*. Assim, faz-se notório que a bactéria *Klebsiella pneumoniae* produz importantes metabólitos secundários com atividades biológicas (AL-RUBAYE; KADHIM; HAMEED, 2017).

Os demais isolados não apresentaram nenhuma característica que chamasse a atenção, inibindo o crescimento fúngico somente quando este se aproxima das células bacterianas, havendo inibição de crescimento somente sobre elas.

Das 47 bactérias isoladas da própolis vermelha e testadas contra o fungo *C. falcatum* utilizando duas bactérias por placa, 18 apresentaram potencial em inibir o crescimento do fungo em estudo, e então foram testadas individualmente em quadruplicata. Ao final do ensaio foi realizada a análise de variância e o teste de média Scott-Knott a 5% de probabilidade (Tabela 8).

Tabela 8. Percentual de inibição do fungo *Colletotrichum falcatum* em teste antagônico com microrganismos isolados da própolis vermelha e da resina de *D. ecastophyllum*.

Microrganismo	Identificação	% de inibição
AN P MAC 4	<i>Pantoea cyripedii</i>	11 d
AN P MAC 7	<i>Enterobacter sp.</i>	15 d
AN R MAC 2	<i>Enterobacter sp.</i>	16 d
AN R MAC 4	<i>Enterobacter bugandensis</i>	66 a
ISP2 P MAC 3	<i>Pluralibacter gergoviae</i>	38 b
ISP2 P MAC 4	<i>Brucella intermedia</i>	10 d
LNMS P MAC 1	<i>Enterobacter sp.</i>	15 d
LNMS P MAC 4	<i>Pantoea agglomerans</i>	09 d
LNMS P MAC 5	<i>Pantoea dispersa</i>	07 d
TGE P MAC 2	<i>Enterobacter asburiae</i>	15 d
TGE P MAC 6	<i>Pantoea agglomerans</i>	12 d
TGE R MAC 3	<i>Enterobacter sp.</i>	22 c
TGE R MAC 4	<i>Citrobacter braakii</i>	49 b
TGE R MAC 5	<i>Enterobacter cloacae</i>	25 c
TGE R MAC 6	<i>Enterobacter sp.</i>	12 d
TSA P MAC 2	<i>Enterobacter sp.</i>	13 d
TSA P MAC 4	Não identificado	61 a
TSA R MAC 3	<i>Enterobacter sp.</i>	22 c
Controle	-	0

Ensaio realizado em quadruplicata e médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Legenda: AN: Ágar nutriente; CCA: Glicerol, Peptona e sais; ISP2: International Streptomyces Project 2; LNMS: Ágar , sais minerais com baixo teor de nutrientes; TGE: Ágar Extrato glicose Triptona; TSA: Ágar Triptona de soja; P: Própolis; R: Resina; MAC: Marechal Deodoro.

Semelhantemente aos microrganismos isolados da própolis verde, os microrganismos isolados da própolis vermelha e da sua respectiva resina de origem, apresentaram percentual de inibição variando entre 7 e 66 %, onde 16 bactérias apresentaram percentual de inibição menor que 50% (figura 13). As cepas *Enterobacter bugandensis* (AN R MAC 4) e TSA P MAC 4 (não foi possível identificar este isolado) foram os que apresentaram maior percentual de inibição, sendo estatisticamente superior às demais cepas, com 66 e 61 % respectivamente. As cepas *Pantoea cyripedii* (AN P MAC 4), *Enterobacter* sp. (AN P MAC 7, AN R MAC 2, LNMS P MAC 1, TGE R MAC 6 e TSA P MAC 2), *Enterobacter asburiae* (TGE P MAC 2), *Pantoea dispersa* (LNMS P MAC 5), *Pantoea agglomerans* (LNMS P MAC 4 e TGE P MAC 6), *Brucella intermedia* (ISP2 P MAC 4) foram estatisticamente inferiores aos demais isolados, com percentual de inibição variando entre com 07 e 15 %.

A cepa AN R MAC 4, identificada como *Enterobacter bugandensis*, inibiu em 66 % o crescimento do *C. falcatum*. O outro isolado que com essa mesma identificação (AN P MAC 3) não apresentou inibição do crescimento dos micélios do fungo em estudo, dessa maneira, sugere que há diferenças no metabolismo de bactérias mesmo sendo da mesma espécie.

As cepas *Citrobacter braakii* (TGE R MAC 4) e *E. cloacae* (TGE R MAC 5), foram estatisticamente diferentes em inibir o crescimento do fungo, mas ambos os isolados apresentam uma área que delimita bem a zona em que o fungo cresce e depois não cresce mais. Os demais isolados só inibiram o crescimento fúngico, quando os micélios se aproximaram das células bacterianas.

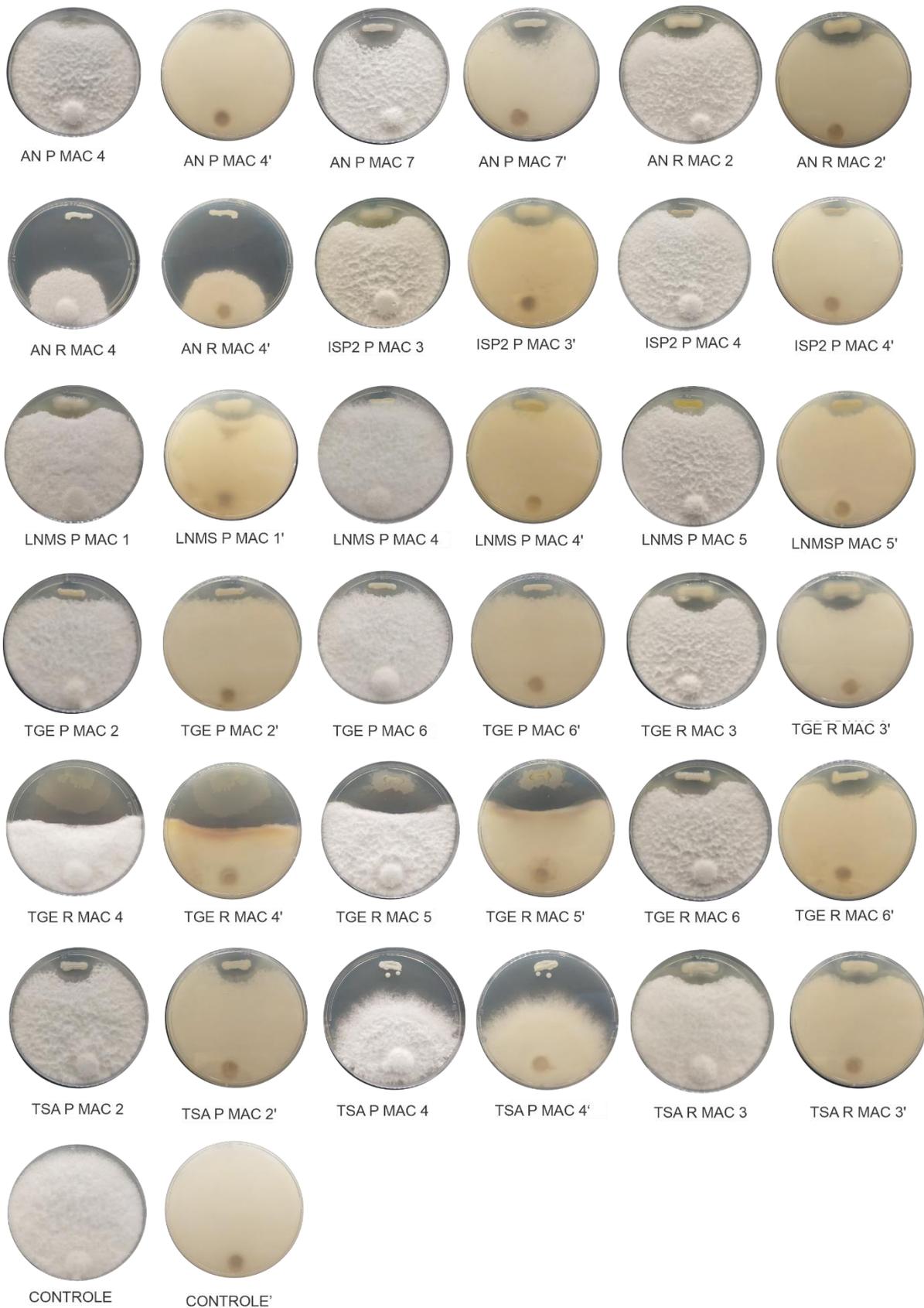


Figura 13. Inibição do crescimento micelial de *C. falcatum* frente a microrganismos isolados da própolis vermelha e resina de *D. ecastophyllum*. Códigos seguidos de (') representam o verso da placa.

Ao analisar o ensaio antagônico das 39 bactérias isolados da própolis verde da Caatinga e da resina de *M. tenuiflora* utilizando duas bactérias por placa, foi observado que 10 bactérias inibiram o crescimento do fungo e então foram testadas individualmente frente ao fungo *C. falcatum* também em quadruplicata e ao final do ensaio também realizada a análise de variância e o teste de média Scott-Knott a 5% de probabilidade (Tabela 9).

Tabela 9. Percentual de inibição do fungo *Colletotrichum falcatum* em teste antagônico com microrganismos isolados da própolis verde da Caatinga e da resina de *M. tenuiflora*.

Microrganismo	Identificação	% de inibição
AN P REM 3	<i>Enterobacter morii</i>	39 b
ISP2 R REM 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61 a
ISP2 R REM 4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53 b
ISP2 R REM 6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	79 a
ISP2 R REM 7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72 a
LNMS P REM 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75 a
TSA P REM 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	53 b
TSA P REM 3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40 b
TSA P REM 4	<i>Klebsiella aerogenes</i>	69 a
TSA R REM 4	<i>Enterobacter sp.</i>	25 c
Controle	-	0

Ensaio realizado em quadruplicata e médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Legenda: AN: Ágar nutriente; ISP2: International Streptomyces Project 2; LNMS: Ágar, sais minerais com baixo teor de nutrientes; TSA: Ágar Tripton de soja; P: Própolis; R: Resina; REM: Remanso.

O percentual de inibição dos microrganismos da própolis verde da Caatinga e a resina de *Mimosa tenuiflora* variou entre 25 e 79 % (figura 14). A cepa *Klebsiella aerogenes* (TSA P REM 4), juntamente com as cepas identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* (ISP2 R REM 2, ISP2 R REM 6, ISP2 R REM 7 E LNMS P REM 2) foram estatisticamente superiores às demais cepas, enquanto que a cepa *Enterobacter sp.* (TSA R REM 4) apresentou o menor percentual de inibição, sendo estatisticamente inferior às demais. Entretanto, cabe lembrar que este ensaio é considerado qualitativo.

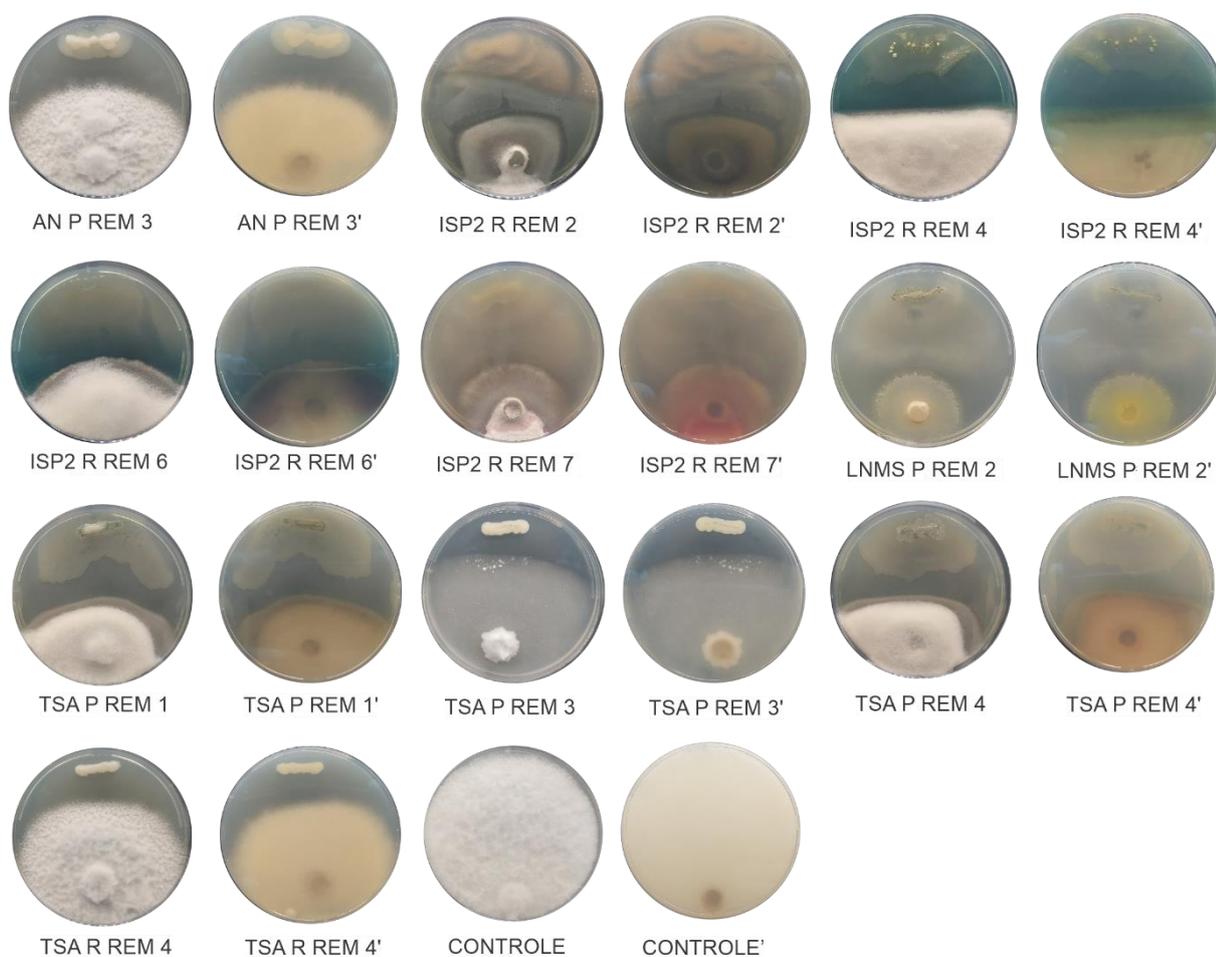


Figura 14. Inibição do crescimento micelial de *C. falcatum* frente a microrganismos isolados da própolis verde da Caatinga e resina de *M. tenuiflora*. Códigos seguidos de (') representam o verso da placa.

A cepa TSA P REM 4 identificado como *Klebsiella aerogenes* inibiu em 69 % o crescimento micelial do fungo, e entre os microrganismos identificados como *K. aerogenes*, foi o único que inibiu o crescimento fúngico. Entre os microrganismos identificados como *Klebsiella pneumoniae*, apenas os isolados TSA P REM 1 e TSA P REM 3 inibiram em 53 e 49 %, respectivamente, o fungo *C. falcatum*. Já em relação ao gênero *Enterobacter*, o isolado TSA R REM 4 identificado ao nível de gênero inibiu em 25 % o crescimento do fungo, enquanto o isolado AN P REM 3 identificado como *Enterobacter mori* inibiu em 39 %. Assim, nota-se que cepas identificadas com o mesmo gênero, ou até mesmo a mesma espécie apresentaram diferente aptidão para inibição do fungo *C. falcatum*. Esse resultado pode ser explicado devido a potenciais variações na informação genética das espécies bacterianas, conferindo diferenças metabólicas significativas aos isolados da mesma espécie (FANTROUSSI; AGATHOS, 2005). Técnicas de genética molecular podem ser úteis na

determinação dos graus de variação genética intraespecífica e estudos de polimorfismo têm contribuído para a compreensão da diversidade genética e das estruturas populacionais de microrganismos e têm fornecido informações para programas de controle biológico (TIAGO; OLIVEIRA; LIMA, 2014).

O isolado *Klebsiela pneumoniae* (TSA P REM 3) apresentou alteração no crescimento do fungo, reduzindo o aspecto cotonoso do fungo quando comparado ao tratamento controle. Os isolados ISP2 R REM 2, LNMS P REM 2 e ISP2 R REM 7, todos identificados como *Pseudomonas aeruginosa*, também alteraram o crescimento do fungo quando comparado ao controle. E ainda, com o isolado ISP2 R REM 7 o fungo apresentou um pigmento vermelho, deixando a interação entre fungo e bactéria quimicamente ainda mais complexa. Interações entre microrganismos levam à ativação de mecanismos complexos de regulação, o que resulta na biossíntese de produtos naturais altamente diversos, como moléculas de defesa e metabólitos com ação antibiótica, alterando o crescimento e morfologia do microrganismo antagônico (SCHERLACH; HERTWECK 2009; ESTRADA et al., 2011).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, presente na própolis verde da Caatinga e na resina de origem, apresentou maior percentual de inibição frente ao fungo *C. falcatum*, com percentual variando entre 53 e 79 %, onde o isolado ISP2 R REM 4 foi estatisticamente inferior aos demais. Em trabalhos anteriores, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, isolada de outras fontes apresentou compostos bioativos contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Rizoctonia solani* e *Colletotrichum gloesporioides* e contra *Colletotrichum falcatum* (GOSWAMI et al., 2014; SASIREKHA; SRIVIDYA 2016; YASMIN; FAUZIA; RASUL, 2016; CHANDRA et al., 2020), assim a *P. aeruginosa* pode oferecer a possibilidade da utilização de seus metabólitos bioativos como alternativa fungicida para controle da podridão vermelha da cana-de-açúcar (GOSWAMI et al., 2015), e por esse motivo, uma cepa identificada como *P. aeruginosa* (ISP2 R REM 7) foi selecionada para as próximas etapas deste trabalho.

