



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



PPG - Biologia Geral e Aplicada

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Atividade antibacteriana de peptídeos antimicrobianos (PAMs) nisina e melitina
e óleos essenciais de copaíba e pitanga sobre bactérias causadoras de
infecções na pele**

Tatiane Baptista Zapata

Orientador: Prof. Associado Ary Fernandes Júnior

Coorientadora: Dra. Ana Flávia Marques Pereira

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração em Biologia de Micro-organismos e Imunidade.

Botucatu

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Zapata, Tatiane Baptista.

Atividade antibacteriana de peptídeos antimicrobianos nisina e melitina e óleos essenciais de copaíba e pitanga sobre bactérias causadoras de infecções na pele / Tatiane Baptista Zapata. - Botucatu, 2024

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

Orientador: Ary Fernandes Júnior

Coorientador: Ana Flávia Marques Pereira

Capes: 21202010

1. Citometria de fluxo. 2. *Propionibacterium acnes*. 3. Sinergismo farmacológico. 4. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. 5. *Streptococcus pyogenes*.

Palavras-chave: Citometria de fluxo; *Cutibacterium acnes*; Sinergismo; *Staphylococcus aureus* meticilina resistente; *Streptococcus pyogenes*.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Atividade antibacteriana de peptídeos antimicrobianos nisina e melitina e óleos essenciais sobre bactérias causadoras de infecções na pele

AUTORA: TATIANE BAPTISTA ZAPATA

ORIENTADOR: ARY FERNANDES JÚNIOR

COORIENTADORA: ANA FLÁVIA MARQUES PEREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biologia Geral e Aplicada, área: Biologia de Micro-organismos e Imunidade pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ARY FERNANDES JÚNIOR (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Profa. Dra. VERA LUCIA MORES RALL (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Profa. Dra. CRISTIANE MENGUE FENIMAN MORITZ (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia / Universidade Estadual de Maringá - UEM

Botucatu, 27 de maio de 2024

Maria Victória Ramalho da Cunha
Assistente Administrativo II da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu

Dedico este trabalho aos meus pais, em especial ao meu pai Helmer (*in memoriam*), por ter me dado o dom da vida e ter me ensinado o significado do amor

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela minha vida e por permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados com determinação e que fez com que meus objetivos fossem alcançados durante todos os anos de minha formação acadêmica.

Aos meus pais Clarice e Helmer (in memoriam) que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava na realização da minha graduação. Por acreditarem nos meus sonhos e me apoiarem incondicionalmente e por me ajudarem a ser a pessoa que sou hoje.

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado pelas amizades incondicionais e apoio demonstrado durante os últimos anos e pelo companheirismo e troca de experiências que me permitiram meu crescimento como pessoa e profissional. Agradeço em especial Amanda Grosselli, Flávia Alexandre, Jéssica Batista, Thais Romano e Vitória Corrêa pela amizade e paciência como também pelas risadas durante estes anos de nossa convivência.

Agradeço também ao meu namorado e parceiro Gabriel Padilha por ter tornado minha jornada mais leve.

Aos meus amigos de laboratório Ana Flávia Pereira, Alessandra Sani, Débora Silva e Nicolas Ripari que sem suas ajudas não seria possível realizar este trabalho. Obrigada por todo apoio e incentivos que certamente impactaram na minha formação acadêmica.

Ao professor Ary Fernandes Júnior, por sua orientação e por ter desempenhado essa função com dedicação e amizade. Também agradeço minha coorientadora Ana Flávia Marques Pereira pela ajuda, ensinamentos e principalmente paciência que guiaram o meu aprendizado. Desta forma só tenho a gratidão e agradecimentos a ambos.

Agradeço aos servidores do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas – Setor de Microbiologia e Imunologia, em especial Aline Parisoto Missio, Ivana Giovannetti Castilho, Larissa Ragozo C. de Oliveira e Patricia L. de Souza pelos auxílios e colaboração durante minha estadia no setor.

Ao instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” nas figuras de seu corpo docente e administrativo por todo aprendizado e auxílio durante o mestrado.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) 2022/07963 e a Pró-Reitoria de Pós-Graduação pela bolsa de mestrado.

“Todo grande sonho começa com um sonhador. Lembre sempre, você tem uma força interna, a paciência, e a paixão para alcançar as estrelas para mudar o mundo. ”

Harriet Tubman

Resumo

A resistência aos fármacos antibacterianos tem aumentado e mostrado a necessidade das pesquisas que visam novas opções terapêuticas para tratamento de doenças infecciosas. As piodermites como impetigo, ectima, erisipela, síndrome da pele escaldada estafilocócica, foliculite e acne representam um desafio clínico. Os produtos naturais, como os óleos essenciais e peptídeos antimicrobianos, são alternativas para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas considerando a ampla atividade biológica destes produtos. Este estudo visa avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de pitanga (*Eugenia uniflora*) e copaíba (*Copaifera langsdorffii*), do óleo resina de copaíba (*Copaifera reticulata*), além de dois peptídeos antimicrobianos: a nisina, uma bacteriocina produzida por *Lactococcus* spp., e a melitina, uma fração do veneno da abelha *Apis mellifera*. Os antimicrobianos foram testados sobre linhagens padrões ATCC (*American Type Culture Collection*) de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA), *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) e *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) utilizando a metodologia da microdiluição (REMA – *Resazurin Microtiter Assay*) para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Na sequência, foram realizados ensaios utilizando os produtos antimicrobianos com as melhores atividades inibitórias sobre as bactérias testadas, com o objetivo de verificar o sinergismo com fármacos de uso convencional pela metodologia da curva de inibição do crescimento. Além disso, foram avaliadas a ação antibiofilme da nisina, melitina e as suas associações com fármacos antimicrobianos, bem como o efluxo de íons potássio e fosfato. A citotoxicidade desses produtos sobre queratinócitos (linhagem HaCaT) utilizando metodologia do vermelho neutro e citometria de fluxo também foram verificadas. Enquanto os óleos essenciais de pitanga, copaíba e óleo resina de copaíba apresentaram ação antimicrobiana com CIM podendo chegar até 8.000 µg/mL, a nisina e a melitina apresentaram eficácia frente às bactérias testadas com os menores valores de CIM. A nisina apresentou uma CIM de 3,1 µg/mL para MRSA, de 6,25 µg/mL para *S. pyogenes* e de 0,2 µg/mL para *C. acnes*. A melitina apresentou CIM de 62,5 µg/mL para MRSA, 15,6 µg/mL para *S. pyogenes* e de 3,91 µg/mL para *C. acnes*. A associação de 25% da CIM obtida para nisina e melitina com 25% da CIM dos fármacos oxacilina, cefalotina e clindamicina demonstrou ser sinérgica, principalmente sobre *C. acnes*. As concentrações subinibitórias da combinação da nisina e melitina com os antimicrobianos foram capazes de reduzir a formação de biofilme de MRSA e *C. acnes*. A melitina e a nisina

demonstraram ter ação sobre o efluxo de íons potássio e fosfato, indicando uma possível ação sobre a membrana plasmática das bactérias testadas. Além disso, não foram observados efeitos citotóxicos da nisina e melitina sobre as células de queratinócitos HaCaT com viabilidade celular próxima à concentração de CIM sendo de 98% e 96%, respectivamente. A combinação de nisina com clindamicina também não demonstrou efeito citotóxico, na concentração de 3,125 µg/mL e 1,56 µg/mL, respectivamente, apresentando viabilidade celular de 98,21%. A nisina, na concentração de 25,0 µg/mL, não induziu apoptose ou morte tardia significativa em células de queratinócitos HaCaT. Como conclusão do estudo, a nisina e melitina, bem como as associações com fármacos antibacterianos, demonstraram potencial para se tornarem candidatas ao desenvolvimento de novas opções terapêuticas contra MRSA, *S. pyogenes* e *C. acnes*.

Palavras chaves: *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA), *Streptococcus pyogenes*, *Cutibacterium acnes*, sinergismo, citometria de fluxo, *Eugenia uniflora*, *Copaifera langsdorffii*, *Copaifera reticulata*

Antibacterial activity of antimicrobial peptides nisin and melittin and essential oils copaiba and pitanga on bacteria causing skin infections

Abstract

Resistance to antibacterial drugs has increased and highlighted the need for research aimed at new therapeutic options for the treatment of infectious diseases. Pyodermitis conditions such as impetigo, ecthyma, erysipelas, staphylococcal scalded skin syndrome, folliculitis, and acne represent a clinical challenge. Natural products, such as essential oils and antimicrobial peptides, are alternatives for developing new therapeutic options, considering the broad biological activity of these products. This study aims to evaluate the antibacterial activity of essential oils from pitanga (*Eugenia uniflora*) and copaíba (*Copaifera langsdorffii*), copaíba resin oil (*Copaifera reticulata*), and two antimicrobial peptides: nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus* spp., and melittin, a fraction of the venom of the bee *Apis mellifera*. The antimicrobials were tested on ATCC (American Type Culture Collection) standard strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), and *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) using the microdilution methodology (REMA – Resazurin Microtiter Assay) to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). Subsequently, tests were conducted using the antimicrobial products with the best inhibitory activities on the tested bacteria to verify synergism with conventional drugs using the growth inhibition curve methodology. Additionally, the antibiofilm action of nisin, melittin, and their associations with antimicrobial drugs, as well as the efflux of potassium and phosphate ions, were evaluated. The cytotoxicity of these products on keratinocytes (HaCaT cell line) using the neutral red method and flow cytometry was also verified. While pitanga, copaíba essential oils, and copaíba resin oil showed antimicrobial action with MICs up to 8,000 µg/mL, nisin and melittin were effective against the tested bacteria with the lowest MIC values. Nisin showed an MIC of 3.1 µg/mL for MRSA, 6.25 µg/mL for *S. pyogenes*, and 0.2 µg/mL for *C. acnes*. Melittin showed an MIC of 62.5 µg/mL for MRSA, 15.6 µg/mL for *S. pyogenes*, and 3.91 µg/mL for *C. acnes*. The combination of 25% of the MIC obtained for nisin and melittin with 25% of the MIC of the drugs oxacillin, cephalothin, and clindamycin demonstrated synergistic effects, mainly on *C. acnes*. Subinhibitory concentrations of the combination of nisin and melittin with antimicrobials were able to reduce biofilm formation of MRSA and *C. acnes*. Melittin and nisin demonstrated effects on the efflux of potassium and phosphate ions, indicating a possible action on

the plasma membrane of the tested bacteria. Furthermore, no cytotoxic effects of nisin and melittin were observed on HaCaT keratinocyte cells, with cell viability near the MIC concentration being 98% and 96%, respectively. The combination of nisin with clindamycin also did not show a cytotoxic effect at concentrations of 3.125 µg/mL and 1.56 µg/mL, respectively, presenting cell viability of 98.21%. Nisin, at a concentration of 25.0 µg/mL, did not induce significant apoptosis or late death in HaCaT keratinocyte cells. In conclusion, nisin and melittin, as well as their combinations with antibacterial drugs, demonstrated potential as candidates for the development of new therapeutic options against MRSA, *S. pyogenes*, and *C. acnes*.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pyogenes*, *Cutibacterium acnes*, synergism, flow cytometry, *Eugenia uniflora*, *Copaifera langsdorffi*, *Copaifera reticulata*

Lista de Figuras

- Figura 1.** Fluxograma de propagação de genes de resistência aos fármacos antimicrobianos. (ARGs = genes de resistência aos fármacos antibacterianos; ARBs= bactérias resistentes aos fármacos antibacterianos (Jian et al., 2021).....18
- Figura 2.** Mecanismos pelos quais patógenos desenvolvem resistência aos fármacos antibacterianos (Lima et al, 2021).....19
- Figura 3.** Microbiologia Estrutura da pele e microbiota. (Ito & Amagi, 2023).....22
- Figura 4.** Fatores que influenciam na colonização microbiana da pele (Tryon & Grice,(2022).....22
- Figura 5.** Componentes celulares que são conhecidos sítios de ação dos PAMs e principais PAMs. Made with BioRender.com. Deo, et al. (2022).....32
- Figura 6.** Fotos do destilador para óleo essencial marca Marconi modelo MA 480.....35
- Figura 7.** Cromatograma do óleo essencial de *C. langsdorffi* (CG-FID).....44
- Figura 8.** Cromatograma do óleo essencial de *E. uniflora* (CG-FID).....44
- Figura 9.** Composição química (%) e cromatograma do óleo resinado de *C. reticulata*(CG-FID).....44
- Figura 10.** Representação gráfica do time kill curve obtidas pela leitura de OD₆₀₀ sobre linhagem de MRSA incubados a 37° C em 24 horas. As barras indicam o desvio padrão. CIM (concentração inibitória mínima) NIS (nisina) MEL (melitina) e OXA(oxacilina).....46
- Figura 11.** Representação gráfica do time kill curve obtidas pela leitura de OD₆₀₀ sobre linhagem de *S. pyogenes* incubados a 37° C em 24 horas. As barras indicam o desvio padrão. CIM (concentração inibitória mínima) NIS (nisina) MEL (melitina) e CEFA(cefalotina).....47
- Figura 12.** Representação gráfica do time kill curve obtidas pela leitura de OD₆₀₀ sobre linhagem de *C. acnes* incubadas a 37° C em 48 horas. As barras indicam o desvio padrão. CIM (concentração inibitória mínima) NIS (nisina) MEL (melitina) e CLD(clindamicina).....47
- Figura 13.** Representação gráfica da porcentagem de viabilidade celular de acor com cada diluição teste. Gráfica **A** referente à Nisina. Gráfico **B** à clindamicina. Gráfico **C** à Melitina e Gráfico **D** ao DMSO 51

Figura 14. A análise das células HaCaT foi realizada após tratamento com nisina, clindamicina e sua combinação (NIS+CLD) para avaliar a indução de apoptose precoce e apoptose/necrose tardia. A avaliação utilizou marcação com anexina V (FITC) e iodeto de propídio. Os tratamentos foram representados da seguinte forma: (A) Controle negativo basal (autofluorescência); (B) CIM clindamicina; (C) Controle positivo basal (autofluorescência); (D) CIM nisina; (E) CIM NIS+CLD (Quadrante UL: representa apoptose tardia ou células necróticas - anexina V negativa e iodeto de propídio positivo; Quadrante UR: representa células apoptóticas tardias ou necróticas - anexina V positiva e iodeto de propídio positivo; Quadrante LL: representa células vivas - anexina V negativa e iodeto de propídio negativo. Quadrante LR: representa células apoptóticas precoces - anexina V positiva e iodeto de propídio negativo).....53

Figura 15. Percentual de inibição do biofilme das concentrações subinibitórias de 25%, 50% e 75% da CIM de melitina, nisina, oxacilina, associação de melitina com oxacilina e nisina e oxacilina sobre MRSA. Símbolos iguais representam diferenças significativas de atividade antibiofilme entre produtos para um mesmo microrganismo quando $p \leq 0,05$ 55

Figura 16. Percentual de inibição do biofilme das concentrações subinibitórias de 25%, 50% e 75% da CIM de melitina, nisina, clindamicina, associação de melitina com clindamicina e nisina e clindamicina sobre *C. acnes*. Símbolos iguais representam diferenças significativas de atividade antibiofilme entre produtos para um mesmo microrganismo quando $p \leq 0,05$ 56

Figura 17. Percentual de inibição do biofilme das concentrações subinibitórias de 25%, 50% e 75% da CIM de melitina, nisina, cefalotina, associação de melitina com cefalotina e nisina e cefalotina sobre *S. pyogenes*. Símbolos iguais representam diferenças significativas de atividade antibiofilme entre produtos para um mesmo microrganismo quando $p \leq 0,05$ 56

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição química (%) do óleo essencial de <i>C. langsdorffii</i> (CG-FID) IRL calc.: Índice de retenção linear calculado; ni= não identificado.....	42
Tabela 2. Composição química (%) do óleo essencial de <i>E. uniflora</i> (CG-FID) IRL calc.: Índice de retenção linear calculado; ni= não identificado.....	43
Tabela 3. Composição química (%) do óleo-resina <i>C. reticulata</i> (CG-FID) IRL calc.: Índice de retenção linear calculado; ni= não identificado.....	43
Tabela 4. Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL, para os óleos essenciais de copaíba e pitanga, óleo resina de copaíba, melitina e nisina.....	45
Tabela 5. Valores de Concentração Bactericida Mínima (CBM) em µg/mL, para os óleos essenciais de copaíba e pitanga, óleo resina de copaíba, melitina e nisina.....	45
Tabela 6. Dados de absorvância das análises do composto nisina por análise de vermelho neutro	48
Tabela 7. Dados de absorvância das análises do composto clindamicina por análise de vermelho neutro.....	49
Tabela 8. Dados de absorvância das análises do composto melitina por análise de vermelho neutro.....	49
Tabela 9. Dados de absorvância das análises da combinação dos compostos Nisina + Clindamicina por análise de vermelho neutro.....	50
Tabela 10. Dados de absorvância tabulados das análises de DMSO por análise de vermelho neutro	50
Tabela 11. Resultados em percentual em marcação da população de células viáveis, de apoptose e morte tardia das células HaCaT com iodeto de propídio (PI) e FITC Anexina V (ANE V) após a exposição aos tratamentos com nisina, clindamicina e NIS+CLD.....	52
Tabela 12. Efluxo de íons potássio e fosfato, expresso em mg/L, após o tratamento de MRSA 2 ATCC com CIM e 2x CIM de melitina, nisina e oxacilina nos tempos 0 e 4 horas.....	54

Tabela 13. Efluxo de íons potássio e fosfato, expresso em mg/L, após o tratamento de *S. pyogenes* ATCC com CIM e 2x CIM de melitina, nisina e oxacilina nos tempos 0 e 4 horas.....54

Tabela 14. Efluxo de íons potássio e fosfato, expresso em mg/L, após o tratamento de *C. acnes* ATCC com CIM e 2x CIM de melitina, nisina e oxacilina nos tempos 0 e 4 horas.....54

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
h	Hora
Log	Logaritmo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
s	Segundo
µg	Micrograma
µL	Microlitro

Sumário

1. Introdução	17
2. Revisão Bibliográfica	18
2.1 Aspectos gerais sobre a resistência aos fármacos antimicrobianos	18
2.2 A pele	21
2.2.1 Microbiota	22
2.3 Patógenos implicados em doenças na pele	25
2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.3.2. <i>Streptococcus pyogenes</i>	26
2.3.3 <i>Cutibacterium acnes</i>	27
2.4. Biofilme	29
2.5. Produtos antimicrobianos naturais	31
3. Objetivos	34
4. Material e Métodos	35
4.1 Linhagens Bacterianas e Antibacterianos	35
4.2 Óleos essenciais e os PAMs	35
4.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	37
4.5. Curva de sobrevivência pela metodologia da densidade óptica (DO) a 600nm.	38
4.6. Análises de citotoxicidade pela metodologia de Vermelho neutro.	39
4.7. Análise de citotoxicidade da nisina e clindamicina por citometria de fluxo	40
4.8. Inibição da formação do Biofilme Bacteriano	40
4.9. Metodologia Efluxo de íons potássio e fosfato	41
5. Análise estatística	41
6. Resultados	42
6.1 Caracterização dos óleos essenciais	42
6.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	46
6.3 Curva de sobrevivência	47
6.4 Citotoxicidade pela metodologia de Vermelho neutro	49
6.5. Análise de citotoxicidade da nisina e clindamicina por citometria de fluxo	52
6.6. Efluxo de íons potássio e fosfato	55
6.7. Inibição da formação do Biofilme Bacteriano	56
7. Discussão	58
8. Conclusão:	64
9. Referências Bibliográfica	65
Apêndices A- Exsicata com folhas e flores de <i>Eugenia uniflora</i> (Pitanga)	73
Apêndices B- Exsicata com folhas e fruto de <i>Copaifera langsdorffii</i> (Copaíba)	74

1. Introdução

O uso dos fármacos antimicrobianos reduziu significativamente a morbidade e a mortalidade associada às doenças bacterianas. Contudo, este uso intenso e às vezes inapropriado, tem contribuído para o aumento na frequência de linhagens bacterianas resistentes a estes fármacos tornando-se um problema de saúde pública tanto para os países desenvolvidos como para os em desenvolvimento (Ghosh et al., 2020).

A resistência aos fármacos antimicrobianos ocorre devido uma variedade de mecanismos que dependem de fatores genéticos e ambientais, sendo que esta resistência ocorre principalmente por mutação genética ou aquisição de material genético exógeno (transferência horizontal de genes) (Lima et al., 2021).

Com o aumento no número de linhagens bacterianas resistentes, e consequente decréscimo nas opções terapêuticas, houve aumento na pressão para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos (Vrabl et al., 2022). Algumas estratégias têm sido aplicadas para mitigar esse problema como a conscientização do público sobre o uso mais direcionado dos fármacos antimicrobianos tanto na medicina humana como veterinária e agropecuária além da busca de novas terapias e novos compostos bioativos (O'Neill, 2016; Vrabl et al., 2022).