6.4 Avaliação da inibição do crescimento micelial do fungo *C. falcatum* por metabólitos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (ISP2 R REM 7)

A técnica de incorporação de substâncias ativas contra fungos requer uma dispersão homogênea da amostra no meio, e pode ser utilizada para identificar compostos que são ativos para determinado grupo de patógenos de interesse. As vantagens desse método são a sua

simplicidade, rapidez e fácil identificação do que foi ativo ou não (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988).

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* já apresenta diversos relatos na literatura com atividade antifúngica (como citado no tópico anterior), e esse foi um dos motivos para a selecionarmos para o estudo da produção de metabólitos secundários. Entre as bactérias identificadas como *P. aeruginosa*, foi selecionada a cepa ISP2 R REM 7 para estudo do perfil químico, pois além de ter demonstrado potencial na inibição do fungo, foi a única cepa que produziu um pigmento vermelho (figura 14) na presença do fitopatógeno, podendo ser um indicativo de produção de compostos específicos antifúngicos.

Após o cultivo da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (ISP2 R REM 7) em meio TSB, partição líquido-líquido, fracionamento *clean up* e fracionamento em coluna sep-Pak C₁₈ foi realizado o ensaio de incorporação no meio de cultura e os resultados podem ser observados na figura 15.

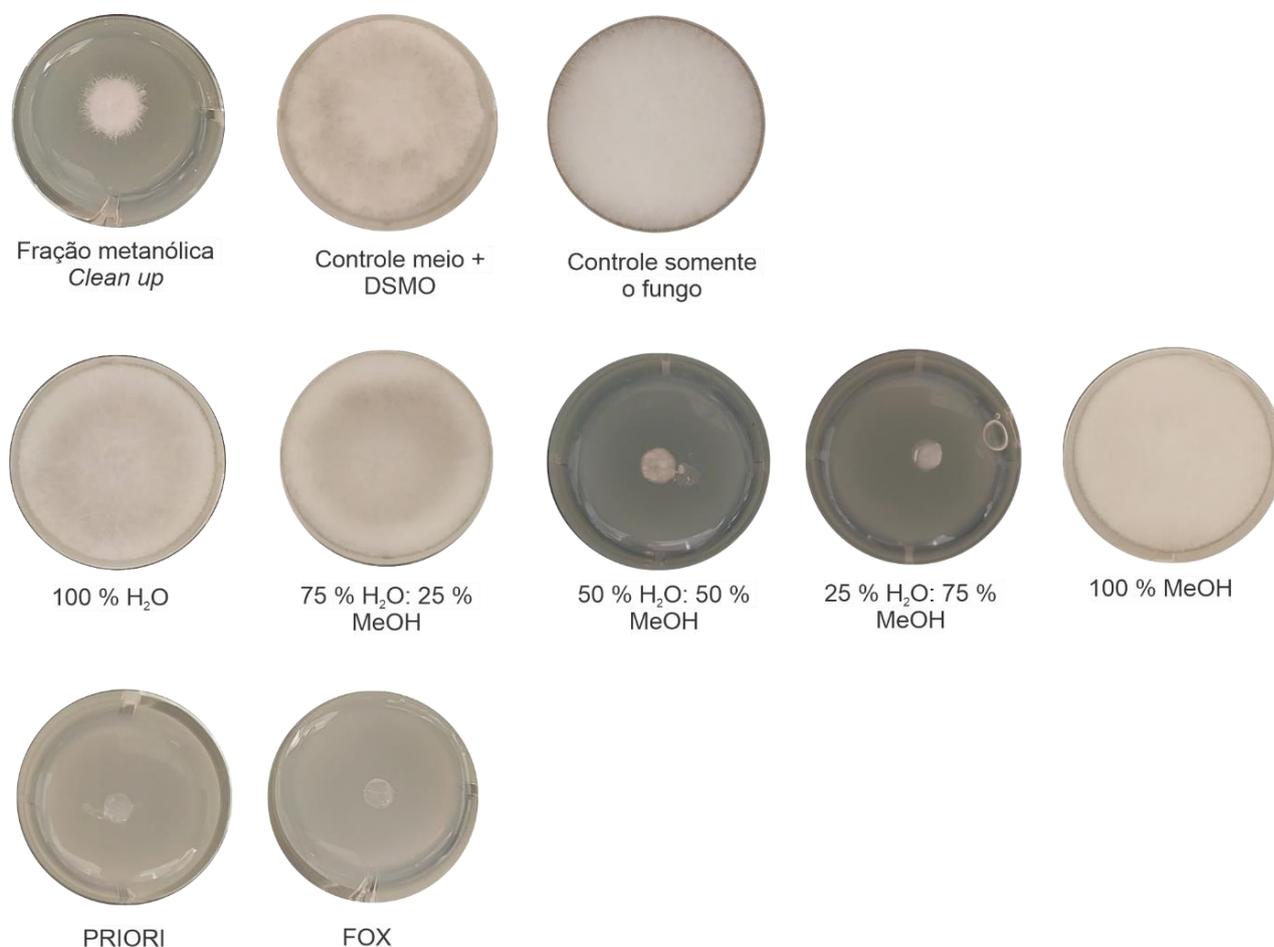


Figura 15. Ensaio de incorporação em meio de cultura BDA com a fração metanólica após o *clean up*: frações geradas a partir da coluna sep-Pak C₁₈ e fungicidas Piori e Fox na concentração de 250 µg ml⁻¹ contra o fungo *Colletotrichum falcatum*.

Ao realizar a análise de variância, os resultados obtidos com esse ensaio não passaram no teste de normalidade, por isso não fizemos o teste de média Skott-Knott. Com base nos resultados apresentados, foi verificado que a fração metanólica após o *clean up* inibiu em 86 % o crescimento do fungo, enquanto que as frações obtidas após o fracionamento com a coluna Sep-Pak: 100 % água, água:metanol (75:25) e 100% metanol não inibiram o crescimento do fungo, apresentando crescimento igual ao tratamento controle. Já as frações água:metanol (50:50) e água:metanol (25:75) inibiram o crescimento do fungo em 100 %, o mesmo resultado apresentado pelos fungicidas. Foi comprovado também que utilizando frações mais puras, houve um aumento da atividade antifúngica, visto que ao comparar a fração após o *clean up* e as frações geradas a partir da cromatografia sepak C₁₈, essas últimas frações inibiram completamente o crescimento micelial do fungo.

A produção de antibióticos se dá através do metabolismo secundário de seus produtores, e são ferramentas importantes para reprodução dos microrganismos quando avaliando em ambiente competitivo, inclusive podem ser mais importantes do que a competição por nutrientes. A ação dos antibióticos pode ser observada na redução ou paralisação do crescimento e esporulação do microrganismo antagônico, redução na germinação de esporos, além de distorções na hifa e endólise (BOMFIM et al., 2010).

Foi relatado na literatura que *Pseudomonas sp.* produzem muitos compostos aromáticos heterocíclicos como a quinolina e metabólitos secundários, por exemplo, antibióticos, sideróforos quelantes de ferro e cianeto, que são em sua maioria responsáveis pela supressão de fungos (NARAYANASAMY; NARAYANASAMY, 2013).

Assim, como etapa seguinte deste trabalho foi avaliar o perfil químico dessas frações em UPLC – MS/MS e identificar quais os possíveis compostos bioativos produzidos por esta bactéria responsáveis pela atividade antifúngica.

6.5 Estudo químico dos metabólitos secundários produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (ISP2 R REM 7)

Após obtenção do meio metabólito, e algumas etapas de limpeza e separações, as frações ativas obtidas foram analisadas por UPLC-MS/MS.

As frações que continham metabólitos ativos foram: a fração metanólica (após o *clean up*), e as frações: água metanol (50:50) e a água metanol (25:75), após a cromatografia em coluna aberta Sep-pak C₁₈. Os gráficos (Figura 16) a seguir estão representados pelas seguintes cores: fração metanólica (após o *clean up*) na cor vermelha, fração água:metanol (50:50) na cor azul, água:metanol (25:75) cor verde e as frações que não deram atividade (água:metanol (75:25) e metanol 100% - a fração 100 água foi descartada por ser considerada apenas com resíduos de meio de cultivo) estão em cinza. Os nodos foram coloridos desta forma para facilitar a localização e visualização das *features* que estão presentes na fração metanólica após o *clean up* e nas frações que deram atividade antifúngica.

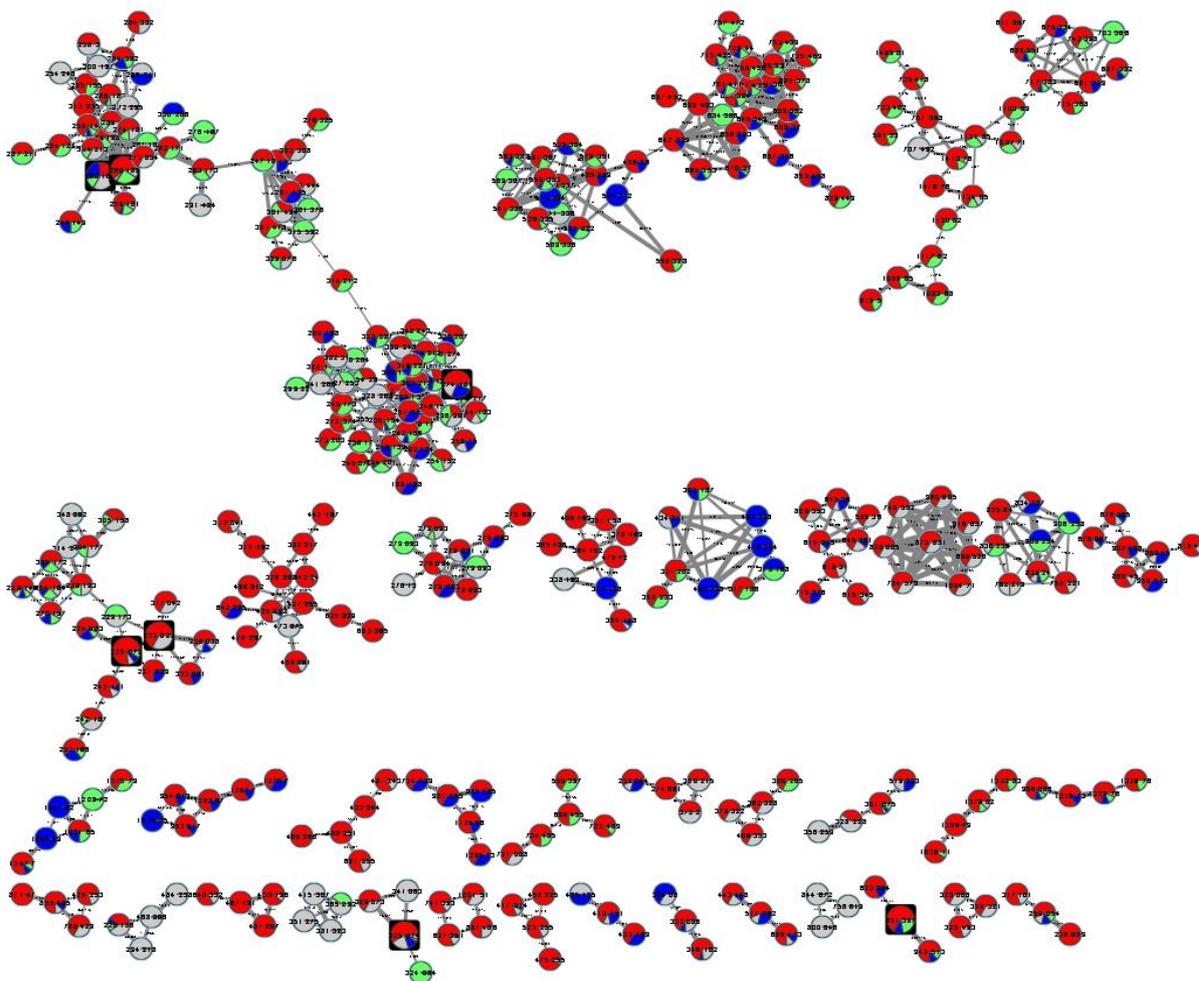


Figura 16. Análise das redes moleculares clássicas para a fração metanólica (após o *clean up*) e as frações geradas em cromatografia em coluna C₁₈ (água:metanol (75:25), água:metanol (50:50), água:metanol (25:75) e metanol 100% metanol). *Features* que apresentam a cor vermelha representa compostos encontrados na fração após o *clean up*; a cor verde representa a *features* presentes na fração ativa água:metanol (50:50); a cor azul representa *features* na fração ativa água:metanol (27:75). *Features* em cinza representam as frações não ativas água:metanol (27:75) e metanol 100 %.

Com essa análise, foram obtidos sete hits (anotações) segundo as bibliotecas do GNPS com relatos na literatura de serem produzidos por bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, os quais estão indicados na seguinte tabela (Tabela 10) e estrutura química na figura 17. A partir dessas anotações, foi elaborado um *mirror match* (ANEXO E) dos compostos anotados segundo as bibliotecas do GNPS. O *mirror match* é uma representação que indica o nível de similaridade ou de coincidência, dos espectros experimentais (espectro de massas acima na cor preta – anotados neste trabalho) com respeito ao espectro de referência da base de dados (espectro de massas de baixo na cor verde) o qual vem acompanhado de um *score* que indica esse nível de similaridade, o qual, quanto mais perto de

1 maior a semelhança entre os dois, sendo um valor mínimo considerado com bom, um valor de 0,7.

Tabela 10. Anotações das amostras com as livrarias do GNPS

Cluster	Aduto	Massa precursora	Nome do composto	Fórmula molecular	Similaridade (cosseno)
6868	M+H	222.022	Ácido aeruginóico	C ₁₀ H ₇ NO ₃ S	0.85
6654	M+H	197.072	1-Hidroxifenanzina	C ₁₂ H ₈ N ₂ O	0.79
6882	M+H	225.072	Ácido fenazina-1-carboxílico	C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₂	0.88
8592	M+H	260.165	Sinal de quinolona de <i>Pseudomonas</i>	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	0.89
8589	M+H	260.169	Sinal de quinolona de <i>Pseudomonas</i>	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	0.93
11944	M+H	325.074	Pioquelina	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃ S ₂	0.86
16588	M+H	651.397	Rhamnolipídeo (Rha-Rha-C10-C10)	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	0.87

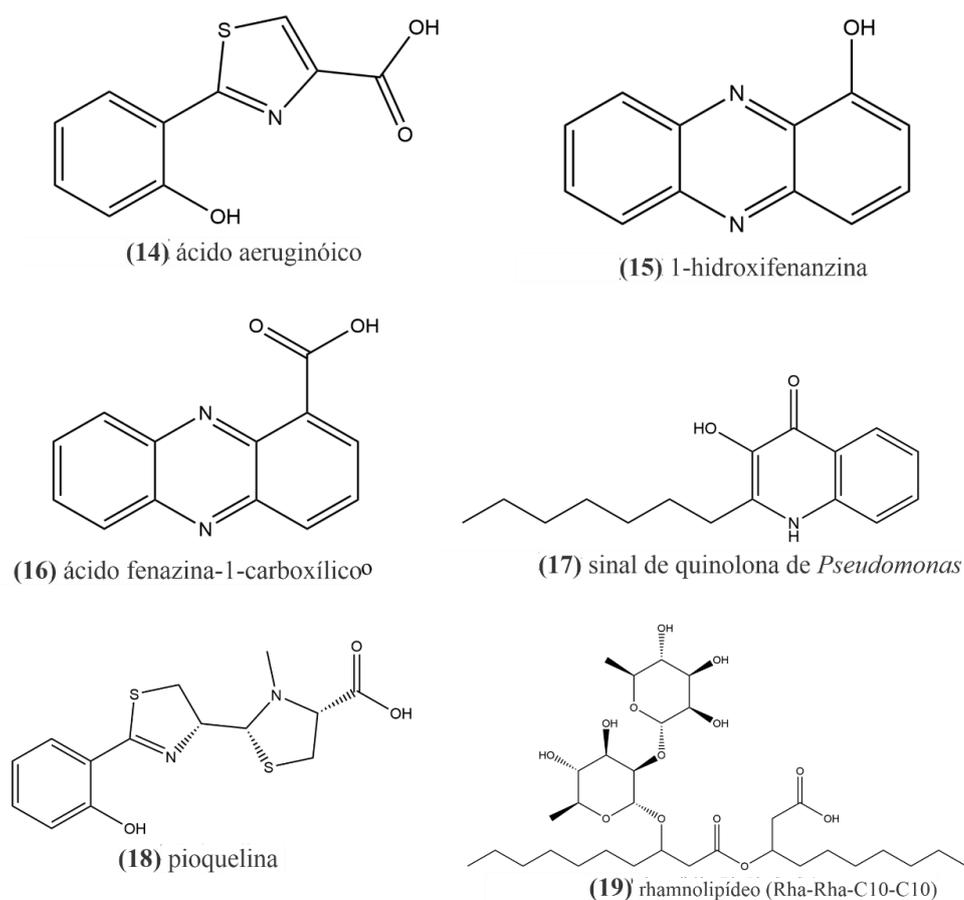


Figura 17. Estrutura química dos compostos químicos anotados na análise de molecular network que apresentam atividade antifúngica relacionada.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* empregam diversas estratégias para sequestrar ferro vital para sua sobrevivência, a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo é capaz de produzir de pioquelina, um sideróforo para captar ferro do ambiente (KAPLAN; MUSAEV; WUEST, 2021). A pioquelina é um ácido monocarboxílico e um membro das tiazolidinas produzidas pela condensação do ácido salicílico com duas moléculas de cisteína (TAKASE et al., 2000). Foi indicado que a pioquelina é produzida por *P. aeruginosa*, mas somente quando a concentração de ferro se torna extremamente baixa é que esta bactéria começa a produzir esse composto (DUMAS; ROSS-GILLESPIE; KÜMMERLI, 2013). A produção de pioquelina pode ter um papel na contínua resposta inflamatória que causa danos aos tecidos em infecções crônicas, como em infecções císticas pulmões com fibrose (LYCZAK; CANNON; PIER, 2002).