Os produtos naturais são considerados pilares importantes para desenvolvimento de antimicrobianos (Wright, 2017) devido a diversidade de suas propriedades biológicas (Gatadi et al., 2019). Diversos compostos naturais demonstraram seus efeitos antimicrobianos como os óleos essenciais (OEs) e os Peptídeos Antimicrobianos (PAMs), sendo estes últimos derivados de microrganismos, plantas, mamíferos, insetos e anfíbios.

Considerando que este estudo teve como abordagem testar sensibilidade de bactérias que ocasionam doenças na pele humana, é importante destacar que a pele se constitui em uma barreira eficaz contra as infecções bacterianas. Embora muitas bactérias entrem em contato, ou colonizem a pele, elas normalmente não conseguem causar infecções, porém, quando ocorrem as doenças bacterianas, estas podem ser desde infecções superficiais leves, que frequentemente se resolvem sem tratamento, até casos com risco de vida que requerem intervenções cirúrgicas de

1 emergência e antibioticoterapia intensiva (Leong & Gouliouris, 2021).

2 Este estudo teve como objetivo a realização de testes de sensibilidade
3 antibacteriana de produtos antimicrobianos de origem vegetal (óleos essenciais) e
4 PAMs sobre linhagens padrões ATCC de bactérias que podem causar infecções na
5 pele humana. Também foram realizados ensaios para verificar possíveis interações
6 destes produtos juntamente com fármacos antibacterianos convencionais, ensaios de
7 citotoxicidade sobre queratinócitos humanos, inibição da formação de biofilmes e
8 efluxo de íons potássio e fosfato visando acrescentar conhecimentos para uso destes
9 antimicrobianos na elaboração de um produto com finalidade terapêutica sobre
10 doenças de pele.

11 **2. Revisão Bibliográfica**

12 **2.1 Aspectos gerais sobre a resistência aos fármacos antimicrobianos**

13 A resistência aos fármacos antimicrobianos é um desafio de saúde pública na
14 atualidade, pois os isolados resistentes que eram restritos ao ambiente hospitalar
15 agora também são encontradas na comunidade como consequência da globalização
16 e o uso intensivo dos fármacos antimicrobianos. A estimativa é que até o ano de 2050
17 não existirão fármacos antibacterianos eficazes disponíveis se novas opções não
18 forem desenvolvidas. Isso demonstra a necessidade de buscar métodos alternativos
19 de controle de patógenos resistentes aos fármacos antibacterianos (Vivas et al.,
20 2019).

21 A intensa utilização dos antimicrobianos convencionais leva à disseminação da
22 resistência bacteriana, sendo que os genes que conferem resistência podem ser
23 facilmente transferidos entre as bactérias (Li et al., 2023). Jian et al (2021)
24 apresentaram um fluxograma (**Figura 1**) que ilustra o surgimento e a disseminação de
25 linhagens resistentes aos antimicrobianos atuais.

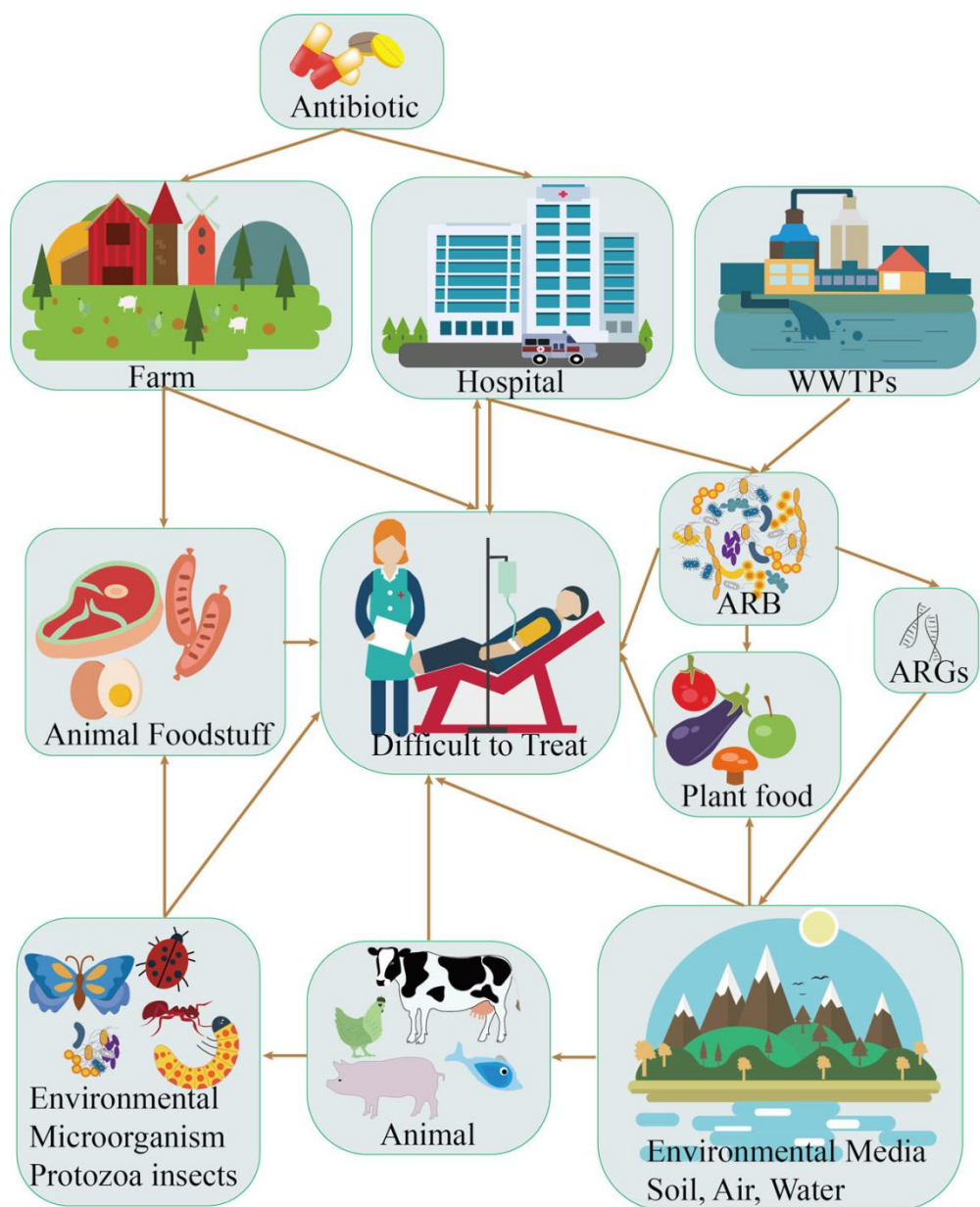


Figura 1. Fluxograma de propagação de genes de resistência aos fármacos antimicrobianos. (ARGs = genes de resistência aos fármacos antibacterianos; ARBs= bactérias resistentes aos fármacos antibacterianos (Jian et al., 2021).

1 Segundo a **Figura 1**, a origem e a base molecular da resistência bacteriana,
2 são a presença de genes de resistência aos fármacos antibacterianos (ARGs) e
3 bactérias resistentes aos fármacos antibacterianos (ARBs) são selecionadas quando
4 fármacos antibacterianos são utilizados na agropecuária, hospitais e comunidade em
5 geral. Por colonizarem os intestinos de humanos e animais, as ARBs são eliminadas
6 no ambiente, sendo que as fezes animais podem ser utilizadas como fertilizantes na
7 forma de águas residuárias com ou sem tratamento. As bactérias resistentes uma vez
8 no ambiente (solo, ar, águas superficiais e subterrâneas), podem transferir genes de

modo horizontal entre elas e patógenos oportunistas podem surgir com resistência múltipla. As ARBs no ambiente entram em insetos e protozoários e depois circulam entre animais e humanos por meio da cadeia alimentar, promovendo a transferência e disseminação de ARGs.

As bactérias conhecidas como ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) são consideradas bactérias de prioridade alta, devido a sua resistência aos antimicrobianos, podendo ocasionar infecções com alta morbidade e mortalidade, acarretando muitos dias de internação hospitalar e elevados custos com a saúde. Essas bactérias ainda podem disseminar seus genes de resistência entre humanos, animais e o ambiente (Santajit & Indarwattana, 2016).

O resultado desta transferência horizontal e mutação genética, é apresentado na forma de mecanismos bioquímicos da resistência (**Figura 2**). Estes mecanismos são variados, sendo que o mais comum é a modificação de fármacos por meio da ação de enzimas capazes de alterar e até mesmo destruir o fármaco; alteração do sítio de ação do fármaco; elevada expressão do alvo do fármaco; redução da concentração do fármaco no interior da célula bacteriana além da produção de biofilme que impede a difusão do fármaco na matriz do biofilme (Lima et al., 2021).

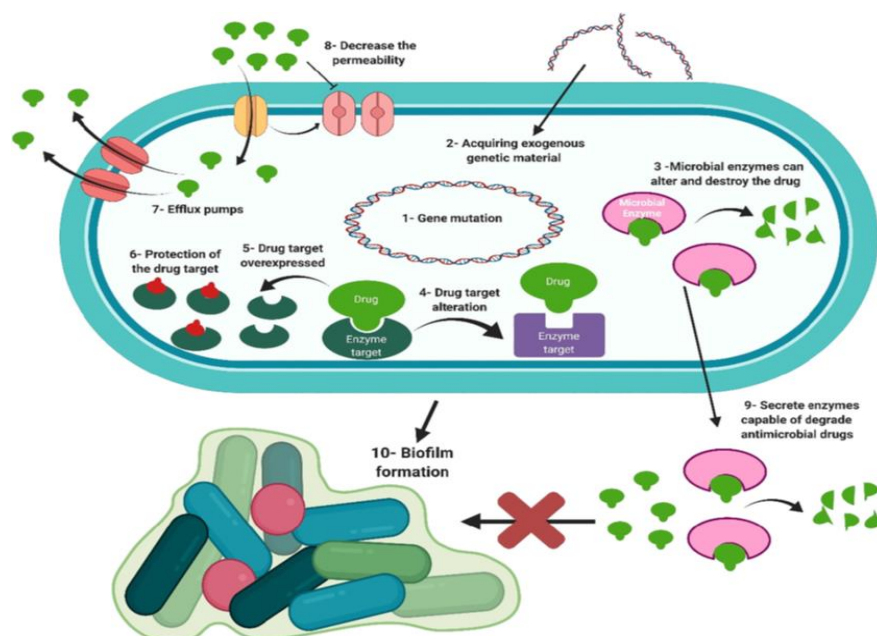


Figura 2. Diferentes Mecanismos pelos quais patógenos adquirem resistência aos fármacos antibacterianos (Lima et al, 2021).

2.2 A pele

A pele representa cerca 16% do peso corporal, sendo o maior órgão do corpo humano, atuando como uma fronteira entre o organismo e o ambiente externo. Além da sua função primordial, ela regula atividades essenciais, como proteção contra danos mecânicos; limita a absorção de substâncias; absorve a radiação ultravioleta (UV) e sintetiza vitamina D; regula a temperatura corporal e estabiliza a pressão sanguínea. Também desempenha um papel crucial no aspecto sensorial, transmitindo sensação de dor, frio e calor (Ribeiro, 2010). O pH fisiológico da pele varia entre 4,5 e 6,0, dependendo da região do corpo ou da idade, contribuindo para a proteção bactericida e fungicida na superfície do corpo (Rasche, 2014).

O sistema tegumentar já foi considerado o maior órgão do corpo humano, com atribuições importantes para o funcionamento geral do organismo, pois constitui uma barreira entre o meio interno e o meio externo (Gomes & Damazio, 2009). Histologicamente a pele é subdivida em duas camadas epiderme e derme que ficam apoiadas numa camada formada por tecido adiposo, a hipoderme, considerada uma camada subcutânea (Lyra et al, 2019).

Epiderme é a camada superior da pele, composta por epitélio estratificado escamoso com células de queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação. Os queratinócitos são o principal tipo celular presente neste epitélio, no entanto, também há presença de melanócitos que fornecem uma barreira contra a radiação ultravioleta (UV) por meio da melanina. A epiderme é composta por diversas camadas, também conhecida como estratos, sendo elas a camada córnea, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal (Pereira, 2011).

A segunda camada, a derme consiste predominantemente de matriz extracelular, como colágeno, que é produzida por fibroblastos e elastina (Chambers & Vukmanovic-Stejjic, 2020). A derme se subdivide em duas partes: a derme papilar, camada que está em contato direto com a epiderme e a derme reticular camada mais interna. As fibras de colágenos formam uma rede que sustenta as outras estruturas presentes no epitélio e conferindo maior resistência permitindo a deformação da pele e o retorno ao estado original. Na derme há presença de estruturas como vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, glândulas sudoríparas e folículos pilosos (Pereira, 2011).

A hipoderme é a camada da pele mais profunda, esta camada subcutânea consiste em tecido conjuntivo e células de gordura denominadas adipócitos, tendo espessura variável. Esta camada desempenha funções biológicas de proteção ao organismo contra choques mecânicos, manutenção da temperatura corporal e acúmulo de energia e mobilidade da pele em relação às estruturas subjacentes (Leonardi, 2008; Lyra et al, 2019).

2.2.1 Microbiota

A pele está na interface entre a complexa fisiologia do organismo animal e o ambiente externo e por ser uma barreira epidérmica semipermeável evita tanto o escape de umidade quanto a entrada de agentes infecciosos ou substâncias tóxicas (Segre, 2006, Rosenthal et al. 2011, Hall et al., 2018). Também representa um habitat para comunidades microbianas, cujas interações com o hospedeiro são dinâmicas e compreendem microrganismos que variam em função dos locais anatômicos (Ito & Amagai, 2023). Algumas características extremas da pele, como desidratação e pH ácido e poucos nutrientes, contribuem para as adversidades que os patógenos enfrentam quando colonizam a pele humana (Byrd et al., 2018).

A **Figura 3** apresenta a estrutura da pele e microbiota com destaque para as interações com a microbiota (vírus, bactérias, fungos e ácaros). Esta microbiota está distribuída na epiderme, folículos capilares, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas, que fornecem vários microambientes para os microrganismos comensais. A presença dos microrganismos comensais da pele atua como uma barreira contra patógenos, prevenindo a colonização e invasão por competição por nutrientes (Ito & Amagai, 2023).

A microbiota da pele humana varia de acordo com o microambiente ocupado bem como em função das atividades dos apêndices da pele, podendo ser categorizados como sebáceos (oleosos), úmidos ou secos além de outros fatores tais como locais, sistêmicos, ambientais e decorrentes do estilo de vida do hospedeiro (Grice & Segre, 2011; Byrd et al, 2018; Tryon & Grice, 2022). Na **Figura 4** são destacados estes fatores, tais como produtos utilizados na pele, higiene, dieta, idade, sistema imune, clima e poluição.

A microbiota também aumenta a barreira química protetiva da pele ao produzir lipases que digerem os triglicerídeos do sebo em ácidos graxos livres, que ampliam a

1 acidez da pele e restringem a colonização por espécies transitórias e patogênicas. A
2 microbiota da pele humana é composta principalmente por bactérias pertencentes aos
3 gêneros *Staphylococcus*, *Cutibacterium*, *Micrococcus* e *Corynebacterium* (Byrd et
4 al.,2018). Os microrganismos da pele têm papel essencial na proteção contra
5 patógenos invasores bem como estimular o sistema imunológico pela indução de
6 tolerância imunológica. Para manutenção da homeostase da pele alguns
7 microrganismos contribuem nas defesas inatas e adaptativas, tais como a liberação
8 de PAMs modulando assim as respostas imunológicas por meio da interação
9 hospedeiro-microbiota (Tryon and Grice, 2022).

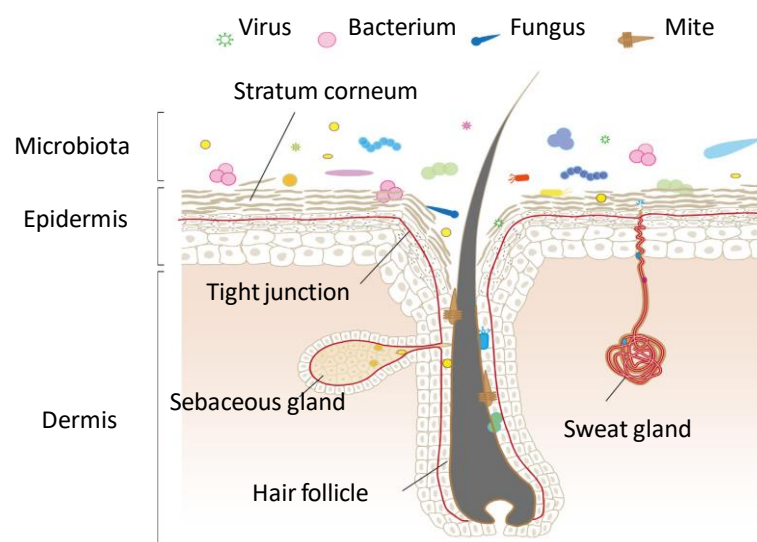


Figura 3. Estrutura da pele e microbiota. (Ito & Amagi, 2023)

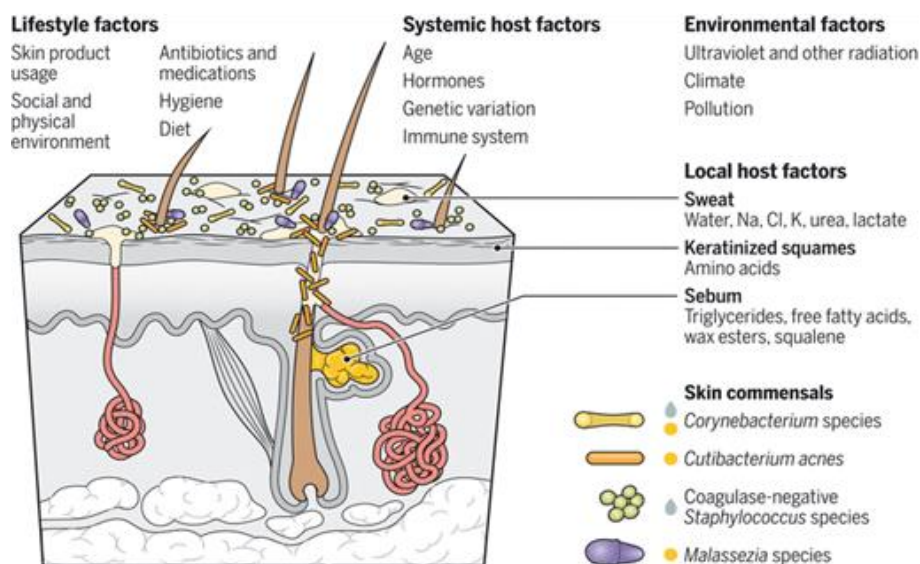


Figura 4. Fatores que influenciam na colonização microbiana da pele (Tryon & Grice, 2022).

O sistema imunológico evoluiu em estreita colaboração com os microrganismos residentes na pele. A ligação de padrões moleculares associados a patógenos a receptores de reconhecimento de padrões desencadeia respostas imune inata, resultando na liberação de PAMs como a catelicina LL-37. Sintetizados por espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa, especialmente *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus hominis*, capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, presente em indivíduos com dermatite atópica. Nakatsuji, et al. (2017), também corroborado por Parlet et al. (2019), afirmam que a reintrodução de cepas produtoras de PAMs em peles humanas com dermatite atópica ocasionam uma diminuição da colonização por *S. aureus*, reforçando que as bactérias comensais da pele a protegem contra patógenos e demonstram como a disbiose do microbioma da pele pode levar à doença.

Apesar da presença da microbiota da pele ser importante para saúde da pele, a disbiose pode levar a várias doenças de pele como a dermatite atópica. A proliferação de um isolado bacteriano e a diminuição da diversidade da comunidade microbiana acarreta a disfunção da barreira protetiva da pele além da ocorrência de anormalidades imunológicas (Ito & Amagai, 2023). Há também evidências de que danos e sensibilização da pele podem influenciar na imunologia de outros locais do organismo como os intestinos e pulmões. Segundo Leyva-Castillo et al. (2019), danos superficiais na pele fazem com que os queratinócitos liberem IL-33 (Interleucina-33) sistemicamente. Em sinergia com a IL-25, a IL-33 desencadeia a ativação de ILC2s no intestino para gerar IL-4. Isto, por sua vez, estimula a expansão dos mastócitos no intestino, onde estão preparados para exacerbar repostas aos alérgenos e causar a anafilaxia.