O Sinal de quinolona de *Pseudomonas* (PQS) é uma das três moléculas de *quorum sensing* (QS) produzidas por bactérias da espécie *P. aeruginosa*. O QS é um fenômeno natural realizado por alguns microrganismos que acontece através da liberação de pequenas moléculas de sinalização que podem se difundir livremente entre as células bacterianas e podem ser detectadas por proteínas receptoras específicas, localizadas no citoplasma celular ou na membrana celular (JIMENEZ et al., 2012; LEE; ZHANG 2015; HODGKINSON et al., 2016). A rede de sinalização de *P. aeruginosa* é talvez um dos sistemas mais complexos conhecidos e, até o momento, é o mais bem estudado entre todos os sistemas de microrganismos. Consiste em múltiplas camadas de sinalização interligadas que regulam coordenadamente a virulência e a persistência, impulsionando o surgimento de *P. aeruginosa* do enorme número de espécies que compõem o domínio bacteriano da biodiversidade para se juntar a um grupo de elite de algumas dezenas que representam uma grande ameaça para os seres humanos (JIMENEZ et al., 2012; DIGGLE et al., 2007). As análises dos mecanismos moleculares da comunicação célula a célula podem ajudar os cientistas a desenvolver agentes antimicrobianos específicos que diminuirão as características defensivas e ofensivas dos patógenos. A geração do PQS pode alterar toda a arquitetura da população bacteriana, melhorando sua aptidão em vários ambientes e causando resistência ao estresse ambiental (LIN et al., 2018).

O ácido aeruginóico é uma substância derivada do metabólito aerugina (YANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1993), isolado pela primeira vez em 1988 por Zunnundzhanov et al (1988) de uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. O composto análogo à aerugina, o (+)-(S)-dihydroaeruginic acid isolado da bactéria do gênero *Pseudomonas*, possui relatos na literatura de atividade *in vitro* contra uma gama de fungos fitopatogênicos, incluindo

Cladosporium cucumerinum, *Colletotrichum orbiculare*, *Cylindrocarpon destructans*, *Didymella bryoniae*, *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* (LEE; MOON; HWANG, 2003).

O ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) é um composto amplamente relacionado a metabólitos microbianos produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas* (XIONG et al., 2017). Esse composto apresenta elevada importância agrícola, visto que já foi relatado na literatura que esse composto isolado de *P. aeruginosa* possui atividade antifúngica a diversos fungos fitopatogênicos, como contra os fungos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum* (XIONG et al., 2017) *Botrytis cinerea* (SIMIONATO et al., 2017). Outro fungo com relatos relatado que o PCA é capaz de inibir o seu crescimento *in vitro*, é o *Phellinus noxius*, onde através de abordagens morfológicas, fisiológicas e molecular, foi observado que com a presença de PCA, há a interrupção no crescimento fúngico, eventual morte do patógeno e alteração no metabolismo do fungo e que esse composto possui um amplo espectro de efeitos celulares (HUANG et al., 2016).

A 1-hidroxifenazina, é um produto secundário da biossíntese da piocianina, que também apresenta propriedades ativas redox, mas oxida em potenciais mais negativos (SISMAET; PINTO; GOLUCH, 2017). O composto 1-hidroxifenazina produzido por *P. aeruginosa* possui relatos de atividade antifúngica, mostrando-se eficiente em inibir o crescimento *in vitro* dos fungos *Cochliobolus miyabeanus*, *Diaporthe citri*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and *Exserohilum turcicum* e das bactérias *Salmonella* sp., *Klebsiella oxytoca*, *Shigella castellani*, *Salmonella typhi* e *Bacillus anthracis* dessa forma, sugerindo que os compostos produzidos por *P. aeruginosa* possuem um potencial significativo para o controle biológico de microrganismos fitopatogênicos, particularmente patógenos fúngicos (LIU et al., 2020b).

Com essa análise dos metabólitos produzidos pela *P. aeruginosa*, foi possível identificar alguns biossurfactantes, como o rhamnolipídeo (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀). Esse composto já foi relatado na literatura por ser produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (MONTEIRO et al., 2007; SAIKIA et al., 2014; NDLOVU et al., 2017; ZHAO et al., 2018). Entre os biossurfactantes, os rhamnolipídeos têm atraído a atenção da indústria de forma significativa nos últimos anos (JIANG et al., 2020), pois estão entre os biossurfactantes mais produzidos por microrganismos quando comparado a outros biossurfactantes bacterianos, possuem alta biodegradabilidade (SOBERÓN-CHÁVEZ et al., 2021) e baixa toxicidade (JOHANN et al., 2016). Os rhamnolipídeos têm sido utilizados em diversos processos, como

na biorremediação de hidrocarbonetos de solo, água contaminada e derramamentos de óleo no ambiente, como também na remoção de metais pesados (COSTA et al., 2010). Ainda mais, os ramnolipídeos isolados de *P. aeruginosa* possuem relatos na literatura por possuir atividade antifúngica *in vitro* contra os patógenos *Fusarium oxysporum* (DEEPIKA; SRIDHAR; BRAMHACHARI, 2015), *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, e *Rhizopus oryzae* (ONLAMOOOL; SAIMMAI; MANEERAT, 2023) e contra o fungo *Colletotrichum falcatum* (GOSWAMI et al., 2015).

Para trabalhos futuros, será considerado que o isolamento do composto ativo é fundamental para atribuir de forma inequívoca qual composto é o responsável pela atividade antifúngica ao fitopatógeno *C. falcatum*.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho, foram isolados 164 microrganismos das amostras da própolis verde, vermelha e verde da Caatinga, como também das suas respectivas resinas de origem. Com a identificação desses microrganismos, observa-se que há espécies específicas para cada material, como também foram identificadas algumas espécies em comum entre as própolis analisadas e suas resinas de origem, como também entre as própolis.

Os gêneros de bactéria em comum para todos os materiais coletados foram *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pantoea*. Enquanto que para os fungos, o gênero *Penicillium* esteve presente nas amostras de própolis verde e verde da Caatinga.

Foi identificado alguns microrganismos presentes em apenas um meio, como o *Bacillus pumillus* isolado no meio LNMS das amostras da própolis verde, corroborando com a ideia de que é importante utilizar vários meios no isolamento para aumentar a diversidade de isolados. Como também, utilizando meios de cultura contendo própolis, conseguimos isolar um fungo que não cresceu em outros meios, o *Penicillium corylophilum*, dessa maneira, reforça a ideia de que se deve utilizar meios de cultura semelhantes às do ambiente em que microrganismos vivem na prospecção de novos microrganismos, ou aumentar a diversidade de isolados.

O ensaio antagônico das bactérias frente o fungo *Colletotrichum falcatum* demonstrou que há bactérias que possuem o potencial de inibir o crescimento do fungo em condições *in vitro*, e é um indicativo inicial de que esses microrganismos podem contribuir produzindo compostos com propriedades antifúngica da própolis, desse modo, selecionamos uma bactéria para analisar seus metabólitos secundários.

Por fim, através de ferramentas de molecular network e estudo de metabolômica para a *Pseudomonas aeruginosa* (ISP2 R REM 7) foram anotados alguns compostos com relatos na literatura com atividade antifúngica, como o rhamnolipídeo (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀), 1-hidroxifenazina e o ácido fenazina-1-carboxílico.

8. CONCLUSÃO

Existem microrganismos associados à própolis e em suas resinas de origem. Comparando os microrganismos isolados de diferentes tipos e localidades podemos concluir que existem microrganismos comuns, mas também únicos em cada tipo de amostra.

As bactérias isoladas demonstraram ter potencial antifúngico ao fungo fitopatógeno *Colletotrichum falcatum*. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou que produz metabólitos secundários com propriedades antifúngicas.

No melhor do nosso conhecimento este é o primeiro relato de microrganismos isolados das própolis verde, vermelha e verde da caatinga. Como também, este trabalho sendo o primeiro a relacionar a microbiota presente na resina que dá origem a cada tipo de própolis.

REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, V.P. Diseases of Sugarcane and Sugar- beat. **Oxford and IBH, Pub., Co., Pvt., Ltd, New Delhi, 483.1990.**
- ALBUQUERQUE, R.; ITO, N.M.K.; MIYAJY, C.I. Estudo comparativo de diferentes meios de cultura para o isolamento de salmonelas em matérias-primas e rações. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.1, 2000.
- ALENCAR, S. M. et al. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 35, p. 909-915, 2005.
- ALENCAR, S.M. et al., Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis, **Journal Ethnopharmacology**, 113: 278-283. 2007.
- AL-RUBAYE, A. F.; KADHIM, M. J.; HAMEED, I. H. Characterization of antifungal secondary metabolites produced by *Klebsiella pneumoniae* and screening of its chemical compounds using GC-MS. **International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research**, v. 8, n. 2, p. 141-148, 2017.
- AMAL, A. M. et al. Selection of Pigment (Melanin) production in *Streptomyces* and their application in Printing and Dyeing of Wool Fabrics. **Research Journal of Chemical Sciences ISSN**, v. 2231, p. 606X, 2011.
- AMBREETHA, S. et al. Rhizospheric and endophytic *Pseudomonas aeruginosa* in edible vegetable plants share molecular and metabolic traits with clinical isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 4, p. 3226-3248, 2022.
- AMORIM, L.; et al. Manual de Fitopatologia Vol. 2. **Doenças das plantas cultivadas. 5a edição. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016.**
- ANDRIANASOLO, E. H. et al. Ammonificins A and B, hydroxyethylamine chroman derivatives from a cultured marine hydrothermal vent bacterium, *Thermovibrio ammonificans*. **Journal of natural products**, v. 72, n. 6, p. 1216-1219, 2009.
- ANJUM, S. I. et al. Honey bee gut an unexpected niche of human pathogen. **Journal of King Saud University-Science**, v. 33, n. 1, p. 101247, 2021.
- ARAÚJO, C. L.; GUALTER, R. M. R. Caracterização morfofisiológica de bactérias nativas de solos do Cerrado isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Biotemas**, v. 30, n. 1, p. 25-35, 2017.
- ARON, A. T.; et al. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature Protocols**, London, v. 15, n. 6, p. 1954–1991, 2020.
- BANKOVA, V. D. et al. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research, **J. Apic. Res.** 58, 1–49. 2019.
- BASTOS E. et al. *In vitro* Study of the Antimicrobial Activity of Brazilian Propolis against *Paenibacillus Larvae*. **J Invertebr Pathol** 97(3): 273-281. 2008.

- BERTRAND, S. et al. Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. **Journal of chromatography A**, v. 1292, p. 219-228, 2013.
- BHATI, P; SHOUCHE, S. Potencial of actinomycetes as bioremediating and biocontrolling agents. **Paripex - Indian Journal of Research**, v.8, p.36-40, 2019.
- BLEAU, N. et al. Dynamics of the honeybee (*Apis mellifera*) gut microbiota throughout the overwintering period in Canada. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1146, 2020.
- BOKULICH, N. A.; MILLS, D. A. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 8, p. 2519-2526, 2013.
- BOMFIM, M. P. et al. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v. 36, p. 61-67, 2010.
- BONNET, M. et al. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. **New microbes and new infections**, v. 34, p. 100622, 2020.
- BREAUD, C. et al. LC-MS based phytochemical profiling towards the identification of antioxidant markers in some endemic *Aloe* species from Mascarene Islands. **Antioxidants**, v. 12, n. 1, p. 50, 2022.
- BRITO, F. *et al.* Actinobactérias do solo rizosférico no bioma Caatinga. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, 2015.
- BUENO-SILVA, B. et al. The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: Chemical composition and antibacterial activity, **Nat. Prod. Res.** 31. 1318–1324, <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1239088>. 2017.
- CARO, Y. et al. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. **Natural products and bioprospecting**, v. 2, p. 174-193, 2012.
- CARVALHO, A. M. X.; et al. SPEED Stat: a free, intuitive, and minimalist spreadsheet program for statistical analyses of experiments. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 20(3): e327420312, 2020.
- CASALONE, E. et al. Propolis hosts a diverse microbial community. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1-11, 2020.
- CASTELLANI, A. Variability of mold culture of fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.42. p.225. 1939
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. de; OLIVEIRA, A. N. de. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, p. 161-169, 2010.

- CHAMBERS, M. et al. A Cross-platform Toolkit for Mass Spectrometry and Proteomics. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 918-920, 2012.
- CIFTCI-YILMAZ, S. et al. Evaluating antioxidant capacity of different propolis samples from konya, Turkey and their inhibitory effect on head and neck cancer cells. **BioRxiv**, p. 183913, 2017.
- CONTE, F. L. et al. Propolis increases Foxp3 expression and lymphocyte proliferation in HIV-infected people: a randomized, double blind, parallel-group and placebo-controlled study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 111984, 2021.
- COSTA, G. L.; MORAES, A. M. L. GALVÃO, C. Entomopathogenic effect of *Aspergillus giganteus* and *Penicillium corylophilum* on two triatomine vectors of Chagas disease. **Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms**, v. 43, n. 1, p. 3-7, 2003.
- COSTA, G. L; MORAES, A. M. L.; OLIVEIRA, P. C. Pathogenic action of *Penicillium species* on mosquito vectors of human tropical diseases. **Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms**, v. 38, n. 5-6, p. 337-341, 1998.
- COSTA, M. M. et al. *Colletotrichum falcatum* and *Fusarium* species induce symptoms of red rot in sugarcane in Brazil. **Plant Pathology**, v. 70, n. 8, p. 1807-1818, 2021.
- COSTA, S. G. V. A. O., et al. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**. 45.9: 1511-1516. 2010.
- CRIGHTON, E. et al. The application of metabolomics for herbal medicine pharmacovigilance: a case study on ginseng. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. 5, p. 429-435, 2016.
- CRUZ-MARTÍN, M. et al. Antifungal activity of Musa phyllosphere *Bacillus pumilus* strain against *Mycosphaerella fijiensis*. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, p. 121-125, 2017.
- CRUZ-MARTÍN, M. et al. Role of *Bacillus pumilus* chitinases in antifungal activity against *Pseudocercospora fijiensis* Morelet. **Journal of Natural Pesticide Research**, v. 3, p. 100019, 2023.
- DAMODARAN, T. Propolis. In: **Nutraceuticals**. Academic Press, 2021. p. 795-812.
- DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 5, p. 435-441, 2008.
- DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J.-P.; PAGÈS, J.-M. *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 4, p. 10.1128/cmr. 00002-19, 2019.

- DEEPIKA, K. V., SRIDHAR, P. R., & BRAMHACHARI, P. V. Characterization and antifungal properties of rhamnolipids produced by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain KVD-HM52. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 4(4), 608-615. 2015.
- DEEPIKA, V. B.; MURALI, T. S.; SATYAMOORTHY, K. Modulation of genetic clusters for synthesis of bioactive molecules in fungal endophytes: A review. **Microbiological Research**, v. 182, p. 125-140, 2016.
- DEGRANDI-HOFFMAN, G.; ECKHOLM, B. J.; HUANG, M. H. A comparison of bee bread made by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) and its effects on hemolymph protein titers. **Apidologie**, v. 44, p. 52-63, 2013.
- DEZMIREAN, D. S. et al. Plant sources responsible for the chemical composition and main bioactive properties of poplar-type propolis. **Plants**, v. 10, n. 1, p. 22, 2020.
- DIGGLE, S. P. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. **Chemistry & biology**, v. 14, n. 1, p. 87-96, 2007.
- DORNELES, K. R. et al. Wheat leaf resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* induced by silicon activation of phenylpropanoid metabolism. **Plant Pathology**, v. 67, n. 8, p. 1713-1724, 2018. et al., 2018
- DUFOSSE, L. et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 56-61, 2014.
- DUFOSSÉ, Laurent. Pigments, microbial. **Reference module in life sciences**, 2016.
- DUMAS, Z.; ROSS-GILLESPIE, A.; KÜMMERLI, R. Switching between apparently redundant iron-uptake mechanisms benefits bacteria in changeable environments. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1764, p. 20131055, 2013.
- DUTTAMAJUMDAR, S.K. Red Rot of Sugarcane. **Indian Institute of Sugarcane Research, Lucknow**, 46. 2008
- ESTRADA, A. E. R. et al. *In vitro* interactions between *Fusarium verticillioides* and *Ustilago maydis* through real-time PCR and metabolic profiling. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 9, p. 874-885, 2011.
- FANTROUSSI, S.; AGATHOS, S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 3, p. 268-275, 2005.
- FERREIRA, J. M. et al. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. In **Journal of the Science of Food and Agriculture** (Vol. 97, Issue 11, pp. 3552–3558). 2017.

- FERREIRA, M. A. et al. Diversidade da microbiota de fungos da própolis in natura. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 4, p. 6369-6385, 2021.
- FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. et al. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, 150(2), 655-664, 2013
- FREIRES, I. A.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 267-279, 2016.
- FREITAS, V. R.; PICOLI, S. U. A coloração de Gram e as variações na sua execução. **NewsLab**, v. 82, p. 124-128, 2007.
- GAMLIEL, A.; KATAN, J.; COHEN, E. Toxicity of chloronitrobenzenes to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* as related to their structure. **Phytoparasitica**, v. 17. n. 2. p. 101-106, 1989.
- GARCIA-MAZCORRO, J. F.; KAWAS, J. R.; MARROQUIN-CARDONA, A. G. Descriptive bacterial and fungal characterization of propolis using ultra-high-throughput marker gene sequencing. **Insects**, v. 10, n. 11, p. 402, 2019.
- GAZIM, Z. C. et al. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological investigations of *Baccharis dracunculifolia* DC. (ASTERACEAE). **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 1048688, 2022.
- GONTANG, E. A. et al. Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine actinobacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 8, p. 2487-2499, 2010.
- GOSWAMI, D. et al. Antifungal properties of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* DS9 against *Colletotrichum falcatum*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 11, p. 1265-1274, 2015.
- GOSWAMI, D.; HANDIQUE, P. J. & DEKA, S. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium sacchari*: the causal organism of pokkah boeng disease of sugarcane. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 548-557, 2014.
- GRABOWSKI, N. T.; KLEIN, G. Microbiology and foodborne pathogens in honey. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 9, p. 1852-1862, 2017.
- GRAM, C. U. Die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. **Fortschritte der Medicin**, v. 2, p. 185-189, 1884.
- GRUBBS, K. J. et al. Correction: Unique Honey Bee (*Apis mellifera*) Hive Component-Based Communities as Detected by a Hybrid of Phospholipid Fatty-Acid and Fatty-Acid Methyl Ester Analyses. **Plos one**, v. 10, n. 4, p. e0121697, 2015.

- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.
- GUPTA, P. et al. Implications of plant growth promoting *Klebsiella* sp. CPSB4 and *Enterobacter* sp. CPSB49 in luxuriant growth of tomato plants under chromium stress. **Chemosphere**, v. 240, p. 124944, 2019.
- GUPTA, S. et al. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. **Biotechnology advances**, v. 39, p. 107462, 2020.
- HASSAN, M. N; AFGHAN, S.; HAFEEZ, F. Y. Suppression of red rot caused by *Colletotrichum falcatum* on sugarcane plants using plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol**, v. 55, p. 531-542, 2010.
- HAYACIBARA M. F. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **Journal Antimicrob Chemother** ;52: 782–9. 2003
- HEIDEN, G. *Baccharis* in Flora e Funga do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2022.
- HODGKINSON, J. T. et al. A new Pseudomonas quinolone signal (PQS) binding partner: MexG. **Chemical science**, v. 7, n. 4, p. 2553-2562, 2016.
- HOGGARD, M. et al. Characterizing the human mycobiota: a comparison of small subunit rRNA, ITS1, ITS2, and large subunit rRNA genomic targets. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2208, 2018.
- HOUBRAKEN, J. A. M. et al. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. **Fungal Diversity**, v.44, p.117-133, 2010. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0047-z>
- HU, C.; XU, G. Metabolomics and traditional Chinese medicine. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 61, p. 207-214, 2014.
- HUANG, H. et al. The effect of phenazine-1-carboxylic acid on the morphological, physiological, and molecular characteristics of *Phellinus noxius*. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 613, 2016.
- HURTADO, P.; ROMERO, D.; LÓPEZ CARRASCAL, C. E. Arabidopsis muestra resistencia no-hospedero constitutiva contra *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*. **Acta Biológica Colombiana**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 345-351, 2021.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola – Cana-de-açúcar**. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/14/10193>. Acesso em: 17 de out. 2023
- INÁCIO, A. C. F. et al. Caracterização morfofisiológica de bactérias solubilizadoras de fosfatos provenientes da rizosfera de plantas alimentícias não convencionais. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 24547-24565, 2020.

- IÓCA, L. P.; ALLARD, P.; BERLINCK, R. G.S. Thinking big about small beings—the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. **Natural product reports**, v. 31, n. 5, p. 646-675, 2014.
- JAIN, S. et al. Botanical Origin of the Brazilian Red Propolis: a New Approach Using DNA analysis. **Journal of Apicultural Science**, 58(2) 79-85. 2014. <https://doi.org/10.2478/jas-2014-0024>
- JIANG, J. et al. Recent progress towards industrial rhamnolipids fermentation: process optimization and foam control. **Bioresource technology**, v. 298, p. 122394, 2020.
- JIMENEZ, P. N. et al. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 1, p. 46-65, 2012.
- JIN, M. et al. Effects of Se-enriched polysaccharides produced by *Enterobacter cloacae* Z0206 on alloxan-induced diabetic mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 2, p. 348-352, 2012.
- JIN, M. et al. Preparation and biological activities of an exopolysaccharide produced by *Enterobacter cloacae* Z0206. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 3, p. 607-611, 2010.
- JOHANN, S., et al. Mechanism-specific and whole-organism ecotoxicity of mono-rhamnolipids. **Science of the total environment**, 548, 155-163. 2016.
- KAPLAN, A. R.; MUSAEV, D. G.; WUEST, W. M. Pyochelin biosynthetic metabolites bind iron and promote growth in *Pseudomonas* demonstrating siderophore-like activity. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 544-551, 2021.
- KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 1, p. e1-e1, 2013.
- KUMAR, A. S. S., RAJ, K., Fungal diseases of sugarcane, in: Gupta, V.K., Paul, Y.S. (Eds.), Diseases of Field Crops. **Indus Publishing Company**, New Delhi, 288– 307. 2002.
- LACONI, A. et al. Beehive products as bioindicators of antimicrobial resistance contamination in the environment. **Science of The Total Environment**, v. 823, p. 151131, 2022.
- LEE, J. Y.; MOON, S. S.; HWANG, B. K. Isolation and antifungal and antioomycete activities of aerugine produced by *Pseudomonas fluorescens* strain MM-B16. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2023-2031, 2003.
- LEE, J.; ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. **Protein & Cell**, v. 6, n. 1, p. 26-41, 2015.
- LIN, J. et al. The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS): not just for quorum sensing anymore. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 230, 2018a.
- LIU, T. T. et al. Isolation and identification of bioactive substance 1-hydroxyphenazine from *Pseudomonas aeruginosa* and its antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 303-310, 2020b.

- LIU, Y. et al. Thiacloprid exposure perturbs the gut microbiota and reduces the survival status in honeybees. **Journal of hazardous materials**, v. 389, p. 121818, 2020.
- LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, Gerald B. Lung infections associated with cystic fibrosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 194-222, 2002.
- MAGAJI, H. et al. Sustainable production of glutamic acid by *Enterobacter* sp. strain isolated from cheese for potential protein biosynthesis: optimization by response surface methodology. **Bioresource Technology Reports**, v. 24, p. 101647, 2023.
- MARUYAMA, H. et al. Antihypertensive effects of flavonoids isolated from brazilian green propolis in spontaneously hypertensive rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 7, p. 1244-1250, 2009.
- MATA, V. et al. Germinação de sementes de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taubert sob diferentes temperaturas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, 2014.
- MATOS, A. E. P. et al. Characterization of the Bacterial Communities Inhabiting Tropical Propolis of Puerto Rico. **Microorganisms**, v. 11, n. 5, p. 1130, 2023.
- MATTOLI, L.; GIANNI, M.; BURICO, M. Mass spectrometry-based metabolomic analysis as a tool for quality control of natural complex products. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 42, n. 4, p. 1358-1396, 2023.
- MEIJ, A. V. D., et al. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. **FEMS Microbiology Reviews**, 005, 41, 392–416. 2017.
- MENDONÇA, L. S. et al. Seasonality in the Volatile Oil Composition of Green Propolis from the Caatinga Biome. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, p. 497-501, 2021.
- METELEV, M. et al. Acinetodin and klebsidin, RNA polymerase targeting lasso peptides produced by human isolates of *Acinetobacter gyllenbergii* and *Klebsiella pneumoniae*. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 3, p. 814-824, 2017.
- MILANI, M.; OLIVEIRA, D. S.; MORALES, E. M. Resíduos de agrotóxicos em alimentos no Brasil. **Interciênc Socied**, v. 5, n. 1, p. 25-37, 2020.
- MINTEGUIAGA, Manuel et al. *Baccharis dracunculifolia* DC. **Medicinal and Aromatic Plants of South America Vol. 2: Argentina, Chile and Uruguay**, p. 85-105, 2021.
- MOLINA, C. A. et al. Selection of a *Bacillus pumilus* strain highly active against *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1320-1327, 2010.
- MONTEIRO, S. A. et al. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. **Chemistry and physics of lipids**, v. 147, n. 1, p. 1-13, 2007.
- MUHAMMAD, M. et al. Bacterial pigments and their applications. **In: Bacterial Secondary Metabolites**. Elsevier, p. 277-298. 2024

- MUÑOZ-COLMENERO, M. et al. Differences in honey bee bacterial diversity and composition in agricultural and pristine environments—a field study. **Apidologie**, v. 51, p. 1018-1037, 2020.
- NARAYANASAMY, P.; NARAYANASAMY, P. Mechanisms of action of bacterial biological control agents. **Biological Management of Diseases of Crops: Volume 1: Characteristics of Biological Control Agents**, p. 295-429, 2013.
- NARAYANAN, Z.; GLICK, B. R. Secondary metabolites produced by plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 2008, 2022.
- NAVROSKI, D. et al. Diversidade morfológica de rizobactérias obtidas de solos sob distintos manejos de cultivo da região oeste do Paraná. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, n. 1, p. 117-128, 2015.
- NDLOVU, T. et al. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. **AMB Express**, v. 7, p. 1-19, 2017.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.
- NGALIMAT, M. S. et al. Characterisation of bacteria isolated from the stingless bee, *Heterotrigona itama*, honey, bee bread and propolis. **PeerJ**, v. 7, p. e7478, 2019.
- NIU, G.; JOHNSON, R. M.; BERENBAUM, M. R. Toxicity of mycotoxins to honeybees and its amelioration by propolis. **Apidologie**, v. 42, p. 79-87, 2011.
- NOWAK, A. et al. Characterization of *Apis mellifera* gastrointestinal microbiota and lactic acid bacteria for honeybee protection: a review. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 701, 2021.
- OKAMURA, T. et al. Brazilian green propolis improves gut microbiota dysbiosis and protects against sarcopenic obesity. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, 2022.
- OLDONI, T. L. C. et al. Chemical characterization and optimization of the extraction process of bioactive compounds from propolis produced by selected bees *Apis mellifera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 2054-2062, 2015.
- ONLAMOOL, T.; SAIMMAI, A.; MANEERAT, S. Antifungal activity of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* A4 against plant pathogenic fungi. **Trends in Sciences**, v. 20, n. 3, p. 6524-6524, 2023.
- PATEL, P. et al. Assessment of genetic diversity in *Colletotrichum falcatum* Went accessions based on RAPD and ISSR markers. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 153-159, 2018.
- PATIL, R. H.; PATIL, M. P.; MAHESHWARI, V. L. Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi: a review of biotechnological production and their potential applications. **Studies in natural products chemistry**, v. 49, p. 189-205, 2016.

- PAULINO, N. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1-3, p. 296-301, 2008.
- PAVLOVIC, R. et al. Effectiveness of different analytical methods for the characterization of propolis: a case of study in Northern Italy. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 504, 2020.
- PAZIN, W. M. et al. Bioactivity and action mechanism of green propolis against *Pythium aphanidermatum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.
- PEREIRA, D. S. et al. Histórico e principais usos da própolis apícola. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 11, n. 2, p. 01-21, abr–jun., 2015.
- PICCINELLI, A. L. et al. Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6484-6491, 2011.
- PITT, J. I., HOCKING. **Fungi and food spoilage**. New York: Springer, 2009.
- PONTES, M. L. C. et al. Chemical characterization and pharmacological action of Brazilian red propolis. **Acta Brasiliensis**, v. 2, n. 1, p. 34-39, 2018.
- PRIHASTUTI, H. et al. Neotypification of *Colletotrichum falcatum*, the causative agent of red-rot disease in sugarcane. **Sydowia**, 62, 283–293. 2010.
- PRZYBYŁEK, I.; KARPIŃSKI, T. M. Antibacterial properties of propolis. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2047, 2019.
- QUECINE, M. C. et al. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 21, p. 7511-7518, 2012.
- RAGUVARAN, K. et al. Larvicidal, antioxidant and biotoxicity assessment of (2-(((2-ethyl-2 methylhexyl) oxy) carbonyl) benzoic acid isolated from *Bacillus pumilus* against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 10, p. 650, 2022.
- RAL. Lista com as 213 cores ral clássica. 2015. Disponível em: <https://ral-colours.com.br/wp-content/uploads/2015/03/Lista-de-cores-Ral.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2024
- REMPE, C. S. et al. The potential of systems biology to discover antibacterial mechanisms of plant phenolics. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 422, 2017.
- RIEDLINGER, J. et al. Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucospora* strain AB-18-032. **The Journal of Antibiotics**, v. 57, n. 4, p. 271-279, 2004.
- RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.

- SAELAO, P. et al. Honeybee microbiome is stabilized in the presence of propolis. **Biology letters**, v. 16, n. 5, p. 20200003, 2020.
- SAIKIA, R. R. et al. Achieving the best yield in glycolipid biosurfactant preparation by selecting the proper carbon/nitrogen ratio. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 17, p. 563-571, 2014.
- SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, S. R. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, 2017.
- SALLEMI, S. et al. Fungal community investigation from propolis natural products: diversity and antibacterial activities evaluation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, 2022.
- SAMUELS R. I., MATTOSO T. C., MOREIRA D. D. O. Chemical warfare: Leaf-cutting ants defend themselves and their gardens against parasite attack by deploying antibiotic secreting bacteria. **Commun Integr Biol**. 6: e23095. 2013.
- SANTISTEBAN, R. M. et al. Melissopalynological, physicochemical analysis, antiradicalar activity and chemical profile by UPLC-DAD-QTOF-MS/MS of *Frieseomelitta doederleini* (abelha branca) honey bee: comparison with the flowers of *Mimosa tenuiflora* (jurema preta). **Química Nova**, v. 42, p. 874-884, 2019.
- SANTOS, C. S.; et al. Efeito do extrato de plantas no controle de fungos do tomateiro. **Fragmentos de Cultura**, v. 24, n. 1, p. 139-151. 2014.
- SANTOS, D. A. et al. Brazilian red propolis extracts: study of chemical composition by ESI-MS/MS (ESI+) and cytotoxic profiles against colon cancer cell lines. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 1, p. 120-130, 2019.
- SASIREKHA, B.; SRIVIDYA, S. Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. **Agriculture and Natural Resources**, v. 50, n. 4, p. 250-256, 2016.
- SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 7, n. 9, p. 1753-1760, 2009.
- SCOARIS, D. O. et al. Microbial communities associated with honey bees in Brazil and in the United States. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 2097-2115, 2021.
- SEKUROVA, O. N. SCHNEIDER, O. ZOTCHEV, S. B. Novel bioactive natural products from bacteria via bioprospecting, genome mining and metabolic engineering. **Microbial Biotechnology**. 12(5), 828–844. 2019
- SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.
- SHARMA, R. et al. A review on red rot: the cancer of sugarcane. **J Plant Pathol Microbiol**, v. 1, p. 003, 2015.