O microbioma da pele é fundamental para a homeostase e patogênese de diversas doenças. Conforme mencionado previamente, a variabilidade microbiana está relacionada ao hospedeiro, ao seu comportamento e a fatores ambientais, ou a combinação deles, e que possuem potencial de ocasionar alteração da microbiota causando disbiose (Rosenthal et al, 2011; Ito & Amagai, 2023). Por fim, os microrganismos comensais estão em simbiose e contribuem para a saúde humana por meio da produção de moléculas de defesa ou antimicrobianos naturais. (Baviera et al, 2014).

2.3 Patógenos implicados em doenças na pele

As doenças de pele geralmente são classificadas de acordo com os tecidos específicos envolvidos como por exemplo os folículos pilosos (foliculite) até a fáscia profunda (fasciíte). As diretrizes da *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) de 2014 descrevem uma classificação das doenças baseadas na gravidade (leve, moderada ou grave) e na distinção entre infecções purulentas (furúnculos, carbúnculos, abscessos) e não purulentas (celulite, erisipela, fasciíte necrosante) (Stevens et al., 2014).

Embora *Staphylococcus aureus* e estreptococos beta-hemolíticos representem os mais comumente isolados nestas doenças, mais recentemente organismos Gram-negativos, bem como infecções mistas tanto por Gram-negativos e positivos também tem se mostrado causas significativas de infecções cutâneas agudas (Kaye et al., 2019).

2.3.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus é um patógeno oportunista Gram-positivo comumente associado a doenças de pele e em tecidos moles (impetigo contagioso, dermatite supurativa e foliculite) além de outras manifestações clínicas. As doenças ocorrem quando a bactéria ultrapassa as camadas protetoras externas da pele e mucosa sobrevivendo as defesas inatas devido expressão de adesinas, exoenzimas, toxinas, superantígenos, polissacarídeos associados à superfície, cápsula e outros fatores para sobrevivência no hospedeiro além de produção de biofilme (Keim & Horswill, 2023).

Um relatório do programa de vigilância antimicrobiana, que reuniu dados de doenças infecciosas de pele e tecidos moles (IPTM) em diferentes hospitais da América do Norte, América Latina e Europa durante sete anos (1998–2004), descreveu o *S. aureus* como o principal agente etiológico e o mais frequentemente isolado com um total de 33,5%, sendo que o *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) apresentou percentual de 68,3% em um total de 498 isolados de *S. aureus* em doenças de pele em um hospital na Colômbia (Valderrama-Beltrán et al., 2019).

Desde seu surgimento, em 1961, o MRSA disseminou amplamente, podendo

ocasionar desde lesões cutâneas a casos graves como pneumonia, meningite, endocardite e septicemia com elevada mortalidade. Comparadas às infecções causadas por *S. aureus* sensíveis à meticilina, as causadas por MRSA costumam ser mais graves e de difícil tratamento (Vivas et al., 2019).

S. aureus e *Streptococcus pyogenes* são as bactérias causadoras de infecções de pele, e antimicrobianos orais ou tópicos, como β -lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina e quinolonas, são prescritos dependendo da gravidade e disseminação das lesões infecciosas (Kurokawa et al., 2022).

2.3.2. *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes (*S. pyogenes*) é um *Streptococcus* do grupo A de Lancefield β -hemolítico, comumente referido como GAS. É um coco Gram-positivo com tendência de formar longas cadeias quando cultivada em meio líquido. GAS é um anaeróbio facultativo, beta-hemolítico em ágar sangue (5%), forma colônia ao redor de 0,5 mm assim como uma grande zona de hemólise (Doern, 2022). *S. pyogenes* também expressa uma variedade de fatores de virulência que são cruciais para adesão, colonização, disseminação e evasão das defesas imunológicas (Bae et al., 2022)

O *S. pyogenes* é agente de uma variedade de doenças, desde infecções autolimitadas da garganta e da pele e que pode também causar a síndrome de choque tóxico estreptocócico (STSS). Podem ocorrer complicações não supurativas pós-infecciosas de doença cardíaca reumática (febre reumática) e glomerulonefrite aguda (Jespersen et al., 2020, Dhekane, et al., 2023).

Além de impetigo, o *S. pyogenes* é uma das causas mais comuns de erisipela, celulite e fascíte necrosante. O impetigo primário ocorre devido à invasão bacteriana direta da pele saudável e se manifesta como lesões maculopapulares ou vesiculares que muitas vezes ficam cobertas por crostas de cor amarela. O impetigo secundário pode ocorrer quando as bactérias entram por barreiras cutâneas rompidas resultante de trauma, picada de inseto ou doenças crônicas da pele (Lam et al., 2022).

Há evidências epidemiológicas de que a falta de higiene pessoal é um importante fator de risco para o desenvolvimento de piodermite estreptocócica (Bennett et al., 2022). Estudos demonstraram que há alta incidência em pacientes colonizados em pele intacta, resultando em lesões cutâneas em poucas semanas que

se iniciam como uma pápula que rapidamente se transforma em uma vesícula cercada por eritema que após uma semana se decompõem para formar uma crosta espessa (Doern, 2022).

Dada a importância clínica dos estreptococos beta-hemolíticos, diferenciá-los é fundamental para determinar o significado clínico dos resultados das culturas. Historicamente, alguns laboratórios utilizam testes, como o fator CAMP e suscetibilidade à bacitracina, para diferenciar os estreptococos beta-hemolíticos, embora a espectrometria de massa por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) esteja ganhando força para identificação de bactérias (Doern, 2022).

O tratamento atual para infecções por *S. pyogenes* é baseado em antimicrobianos convencionais e na profilaxia dos sintomas, sendo a penicilina e a clindamicina os principais antimicrobianos utilizados para infecções cutâneas estreptocócicas. Embora o uso desses antimicrobianos tenha sido eficaz no tratamento de infecções por *S. pyogenes*, a resistência a esses tratamentos tem aumentado ao redor do mundo. Desta forma é necessário estabelecer novos tratamentos ou estratégias para promover o uso adequado dos fármacos antibacterianos existentes (Bae et al, 2022).

2.3.3 *Cutibacterium acnes*

O *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) é uma espécie bacteriana comum na pele e era anteriormente conhecido como *Propionibacterium acnes*, tendo a sua renomeação ocorrida no ano de 2016 (Andrade et al., 2018). *C. acnes* é uma bactéria em forma de bastonete, Gram-positiva, não formadora de esporos e anaeróbia. Presente na microbiota da pele como um comensal, principalmente encontrada em associação com glândulas sebáceas e folículos pilosos além de poder estar presente também na cavidade oral, respiratório superior, trato gastrointestinal e geniturinário. Além disto, coloniza frequentemente os ombros, quadris e os joelhos, sendo que os indivíduos do sexo masculino tendem a ter maior colonização com este comensal do que as do sexo feminino (Corbisiero, et al, 2023). É também um colonizador dos folículos pilosos da pele de humanos saudáveis especialmente do rosto (Ahle et al, 2023).

Esta bactéria, que representa uma pequena fração das bactérias presente na superfície da pele, é capaz também de preservar a homeostase da pele protegendo da invasão de microrganismos patogênicos (Boyanova, 2023). Embora não seja

1 comumente patogênica, esta bactéria pode ocasionar doenças invasivas de pele e
2 tecidos moles e associadas a implantes (articulações protéticas, implantes,
3 dispositivos cardiovasculares e cerebrovasculares) (McKean et al, 2020).

4 A acne vulgar (acne) é uma doença inflamatória das glândulas sebáceas da
5 pele, em especial do rosto, pescoço, tórax e costas, que é resultado da interação de
6 vários fatores (Lee et al, 2014). Dentre estes fatores, há o aumento da produção de
7 sebo pelas glândulas sebáceas e queratinização folicular dos ductos pilossebáceos,
8 além de outro fator recentemente descoberto que é a própria microbiota da pele e
9 suas interações com o sistema imunológico inato. A acne se desenvolve também
10 devido a fatores tais como o desequilíbrio hormonal, doenças bacterianas, estresse,
11 alimentação e uso de cosméticos (Lee et al., 2014, Drenó et al, 2020, Lim et al., 2021).
12 Além disso, *C. acnes* desempenha um papel real em outras doenças, incluindo uma
13 doença rara chamada síndrome SAPHO (sinovite, acne, pustulose, hiperostose,
14 osteíte) (Corbisiero et al, 2023).

15 A identificação de *C. acnes* muitas vezes representa um desafio diagnóstico
16 que requer correlação clínica para descartar a possibilidade de contaminação, dada a
17 onipresença deste organismo como comensal na pele humana. No entanto, as
18 doenças causadas por *C. acnes* são cada vez mais reconhecidas devido ao crescente
19 número de métodos de diagnóstico molecular, tais como a amplificação do rRNA 16S
20 (Corbisiero et al, 2023).

21 A espécie é polifilética incluindo três subespécies distintas designadas *C. acnes*
22 subsp. *acnes* (filotipo I também subdividido em filotipos IA1, IA2, IB, IC), *C. acnes*
23 subsp. *defendans* (filotipo II); *C. acnes* subsp. *elongatum* (filotipo III) sendo que a
24 colonização da pele com múltiplos isolados de *C. acnes* (IA1, IB e II) aumenta
25 consideravelmente durante a puberdade (Ahle et al, 2023).

26 Segundo Drenó et al, (2020), a compreensão do papel de *C. acnes* na
27 fisiopatologia da acne passou por uma mudança de paradigma, ou seja, em vez da
28 hiperproliferação de *C. acnes*, é a perda de equilíbrio e diversidade entre os diferentes
29 filotipos de *C. acnes*, juntamente com uma disbiose do microbioma da pele, e isto atua
30 como um gatilho para ativação do sistema imunológico inato e que tem como
31 resultados a inflamação cutânea. Foi observada também a predominância do filotipo
32 IA1 de *C. acnes*, com perfil mais virulento na acne do que na pele normal.

1 As doenças por *C. acnes* ocorrem por conta de uma série de fatores de
2 virulência, porém, é suscetível aos beta-lactâmicos, quinolonas, clindamicina e
3 rifampicina, embora a resistência à clindamicina esteja aumentando. O tratamento
4 frequentemente requer uma combinação de cirurgia e de tratamento prolongado com
5 antibacterianos podendo ter um curso de 3 a 6 meses de tratamento, incluindo 2 a 6
6 semanas de tratamento intravenoso com betalactâmico (Achermann et al., 2014).

7 Antimicrobianos como o adapaleno e a tetraciclina são agentes terapêuticos
8 típicos para doenças inflamatórias da pele induzidas por *C. acnes*, porém seu uso
9 excessivo pode levar a efeitos colaterais, como a irritação da pele. Evidências
10 mostraram também que os medicamentos fitoquímicos são de uso potencial como por
11 exemplo os flavonoides, saponinas e panaxinol (composto não saponina) (Wei et al.,
12 2021).

13 O uso de saponinas (sapindosídeos A e B) obtidas de *Sapindus mukorossi*
14 Gaertn mostrou que a combinação sinérgica das duas saponinas A e B, com destaque
15 para melhor ação do tipo A, causou lise de *C. acnes* pela ação direcionada a
16 membrana celular que promoveu aumento da permeabilidade por destruir a sua
17 integridade, sua ultraestrutura e alterar composição química da membrana (Wei et al.,
18 2021).

19 **2.4. Biofilme**

20 O biofilme consiste em uma comunidade de microrganismos organizados
21 de forma tridimensional numa arquitetura complexa que vive em superfícies e é
22 encapsulado, possui proteínas e pode ou não conter DNA externo (eDNA)
23 (Venkatesan et al, 2015). As bactérias secretam matrizes de substâncias
24 polimérica extracelulares, que são geralmente compostas de exopolissacarídeos
25 (compostos de alto peso molecular constituído de açúcares). As estruturas
26 formadas no biofilme possuem canais pelos quais os nutrientes podem circular e
27 as células podem exibir diferentes padrões de expressão gênica (Rabin et al,
28 2015).

29 O biofilme permite a sobrevivência das bactérias em ambientes hostis.
30 Apesar da forma planctônica das bactérias possuírem um crescimento celular e
31 taxa de reprodução alta, a formação do biofilme aumenta a tolerância das bactérias
32 ao ambiente (Pereira et al, 2020). Os biofilmes são comunidades microbianas que

1 aderem a estruturas bióticas ou abióticas, evitando que as bactérias sejam lavadas
2 pelo fluxo de água ou corrente sanguínea por simplesmente estarem atreladas a
3 superfícies ou tecidos (Hall et al, 2016).

4 A formação do biofilme pode ser descrita em três estágios: aderência,
5 maturação e dispersão. A fase de aderência pode ser dividida em duas partes:
6 aderência a superfície e a formação de microcolônias. Na primeira parte as
7 bactérias dependem dos flagelos para interação inicial entre célula e superfícies.
8 As bactérias podem aderir através de diferentes forças, como hidrofóbicas,
9 eletrostática, força de Vander Walls, entre outras. Na segunda parte, a motilidade
10 de contração mediadas pelo pili permite que as células se agreguem e formem as
11 microcolônias. Na etapa de maturação, a produção da matriz polimérica
12 extracelular envolve as estruturas formadas, fornecendo características estruturais
13 de cada espécie. Na dispersão, em todo o biofilme ou apenas em parte dele,
14 ocorre a liberação de bactérias planctônicas para propagação de novos biofilmes
15 em outros locais (Venkatesan et al, 2015; Rabin et al, 2015; Pereira et al, 2020).

16 Para a formação e dispersão do biofilme, as bactérias precisam sincronizar
17 sua expressão genética e essa regulação acontece por meio do *quorum sense*
18 (comunicação célula a célula). Para que esse processo ocorra uma variedade de
19 interações intra e intercelulares, sinais denominados de autoindutores. Os
20 autoindutores são detectados por receptores específicos induzindo ou reprimindo
21 a expressão do gene alvo. O sistema de *quorum sensing* é codificado pelo locus
22 do gene *agr* (gene acessório regulador) em *S. aureus* (Solano et al, 2014; Rabin et
23 al, 2015; Pereira et al, 2020).

24 As bactérias associadas ao biofilme são altamente resistentes aos
25 antimicrobianos. Esse fato pode ocorrer, pois o biofilme limita a difusão dos
26 antimicrobianos. Diversos fatores podem ser atribuídos a resistência do biofilme
27 aos antimicrobianos, essas incluem: encapsulamento de matriz de substâncias
28 poliméricas extracelular, baixa expressão de proteínas, diminuição dos fatores de
29 crescimento, diferentes fenótipos, ativação de bombas de efluxo e comunicação
30 intercelular. As doenças bacterianas persistentes, e aumento da resistência aos
31 antimicrobianos, pode muitas vezes ser atribuídos à formação de biofilme
32 (Venkatesan et al, 2015; Rabin et al, 2015)

2.5. Produtos antimicrobianos naturais

Nos últimos anos, o aumento sem precedentes da resistência aos fármacos antibacterianos, juntamente com a falta de terapias adequadas, tornou o tratamento de doenças infeccções cutâneas e feridas crônicas um desafio clínico. Desta forma, a utilização de moléculas naturais com características antimicrobianas e com capacidade de apoiar a cicatrização de feridas, pode ser interessante para o tratamento destas doenças da pele e dos tecidos moles (Raileanu et al., 2023).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OE) está associada à presença de metabólitos secundários sintetizados pelas plantas. Seu mecanismo de ação envolve a interação de seus componentes hidrofóbicos com os lipídios presentes na membrana celular do microrganismo, resultando em danos metabólitos e consequente morte celular (Silva et al, 2021).

Os OE são fluídos hidrofóbicos e aromáticos extraídos de plantas, que tal como a maioria dos produtos obtidos a partir de matrizes biológicas, apresenta uma composição química complexa. Esses óleos são compostos por moléculas voláteis, como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropenos. Os componentes dos OE são biossintetizados pelas plantas como metabólitos secundários e desempenham um papel importante na proteção contra patógenos e predadores (Porto de Matos et al., 2019). Os OE constituem uma parte importante da biodiversidade natural e são importantes fontes para vários setores, tais como cosméticos, fragrâncias, perfumaria e indústrias farmacêuticas (Swamy & Sinniah, 2015). Além disso, os OE tornaram-se um dos substitutos naturais em ascensão por apresentarem propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, antivirais, antiparasitárias e inseticidas (Ahmed et al., 2021).

O óleo de copaíba é utilizado especialmente em regiões tropicais e, no Brasil, é comumente extraído na Amazônia e região central, inclusive sendo exportado para vários países. O óleo-resina da copaíba é um exsudado constituído por ácidos resinosos e compostos voláteis (Veiga & Pinto, 2002). Os componentes bioativos mais presentes no óleo da copaíba são os sesquiterpenos e diterpenos. Possuem inúmeras propriedades importantes como atividade analgésica,

antiparasitária, anti-inflamatória, larvicida, expectorante, diurética e antibacteriana (Norcino et al., 2020).

A pitangueira (*Eugenia uniflora*) é uma árvore nativa do Brasil encontrada principalmente na região sul e sudeste, mas é cultivada em vários países subtropicais. Uma grande diversidade de nutrientes e componentes bioativos é encontrada nas folhas e nos frutos. Foram demonstrados em estudos anteriores que as folhas da pitanga têm constituintes como antraquinonas, esteroides, terpenos, flavonoides, taninos, dentre outros. Os efeitos antimicrobianos, antiviral, antifúngico e antioxidante no metabolismo dessa planta têm sido observados. O óleo essencial das folhas de *E. uniflora* demonstrou atividade antibacteriana contra espécies patogênicas Gram-positivas (Fidelis et al., 2022).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) ocorrem naturalmente em todos os organismos vivos, como bactérias, fungos, plantas e animais, podendo compor a primeira linha de defesa da imunidade inata de animais e plantas. Os PAMs compartilham algumas características como aminoácidos, tamanho, carga, estrutura secundária e hidrofobicidade. Em geral, essas moléculas são pequenas, catiônicas, contêm resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e/ou apolares, estruturas de alfa hélice, momento hidrofóbico e anfipaticidade (Torres et al., 2019). Além disso, os PAMs possuem como vantagem poucos relatos na literatura de microrganismos patogênicos resistentes (Guilhelmelli et al., 2013; Andersson, 2016).

A ruptura da membrana é o modo de ação mais importante e primário para a atividade antimicrobiana desses peptídeos, porém não sendo o único, podendo inibir também funções celulares. Uma vez dentro da célula microbiana, os PAMs podem inibir a parede celular, DNA, RNA e síntese de proteínas, bem como inibir a atividade de enzimas, podendo levar ao colapso das vias metabólicas e resultar em morte celular (Lima et al., 2021, Deo et al., 2022). Considerando tais mecanismos de ação possíveis, Deo et al. (2022), descreveram os sítios possíveis de serem afetados pela ação dos mais variados PAMs, sendo que na **Figura 5**, são apresentados os principais sítios e respectivos PAMs capazes de resultar em morte bacteriana.

A nisina é uma bacteriocina, da classe Ia também conhecida como lantibiótico, e é produzida por *Lactococcus lactis* e *Streptococcus uberis* (Zaschke-Kriesche, 2019). Esse peptídeo contém uma ação de amplo espectro contra diversas bactérias Gram-positivas (Delves-Broughton et al., 1996). É uma bacteriocina considerada segura para consumo (GRAS - *Generally Recognized As Safe*) e utilizada na indústria alimentícia para a preservação de alimentos. Seu modo de ação implica na sua capacidade de formar poros na membrana bacteriana (Guilhelmelli et al., 2013).