- SILVA, M. G. et al. Antibacterial activity from *Penicillium corylophilum* Dierckx. **Microbiological research**, v. 159, n. 4, p. 317-322, 2004.
- SILVA, R. S.; et al. Efeito sinérgico de *Cordia curassavica* Jacq. Associação de óleos essenciais contra o fitopatógenos *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. **Environ Sci Pollut**, v. 27, p. 4376-4389, 2020.
- SILVA-CARVALHO R, BALTAZAR F; ALMEIDA-AGUIAR C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2015
- SILVEIRA, A. C et al. Propriedades biológicas e potencial terapêutico da própolis: uma revisão integrativa da literatura. **Brazilian Journal of Surgery & Clinical Research**, v. 35, n. 1, 2021.
- SIMIONATO, A. S. et al. The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1102, 2017.
- SIMONE-FINSTROM, M. ; SPIVAK, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 295-311, 2010.
- SINACORI, M. et al. Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin. **Food microbiology**, v. 38, p. 284-294, 2014.
- SINGH, N. K. et al. Multi-drug resistant *Enterobacter bugandensis* species isolated from the International Space Station and comparative genomic analyses with human pathogenic strains. **BMC microbiology**, v. 18, p. 1-13, 2018.
- SISMAET, H. J.; PINTO, A. J.; GOLUCH, E. D. Electrochemical sensors for identifying pyocyanin production in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 97, p. 65-69, 2017.
- SIVAKUMAR, G. et al. Characterization and role of gut bacterium *Bacillus pumilus* on nutrition and defense of leafhopper (*Amrasca biguttula biguttula*) of cotton. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 87, n. 4, p. 534-9, 2017.
- SNOWDON, J. A.; CLIVER, D. O. Microorganisms in honey. **International journal of food microbiology**, v. 31, n. 1-3, p. 1-26, 1996.
- SOBERÓN-CHÁVEZ, G. et al. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: from molecular genetics to the market. **Microbial Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 136-146, 2021.
- SON, N. T.; RIBEIRO, V. P.; BASTOS, J. K. Flavonoids from green propolis of the Northeastern Brazilian Caatinga *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.: A chemotaxonomic aspect. **Biochemical Systematics and Ecology**, 104(August), 8–11. 2022 <https://doi.org/10.1016/j.bse.2022.104473>.
- STRACHAN, C. R.; DAVIES, J. Antibiotics and evolution: food for thought. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 149-153, 2016.

- SZLISZKA, E. et al. Inhibition of inflammatory response by artemisinin C in activated RAW264.7 macrophages. **Evidence-based complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
- TAKASE, H. et al. Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. **Infection and immunity**, v. 68, n. 4, p. 1834-1839, 2000.
- TEIXEIRA E. W., et al. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine** 2(1): 85-92. 2005. DOI: 10.1093/ecam/neh055.
- THANGAMANI, P. R. et al. Morphological characterization and reaction of partial purified toxin of sugarcane red rot pathogen *Colletotrichum falcatum* collected from Southern India. **International Journal of Agricultural Sciences**, v. 3, n. 10, p. iv+ 060-076, 2013.
- TIAGO, P. V.; OLIVEIRA, N. T.; LIMA, E. Á. L. A. Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: morphological, molecular, and ecological aspects. **Ciência Rural**, v. 44, p. 645-651, 2014.
- TORETI, V.C; SATO, H.H; PASTORE, G,M; PARK, Y.K. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 697390, 13, 2013.
- TSADILA, C.; AMOROSO, C.; MOSSIALOS, D. Microbial Diversity in Bee Species and Bee Products: Pseudomonads Contribution to Bee Well-Being and the Biological Activity Exerted by Honey Bee Products: A Narrative Review. **Diversity**, v. 15, n. 10, p. 1088, 2023.
- TURI, K. N. et al. A review of metabolomics approaches and their application in identifying causal pathways of childhood asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 4, p. 1191-1201, 2018.
- VARDAR-ÜNLÜ, G.; SILICI, S.; ÜNLÜ, M. Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1011-1017, 2008.
- VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W. A. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1065-1079, 2013.
- VÖLKSCH, B. et al. Polyphasic study of plant-and clinic-associated *Pantoea agglomerans* strains reveals indistinguishable virulence potential. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1381-1391, 2009.
- WALTER, L. S.; GABIRA, M. M.; NOGUEIRA, A. C. Accelerated aging test in *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. seeds. **Revista Forestal Mesoamericana Kurú**, v. 17, n. 40, p. 51-57, 2020.
- WALTERSON, A. M.; STAVRINIDES, J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. **FEMS microbiology reviews**, v. 39, n. 6, p. 968-984, 2015.

- WALUNJ, A. A.; ABHANG, P. B.; JOHN, P. *In vitro* evaluation of mutant and wild strain of *Trichoderma harzianum* against soil borne plant pathogen. **International Journal of Plant Protection**, v. 8, n. 1, p. 108– 111, 2015.
- WANG M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.
- WANG, J. et al. Metabolomics assisted metabolic network modeling and network wide analysis of metabolites in microbiology. **Critical reviews in biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 1106-1120, 2018.
- WEN, Y. et al. The microbial community dynamics during the vitex honey ripening process in the honeycomb. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1649, 2017.
- WHITE, T. J., et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In **PCR protocols: a guide to methods and applications** (pp. 315–322). New York: Academic Press. 1990.
- WU, C. et al. Metabolomics in the natural products field—a gateway to novel antibiotics. *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 13, p. 11-17, 2015.
- WYRES, K. L.; HOLT, K. E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 131-139, 2018.
- XIONG, Z. et al. Synthesis and bioactivities of phenazine-1-carboxylic acid derivatives based on the modification of PCA carboxyl group. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 9, p. 2010-2013, 2017.
- XU, C. L. et al. Preparation, characterization and immunomodulatory activity of selenium-enriched exopolysaccharide produced by bacterium *Enterobacter cloacae* Z0206. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 6, p. 2095-2097, 2009.
- XU, Y. et al. Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 37-48, 2014.
- YANG, W.; DOSTAL, L.; ROSAZZA, J. P.N. Aeruginol {2-(2'-Hydroxyphenyl)-4-hydroxymethylthiazole}, a New Secondary Metabolite from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 11, p. 1993-1994, 1993.
- YASMIN, S.; HAFEEZ, F. Y.; RASUL, G. Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* Z5 for biocontrol of cotton seedling disease caused by *Fusarium oxysporum*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 11, p. 1227-1242, 2014.
- YE, D. et al. Microbial metabolomics: From novel technologies to diversified applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 148, p. 116540, 2022.
- YOSRI, N. et al. Anti-viral and immunomodulatory properties of propolis: Chemical diversity, pharmacological properties, preclinical and clinical applications, and in silico potential against SARS-CoV-2. **Foods**, v. 10, n. 8, p. 1776, 2021.

- YUAN, M. et al. A comparative study between Chinese propolis and Brazilian green propolis: metabolite profile and bioactivity. **Food & function**, v. 11, n. 3, p. 2368-2379, 2020.
- ZHANG, C. et al. Artepillin C, is it a good marker for quality control of Brazilian green propolis? **Natural product research**, v. 31, n. 20, p. 2441-2444, 2017.
- ZHAO, F. et al. Oxygen effects on rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial cell factories**, v. 17, p. 1-11, 2018.
- ZHAO, K. et al. Polysaccharides produced by *Enterobacter cloacae* induce apoptosis in cervical cancer cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 960-964, 2015.
- ZHOU, X. et al. Selenium-enriched exopolysaccharides produced by *Enterobacter cloacae* Z0206 alleviate adipose inflammation in diabetic KKAY mice through the AMPK/SirT1 pathway. **Molecular medicine reports**, v. 9, n. 2, p. 683-688, 2014.
- ZHUANG, L. et al. Development of *Enterobacter aerogenes* fuel cells: from in situ biohydrogen oxidization to direct electroactive biofilm. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 284-289, 2011.
- ZIEMERT, N. et al. Diversity and evolution of secondary metabolism in the marine actinomycete genus *Salinispora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 12, p. E1130-E1139, 2014.
- ŽIŽIĆ, J. B. et al. Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 12, p. 3001-3009, 2013.
- ZUNNUNDZHANOV, A. et al. Structure of aerugine from *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 23, p. 461-465, 1987.

ANEXOS

ANEXO A. Composição dos meios de cultura utilizado no isolamento dos microrganismos

FUNGOS

Mártin	g L⁻¹
Fosfato Dipotássico	1,0
Sulfato de Magnésio	0,5
Peptona	5,0
Dextrose	10,0
Rosa Bengala	0,033
Estreptomicina	0,03
Ágar	15,0
pH = 5,6	

Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

	g L⁻¹
Infusão de batata	4,0
Glicose	20,0
Ágar	15
pH=5,6	

BACTÉRIAS

Ágar Nutriente (NA)

	g L⁻¹
Extrato de Carne	1
Extrato de Levedura	2
Peptona	5
Cloreto de Sódio	5
Ágar	17
pH = 6,8	

Agar Triptona de Soja (TSA)

	g L⁻¹
Triptona	15,0
Peptona de soja	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Ágar	15,0
pH = 7,3	

Ágar Extrato Glicose Triptona (TGE)	g L⁻¹
Extrato de Carne	3,0
Digestão enzimática de caseína	5,0
Dextrose	1,0
Ágar	15,0
pH = 7,0	

ACTINOBACTÉRIAS	
Ágar sais minerais com baixo teor de Nutrientes (LNMS)	g L⁻¹
Extrato de Levedura	0,1
Fosfato Dipotássico	2,0
Cloreto de Sódio	0,2
Sulfato de Magnésio	0,005
Carbonato de Cálcio	0,05
Sulfato de Ferro	0,01
Amido Solúvel	0,1
Ágar	17,0
pH= 7,0	

Sais minerais, amido e Ágar Caseína (MSSC)	g L⁻¹
Amido Solúvel	10
Nitrato de Potássio	2
Caseína	0,3
Cloreto de Sódio	2
Fosfato Dipotássico	2
Sulfato de Magnésio	0,05
Carbonato de Cálcio	0,02
Sulfato de Ferro	0,01
Ágar	17,0
pH = 7,0	