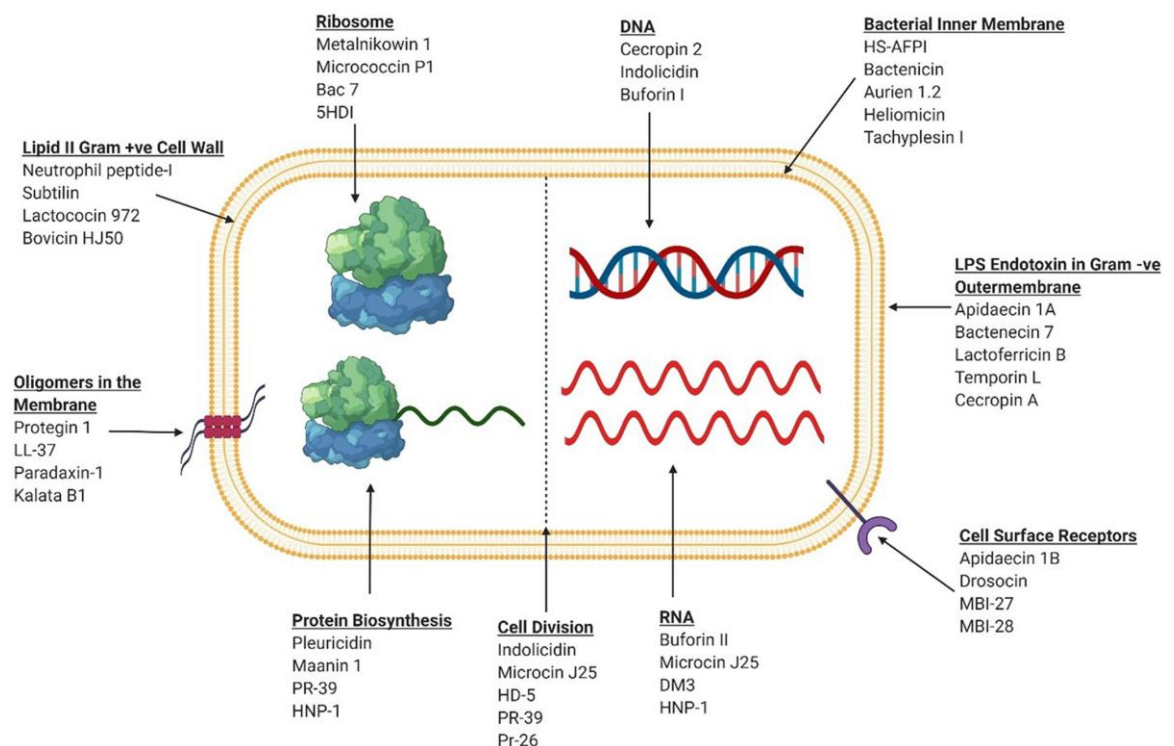


Figura 3. Componentes celulares que são conhecidos sítios de ação dos PAMs e os principais PAMs. Made with BioRender.com. Deo, et al. (2022)

- 1 O desafio do uso da nisina envolve o desenvolvimento de uma melhor forma
- 2 de administrá-la terapeuticamente, uma vez que as enzimas presentes no trato
- 3 gastrointestinal as inativam, sendo o uso tópico, intranasal ou intravenoso uma
- 4 alternativa. Alguns estudos preliminares mostraram que a nisina administrada por
- 5 via intranasal inibiu o crescimento de *S. aureus* no trato respiratório de ratos
- 6 imunocomprometidos (Vivas et al., 2019). Heunis et al (2013) também
- 7 demonstraram que nanofibras contendo nisina em curativos de feridas tem
- 8 potencial para tratar infecções cutâneas por *S. aureus*.

O veneno de abelha *Apis mellifera* tem sido amplamente utilizado como tratamento oriental para diversas doenças inflamatórias e infecções bacterianas (Choi et al., 2015), porém o veneno de abelha é intrinsecamente tóxico. O principal componente do veneno de abelha *Apis mellifera*, a melitina, é um peptídeo linear catiônico de 26 resíduos de aminoácidos com a sequência: GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH₂. A melitina liga-se às membranas de bicamada lipídica, dobra-se em uma estrutura secundária anfipática α -helicoidal e rompe a barreira de permeabilidade. Estudos experimentais e computacionais forneceram evidências de que a inserção da melitina nas membranas citoplasmáticas bacterianas ocasiona a permeabilização da membrana que leva à morte celular por ruptura da membrana (Guha, et al., 2021).

A incapacidade dos antimicrobianos de penetrar através do biofilme é um dos fatores importantes. Alguns resultados demonstraram que a melitina não só pode inibir o crescimento de MRSA, mas também reduzir as populações de células na forma de biofilme em concentrações subinibitórias e isso provavelmente se deve à capacidade da melitina de penetrar no biofilme bacteriano (Alni et al., 2020). Consequentemente, peptídeos catiônicos antimicrobianos, caso da melitina, são bons candidatos para antibioticoterapia anti-MRSA com as suas atividades antibacterianas e antibiofilme, corroborando também com os resultados obtidos por Pereira et al. (2020).

3. Objetivos

O objetivo do estudo foi testar atividade antibacteriana dos óleos essenciais de pitanga (*Eugenia uniflora*), de copaíba (*Copaifera langsdorffi*) e óleo resina de copaíba (*Copaifera reticulata*) além dos PAMs nisina e melitina, sobre linhagens padrões ATCC (*American Type Culture Collection*) de *S. aureus* meticilina resistente (MRSA), *S. pyogenes* e *C. acnes*. Foram também avaliados a inibição da formação de biofilmes, ação sobre membrana plasmática (liberação de íons fosfato e potássio), citotoxicidade pela metodologia do vermelho neutro e por citometria de fluxo sobre linhagem de queratinócitos humanos (célula HaCaT) e finalmente sinergismo destes produtos com fármacos antibacterianos convencionais (oxacilina, cefalotina e clindamicina) para os produtos com as melhores ações inibidoras sobre as bactérias testadas.

4. Material e Métodos

4.1 Linhagens Bacterianas e Antibacterianos

Foram testadas linhagens bacterianas padrões *S. aureus* meticilinaresistente (MRSA) ATCC 33591, *S. pyogenes* ATCC 19615 e *C. acnes* ATCC 6919. Para o controle dos experimentos de sensibilidade foram utilizados os fármacos oxacilina (Sigma Aldrich - Oxacilina Sódica) nos ensaios com MRSA, cefalotina (Sigma Aldrich - Cephalotin Sodium) com *S. pyogenes* e clindamicina (Fosfato de Clindamicina - Embraparma) para *C. acnes*.

4.2 Óleos essenciais e os PAMs

Os OE de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e pitanga (*Eugenia uniflora*) foram extraídos no Laboratório de Bacteriologia e Produtos Naturais do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas – Setor de Microbiologia e Imunologia no Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), utilizando equipamento para extração do tipo Clevenger da marca Marconi modelo MA480 (**Figura 6**), segundo princípio do arraste por vapor a partir de folhas frescas de cada planta. Folhas de *Copaifera langsdorffii* foram coletadas uma única vez, e de um único indivíduo da espécie, na manhã do dia 22/11/2021 no município de Avaré, São Paulo (23°15'34,99"S e 48°58'46,48"O, elevação 588 m) enquanto as folhas de *Eugenia uniflora* foram coletadas também uma única vez e de um único indivíduo da espécie em 02/2022, no Campus da UNESP de Botucatu, município de Botucatu, São Paulo (22°53'14,07"S e 48°29'59,86"O, elevação 871 m).

Foram preparadas as respectivas exsiccatas das amostras das plantas coletadas, sendo identificadas e depositadas no Herbário “Irina Delanova De Gemtchujnicov” do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, com os números de identificação Botu-37461 e Botu-37487 respectivamente. Também foi submetido o protocolo ao sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, tendo recebido o número de cadastro AF6B12E.

Em relação aos demais produtos testados, o óleo resina de copaíba, extraído de tronco da planta *Copaifera reticulata*, foi obtido na forma comercializada de empresa Plumerya Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 100% puro (PL 4207)

1 testado por cromatografia gasosa realizado pela própria empresa. Os PAMs melitina
2 e nisina foram obtidos da empresa Sigma Aldrich, tendo purezas ao redor de 63% e
3 2,5% respectivamente. Segundo informações do distribuidor da nisina (Nisin from
4 *Lactococcus lactis*, Sigma Aldrich® do Brasil, produto código 8 N5764-5G) esta tem
5 peso molecular de 3.354,07 g/mol, sendo a potência do produto correspondente a
6 1.000,000 UI (Unidades Internacionais)/grama. Considerando a grau de pureza de
7 2,5%, calculou-se em 40 UI/μg de nisina pura contida no produto adquirido. Quanto a
8 melitina, esta tem peso molecular de 2846,46 g/mol.



Figura 4. Fotos do destilador para extração dos óleos essenciais de *C. langsdorffii* e *E. uniflora*, marca Marconi modelo MA 480

9 **4.3. Caracterização química dos óleos essenciais e óleo resina**

10 As análises da composição química dos OE foram realizadas sob
11 responsabilidade da equipe da pesquisadora Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques do
12 Centro de Pesquisa de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agrônomo de
13 Campinas (IAC). Foi utilizado um cromatógrafo a gás Thermo Scientific (modelo
14 TRACE 1300 Series GC) equipado com detector de ionização em chamas (DIC),
15 espectrômetro de massas (modelo ISQ 7000) e injetor automático Triplus RSH, com
16 divisão de fluxo de 3:7, para o EM e DIC, respectivamente. O injetor foi mantido a
17 220 °C com divisão de vazão do gás de arraste (hélio) na razão de 1:20. O
18 espectrômetro de massas (EM) operou no modo *full scan*, com ionização por impacto
19 de elétrons (70 eV), faixa de aquisição de 40 a 450 m/z, interface a 240 °C e transfer

line a 250 °C. A separação das substâncias foi realizada em coluna capilar Rtx-5 MS (20 m x 0,18 mm x 0,2 µm), com vazão de gás de arraste de 0,5 mL.min⁻¹ no seguinte programa de temperatura: 60 °C -240 °C, 3 °C. min⁻¹. A quantificação das substâncias foi realizada pelo método de normalização de área com detecção por ionização em chama (DIC). A identificação das substâncias foi efetuada por meio da análise comparativa dos espectros de massas com as bibliotecas National Institute of Standards and Technology (NIST 14); Flavour & Fragrance Natural & Synthetic Compounds (FFNSC3) e os índices de retenção linear das substâncias (IRL) com a literatura (Adams, 2017). Os índices de retenção linear foram obtidos a partir da injeção de uma série de n-alcanos (C9-C24, Sigma-Aldrich, 99%) nas mesmas condições cromatográficas das amostras, aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963). O LTPRI relativo de cada substância foi determinado por meio da injeção de uma mistura de n-alcanos (C9-C24, Sigma-Aldrich, 99%) nas mesmas condições cromatográficas das amostras, utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

Com relação a caracterização química do óleo resina de *C. reticulata*, obtida da empresa Plumerya Ltda, foram apresentadas conforme descrição a seguir para as condições de análise: cromatografia gasosa de alta resolução em cromatógrafo a gás HP5890, utilizando coluna RTX-5, 50 m x 0,32mm x 0,2 µm (Restek), com temperaturas: coluna 100 °C (2 min.), 5 °C/min, injetor: 230 °C, split:1/100 e detector FID: 260 °C.

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

Os ensaios de sensibilidade foram realizados de acordo com a metodologia da microdiluição em microplacas de Elisa de 96 poços (*Resazurin Microtiter Plate Assay* - REMA) adaptada de Martin et al (2003), sendo as concentrações dos tratamentos realizados em meio *Brain Heart Infusion* Caldo (BHI) em um volume total de 100 µL e concentrações dos produtos testados variando de 1 a 8000 µg/mL. A mistura dos produtos, especialmente para os produtos vegetais, no meio de cultura foi obtida pela adição de Tween 80 (0,5%) no meio de cultura. Foram preparadas suspensões bacterianas a partir das culturas das bactérias utilizando a escala McFarland que corresponde a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). As

suspensões bacterianas foram corrigidas para uma concentração aproximada de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL e 100 μ L da suspensão foi adicionada junto aos 100 μ L dos produtos diluídos em meio de cultura, totalizando 200 μ L em cada poço da placa e seguida de incubação em aerobiose a 37 °C por 24 horas para MRSA e *S. pyogenes*. Todos os ensaios de sensibilidade e/ou cultivos de *Cutibacterium acnes* foram realizados em jaras de anaerobiose do tipo GasPak™ com geradores de anaerobiose da marca BD BBL a 37 °C/48h. Ensaios controle por microdiluição também foram realizados utilizando os fármacos oxacilina (MRSA), cefalotina (*S. pyogenes*) e clindamicina (*C. acnes*); controles negativos (meio de cultura sem bactéria). Para leitura foi feita observação de turvação do meio seguida da adição da resazurina (0,01%), o que permite visualização do crescimento bacteriano pela alteração de coloração, sendo que a variação para cor rosa aponta crescimento bacteriano devido à redução da resazurina à resorufina pelas desidrogenases celulares e a cor roxa indicando que não houve crescimento bacteriano. Neste caso, a leitura de CIM foi anotada como sendo aquela em que não houve crescimento bacteriano (sem turvação do meio ou cor roxa após adição da resazurina). Os experimentos foram conduzidos em triplicatas.

Para obtenção da Concentração Bactericida Mínima (CBM), foram preparadas subculturas a partir das concentrações testadas nos ensaios de microdiluição utilizando placas de BHI ágar (MRSA e *S. pyogenes*) e meio de RCA (*Reinforced Clostridium Agar*) para *C. acnes*. As placas foram incubadas em aerobiose a 37 °C/24 h e anaerobiose a 37 °C/48 h para *C. acnes*, sendo a CBM a menor concentração em que não era visualizada a formação de colônias (NCCLS, 1999).

4.5. Curva de sobrevivência pela metodologia da densidade óptica (DO) a 600nm.

As curvas de sobrevivência foram realizadas utilizando os dois produtos antimicrobianos com as melhores atividades inibidoras juntamente com os respectivos fármacos antibacterianos para as espécies bacterianas, por meio de leitor de Elisa (BioTek, modelo Epoch 2) com capacidade de incubação (37 °C) das microplacas de 96 poços, com leituras de Densidade Óptica em 600 nm (DO_{600}) para MRSA, *S. pyogenes* e *C. acnes*. O preparo das linhagens bacterianas foi feito conforme determinação de CIM, utilizando inóculos ao redor de 10^6 UFC/mL em placas de 96

poços contendo 200 µL de BHI, sendo os tratamentos efetuados em triplicatas para cada uma das bactérias testadas conforme a seguir: poço controle para crescimento normal da bactéria, poços contendo valores de CIM para os dois produtos mais efetivos (nisina e a melitina), os respectivos fármacos testados previamente (oxacilina, cefalotina e clindamicina) e combinações correspondentes a ¼ (25%) de CIM entre os produtos naturais e respectivos fármacos antibacterianos.

No caso do MRSA e *S. pyogenes*, as microplacas foram incubadas no leitor de Elisa a 37 °C/24 h e leituras de OD₆₀₀ foram feitas a cada duas horas. Considerando que *C. acnes* é bactéria anaeróbia a sua incubação foi em 37 °C/48 h em meio *Fluid Thioglucollate Medium* (FTM) e as leituras de OD₆₀₀ foram realizadas também a cada duas horas. Os dados dos experimentos foram processados para obtenção de curvas de sobrevivência, para verificação das interações de sinergismo bem como a demonstração se houve ação bactericida ou bacteriostática pela semeadura dos respectivos poços/tratamentos ao final dos períodos de experimentação.

4.6. Análises de citotoxicidade pela metodologia de Vermelho neutro.

Para os ensaios com uso do vermelho neutro foram utilizadas células de linhagem comercial, aneuploides imortalizadas derivadas de queratinócitos epidermais humanos (HaCaT) cultivadas em placas de 96 poços. As células foram expostas aos compostos analisados nisina e a melitina em concentrações variando de 100 a 1,56 µg/mL utilizando o meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* 2% SFB) e mantidas em estufa em atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C/24 h. Após o período de exposição, o corante catiônico foi adicionado e mantido em incubação durante 2 horas nas microplacas. O corante vermelho neutro foi extraído das células viáveis utilizando uma solução acidificada de descoloração (*Destaining Solution*) e a absorbância do corante solubilizado foi quantificada utilizando espectrofotômetro *Varioskan LUX - Thermo Scientific* em um comprimento de onda a 540 nm. Os experimentos foram realizados em sete diluições crescentes, com três replicatas para cada concentração estudada. Cada composto foi diluído em série, com fator de diluição igual a dois. Para o controle positivo foi determinado utilizando uma diluição de 50% de DMSO (Dimetilsulfóxido), concentração sabidamente tóxica. O percentual de viabilidade celular detectado no ensaio foi calculado a partir das médias dos dados

de absorvância no software *Graphpad Prism 6*, considerado os valores de controle negativo como Normalidade 100%. O cálculo de IC₅₀ com base nos dados foi realizado no mesmo software, utilizando regressão linear de dose- resposta, correspondendo a uma medida quantitativa que indica quando a substância é necessária para diminuir em 50% a viabilidade celular. Estes ensaios foram realizados em parceria com a empresa CROP Biolabs, tendo como responsável técnico o Dr. Lucas Gabriel Ribeiro.

4.7. Análise de citotoxicidade da nisina e clindamicina por citometria de fluxo

Para esta etapa foram testadas também com mesmo tipo celular feito com metodologia do vermelho neutro (HaCaT). As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ em DMEM 10% SFB com ausência de vermelho fenol.

A suspensão celular foi obtida de células em confluência máxima de 80% em frascos *Tissue Treated* de 75cm². As células foram tratadas nas concentrações correspondentes a 1 e 2x CIM (duas vezes o valor da CIM) do produto que apresentar a melhor atividade sobre as linhagens bacterianas em estudo. Também foi testada a combinação deste produto com o fármaco que apresentou sinergismo na metodologia da curva de sobrevivência. A viabilidade da suspensão celular pré-exposição aos tratamentos foi determinada por contador automatizado Countess®, sendo feita a exposição em diferentes tempos.

Após a exposição, células foram marcadas com Anexina V (FITC) e Iodeto de Propídeo conforme especificações do fabricante. Após a marcação, ocorreram a leitura em citômetro de fluxo FACSCalibur BD® e análise em Cellquest Pro PAINT-A-GATE BD®. Os gráficos foram gerados em formato dot plot cuja distribuição da população de células analisada foi feita em quatro quadrantes. No gráfico de perfil morfológico, o eixo horizontal Forward Scatter (FSC-H) representa o tamanho das células. O eixo vertical Side Scatter (SSC-H), por sua vez, mostrou a granulosidade celular. Para os experimentos foram utilizados controle negativo (CTL) sem a presença dos produtos avaliados.

4.8. Inibição da formação do Biofilme Bacteriano

Foi testado o efeito dos antimicrobianos na formação de biofilme de MRSA, *S. pyogenes* e *C. acnes* de acordo com a metodologia de Stepanovic' et al. (2000) em triplicata. As cepas foram cultivadas overnight em 4 mL de caldo triptona de soja (TSB) contendo 1% de glicose, padronizado pela escala 0,5 de McFarland e diluídas em TSB

até 10⁶ UFC/mL. Em cada poço, em uma placa de 96 poços de fundo chato foram adicionados 100 µL de meio de cultura contendo o inóculo de cada cepa e mais 100 µL de diferentes concentrações subinibitórias dos compostos testados (25%, 50% e 75% da CIM). Além disso, foram preparados controles positivos (TSB com inóculo de bactérias) e controle branco (TSB sem bactérias). Após incubação (37 °C/48 horas), cada poço foi lavado 3 vezes com tampão de PBS e as placas ficaram secando em temperatura ambiente por 4 horas. O biofilme formado poço foi fixado com 150 µL de metanol por 20 minutos depois de secar overnight. Em seguida foi feita coloração com 150 µL de cristal violeta 1% por 15 minutos e as placas foram lavadas em água corrente para retirada do excesso de corante. Após secagem a 25 °C, os biofilmes corados foram suspensos em 150 µL de ácido acético 33% e realizada a leitura em espectrofotômetro a 570 nm. A formação de biofilme foi determinada por meio da fórmula: (média do valor do tratamento/ média do valor do controle) x 100 (Pesavento et al., 2007).

4.9. Metodologia Efluxo de íons potássio e fosfato

Os ensaios foram realizados de acordo com o método de Lee, Kim e Shin (2002) modificado. Foi feita a determinação das concentrações de íons fosfato e potássio, para as bactérias MRSA, *S. pyogenes* e *C. acnes* utilizando os kits *Potassium test kit MQuant®* e *Phosphate test kit MQuant®* conforme protocolo do fabricante, nos intervalos de tempo de 0 horas e 4 horas. As bactérias foram padronizadas e diluídas em água peptonada preparada (8,5g de cloreto de sódio, 1g de peptona em 1 litro de água destilada estéril), e submetidas a concentrações de 1 e 2 vezes o valor de CIM (2x CIM) previamente determinados nos ensaios de microdiluição com nisina, melitina e os antimicrobianos (clindamicina, cefalotina e oxacilina).

5. Análise estatística

Para as análises estatísticas o teste utilizado foi One Way ANOVA seguidos pelo teste de Tukey's sendo considerado p<0,05 resultados significativos, utilizando software GraphPad Prism versão 6 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA.

6. Resultados

6.1 Caracterização dos óleos essenciais

As caracterizações químicas dos óleos essenciais foram realizadas visando identificar os principais compostos presentes nas amostras. Porém, importante salientar que as caracterizações dos óleos essenciais de *C. langsdorffii* e *E. uniflora* foram realizadas neste estudo enquanto a do óleo resina de *C. reticulata* foi considerada a apresentada pela empresa fornecedora do produto (Plumerya Ltda). Assim sendo, nas **Tabelas 1 a 3** são mostradas as caracterizações além dos seus respectivos cromatogramas nas **Figuras 7 a 9**.