ISP2	g L⁻¹
Extrato de Carne	1,0
Extrato de Levedura	2,0
Extrato de Malte	5,0

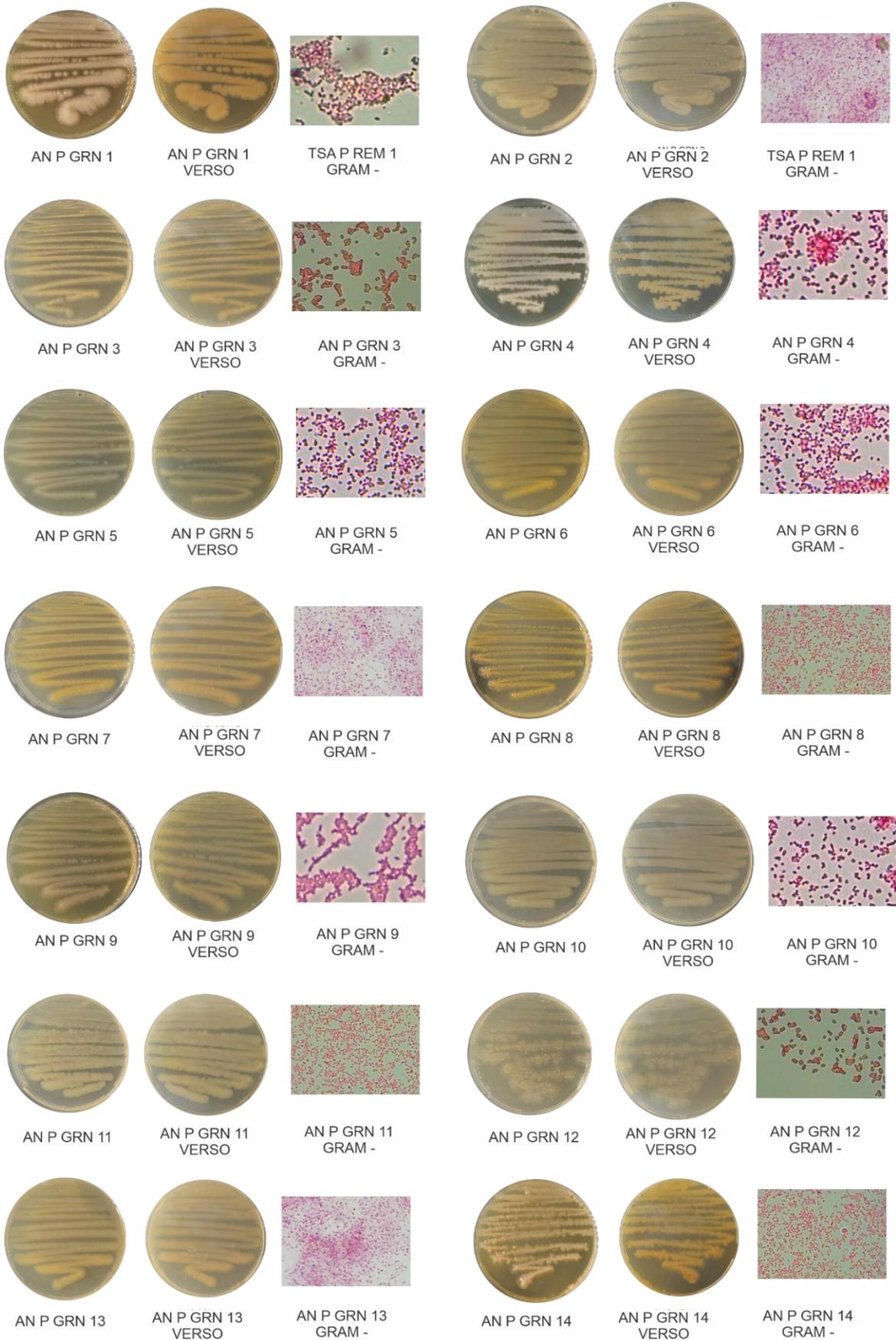
Dextrose	5,0
Ágar	15,0
pH = 7,0	

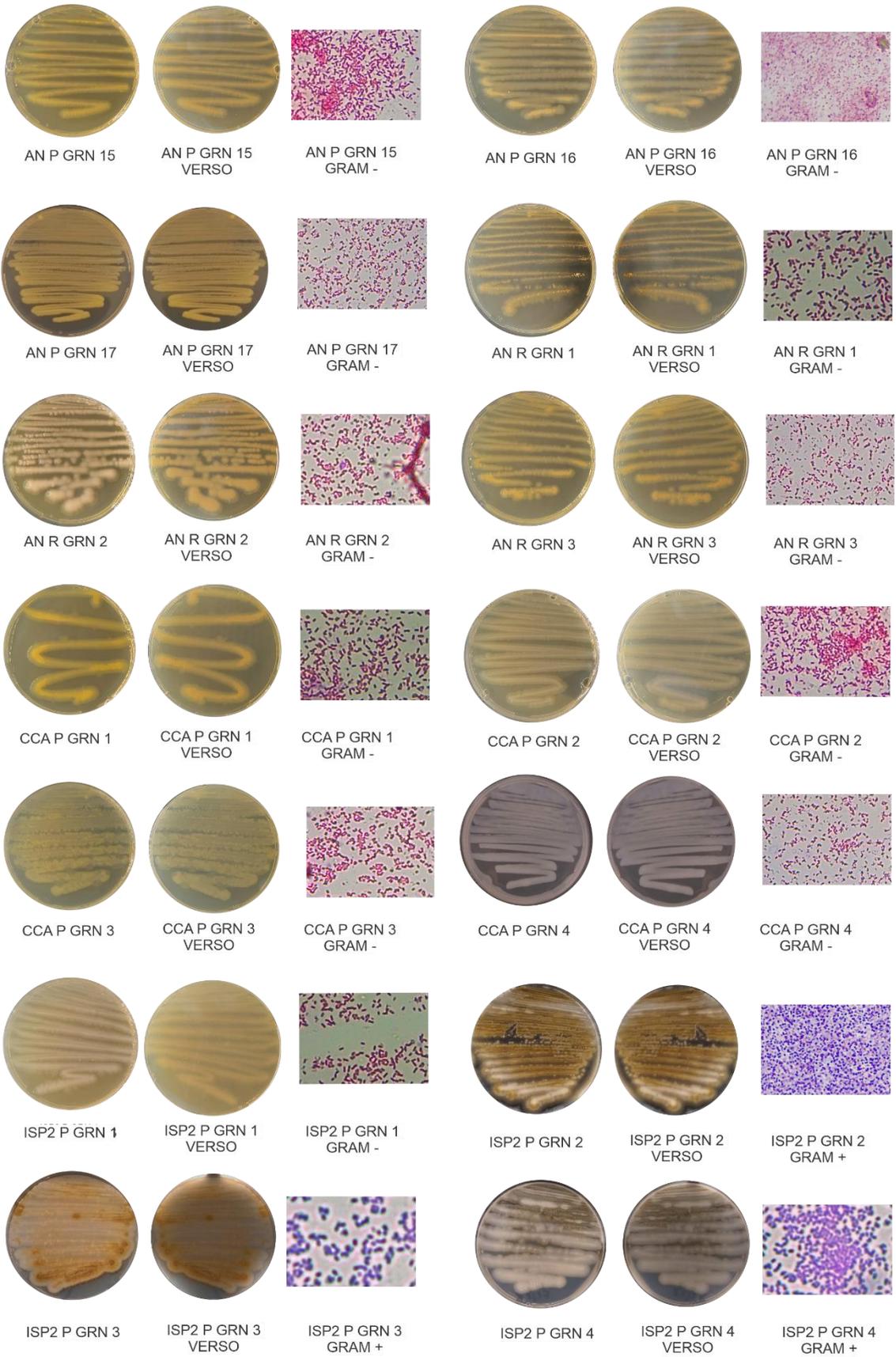
FUNGOS, BACTÉRIAS E ACTINOBACTÉRIAS

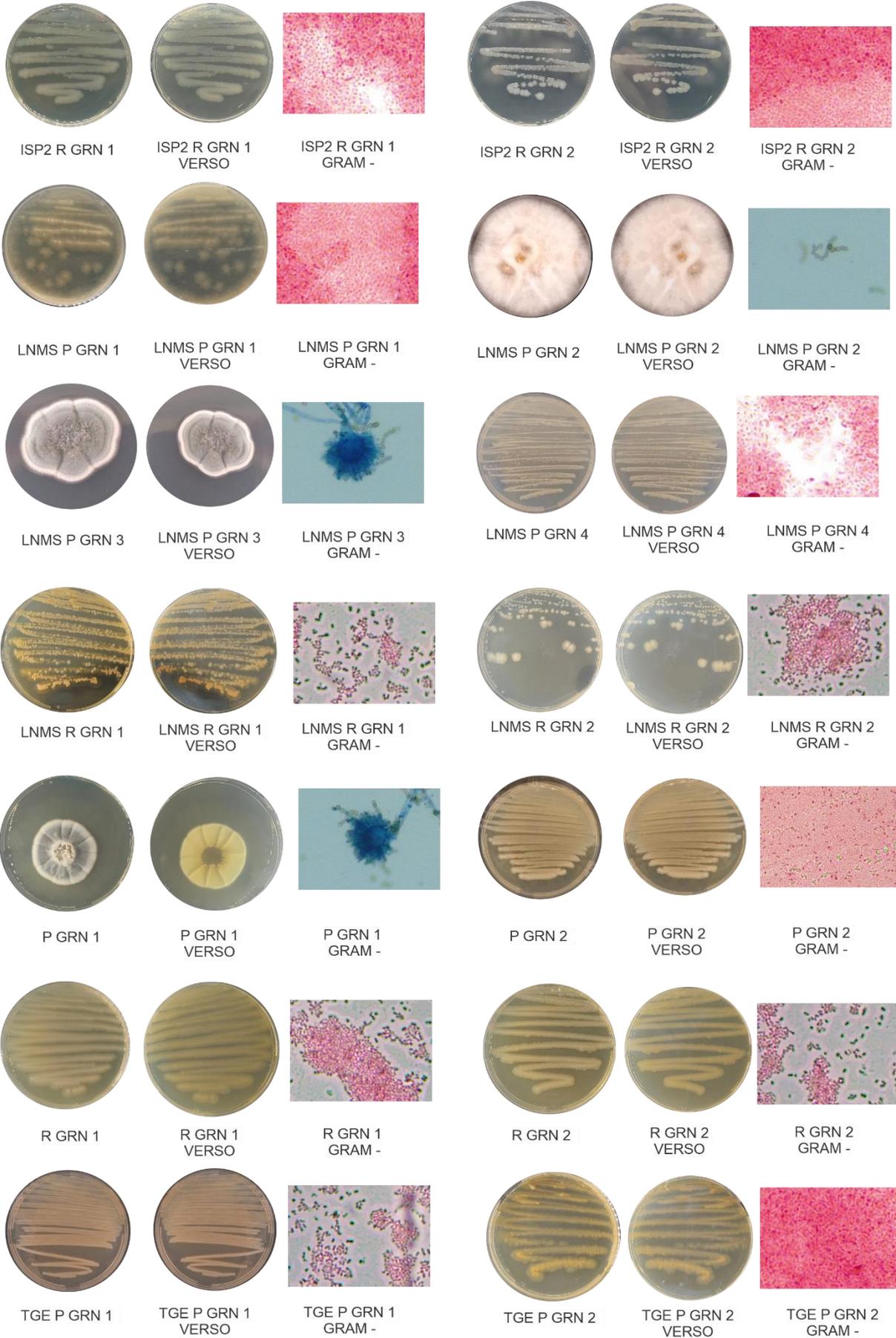
CCA	g L⁻¹
Glicerol	30
Peptona	2
Fosfato de Potássio	1
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	0,5
Agar	15,0
Solução traço (5 ml L⁻¹)	
Sulfato de Ferro Heptahidratado	0,1
Cloreto de Manganês	0,1
Sulfato de Zinco	0,1
pH = 7,0	

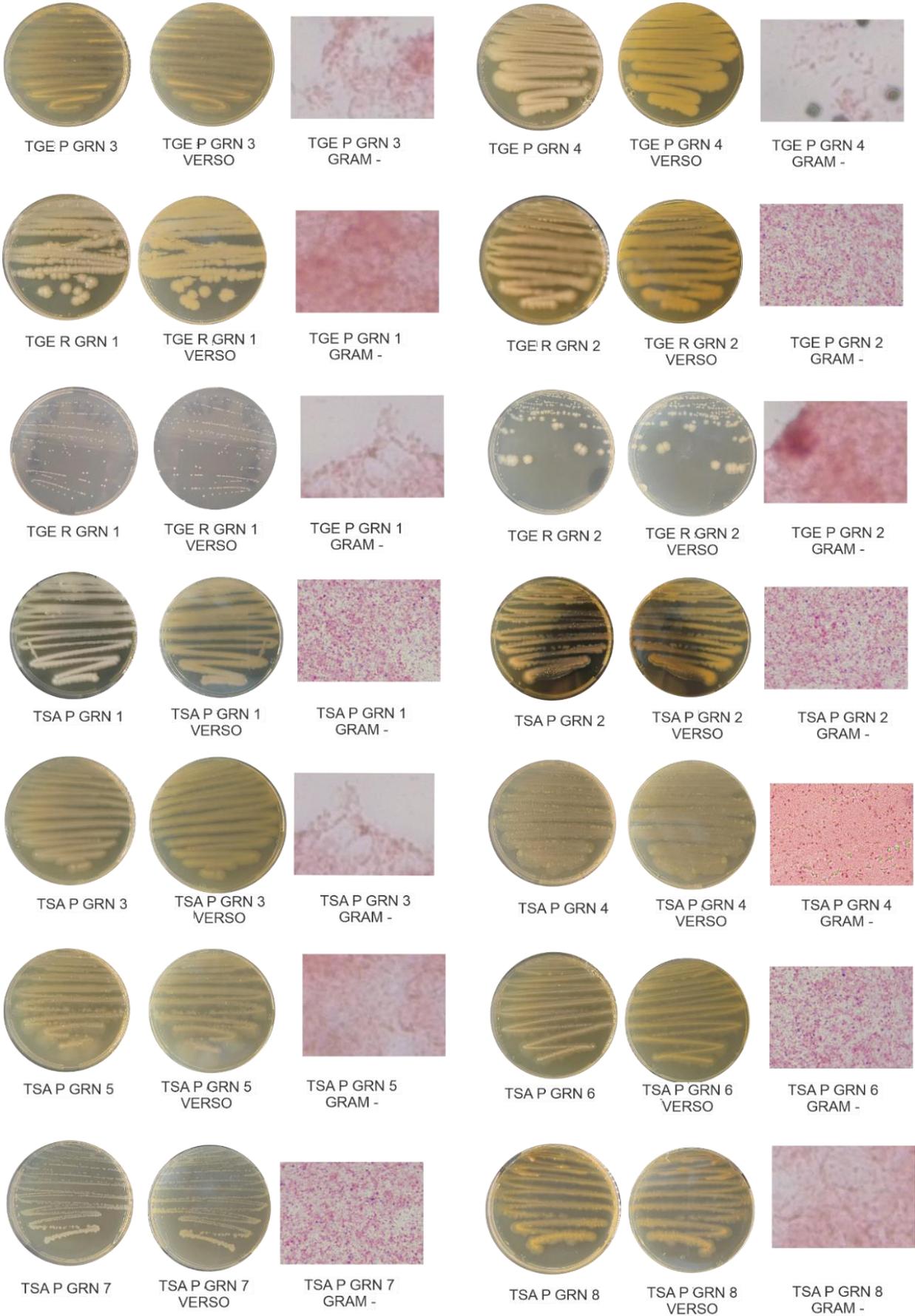
Ágar – água + própolis	g L⁻¹
Ágar	15
Própolis	50,0

ANEXO B. Morfotipo dos microrganismos isolados da própolis verde e da resina de *Baccharis dracunculifolia*.







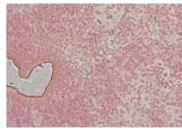




TSA R GRN 1



TSA R GRN 1
VERSO



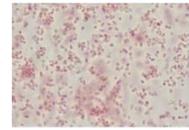
TSA R GRN 1
GRAM -



TSA R GRN 2



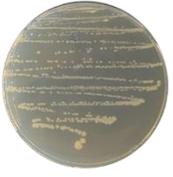
TSA R GRN 2
VERSO



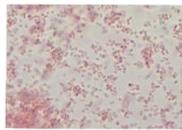
TSA R GRN 2
GRAM -



TSA R GRN 3



TSA R GRN 3
VERSO



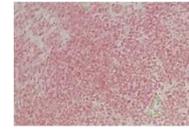
TSA R GRN 3
GRAM -



TSA R GRN 4



TSA R GRN 4
VERSO



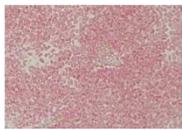
TSA R GRN 4
GRAM -



TSA R GRN 5



TSA R GRN 5
VERSO



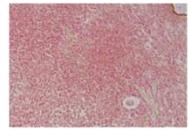
TSA R GRN 5
GRAM -



TSA R GRN 6



TSA R GRN 6
VERSO



TSA R GRN 6
GRAM -



TSA R GRN 7



TSA R GRN 7
VERSO



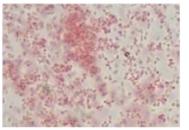
TSA R GRN 3
GRAM -



TSA R GRN 8



TSA R GRN 8
VERSO



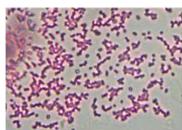
TSA R GRN 8
GRAM -



TSA R GRN 9

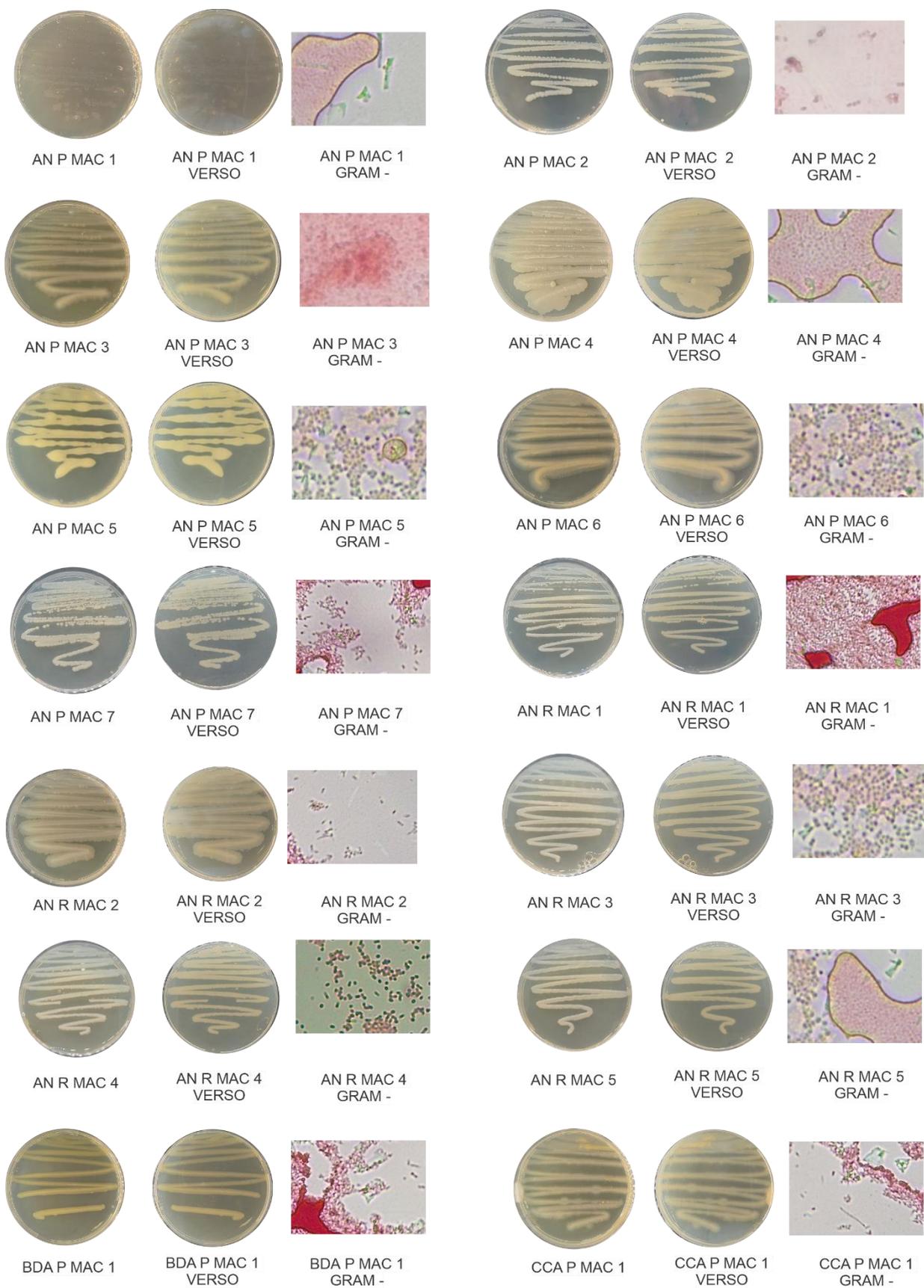


TSA R GRN 9
VERSO



TSA R GRN 9
GRAM -

ANEXO C. Morfotipo dos microrganismos isolados da própolis vermelha e da resina de *Dalbergia ecastophyllum*.