A caracterização química do OE de copaíba (**Tabela 1**), com um total de 96,65% de identificação dos compostos, revelou que o sesquiterpeno Germacreno D foi o principal composto encontrado no OE de *C. langsdorffii* (50,58%), seguido de β -cariofileno (14,88%) e biciclogermacreno (13,87%). Quanto ao OE de *E. uniflora* (**Tabela 2**), considerando um total de 88,26% dos compostos identificados, verificou-se que o curzereno (25,43%) foi o composto majoritário, seguido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (13,66%) e Germacrona (9,72%). Foi encontrado também no óleo de pitanga o biciclogermacreno (5,18%) e Germacreno D (2,84%) que também foram encontrados no OE de *C. langsdorffii*. No óleo-resina de copaíba, o composto majoritário foi β -cariofileno, correspondendo a 74,1%, seguido pelo α -humuleno com 10,2%, como também foi verificada a presença de Germacreno D (3,1%).

Tabela 1. Composição química (%) do óleo essencial de *C. langsdorffii* (CG- FID).

Pico	Substância	IRL calc.	% relativa
1	δ -elemeno	1341	2,41
2	ni	1375	0,19
3	α -copaeno	1379	1,04
4	β -cubebeno	1394	0,21
5	β -elemeno	1396	1,00
6	<i>E</i> -cariofileno	1424	14,88
7	ni	1455	0,21
8	α -humuleno	1459	1,75
9	γ -muroleno	1483	1,05
10	Germacreno D	1488	50,58
11	viridifloreno	1501	1,16
12	biciclogermacreno	1503	13,87
13	α -muuroleno	1506	1,24
14	ni	1513	1,34
15	γ -cadineno	1521	0,99
16	δ -cadineno	1530	5,44
17	guaiol	1613	1,03
18	ni	1670	0,15
19	ni	1675	1,45
Total identificado		-	96,65

IRL calc.: Índice de retenção linear calculado; ni= não identificado

Tabela 2. Composição química (%) do óleo essencial de *Eugenia-uniflora* (CG-FID)

Pico	Substância	IRL calc.	% relativa
1	Z- β -ocimeno	1039	1,33
2	E- β -ocimeno	1050	3,01
3	β -elemeno	1396	3,67
4	E-cariofileno	1424	3,26
5	γ -elemeno	1438	0,84
6	germacreno D	1487	2,84
7	viridifloreno	1501	1,25
8	biciclogermacreno	1503	5,18
9	curzereno	1508	25,43
10	ni	1512	0,92
11	germacreno B	1565	7,93
12	ni	1593	1,22
13	selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	1650	13,66
14	atractilona	1671	1,80
15	ni	1676	1,53
16	ni	1710	8,07
17	germacrona	1715	9,72
18	epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	1771	8,34
Total identificado		-	88,26

IRL calc.: Índice de retenção linear calculado; ni= não identificado

Tabela 3. Composição química (%) do óleo resina *Copaifera reticulata* (CG-FID)

Pico	IR calc	Constituintes	%
1	1338	δ -elemeno	1.2
2	1379	α -copaeno	1.7
3	1426	β -cariofileno	74.1
4	1442	α -bergamoteno	3.8
5	1459	α -humuleno	10.2
6	1487	Germacreno D	3.1
		Outros	5.9
Total identificado			100

IRL calc.: Índice de retenção linear calculado; ni= não identificado

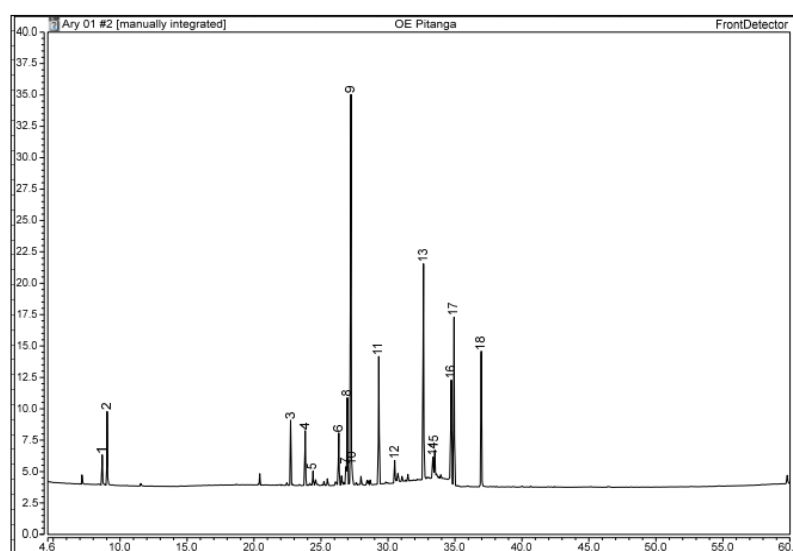


Figura 5. Cromatograma do óleo essencial de *E. uniflora* (CG-FID).

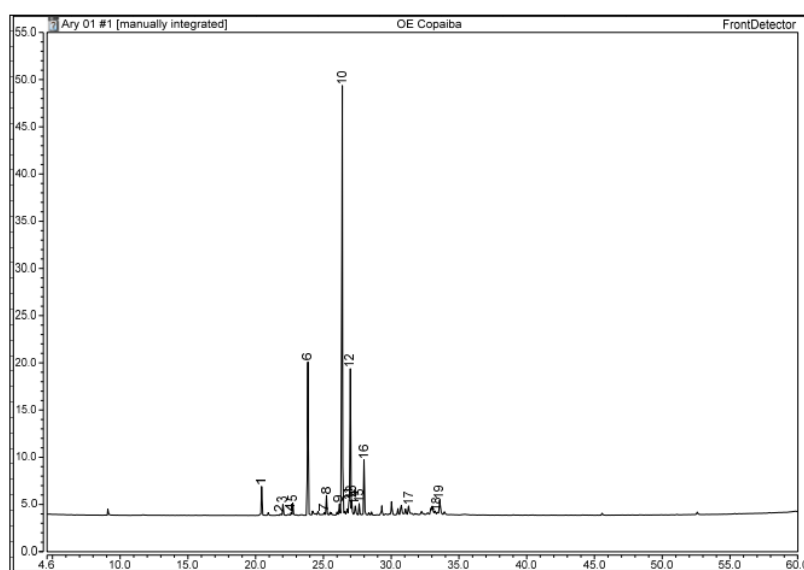


Figura 8. Cromatograma do óleo essencial de *C. langsdorffii* (CG-FID).

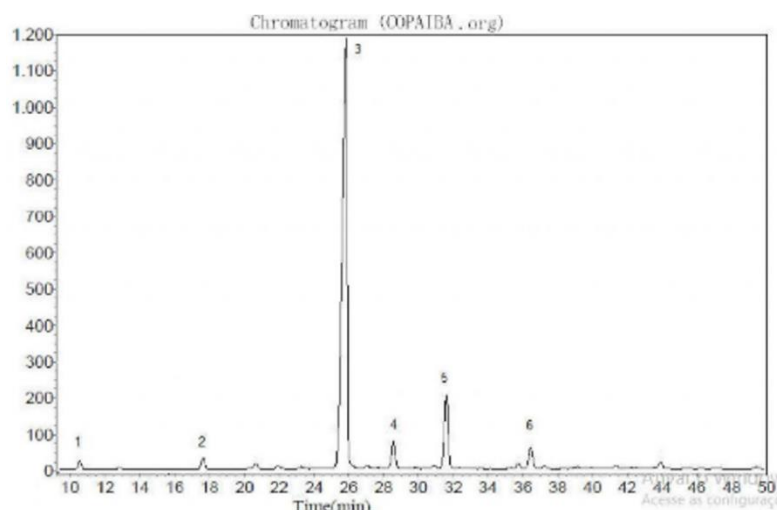


Figura 9 Cromatograma do óleo resina de *C. reticulata* (CG-FID).

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

Nas **Tabelas 4 e 5** são apresentados os valores obtidos de CIM e CBM, para os OEs de copaíba e pitanga, óleo-resina de copaíba e para a melitina e nisina. Além disso, são apresentados também os valores de CIM e CBM para os antimicrobianos clindamicina (*C. acnes*), oxacilina (MRSA) e cefalotina (*S. pyogenes*). A CIM variou entre 125 e 8000 µg/mL para o OE de copaíba, entre 250 e 8000 µg/mL para óleo resina e entre 125 e 8000 µg/mL para o OE de pitanga. É possível notar também que a melitina e nisina apresentaram os resultados mais significativos, podendo ser destacada ação especialmente sobre o *C. acnes* com valores de 1,5 µg/mL e 0,2 µg/mL, respectivamente. Desta forma podemos acrescentar que estes dois peptídeos antibacterianos terão continuidade nos experimentos das etapas seguintes do estudo.

Tabela 4. Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), em µg/mL, para os óleos essenciais de copaíba e pitanga, óleo resina de copaíba, melitina e nisina.

	Copaíba	Copaíba óleo resina	Pitanga	Melitina	Nisina	Fármacos
MRSA	125 ^{aA}	125 ^{aA}	250 ^{abA}	62,5 ^{aA}	3,1 ^{acAB}	7,8 ^{acA}
<i>S. pyogenes</i>	8000 ^{aA}	8000 ^{aB}	125 ^{bA}	15,6 ^{bA}	6,25 ^{bB}	0,5 ^{bA}
<i>C. acnes</i>	8000 ^{aA}	4000 ^{aAB}	8000 ^a	3,91 ^{bA}	0,2 ^{bA}	0,5 ^{bA}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas de atividade antimicrobiana entre produtos para um mesmo microrganismo quando $p \leq 0,05$ e letras maiúsculas diferentes nas colunas representam diferenças significativas de atividade antimicrobiana de um mesmo produto frente a microrganismos diferentes quando $p \leq 0,05$.

Tabela 5. Valores de Concentração Bactericida Mínima (CBM), em µg/mL, para os óleos essenciais de copaíba e pitanga, óleo resina de copaíba, melitina e nisina.

	Copaíba	Copaíba óleo resina	Pitanga	Melitina	Nisina	Fármacos
MRSA	4000 ^{aA}	8000 ^{abA}	4000 ^{aA}	125 ^{abAB}	3,1 ^{abAB}	15,6 ^{abA}
<i>S. pyogenes</i>	8000 ^{aA}	>8000 ^{aA}	>8000 ^{aA}	15,6 ^{bA}	25 ^{bB}	0,5 ^{bB}
<i>C. acnes</i>	8000 ^{aA}	4000 ^{aA}	8000 ^{aA}	1,5 ^{bB}	0,2 ^{bA}	0,5 ^{bB}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas de atividade antimicrobiana entre produtos para um mesmo microrganismo quando $p \leq 0,05$ e letras maiúsculas diferentes nas colunas representam diferenças significativas de atividade antimicrobiana de um mesmo produto frente a microrganismos diferentes quando $p \leq 0,05$.

6.3 Curva de sobrevivência

A possível interação sinérgica entre produtos naturais testados e fármacos antibacterianos foi testada com os peptídeos antibacterianos nisina e melitina por apresentarem as melhores atividades antibacterianas, ou seja, os menores valores da CIM, conforme mostrado na **Tabela 4**. Nas **Figuras 10 a 12**, são apresentadas as representações gráficas dos crescimentos bacterianos, foram realizados os respectivos controles (sem produtos antimicrobianos), foram utilizados os respectivos valores de CIM e as interações sinérgicas entre os peptídeos antibacterianos com a clindamicina, oxacilina e cefalotina. De maneira geral as interações dos peptídeos com os fármacos apresentaram ação bacteriostática frente às cepas testadas.

Segundo a **Figura 10**, na combinação melitina com oxacilina (MEL+OXA) considerando a cepa MRSA foi a que apresentou a melhor interação sinérgica, inclusive sem qualquer crescimento bacteriano no tempo de experimentação. Para o *S. pyogenes* (**Figura 11**), as combinações de nisina com cefalotina (NIS+CEFA) e melitina com cefalotina (MEL+CEFA) também apresentaram ação sinérgica, sendo inclusive notadamente mais eficazes do que os produtos testados isoladamente. O mesmo fenômeno é observado para *C. acnes* (**Figura 12**) considerando que para ambas as combinações dos peptídeos com a clindamicina apresentaram efeito sinérgico idêntico aos observados para as outras bactérias testadas, inclusive com ação idêntica aos antimicrobianos testados isoladamente.

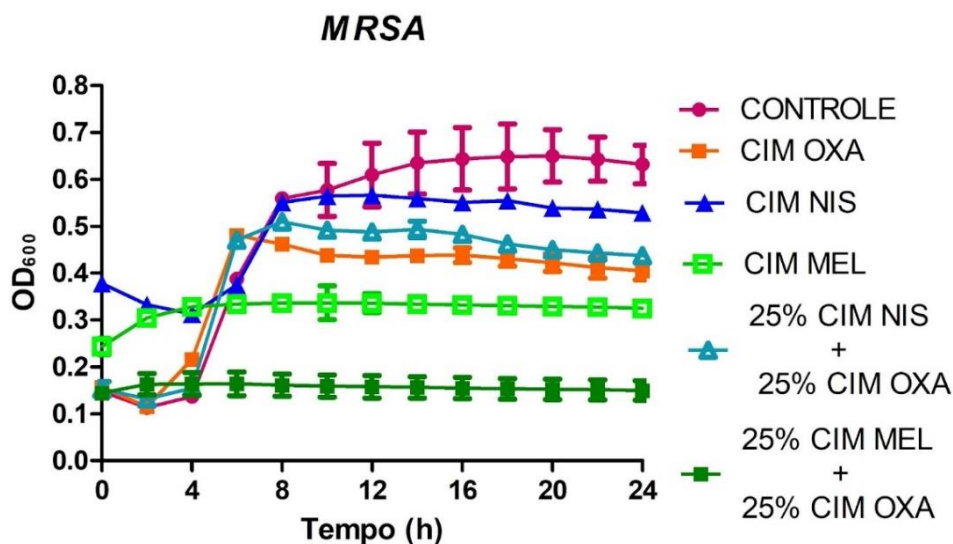


Figura 10. Representação gráfica da curva de sobrevivência obtida pela leitura de OD₆₀₀ sobre linhagem de MRSA incubada a 37 °C em 24 horas. As barras indicam o desvio padrão. CIM (concentração inibitória mínima), NIS (nisina), MEL (melitina) e OXA (oxacilina).

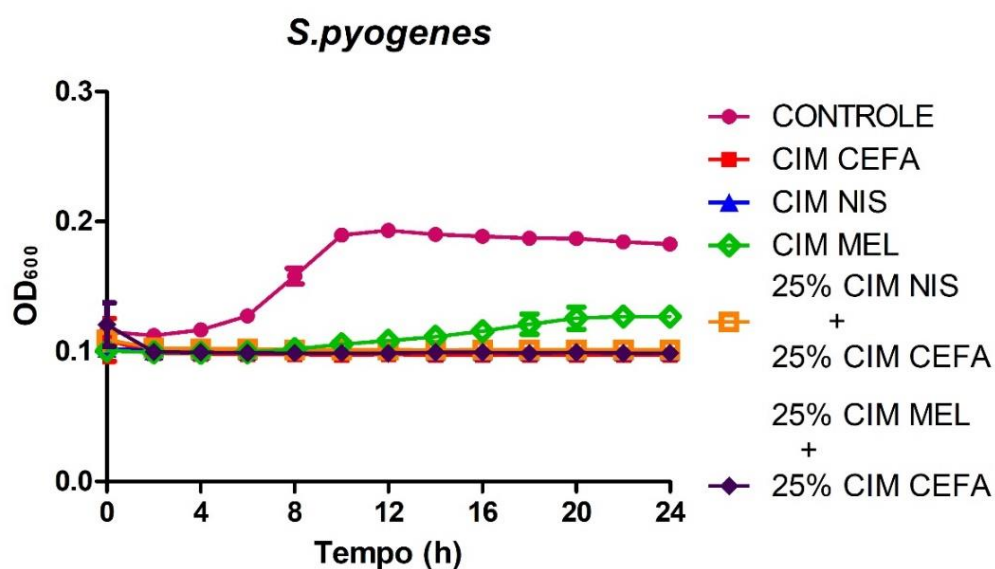


Figura 11 Representação gráfica da curva de sobrevivência obtida pela leitura de OD₆₀₀ sobre linhagem de *S. pyogenes* incubada a 37 °C em 24 horas. As barras indicam o desvio padrão. CIM (concentração inibitória mínima), NIS (nisina), MEL (melitina) e CEFA (cefalotina).

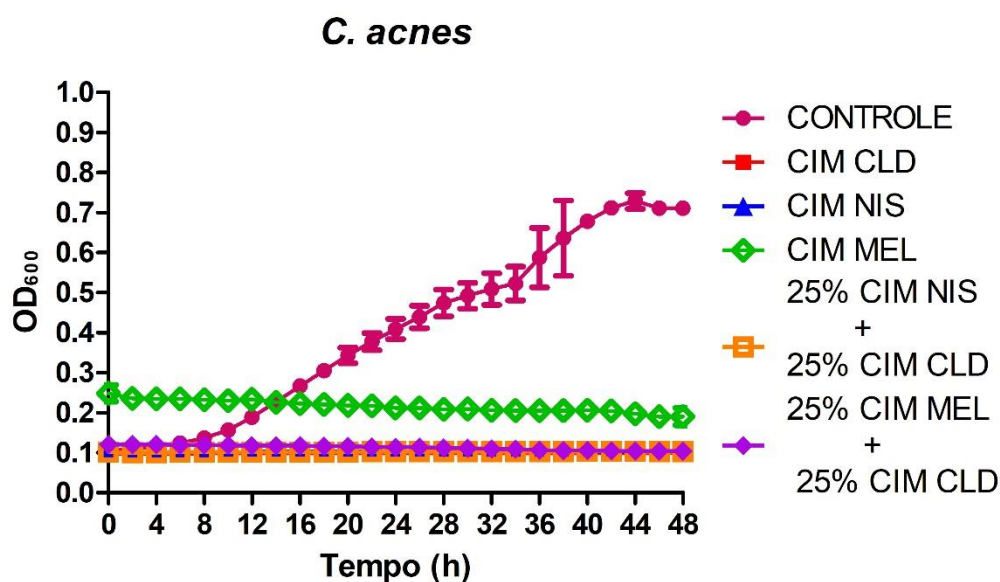


Figura 12. Representação gráfica da curva de sobrevivência obtida pela leitura de OD₆₀₀ sobre linhagem de *C. acnes* incubada a 37 °C em 48 horas. As barras indicam o desvio padrão. CIM (concentração inibitória mínima), NIS (nisina), MEL (melitina) e CLD (clindamicina).

6.4 Citotoxicidade pela metodologia de Vermelho neutro

Os produtos testados em ensaios de sensibilidade bacteriana foram acompanhados pela análise da inocuidade, ou citotoxicidade, utilizando a metodologia do vermelho neutro sobre células HaCaT (queratinócitos humanos) (Tabelas 6 a 10). A análise de vermelho neutro mostrou que na maior concentração testada de 100 µg/mL para nisina (Tabela 6), a viabilidade celular foi de 65,35% com IC₅₀ de 123,2µg/mL. Com a melitina, também testada em concentração de 100 µg/mL (Tabela 8), a viabilidade celular foi ao redor de 66,43% e IC₅₀ de 121,7 µg/mL e a clindamicina apresentou IC₅₀ 178,6 µg/mL e viabilidade celular de 78,78% quando testada em sua maior concentração (50 µg/mL). Os produtos testados demonstraram alta viabilidade celular das células HaCaT nas concentrações testadas que foram valores acima das concentrações inibitórias mínimas obtidas previamente (Figura 13). A combinação de nisina+clindamicina apresentou uma viabilidade celular igual a 79,27% na proporções de 50 + 25 µg/mL e uma viabilidade celular de 90,61% na proporção de 25 + 12,5 µg/mL, valores estes muito acima dos obtidos nos testes de sensibilidade e sinergismo.

Como resultado geral da viabilidade celular, destaca-se também que tanto para nisina como para a melitina, a viabilidade celular apresentou valores acima de 90% em todos os experimentos em que as respectivas concentrações testadas eram menores ou iguais a 50 µg/mL.

Tabela 6. Dados de absorbância das análises do composto nisina por vermelho neutro.

Nisina				
Concentração (µg/mL)	Concentração (Log10)	Abs	DP	VC (%)
100	2,00	0,2935	0,006	65,35
50	1,70	0,4265	0,003	94,97
25	1,40	0,4335	0,007	96,53
12,5	1,10	0,4357	0,003	97,02
6,25	0,80	0,4415	0,003	98,31
3,125	0,49	0,4422	0,005	98,46
1,56	0,19	0,4450	0,002	99,09
CN	0,00	0,4491	0,016	100,00
Branco	0,0475			
IC ₅₀	123.2µg/mL			
LogIC ₅₀	2.090			
R ²	0.9758			

Abs (Absorbância média que corresponde à média das replicatas de absorbância subtraída do valor branco); DP (Desvio Padrão); VC (Viabilidade Celular) e CN (Controle negativo).

Tabela 7. Dados de absorvância das análises do composto clindamicina por vermelho.

Clindamicina				
Concentração (µg/mL)	Concentração (Log10)	Abs	DP	VC (%)
50	1,70	0,3538	0,005	78,78
25	1,40	0,4037	0,010	89,89
12,5	1,10	0,4260	0,003	94,86
6,25	0,80	0,4319	0,005	96,17
3,125	0,49	0,4404	0,002	98,06
1,56	0,19	0,4404	0,001	98,06
0,78	-0,11	0,4439	0,003	98,84
CN	0,00	0,4491	0,016	100,00
Branco	0,0475			
IC ₅₀	178.6µg/mL			
LogIC ₅₀	2.252			
R ²	0.9841			

Abs (Absorvância média que corresponde à média das replicatas de absorvância subtraída do valor branco); DP (Desvio Padrão); VC (Viabilidade Celular) e CN (Controle negativo).

Tabela 8. Dados de absorvância das análises do composto melitina por vermelho neutro.

Melitina				
Concentração (µg/mL)	Concentração (Log10)	Abs	DP	VC (%)
100	2,00	0,2964	0,001	66,43
50	1,70	0,4269	0,004	95,67
25	1,40	0,4445	0,003	99,62
12,5	1,10	0,4430	0,004	99,28
6,25	0,80	0,4354	0,013	97,58
3,125	0,49	0,4441	0,007	99,53
1,56	0,19	0,4428	0,004	99,24
CN	0,00	0,4462	0,020	100,00
Branco	0,0486			
IC ₅₀	121.7µg/mL			
LogIC ₅₀	2.085			
R ²	0.9923			

Abs (Absorvância média que corresponde à média das replicatas de absorvância subtraída do valor branco); DP (Desvio Padrão); VC (Viabilidade Celular) e CN (Controle negativo).

Tabela 9. Dados de absorbância das análises da combinação dos compostos Nisina + Clindamicina por vermelho neutro.

NISINA + CLINDAMICINA			
Concentração (µg/mL)	Abs	DP	VC (%)
50 + 25	0,3537	0,005	79,27
25 + 12,5	0,4043	0,010	90,61
12,5 + 6,25	0,4271	0,003	95,72
6,25 + 3,125	0,4296	0,004	96,28
3,125 + 1,56	0,4382	0,004	98,21
1,56 + 0,78	0,4429	0,003	99,26
0,78 + 0,39	0,4458	0,002	99,91
CN	0,4462	0,020	100,00

Abs (Absorbância média que corresponde à média das replicatas de absorbância subtraída do valor branco); DP (Desvio Padrão); VC (Viabilidade Celular) e CN (Controle negativo).

Tabela 10. Dados de absorbância tabulados das análises de DMSO por vermelho neutro.

DMSO				
Concentração (%)	Concentração (Log10)	Abs	DP	VC (%)
50,00	1,70	0,0000	0,001	0,00
25,00	1,40	0,0004	0,001	0,09
12,50	1,10	0,0338	0,010	7,53
6,25	0,80	0,2202	0,000	49,03
3,13	0,50	0,3854	0,001	85,82
1,56	0,19	0,4196	0,003	93,43
0,78	-0,11	0,4253	0,003	94,70
0,39	-0,41	0,4257	0,007	94,79
CN	0	0,4491	0,016	100,00
Branco	0,0475			
IC ₅₀	5,99%			
LogIC ₅₀	0.7774			
R ²	0.9943			

Abs (Absorbância média que corresponde à média das replicatas de absorbância subtraída do valor branco); DP (Desvio Padrão); VC (Viabilidade Celular) e CN (Controle negativo).

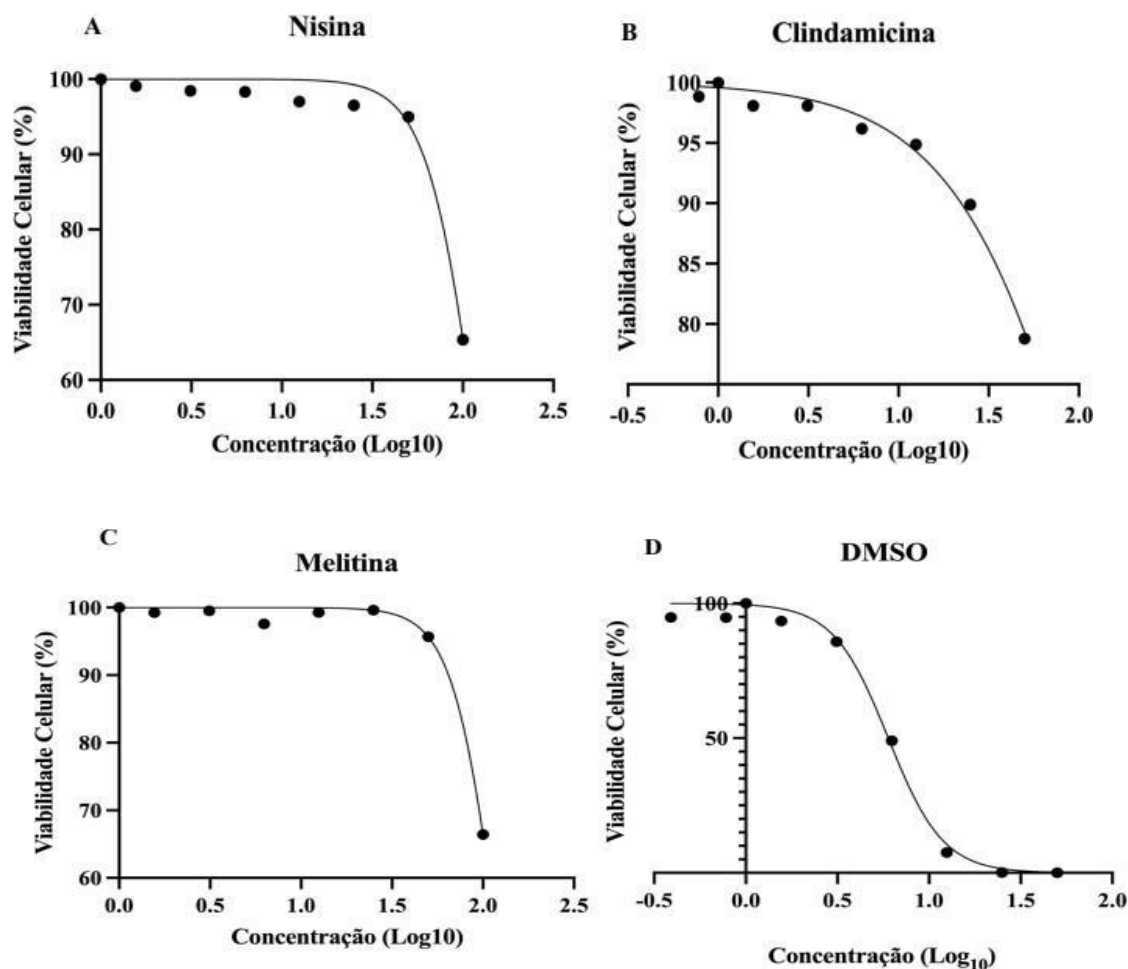


Figura 13. Representação gráfica da porcentagem de viabilidade celular de acordo com cada diluição teste. Gráfico A referente à nisina, gráfico B à clindamicina, gráfico C à melitina e gráfico D ao DMSO.

6.5. Análise de citotoxicidade da nisina e clindamicina por citometria de fluxo

A citometria de fluxo demonstrou que a nisina e a clindamicina nas concentrações de 25 µg/mL e 12,57 µg/mL, respectivamente, não apresentaram efeito citotóxico nas células HaCaT (**Figura 14**). Para determinação da viabilidade celular e porcentagem de morte celular a coloração com FITC Anexina V (ANE V) foi utilizada um conjunto com um corante vital, o iodeto de propídio (PI) para permitir a identificação das células apoptóticas precoces (PI - / ANE V +) e morte tardia (PI +/ ANE V-) ou (PI - / ANE V +) causadas pela melitina e oxacilina (**Tabela 11**). A combinação de nisina com clindamicina (NIS+CLD) apresentou viabilidade celular de 89,18%.

As células HaCaT foram expostas durante 24 horas aos tratamentos nisina, clindamicina e NIS+CLD que apresentaram uma porcentagem de morte tardia

1 variando de 0,04% a 15,24%, com viabilidade celular entre 83,20% a 89,18% e
 2 apoptose entre 1,11% a 1,92% dentro das concentrações testadas. Nas
 3 concentrações testadas de CIM e 2x CIM de nisina, clindamicina e NIS+CLD, as
 4 células HaCaT demonstraram viabilidade celular de mais de 80% com baixa apoptose
 5 e pouca porcentagem de morte tardia
 6

Tabela 11. Resultados em percentual em marcação da população de células viáveis, de apoptose e morte tardia das células HaCaT com iodeto de propídio (PI) e FITC Anexina V (ANE V) após a exposição aos tratamentos com nisina, clindamicina e NIS+CLD.

Tratamentos	PI + / ANE V - (morte tardia) %	PI + / ANE V+ (morte tardia)%	PI - / ANE V- (sem processo de morte) %	PI - / ANE V + (apoptose)%
Controle negativo (autofluorescente)	0	0,01	99,97	0,02
Controle Positivo (DMSO)	0,03	11	87,25	1,72
Clindamicina	0,04	11,87	86,18	1,92
Nisina	0,45	15,24	83,20	1,11
NIS + CLD	0,40	8,55	89,18	1,87

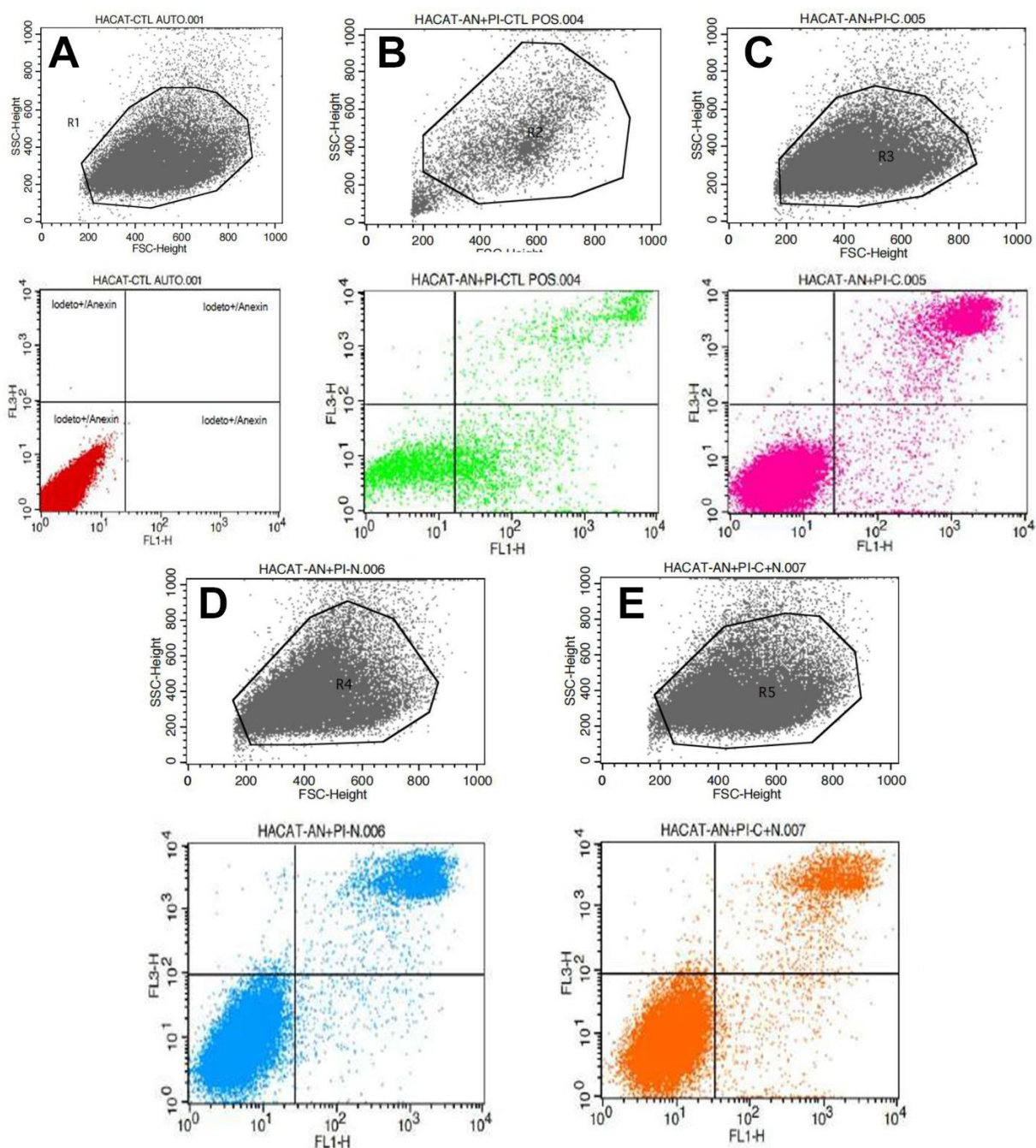


Figura 14. A análise das células HaCaT foi realizada após tratamento com nisina, clindamicina e sua combinação (NIS+CLD) para avaliar a indução de apoptose precoce e apoptose/necrose tardia. A avaliação utilizou marcação com anexina V (FITC) e iodeto de propídio. Os tratamentos foram representados da seguinte forma: (A) Controle negativo basal (autofluorescência); (B) Controle positivo basal (autofluorescência); (C) CIM clindamicina; (D) CIM nisina; (E) CIM NIS+CLD. (Quadrante UL: representa apoptose tardia ou células necróticas - anexina V negativa e iodeto de propídio positivo; Quadrante UR: representa células apoptóticas tardias ou necróticas - anexina V positiva e iodeto de propídio positivo; Quadrante LL: representa células vivas - anexina V negativa e iodeto de propídio negativo. Quadrante LR: representa células apoptóticas precoces - anexina V positiva e iodeto de propídio negativo).

6.6. Efluxo de íons potássio e fosfato

Os efluxos dos íons potássio e fosfato foram medidos em tratamentos nas concentrações de CIM e 2x CIM de nisina, melitina e para os fármacos estabelecidos para cada bactéria após 0 (T0h) e 4h (T4h) de exposição aos tratamentos. Os resultados estão representados nas **Tabela 12 a 14**. A liberação de fosfato variou de 0 a 250 mg/L, sendo a maior liberação para o tratamento de 2X CIM utilizando melitina sobre *S. pyogenes* após 4h de exposição. Quanto ao potássio, a média de liberação variou de 0 a 700 mg/L, sendo também verificada maior liberação no tratamento com 2x CIM de melitina sobre *S. pyogenes* em 4h de exposição.

Tabela 12. Efluxo de íons potássio e fosfato, expresso em mg/L, após o tratamento de MRSA ATCC com CIM e 2x CIM de melitina, nisina e oxacilina nos tempos 0 e 4 horas.

MRSA	Íons Fosfato				Íons Potássio			
	T0h		T4h		T0h		T4h	
Controle	0		0		0		0	
	1x	2x	1x	2x	1x	2x	1x	2x
Nisina	25	25	25	50	250	250	250	250
Melitina	25	25	50	100	250	250	250	450
Oxacilina	0	0	10	10	0	0	250	450

Tabela 13. Efluxo de íons potássio e fosfato, expresso em mg/L, após o tratamento de *S. pyogenes* ATCC com CIM e 2x CIM de melitina, nisina e oxacilina nos tempos 0 e 4 horas.

<i>S.pyogenes</i>	Íons Fosfato				Íons Potássio			
	T0h		T4h		T0h		T4h	
Controle	0		0		0		0	
	1x	2x	1x	2x	1x	2x	1x	2x
Nisina	100	250	100	250	0	0	250	250
Melitina	0	25	0	25	250	250	450	700
Cefalotina	0	0	10	10	0	0	250	250

Tabela 14. Efluxo de íons potássio e fosfato, expresso em mg/L, após o tratamento de *C. acnes* ATCC com CIM e 2x CIM de melitina, nisina e oxacilina nos tempos 0 e 4 horas.

<i>C.acnes</i>	Íons Fosfato				Íons Potássio			
	T0h		T4h		T0h		T4h	
Controle	0		0		0		0	
	1x	2x	1x	2x	1x	2x	1x	2x
Nisina	10	10	10	10	0	0	250	250
Melitina	10	10	10	10	0	0	250	250
Clindamicina	10	10	10	10	250	250	250	250

6.7. Inibição da formação do Biofilme Bacteriano

Os efeitos da ação da melitina, nisina, fármacos antibacterianos e as associações destes sobre a formação de biofilme de MRSA, *S. pyogenes* e *C. acnes* estão representados na **Figuras 15 a 17**. Observa-se que para MRSA a inibição do biofilme variou de 31% a 67% nas concentrações subinibitórias. A combinação dos PAMs com a oxacilina com apenas $\frac{1}{4}$ de cada produto possibilitou inibição ao redor de 60% na formação de biofilme. Para a *C. acnes* a inibição variou de 30% a 47% e as combinações demonstraram inibição de 31% e 32% para melitina com oxacilina e nisina com oxacilina, respectivamente. A inibição do biofilme para *S. pyogenes* variou de 14,2% a 61,8%. A combinação de melitina com cefalotina apresentou capacidade superior a 60% de inibir a formação de biofilme.

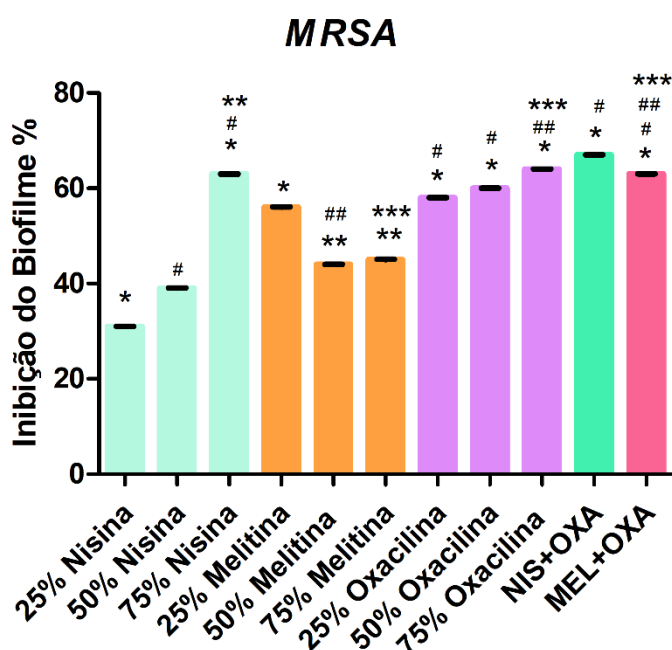


Figura 15. Percentual de inibição do biofilme das concentrações subinibitórias de 25%, 50% e 75% da CIM de melitina, nisina, oxacilina, associação de melitina com oxacilina e nisina e oxacilina sobre MRSA. Símbolos iguais representam diferenças significativas de atividade antibiofilme entre produtos para um mesmo microrganismo quando $p \leq 0,05$.

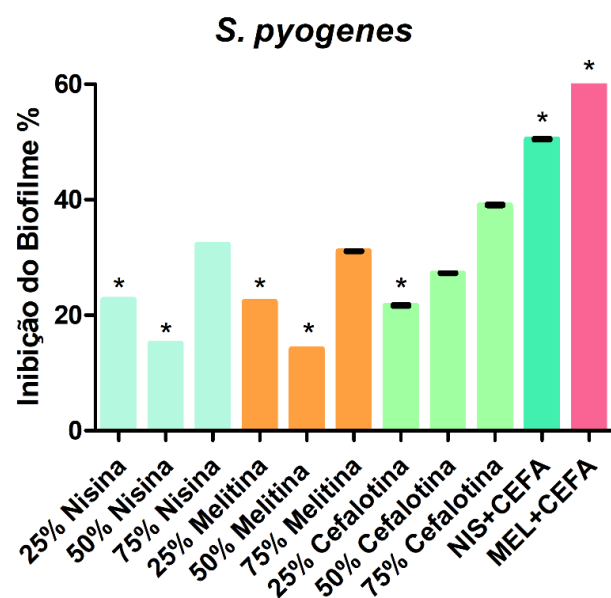


Figura 16. Percentual de inibição do biofilme das concentrações subinibitórias de 25%, 50% e 75% da CIM de melitina, nisina, clindamicina, associação de melitina com cefalotina e nisina e cefalotina sobre *S. pyogenes*. Símbolos iguais representam diferenças significativas de atividade antibiofilme entre produtos para um mesmo microrganismo quando $p \leq 0,05$.