CCA P MAC 2



CCA P MAC 2
VERSO



CCA P MAC 2
GRAM -



CCA R MAC 1



CCA R MAC 1
VERSO



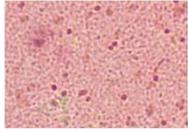
CCA R MAC 1
GRAM -



ISP2 P MAC 1



ISP2 P MAC 1
VERSO



ISP2 P MAC 1
GRAM -



ISP2 P MAC 2



ISP2 P MAC 2
VERSO



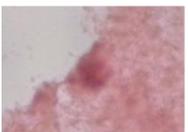
ISP2 P MAC 2
GRAM -



ISP2 P MAC 3



ISP2 P MAC 3
VERSO



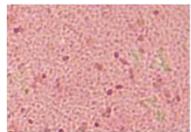
ISP2 P MAC 3
GRAM -



ISP2 P MAC 4



ISP2 P MAC 4
VERSO



ISP2 P MAC 4
GRAM -



LNMS P MAC 1



LNMS P MAC 1
VERSO



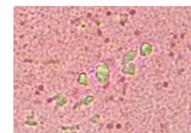
LNMS P MAC 1
GRAM -



LNMS P MAC 2



LNMS P MAC 2
VERSO



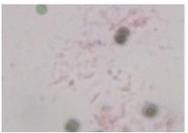
LNMS P MAC 2
GRAM -



LNMS P MAC 3



LNMS P MAC 3
VERSO



LNMS P MAC 3
GRAM -



LNMS P MAC 4



LNMS P MAC 4
VERSO



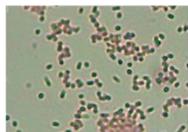
LNMS P MAC 4
GRAM -



MÁRTIN P MAC 1



MARTIN P MAC 1
VERSO



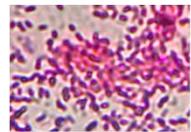
MARTIN P MAC 3
GRAM -



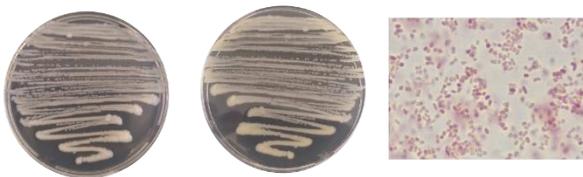
MSSC P MAC 1



MSSC P MAC 1
VERSO



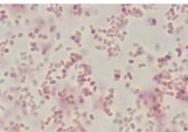
MSSC P MAC 1
GRAM -



TGE P MAC 1



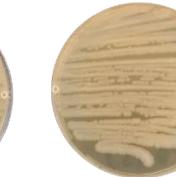
TGE P MAC 1
VERSO



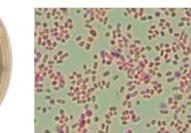
TGE P MAC 1
GRAM -



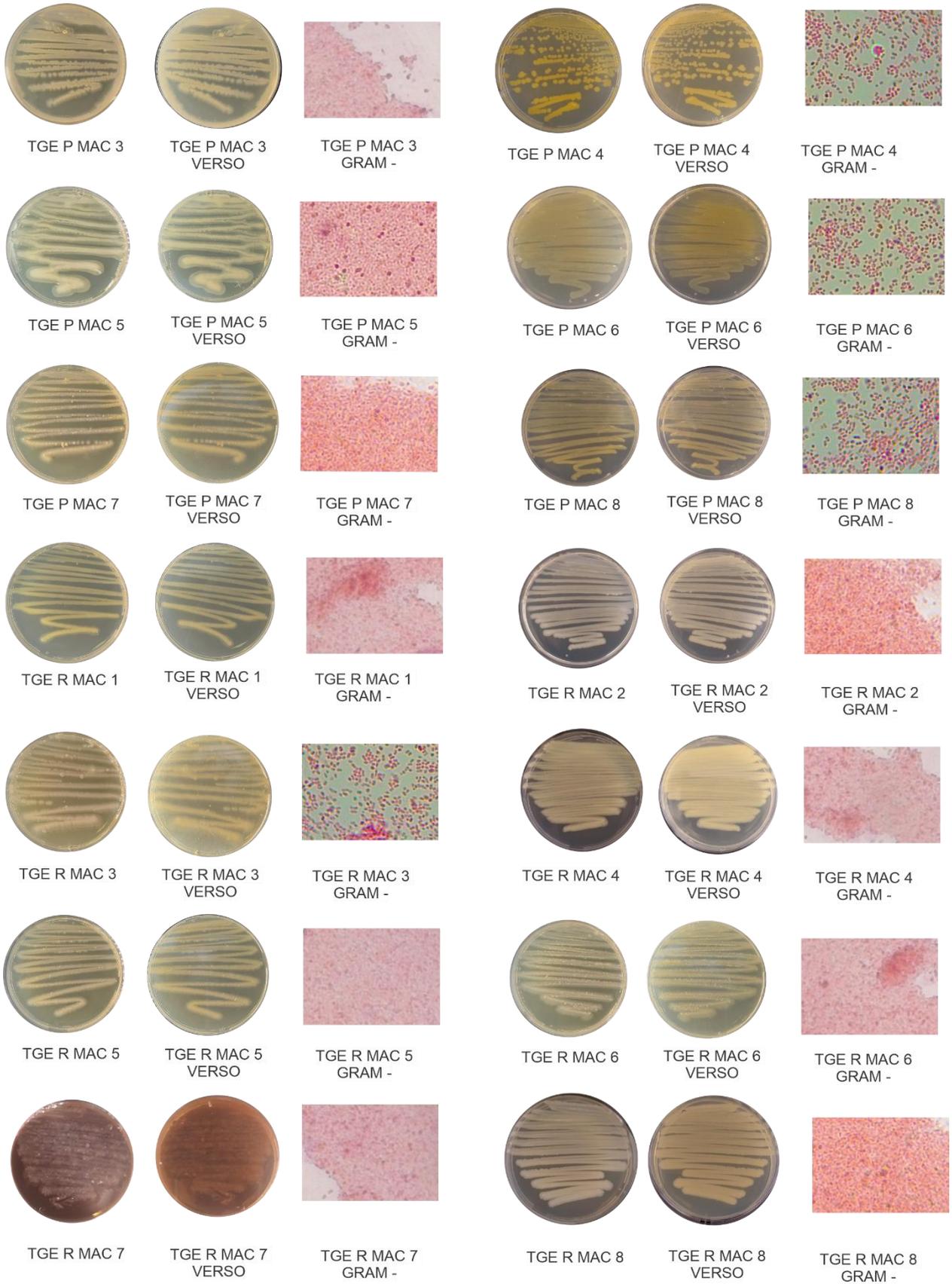
TGE P MAC 2



TGE P MAC 2
VERSO

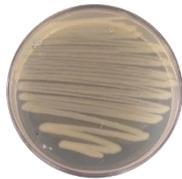


TGE P MAC 2
GRAM -

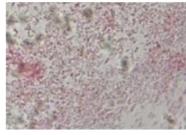




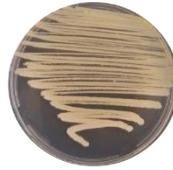
TSA P MAC 4



TSA P MAC 4
VERSO



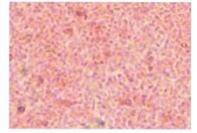
TSA P MAC 4
GRAM -



TSA P MAC 5



TSA P MAC 5
VERSO



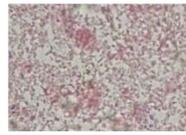
TSA P MAC 5
GRAM -



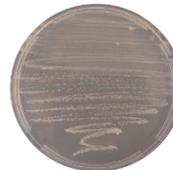
TSA R MAC 1



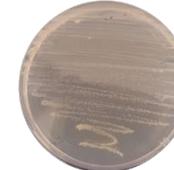
TSA R MAC 1
VERSO



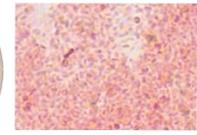
TSA R MAC 1
GRAM -



TSA R MAC 2



TSA R MAC 2
VERSO



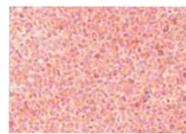
TSA R MAC 2
GRAM -



TSA R MAC 3

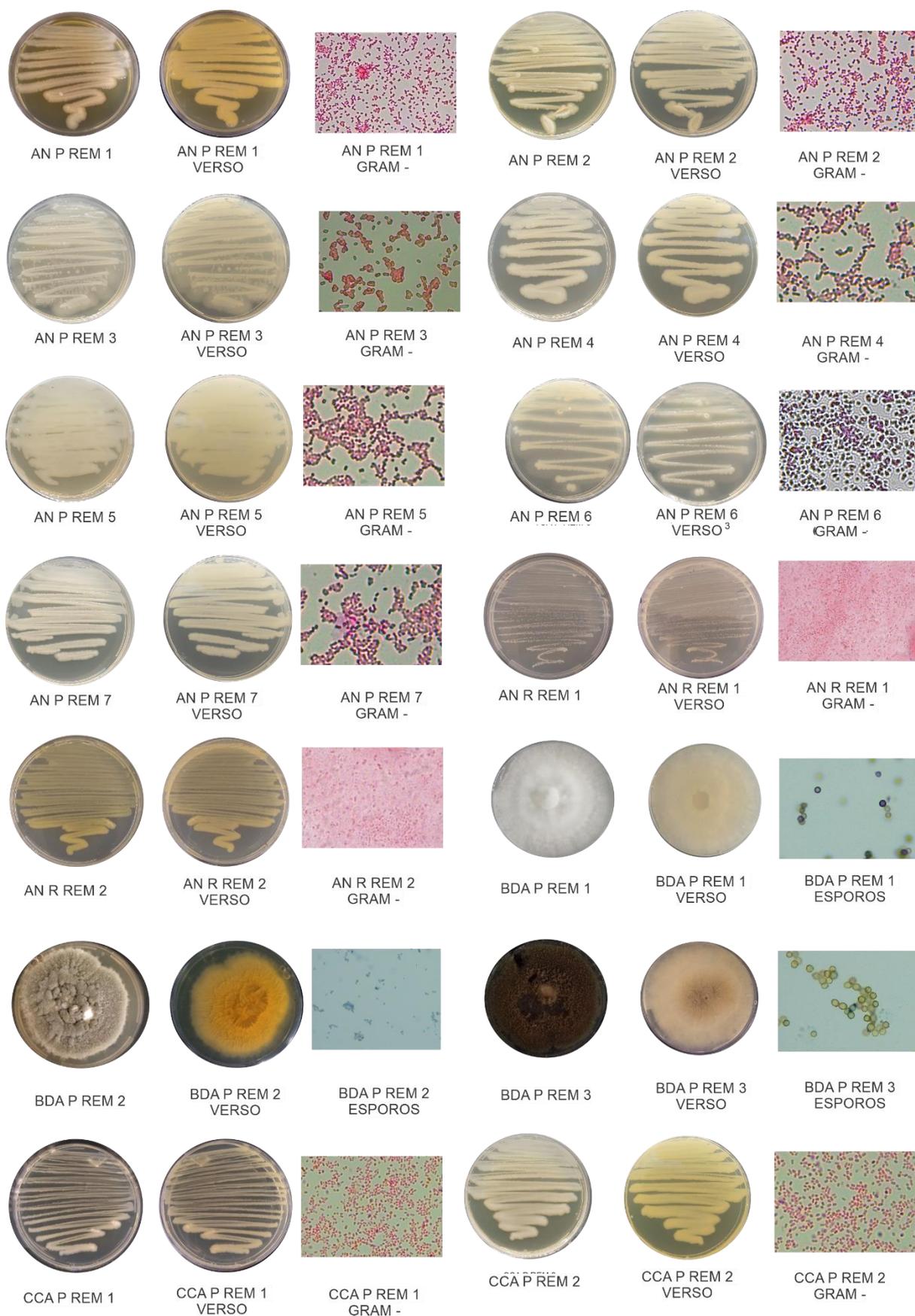


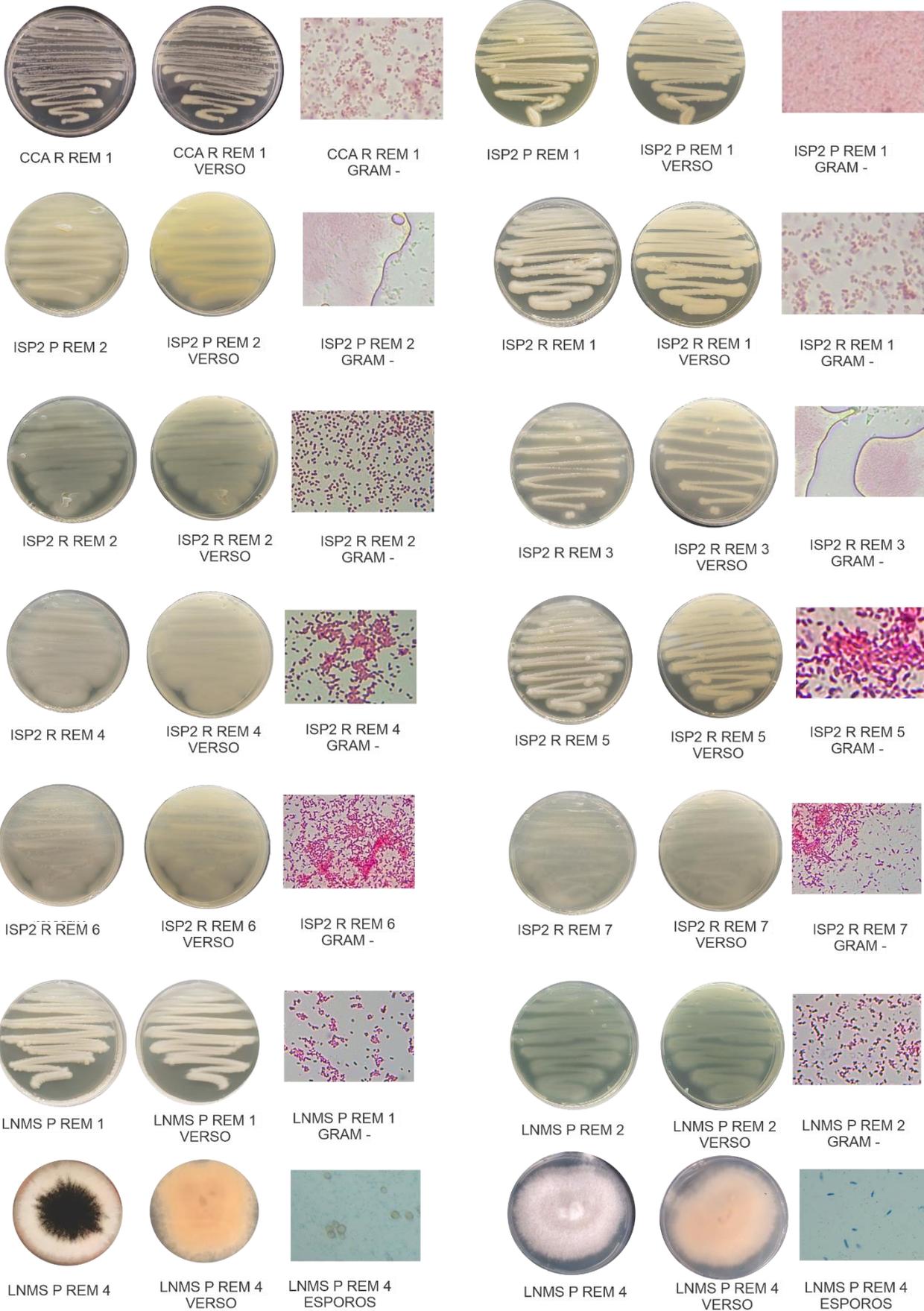
TSA R MAC 3
VERSO



TSA R MAC 3
GRAM -

ANEXO D. Morfotipo dos microrganismos isolados da própolis verde da Caatinga e da resina de *Mimosa tenuiflora*.