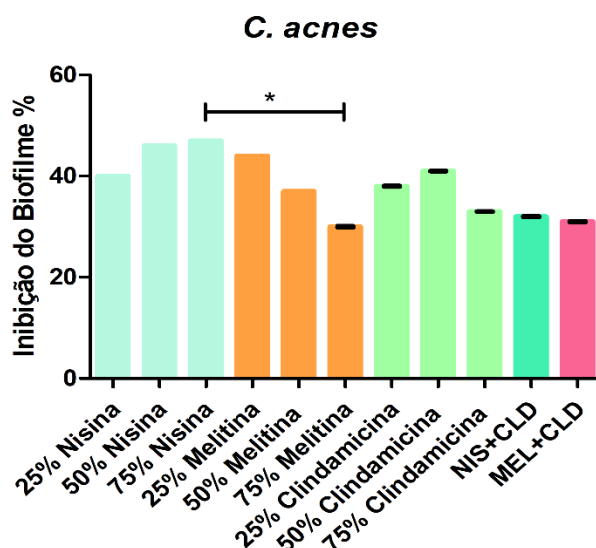


Figura 17. Percentual de inibição do biofilme das concentrações subinibitórias de 25%, 50% e 75% da CIM de melitina, nisina, cefalotina, associação de melitina com clindamicina e nisina e clindamicina sobre *C. acnes*. Símbolos iguais representam diferenças significativas de atividade antibiofilme entre produtos para um mesmo microrganismo quando $p \leq 0,05$.

7. Discussão

Nos últimos anos, a resistência aos antibacterianos tem se tornado um desafio com a diminuição das opções terapêuticas para o tratamento das doenças provocadas por bactérias resistentes tornando necessária a descoberta de novos antimicrobianos (Vrabl et al., 2022). Nesta perspectiva, os óleos essenciais se tornaram um dos substitutos naturais potenciais em ascensão por apresentarem propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, antivirais e antiparasitárias (Ahmed et al., 2021). A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está associada à presença dos metabólitos secundários sintetizados pelas plantas com mecanismo de ação envolvendo a interação de seus componentes hidrofóbicos com os lipídios presentes na membrana celular dos microrganismos que resulta em danos metabólicos e consequente morte celular (Silva et al, 2021).

Os OE são misturas complexas de compostos bioativos sintetizados pelas plantas e presentes em toda a sua extensão. A localização geográfica de origem da planta e a sazonalidade, bem como o método de extração utilizado, influenciam na composição química dos OEs e consequentemente em suas propriedades biológicas, inclusive nas propriedades antimicrobianas (Silva et al., 2021). Assim, é possível esperar que as caracterizações químicas de OEs reportadas por autores diversos serão sempre diferentes, tanto qualitativa quanto quantitativamente, embora compostos considerados majoritários estejam presentes.

Na constituição dos OEs estão presentes moléculas voláteis, como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanos (Porto de Matos et al., 2019). Segundo Trindade et al (2018) e Jesus et al (2023), o composto majoritário do óleo essencial da *C. langsdorffii* é o Germacrene D enquanto para *E. uniflora* é o curzereno e para o óleo resina de *C. reticulata* o β -cariofileno, compostos estes que foram também demonstrados na análise química dos OEs deste estudo, em especial para os compostos majoritários. De uma maneira mais ampla, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está associada à combinação de sesquiterpenos, diterpenos e monoterpenos, que normalmente afetam a integridade da parede bacteriana, sendo que este modo de ação tem sido demonstrado em bactérias Gram-positivas a exemplo do *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (Tobouti et al, 2017).

Segundo Andrade et al., (2018), o óleo essencial de *Cymbopogon martinii* (palmarosa) e o seu composto majoritário geraniol testado sobre linhagens padrões

ATCC de *C. acnes* (ATCC 6919) apresentaram valores de concentração inibitória mínima (CIM) variando de 0,7 mg/mL a 1,6 mg/mL para o óleo essencial de *C. martinii*. Enquanto para o geraniol, foi verificado em equivalente percentual v/v, os valores de CIM mais baixos, sendo a linhagem de *C. acnes* ATCC 11828 a mais sensível aos compostos testados.

Outro estudo, utilizando nanoemulsões e nanopartículas preparadas com óleos de *Cymbopogon martinii* e geraniol para verificar as capacidades inibidoras sobre linhagens de *C. acnes* foi realizado por Lyra (2019). A atividade inibidora foi potencializada quando os antimicrobianos testados (óleo essencial da palmarosa e geraniol) passaram a integrar uma nanoemulsão, e ainda mais aumentada a eficiência quando a nanopartícula de prata (AgNP) foi acrescentada. Resultados de CIM para o OE e geraniol isoladamente foram iguais para a linhagem ATCC 11828 (5000 µg /mL) e a 11827 foi aquela com melhor resultado (1250 µg/mL), sendo a ação antibacteriana considerada moderada ou fraca. Por outro lado, as nanoemulsões preparadas com o OE e geraniol foram mais eficazes com CIM de 625 µg/mL sobre a linhagem 11828 e 312,5 µg/mL para 11827. Com adição de AgNP, os valores de CIM foram ainda menores sobre a linhagem 11828 (312,5 µg/mL) e 11827 (39,06 µg/mL) comprovando a eficiência da AgNPs. De forma geral, houve menor eficiência sobre a linhagem ATCC 6919 de *C. acnes*, com valores de CIM e CBM acima de 5000 µg/mL para os testes utilizando OE, geraniol e AgNP.

Tobouti et al (2017), relataram que a CIM do óleo essencial de copaíba frente ao *S. aureus* foi bacteriostática com valor de 200 µg/mL e CBM de 1200 µg/mL. Também demonstraram que para *S. pyogenes* a CIM foi de 400 µg/mL e CBM de 1200 µg/mL. Bardají et al (2016), testaram a ação inibidora do óleo resina de copaíba sobre isolados de *Streptococcus spp* tendo verificado valores de CIM e CBM que variam de 25 µg/mL a 50 µg/mL. Ferreira et al (2023) demonstraram a susceptibilidade ao óleo essencial de *Eugenia uniflora* (Pitanga) extraídos por turboextração, com valores de CIM de 500 µg/mL para *S. pyogenes* e 250 µg/mL para *S. aureus*. Neste estudo, os valores de CBM para os óleos essenciais de pitanga, copaíba e óleo resina foram superiores aos de CIM demonstrando uma atividade bacteriostática. Os valores de CIM e CBM para os OEs de copaíba e pitanga obtidos no estudo foram nas concentrações máximas testadas que foi ao redor de 8.000 µg/mL.

Os PAMs são moléculas catiônicas pequenas que ocorrem de forma natural em diversos seres vivos, correspondendo à primeira linha de defesa da imunidade inata de animais e plantas (Torres et al, 2019) tendo como vantagem a quase inexistência de relatos na literatura de microrganismos resistentes a esses peptídeos (Guilhelmelli et al., 2013; Andersson, 2016). A ruptura da membrana é o modo de ação e primário e mais importante para a atividade antimicrobiana desses peptídeos, embora não seja o único modo de ação. Estudos mostraram que alguns PAMs foram capazes de realizar sua função antimicrobiana sem causar danos à membrana celular, por meio de ações intracelulares, inibindo algumas funções celulares (Lima et al., 2021).

Pode ser um desafio prevenir ou tratar algumas doenças infecciosas em humanos, tais como infecções da pele e dos tecidos moles que são resistentes aos medicamentos, especialmente aquelas ligadas aos biofilmes. Embora as terapias tradicionais para infecções bacterianas e virais envolvam frequentemente o uso de antimicrobianos e antivirais, o aumento da resistência a estes medicamentos levou os investigadores a procurar formas adjuvantes ou alternativas de tratar estas condições, sendo a nisina um potencial antimicrobiano com uso seguro na indústria alimentícia há décadas. Como potencial agente alternativo para tratamento de doenças infecciosas, especialmente as provocadas por linhagens resistentes aos medicamentos, pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de minimizar o uso de antimicrobianos convencionais (Shin et al., 2016).

Doenças infecciosas em humanos, como as de pele e tecidos moles, e provocadas por linhagens resistentes aos fármacos antibacterianos podem ser agravadas em especial aquelas associadas a biofilmes. Os PAMs possuem diversos sítios de ação, prevenindo o acúmulo de biofilme nos estágios iniciais de sua formação e até mesmo podendo agir nos biofilmes já formados (Shin et al., 2016; Mirzaei et al., 2022).

Alves et al., (2016) comprovaram *in vitro* que a nisina apresentou efeitos bactericidas contra *S. aureus* e *L. monocytogenes* na CIM obtida é que variou de 110 µg/mL a 125 µg/mL, bem como ação bactericida ou bacteriostática sinérgica quando combinado com os compostos fenólicos em diversas combinações sobre ambas as bactérias testadas. Furlanetto (2020), demonstrou a atividade da nisina sobre linhagens bacterianas Gram-positivas, como o MRSA, com CIM obtidos sobre o *S. aureus* (MSSA) e MRSA variando de 1,5 µg/mL a 6,2 µg/mL e CBM igual a 125 µg/mL.

1 Neste estudo, a nisina demonstrou CIM e CBM variando de 0,2 µg/mL a 25 µg/mL
2 sobre *S. pyogenes*, *C. acnes* e MRSA.

3 A ação do veneno (apitoxina) de *Apis mellifera* e sua fração melitina sobre *S.*
4 *aureus*, incluindo MRSA, já foi demonstrada tendo obtido valores de CIM de 7,2 µg/mL
5 e 6,7 µg/mL, para apitoxina e melitina, respectivamente. Os valores de CBM
6 encontrados foram de 28,7 µg/mL e 26 µg/mL para apitoxina e melitina,
7 respectivamente, sendo possível concluir que a apitoxina e a melitina apresentaram
8 atividade antibacteriana contra isolados de MRSA em baixas concentrações (Pereira
9 et al., 2020). Os valores de CIM obtidos com a melitina encontrados neste estudo,
10 foram significativamente baixos e variando de 3,91 µg/mL para *C. acnes*, 15,6 µg/mL
11 para *S. pyogenes* e 62,5 µg/mL sobre MRSA.

12 Os ensaios sobre sinergismo de fármacos convencionais e produtos naturais
13 visam à obtenção de formulações com menores doses de antimicrobianos, em
14 especial para os fármacos antibacterianos ou mesmo para potencializar a ação destes
15 uma vez que o sinergismo também possibilita a mitigação dos problemas relacionados
16 a resistência aos antimicrobianos (Dosler et al, 2016). A combinação de nisina com
17 oxacilina, afeta o crescimento bacteriano já nos estágios iniciais da sua multiplicação
18 influenciando de forma direta na formação das membranas celulares, sítio este que é
19 o alvo do peptídeo antimicrobiano testado (Wang et al., 2023).

20 Pereira et al., (2020) demonstraram o efeito sinérgico e bactericida da melitina
21 associada com a oxacilina sobre isolados de MRSA, sendo uma alternativa para
22 desenvolvimento de um novo agente terapêutico, já que a combinação utilizou uma
23 dose menor do antibiótico e do peptídeo e ocasionou ação bactericida. Neste estudo
24 observa-se que os crescimentos bacterianos com os compostos isoladamente e com
25 todas as combinações entre peptídeos e fármacos, foram inferiores ao teste controle
26 positivo, mostrando assim, que houve efeito sinérgico em todos os ensaios realizados.
27 Pode-se destacar a combinação de melitina+oxacilina que demonstrou ser sinérgica
28 em comparação com a curva desses compostos isoladamente.

29 Furlanetto (2020) demonstrou em seu estudo valores significativos quanto ao
30 potencial anti-biofilme da nisina frente ao *S. aureus*. No presente estudo podemos
31 observar a eficácia da nisina na redução do biofilme frente às cepas de MRSA e *C.*
32 *acnes* mesmo na concentração de 25% do valor do CIM obtida previamente. Além
33 disso, a associação da nisina com os fármacos também demonstrou ser capaz de

erradicar o biofilme produzido pelas bactérias em estudo. A melitina em associação com os antimicrobianos também apresentou ser eficaz anti-biofilme. Este resultado reforça o encontrado em Mirzaei et al., (2024), o qual demonstra a capacidade da melitina em sinergismo com antimicrobianos, a exemplo da vancomicina e rifampicina, em degradar o biofilme. Desta forma, os resultados reforçam a hipótese que o uso de combinações de PAMs com diversos fármacos antibacterianos convencionais é uma estratégia eficaz contra bactérias formadoras de biofilme.

Os PAMs possuem ação seletiva contra membranas bacterianas e não contra células de mamíferos, reforçando uso seguro para terapêutica de doenças infecciosas. Tal ação seletiva pode estar relacionada à forma de arranjo das cadeias hidrofóbicas e hidrofílicas dos peptídeos, que os tornam capazes de distinguir entre a superfície celular carregada mais negativamente (membranas bacterianas) e a membrana celular de organismos multicelulares (Zhang et al., 2022).

A citotoxicidade pode ser analisada por meio da captação do corante vermelho neutro, que se baseia na capacidade de células com células vivas em incorporar e se ligar ao corante. Esse ensaio permite avaliar a permeabilidade da membrana e atividade lisossomal, diferenciando células viáveis, danificadas ou mortas (Gilbert e Friedrich, 2017). Soares et al (2020) relataram que a nisina em células de queratinócitos epidérmicos humanos adultos (HEKa) não exibe efeitos citotóxicos, sendo segura a administração em concentrações superiores a 50 µg/mL nessas células. Nas concentrações testadas neste estudo, na análise pelo método do vermelho neutro, verificou-se que a nisina e a melitina são seguras para células de queratinócito humanos com alta viabilidade celular, sendo utilizadas na concentração sugerida por Soares et al. (2020), e tendo obtida viabilidade celular de HACaT em 94,97% e 95,67% respectivamente. Mesmo a combinação de nisina com clindamicina se mostrou ser segura.

Lee et al., (2014) demonstraram que a melitina atua contra os modelos inflamatórios produzidos pela *C. acnes* tanto *in vitro* como *in vivo*. Quando a melitina foi administrada, a expressão de várias citocinas inflamatórias foi significativamente reduzida quando queratinócitos tratados com *C. acnes* mortas por calor. Melitina inibiu especificamente a produção de TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa) e IL-1b nos queratinócitos, controlando as vias de sinalização NF-kB (Factor nuclear kappa B) e MAPK (Proteína quinase ativada por mitógeno). Além disso, a melitina demonstrou

1 propriedades anti-inflamatórias no modelo animal tratado com *C. acnes*. A redução de
2 NF- κ B, que controlam a síntese de citocinas inflamatórias, foi principalmente
3 responsável por estes benefícios protetores. Estes achados apoiam a viabilidade do
4 uso de melitina para reduzir, ou mesmo cessar, o avanço das condições inflamatórias
5 da pele causadas por *C. acnes*.

6 Ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo sobre linhagem de HaCaT
7 com a nisina e a clindamicina em concentrações de uma e duas vezes o valor de CIM
8 obtida, não demonstraram citotoxicidade, apresentando baixas porcentagens de
9 necrose, não sendo significativamente necróticas. Quanto aos valores de apoptose
10 inicial, em estudo realizado por Furlanetto (2020), reportou que nenhum dos
11 tratamentos apresentou porcentagem significativa de ação da nisina sobre células
12 HCT-116, ou seja, sobre células de câncer de cólon. A nisina testada em valor de 2x
13 a CIM (1,5 μ g/mL), não apresentou toxicidade bem como mostrou baixas
14 porcentagens de necrose e não apresentou valores significativos de apoptose inicial.

15 Outro aspecto deste estudo é que a integridade da membrana celular pode ser
16 determinada pela avaliação do efluxo de íons potássio, uma vez que o aumento do
17 efluxo de íons potássio após o tratamento por PAMs sobre bactérias reforça
18 informação de que houve danos na membrana celular com consequente liberação de
19 íons (LI et al., 2021). Assim, visando reforçar tal informação e medir tal liberação de
20 íons, foram realizados ensaios de liberação de efluxo de potássio e fosfato. Desta
21 forma, os resultados apresentados indicam que a melitina e a nisina foram capazes
22 de agir sobre a membrana plasmática de MRSA e ocasionar o extravasamento de
23 potássio e fosfato. Pereira et al., (2023) demonstraram que após 4h de exposição aos
24 tratamentos com melitina, oxacilina e a associação de ambos nas concentrações de
25 CIM (5,3 μ g/mL) e 2x CIM (10,6 μ g/mL) houve efluxo de 250 mg/L de potássio e de 10
26 mg/L de fosfato para MRSA. As propriedades antibacterianas da nisina contra *S.*
27 *aureus* e *P. aeruginosa* foram estudadas por Ghapanvari et al., (2022), demonstram
28 que a nisina impede o crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e causa danos ou
29 morte às células bacterianas. Além disso, causa danos à membrana principalmente
30 reduzindo o potencial da membrana e a inativação enzimática.

8. Conclusão:

Os OEs de copaíba (*C. langsdorffii* e *E. uniflora*) e óleo resina de copaíba (*C. reticulata*) não demonstraram ação inibidora considerável quando comparado aos PAMs nisina e melitina, tendo apresentado valores elevados de CIM (de até 8000 µg/mL), embora estes produtos tenham demonstrado efeitos inibidores melhores sobre a linhagem de MRSA em comparação as demais espécies bacterianas testadas. A nisina e a melitina demonstraram melhor atividade antimicrobiana para cepas de MRSA, *S. pyogenes* e *C. acnes*.

A continuidade dos estudos com os PAMs nisina e melitina foi levada a efeito nos ensaios de sinergismo e de citotoxicidade em função dos resultados de CIM e CBM obtidos. Esses compostos apresentaram baixa toxicidade *in vitro* frente às células de queratinócitos (HaCaT) mesmo quando testadas em concentrações bem acima dos valores de CIM obtidas. A nisina e a melitina demonstraram ação sobre a integridade da membrana celular bacteriana verificado pela liberação dos íons potássio e fosfato em especial quando há aumento na concentração testadas dos compostos bem como pelo aumento do tempo de experimentação.

Os antimicrobianos testados *in vitro* também foram sinérgicos com os fármacos testados, sendo capazes de reduzir a concentração inibitória mínima (CIM) a ser utilizada em especial frente ao MRSA, bactéria considerada importante na microbiologia clínica. As associações dos peptídeos com fármacos demonstraram ação frente a formação de biofilme para cepas estudadas, o que representa um resultado importante considerando a resistência dos biofilmes aos antimicrobianos em geral.

Portanto, pode se considerar a nisina e melitina como componentes ativos, sejam isoladamente ou mesmo associados aos fármacos antibacterianos, bons candidatos para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para MRSA, *S. pyogenes* e *C. acnes*.