MARTIN P REM 1 MARTIN R REM 1
VERSO MARTIN R REM 1
GRAM -



MARTIN P REM 1 MARTIN R REM 1
VERSO MARTIN R REM 1
GRAM -



MARTIN P REM 3 MARTIN P REM 3
VERSO MARTIN P REM 4
ESPOROS



MARTIN P REM 4 MARTIN P REM 4
VERSO MARTIN P REM 4
ESPOROS



MARTIN P REM 5 MARTIN R REM 5
VERSO MARTIN R REM 5
ESPOROS



MSSC P REM 1 MSSC P REM 1
VERSO MSSC P REM 1
ESPOROS



MSSC P REM 2 MSSC P REM 2
VERSO MSSC P REM 2
ESPOROS



MSSC P REM 3 MSSC P REM 3
VERSO MSSC P REM 3
ESPOROS



MSSC R REM 1 MSSC R REM 1
VERSO MSSC R REM 1
GRAM -



TGE P REM 1 TGE P REM 1
VERSO TGE P REM 1
GRAM -



TGE R REM 1 TGE R REM 1
VERSO TGE R REM 1
GRAM -



TGE R REM 2 TGE R REM 2
VERSO TGE R REM 2
GRAM -



TGE R REM 3 TGE R REM 3
VERSO TGE R REM 3
GRAM -



TGE R REM 2 TGE R REM 2
VERSO TGE R REM 2
GRAM -



TSA P REM 1

TSA P REM 1
VERSO

TSA P REM 1
GRAM -



TSA P REM 1

TSA P REM 2
VERSO

TSA P REM 2
GRAM -



TSA P REM 3

TSA P REM 3
VERSO

TSA P REM 3
GRAM -



TSA P REM 4

TSA P REM 4
VERSO

TSA P REM 4
GRAM -



TSA P REM 5

TSA P REM 5
VERSO

TSA P REM 5
GRAM -



TSA R REM 1

TSA R REM 1
VERSO

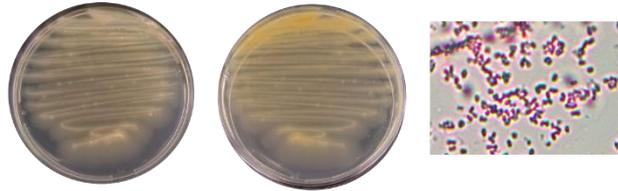
TSA R REM 1
GRAM -



TSA R REM 2

TSA R REM 2
VERSO

TSA R REM 2
GRAM -



TSA R REM 3

TSA R REM 3
VERSO

TSA R REM 3
GRAM -



TSA R REM 4

TSA R REM 4
VERSO

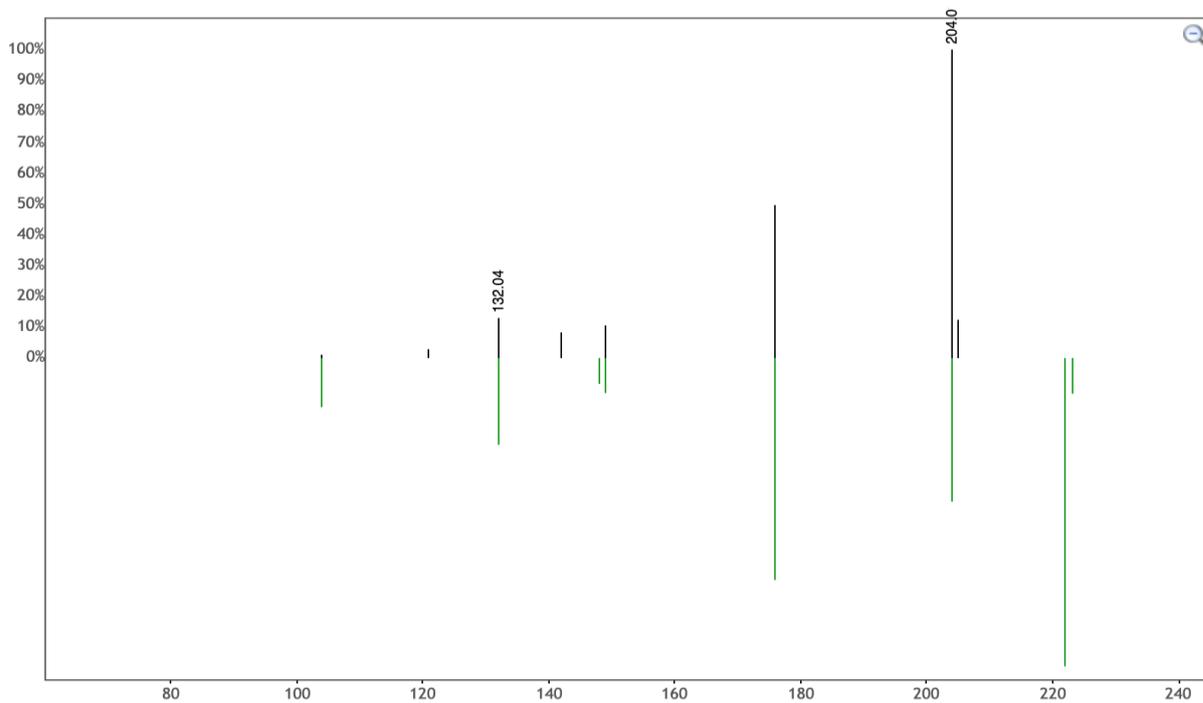
TSA R REM 2
GRAM -



TSA R REM 5

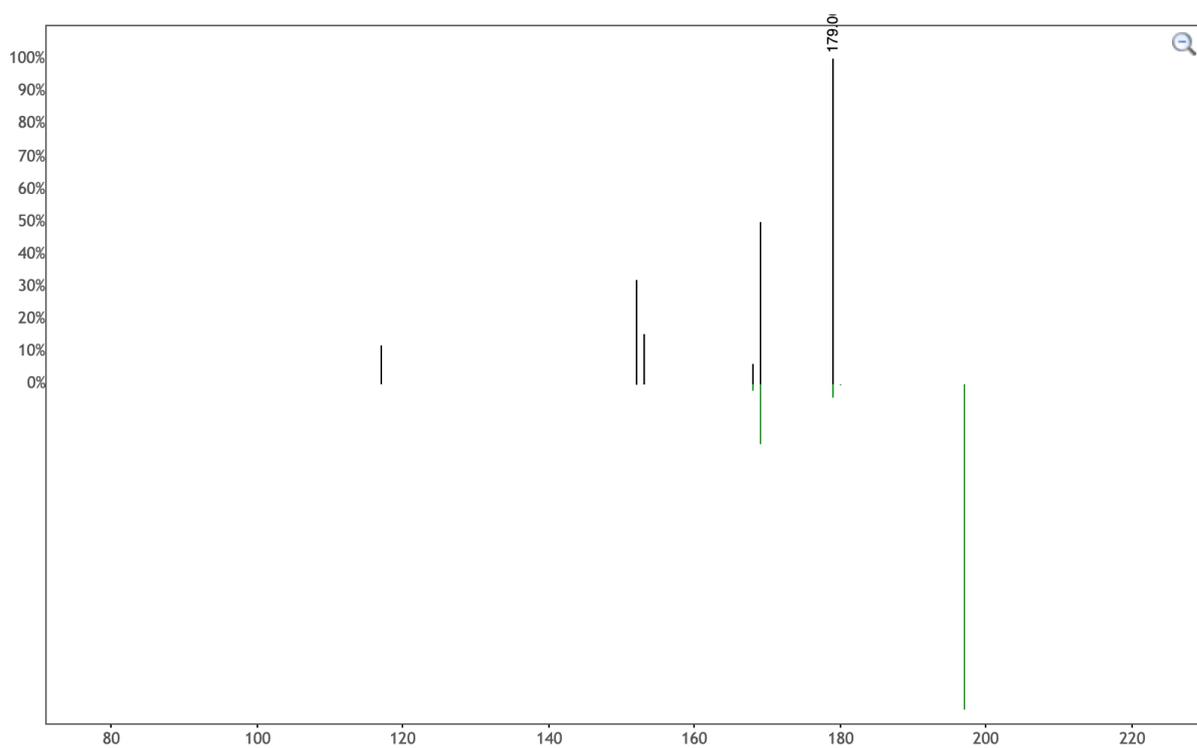
TSA R REM 5
VERSO

TSA R REM 5
GRAM -

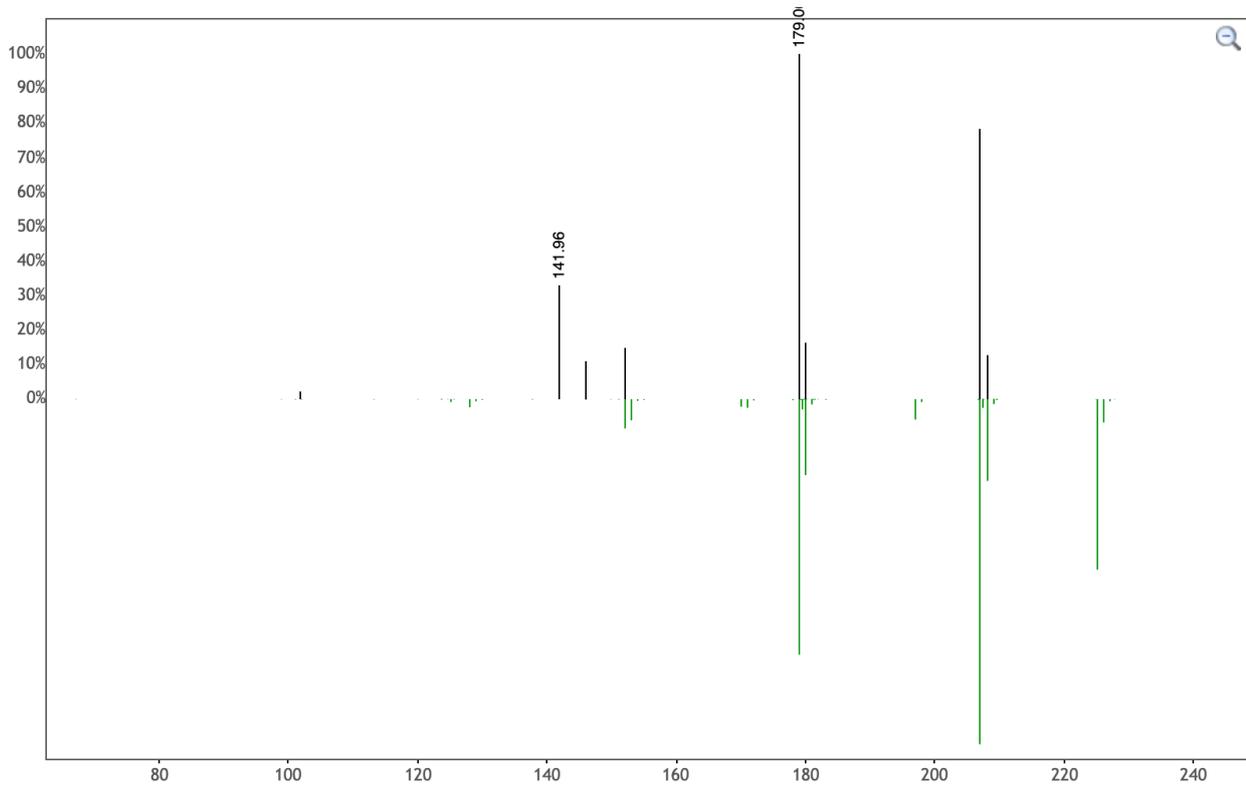
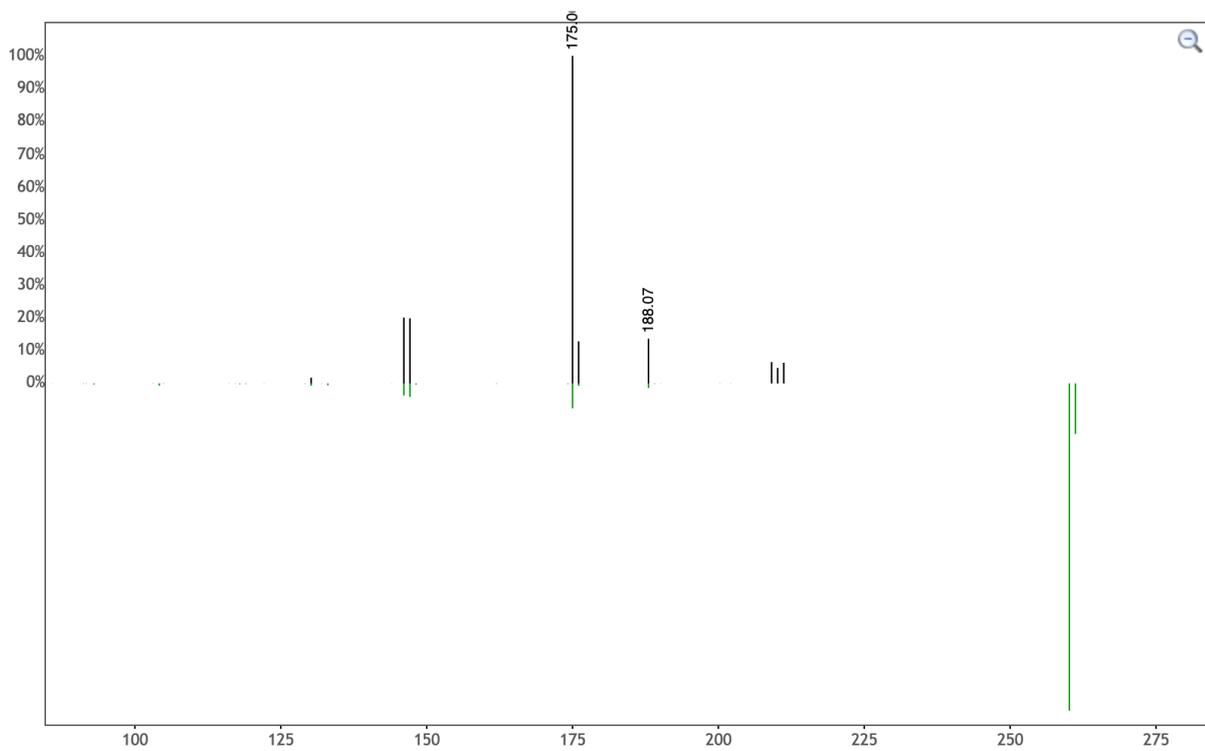
ANEXO E. *Mirror match* dos compostos anotados com atividade antifúngica

Ácido aeruginóico – similaridade de 0,85

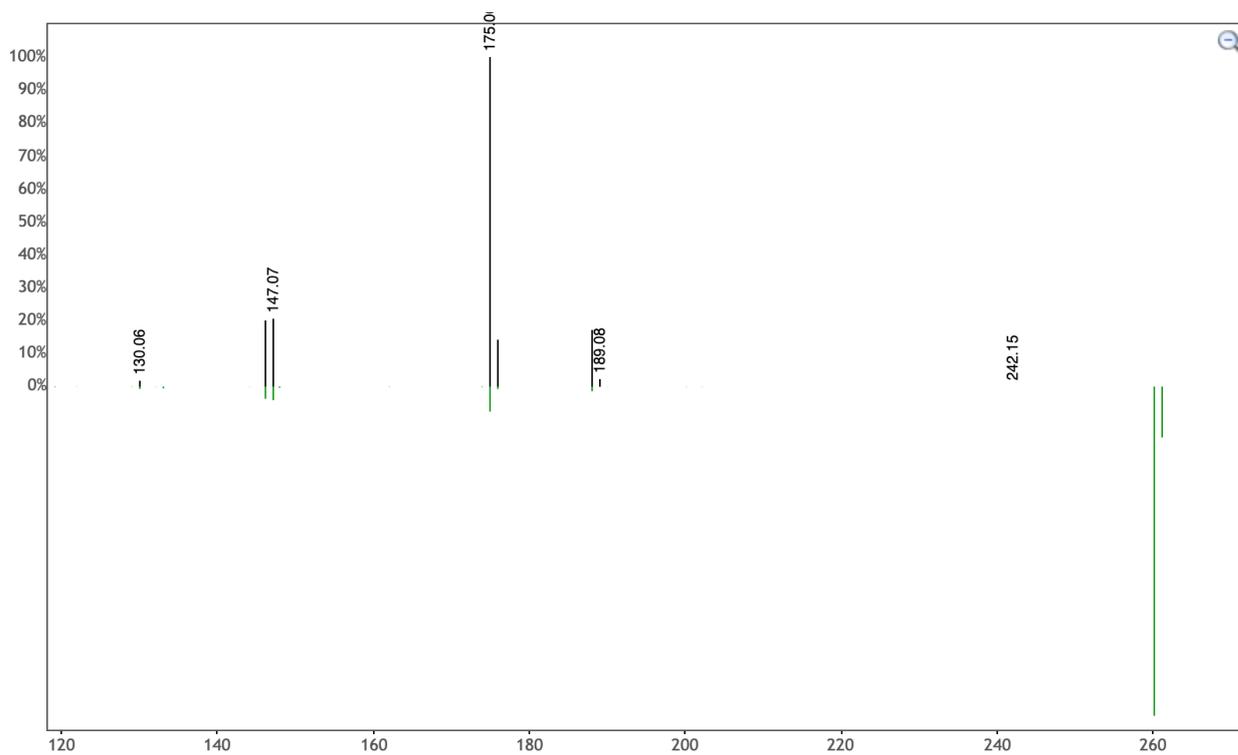
1-Hidroxifenanzina – similaridade de 0,79



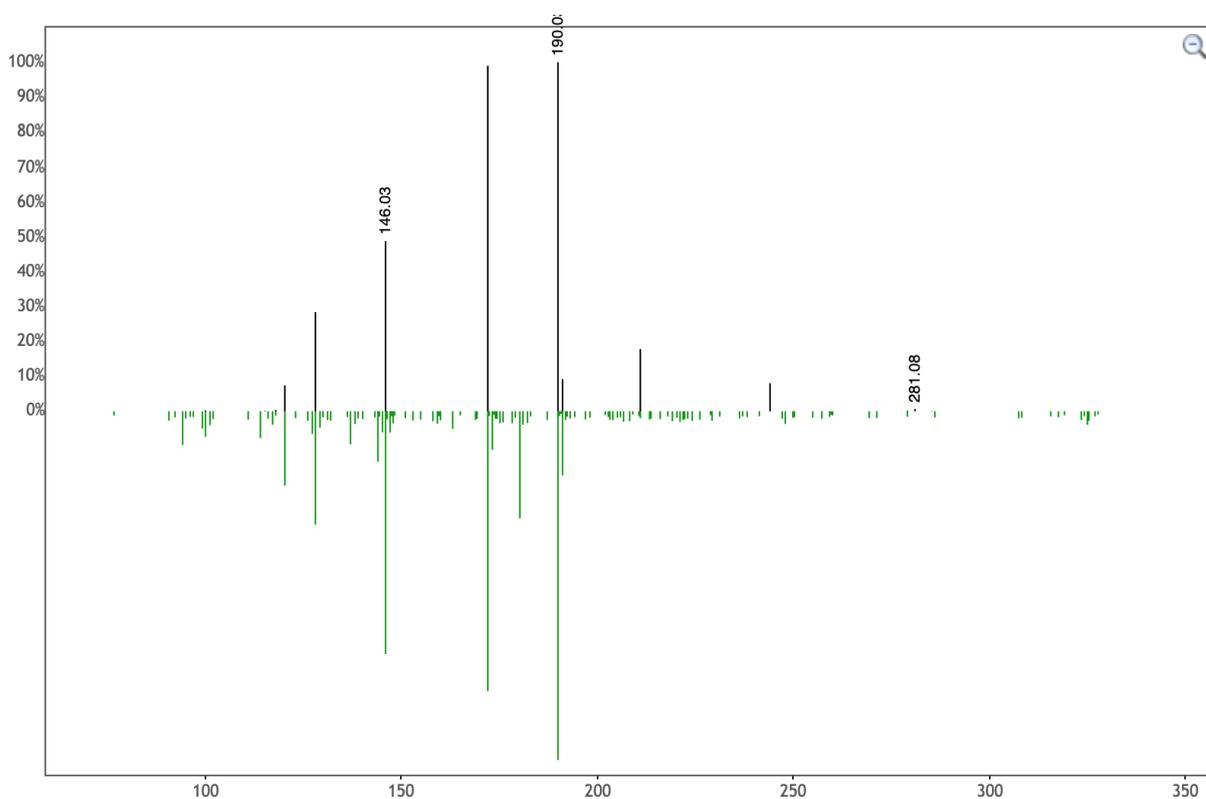
Ácido fenanzina-1-carboxílico – similaridade 0,88

Sinal de quinolona de *Pseudomonas* – similaridade de 0,89

Sinal de quinolona de *Pseudomonas* – similaridade de 0,93



Pioquelina – similaridade de 0,86



Rhamnolípido (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) – similaridade de 0,87