9. Referências Bibliográfica

- 1 ACHERMANN, Y.; GOLDSTEIN, E. J. C.; COENYE, T.; SHIRTLIFF, M. E.
2 *propionibacterium acnes*: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant
3 pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 27, n. 3, p. 419–440,
4 2014.
- 5 ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas**
6 **chromatography/mass spectrometry**. 4th ed. Carol Stream: Allured Publishing
7 Corporation, 2007.
- 8 AHLE, C. M.; FEIDENHANS, C.; BRÜGGEMANN, H. *Cutibacterium acnes*. **Trends**
9 **in Microbiology**, Cambridge, v. 31, n. 4, p. 419-420, 2023.
- 10 AHMED, L. I.; IBRAHIM, N.; ABDEL-SALAM, A. B.; FAHIM, K. M. Potential
11 application of ginger, clove and thyme essential oils to improve soft cheese microbial
12 safety and sensory characteristics. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 42, n. 42, p.
13 101177, 2021.
- 14 ALNI, R. H.; TAVASOLI, F.; BARATI, A.; SHAHROKHI BADARBANI, S.; SALIMI, Z.;
15 BABAEKHO, L. Synergistic activity of melittin with mupirocin: A study against
16 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA)
17 isolates. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, v. 27, n. 10, p. 2580–2585,
18 2020.
- 19 ANDRADE, B. F. M. T.; BARBOSA, L. N.; ALVES, F. C. B.; MARQUES, A. F.P.;
20 ALBANO, M.; RALL, V. L. M.; BRÜGGEMANN, H.; FERNANDES JÚNIOR, A. The
21 impact of *Cymbopogon martinii* essential oil on *Cutibacterium* (formerly
22 *Propionibacterium*) *acnes* strains and its interaction with keratinocytes. **Journal of**
23 **Pharmacy and Pharmacology**, Oxford, v. 70, n. 12, p. 1688–1699, 2018.
- 24 ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**,
25 New York, v. 47, n. 6, p. 415–433, 1998.
- 26 BAE, S.; GU, H.; GWON, M.-G.; AN, H.-J.; HAN, S.-M.; LEE, S.-J.; LEEM, J.; PARK,
27 K.-K. Therapeutic effect of bee venom and melittin on skin infection caused by
28 *streptococcus pyogenes*. **Toxins**, Basel, v. 14, n. 10, p. 663, 2022.
- 29 BARDAJÍ, D. K.; SILVA, J. J.; BIANCHI, T. C.; EUGÊNIO, D. S.; OLIVEIRA, P. F.;
30 LEANDRO, L. F.; ROGEZ, H. L.; VENEZIANNI, R. C.; AMBROSIO, S. R.; TAVARES,
31 D. C.; BASTOS, J. K.; MARTINS, C. H. *Copaifera reticulata* oleoresin: chemical
32 characterization and antibacterial properties against oral pathogens. **Anarobe**,
33 London, v. 40, n. 40, p. 18–27, 2016.
- 34 BAVIERA, G.; LEONI, M. C.; CAPRA, L.; CIPRIANI, F.; LONGO, G.; MAIELLO, N.;
35 RICCI, G.; GALLI, E. Microbiota in healthy skin and in atopic eczema. **BioMed**
36 **Research International**, New York, v. 2014, p. 1–6, 2014.
- 37 BENNETT, J.; MORELAND, N. J.; WILLIAMSON, D. A.; CARAPETIS, J.; CRANE, J.;
38 WHITCOMBE, A. L.; JACK, S.; HARWOOD, M.; BAKER, M. G. Comparison of group

- 1 A streptococcal titres in healthy children and those with pharyngitis and skin
2 infections. **Journal of Infection**, London, v. 84, n. 1, p. 24–30, 2022a.
- 3 BENNETT, J.; MORELAND, N. J.; ZHANG, J.; CRANE, J.; SIKA-PAOTONU, D.;
4 CARAPETIS, J.; WILLIAMSON, D. A.; BAKER, M. G. Risk factors for group A
5 streptococcal pharyngitis and skin infections: a case control study. **The Lancet**
6 **Regional Health - Western Pacific**, London, v. 26, n. 26, p. 100507, 2022b.
- 7 BOYANOVA, L. *Cutibacterium acnes* (formerly *Propionibacterium acnes*): friend or
8 foe? **Future Microbiology**, London, v. 18, p. 235–244, 2023.
- 9 BUI, L. M. G.; TURNIDGE, J. D.; KIDD, S. P. The induction of *Staphylococcus*
10 *aureus* biofilm formation or small colony variants is a strain-specific response to host-
11 generated chemical stresses. **Microbes and Infection**, Paris, v. 17, n. 1, p. 77–82,
12 2015.
- 13 BYRD, A. L.; BELKAID, Y.; SEGRE, J. A. The human skin microbiome. **Nature**
14 **Reviews Microbiology**, London, v. 16, n. 3, p. 143–155, 2018.
- 15 CHAMBERS, E. S.; VUKMANOVIC-STEJIC, M. Skin barrier immunity and ageing.
16 **Immunology**, Oxford, v. 160, n. 2, p. 116–125, 2019.
- 17 CHOI, J. H.; JANG, A. Y.; LIN, S.; LIM, S.; KIM, D.; PARK, K.; HAN, S.-M.; YEO, J.-
18 H.; SEO, H. S. Melittin, a honeybee venom-derived antimicrobial peptide, may target
19 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecular Medicine Reports**, Athens,
20 v. 12, n. 5, p. 6483–6490, 2015.
- 21 CORBISIERO, M. F.; BATTÀ, N.; KYLLO, H.; SMYTH, A.; ALLEN, L.; FRANCO-
22 PAREDES, C. Clinical spectrum of *Cutibacterium acnes* infections: The SAPHO
23 syndrome. **IDCases**, Amsterdam, v. 32, p. e01784, 2023.
- 24 DELVES-BROUGHTON, J.; BLACKBURN, P.; EVANS, R. J.; HUGENHOLTZ, J.
25 Applications of the bacteriocin, nisin. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v.
26 69, n. 2, p. 193–202, 1996.
- 27 DEO, S.; TURTON, K. L.; KAINTH, T.; KUMAR, A.; WIEDEN, H.-J. Strategies for
28 improving antimicrobial peptide production. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 59,
29 p. 107968, 2022.
- 30 DHEKANE, P.; GOPALAKRISHNAN, R.; RAMASUBRAMANIAN, V.;
31 SETHURAMAN, N.; RAMANATHAN, Y.; SURESH KUMAR, D.; NAMBI, P. S. Not so
32 uncommon, yet neglected ‘Severe *Streptococcus pyogenes* infections at a tertiary
33 care center in south India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, New Delhi, v.
34 41, p. 55–58, 2023.
- 35 DOERN, C. D. Group A Streptococcus (*Streptococcus pyogenes*): the most
36 interesting pathogen in the world. **Clinical Microbiology Newsletter**, Boston, v. 45,
37 n. 5, p. 39–46, 2023.

- 1 DRÉNO, B.; DAGNELIE, M. A.; KHAMMARI, A.; CORVEC, S. The skin microbiome:
2 a new actor in inflammatory acne. **American Journal of Clinical Dermatology**
3 Auckland, v. 21, p. 18-24, 2020. Suppl. 1.
- 4 EMPINOTTI, J. C.; UYEDA, H.; RUARO, R. T.; GALHARDO, A. P.; BONATTO, D. C.
5 Pyodermitis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 2, p.
6 277–284, 2012.
- 7 FIDELIS, E. M.; SAVALL, A. S. P.; PEREIRA, F. O.; QUINES, C. B.; ÁVILA, D. S.;
8 PINTON, S. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) as a source of bioactive compounds for
9 health benefits: a review. **Arabian Journal of Chemistry**, Saudi Arabia, v. 15, n. 4,
10 p. 103691, 2022.
- 11 FURLANETTO, A. **Síntese de nanoemulsão e nanopartícula de ouro (aunps)**
12 **contendo nisina e seus efeitos sobre os fatores de virulência de**
13 ***Staphylococcus aureus***. 2020. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e
14 Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.
- 15 GATADIGATADI, S. Natural product derived promising anti-MRSA drug leads: a
16 review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 27, n. 17, p. 3760–3774,
17 2019.
- 18 GHAMARI, S.; ABBASI-KANGEVARI, M.; SAEEDI MOGHADDAM, S.;
19 AMINORROAYA, A.; REZAEI, N.; SHOBEIRI, P.; ESFAHANI, Z.; MALEKPOUR, M.;
20 REZAEI, N.; GHANBARI, A.; KEYKHAIEI, M.; NADERIAN, M.; LARIJANI, B.;
21 MAJNOON, M. T.; FARZADFAR, F.; MOKDAD, A. H. Rheumatic heart disease is a
22 neglected disease relative to its burden worldwide: findings from global burden of
23 disease 2019. **Journal of the American Heart Association**, Oxford, v. 11, n. 13, p.
24 e025284, 2022.
- 25 GHAPANVARI, P.; TAHERI, M.; JALILIAN, F. A.; DEHBASHI, S.; DEZFULI, A. A. Z.;
26 ARABESTANI, M. R. The effect of nisin on the biofilm production, antimicrobial
27 susceptibility and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas*
28 *aeruginosa*. **European Journal of Medical Research**, Munich, v. 27, n. 1, p. 173,
29 2022.
- 30 GHOSH, D.; VEERARAGHAVAN, B.; ELANGO VAN, R.; VIVEKANANDAN, P.
31 Antibiotic resistance and epigenetics: more to it than meets the eye. **Antimicrobial**
32 **Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 64, n. 2, p. e02225-19, 2019.
- 33 GUHA, S.; FERRIE, R. P.; GHIMIRE, J.; VENTURA, C. R.; WU, E.; SUN, L.; KIM, S.
34 Y.; WIEDMAN, G. R.; HRISTOVA, K.; WIMLEY, W. C. Applications and evolution of
35 melittin, the quintessential membrane active peptide. **Biochemical Pharmacology**,
36 Oxford, v. 193, p. 114769, 2021.
- 37 GUILHELMELLI, F.; VILELA, N.; ALBUQUERQUE, P.; DERENGOWSKI, L. S.;
38 SILVA-PEREIRA, I.; KYAW, C. M. Antibiotic development challenges: the various
39 mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers**
40 **in Microbiology**, Lausanne, v. 4, p. 353, 2013.

- 1 HAFFNER, S. M.; MALMSTEN, M. Influence of self-assembly on the performance of
2 antimicrobial peptides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, London, v.
3 38, p. 56–79, 2018.
- 4 HALL, C. W.; THIEN-FAH, M. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic
5 resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**,
6 Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 276–301, 2017.
- 7 HALL, J. B.; CONG, Z.; IMAMURA-KAWASAWA, Y.; KIDD, B. A.; DUDLEY, J. T.;
8 THIBOUTOT, D. M.; NELSON, A. M. Isolation and identification of the
9 follicular microbiome: implications for acne research. **Journal of Investigative**
10 **Dermatology**, New York, v. 138, n. 9, p. 2033–2040, 2018.
- 11 ITO, Y.; AMAGAI, M. Dissecting skin microbiota and microenvironment for the
12 development of therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.
13 74, p. 102311, 2023.
- 14 JESPERSEN, M. G.; LACEY, J. A.; TONG, S. Y. C.; DAVIES, M. R. Global genomic
15 epidemiology of *Streptococcus pyogenes*. **Infection, Genetics and Evolution**,
16 Amsterdam, v. 86, p. 104609, 2020.
- 17 JESUS, N. E.; TAVARES, M. S.; ANÍBAL, P.; MILLER, D. C.; IURI, P.; FREITAS, S.;
18 BENTES, A.; SETZER, W. N.; KELLY, J.; LUIS, P. Chemical composition,
19 antinociceptive and anti-inflammatory activities of the curzerene type essential oil of
20 *Eugenia uniflora* from Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 317, p.
21 116859, 2023.
- 22 JIAN, Z.; ZENG, L.; XU, T.; SUN, S.; YAN, S.; YANG, L.; HUANG, Y.; JIA, J.; DOU,
23 T. Antibiotic resistance genes in bacteria: occurrence, spread, and control. **Journal**
24 **of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 61, n. 12, p. 1049–1070, 2021.
- 25 KAYE, K. S.; PETTY, L. A.; SHORR, A. F.; ZILBERBERG, M. D. Current
26 epidemiology, etiology, and burden of acute skin infections in the United States.
27 **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 68, p. S193–S199, 2019. Suppl. 3.
- 28 KEIM, K. C.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**,
29 Cambridge, v. 31, n. 12, p. 1300–1301, 2023.
- 30 KUROKAWA, I.; KANAYAMA, S.; YAMASAKI, O. Antimicrobial activity of ozenoxacin
31 and other antimicrobials against *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical
32 skin specimens in Japan in 2019 and 2020. **Journal of Infection and**
33 **Chemotherapy**, Amsterdam, v. 28, n. 12, p. 1693–1696, 2022.
- 34 LAM, P. W.; CHAN, A. K.; CHAU, N. Y. E.; CLARK, S. T.; KOZAK, R. A.
35 *Streptococcus pyogenes* secondary impetigo due to loofah sponge use. **IDCases**,
36 Amsterdam, v. 27, p. e01395, 2022.
- 37 LEE, J.-Y.; KIM, Y.-S.; SHIN, D.-H. Antimicrobial synergistic effect of linolenic acid
38 and monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of**
39 **Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 7, p. 2193–2199, 2002.

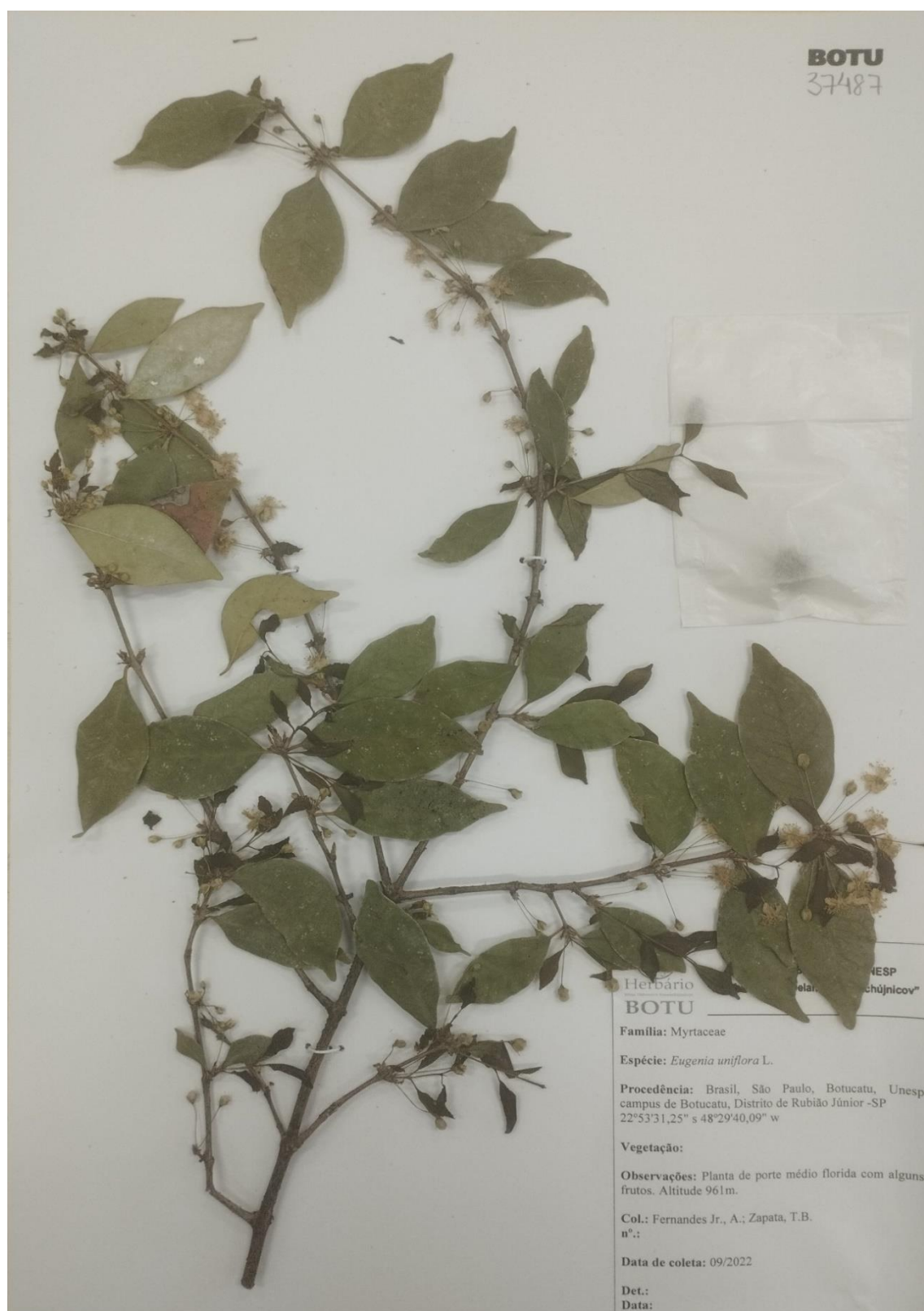
- 1 LEE, W.-R.; KIM, K.-H.; AN, H.-J.; KIM, J.; CHANG, Y.-C.; CHUNG, H.; PARK, Y.-Y.;
2 LEE, M.-L.; PARK, K. The protective effects of melittin on *propionibacterium acnes* –
3 induced inflammatory responses in vitro and in vivo. **Journal of Investigative**
4 **Dermatology**, New York, v. 134, n. 7, p. 1922–1930, 2014.
- 5 LEYVA-CASTILLO, J.-M.; GALAND, C.; KAM, C.; BURTON, O.; GURISH, M.;
6 MUSSER, M. A.; GOLDSMITH, J. D.; HAIT, E.; NURKO, S.; BROMBACHER, F.;
7 DONG, C.; FINKELMAN, F. D.; LEE, R. T.; ZIEGLER, S.; CHIU, I.; AUSTEN, K. F.;
8 GEHA, R. S. Mechanical skin injury promotes food anaphylaxis by driving intestinal
9 mast cell expansion. **Immunity**, Cambridge, v. 50, n. 5, p. 1262-1275.e4, 2019.
- 10 LI, T.; WANG, Z.; GUO, J.; DE LA FUENTE-NUNEZ, C.; WANG, J.; HAN, B.; TAO,
11 H.; LIU, J.; WANG, X. Bacterial resistance to antibacterial agents: Mechanisms,
12 control strategies, and implications for global health. **Science of The Total**
13 **Environment**, Amsterdam, v. 860, p. 160461, 2023.
- 14 LIM, H.-J.; KANG, S.-H.; SONG, Y.-J.; JEON, Y.-D.; JIN, J.-S. Inhibitory effect of
15 quercetin on *propionibacterium acnes*-induced skin inflammation. **International**
16 **Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 96, p. 107557, 2021.
- 17 LIMA, P. G.; OLIVEIRA, J. T. A.; AMARAL, J. L.; FREITAS, C. D. T.; SOUZA, P. F.
18 N. Synthetic antimicrobial peptides: characteristics, design, and potential as
19 alternative molecules to overcome microbial resistance. **Life Sciences**, Oxford, v.
20 278, p. 119647, 2021.
- 21 LYRA, L. P. S. **Desenvolvimento de nanoemulsão de geraniol e óleo essencial**
22 **de palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e sua ação inibitória sobre linhagens de**
23 ***Cutibacterium acnes***. 2019. 128 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e
24 Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.
- 25 MATOS, S. P.; LUCCA, L. G.; KOESTER, L. S. Essential oils in nanostructured
26 systems: Challenges in preparation and analytical methods. **Talanta**, Amsterdam, v.
27 195, p. 204–214, 2019.
- 28 MCKEAN, A. R.; ASSIOTIS, A.; HASSAN, S.; ELVEY, M.; MOORE, L. S. P.;
29 ECKERSLEY, R. *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes* Infection of the native
30 wrist joint. **The Journal of hand surgery**, St Louis, v. 45, n. 6, p. 557.e1–557.e5,
31 2020.
- 32 MIRZAEI, R.; ALIKHANI, M. Y.; ARCIOLA, C. R.; SEDIGHI, I.; YOUSEFIMASHOUF,
33 R.; BAGHERI, K. P. Prevention, inhibition, and degradation effects of melittin alone
34 and in combination with vancomycin and rifampin against strong biofilm producer
35 strains of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **Biomedicine &**
36 **Pharmacotherapy**, Paris, v. 147, p. 112670, 2022.
- 37 NAKATSUJI, T.; CHEN, T. H.; NARALA, S.; CHUN, K. A.; TWO, A. M.; YUN, T.;
38 SHAFIQ, F.; KOTOL, P. F.; BOUSLIMANI, A.; MELNIK, A. V.; LATIF, H.; KIM, J.-N.;
39 LOCKHART, A.; ARTIS, K.; DAVID, G.; TAYLOR, P.; STREIB, J.; DORRESTEIN, P.
40 C.; GRIER, A.; GILL, S. R. Antimicrobials from human skin commensal bacteria
41 protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. **Science**
42 **Translational Medicine**, Washington, v. 9, n. 378, p. eaah4680, 2017.

- 1 NORCINO, L. B.; MENDES, J. F.; NATARELLI, C. V. L.; MANRICH, A.; OLIVEIRA, J.
2 E.; MATTOSO, L. H. C. Pectin films loaded with copaiba oil nanoemulsions for
3 potential use as bio-based active packaging. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 106,
4 p. 105862, 2020.
- 5 O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally**: final report and
6 recommendations. London: HM Government, Wellcome Trust, 2016.
- 7 ONG, L. T. Management and outcomes of acute post-streptococcal
8 glomerulonephritis in children. **World Journal of Nephrology**, Hong Kong, v. 11, n.
9 5, p. 139–145, 2022.
- 10 PARLET, C. P.; BROWN, M. M.; HORSWILL, A. R. Commensal Staphylococci
11 influence *Staphylococcus aureus* skin colonization and disease. **Trends in**
12 **Microbiology**, Cambridge, v. 27, n. 6, p. 497–507, 2019.
- 13 PEREIRA, A. F. M. Influence of apitoxin and melittin from *Apis mellifera* bee on
14 *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 141, p. 104011,
15 2020.
- 16 PEREIRA, T. A. **Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de**
17 **óleo de framboesa, maracujá e pêssego**: avaliação de propriedades cosméticas
18 da formulação. 2011. 119 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
19 Farmacêutica de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- 20 RABIN, N.; ZHENG, Y.; OPOKU-TEMENG, C.; DU, Y.; BONSU, E.; SINTIM, H. O.
21 Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future**
22 **Medicinal Chemistry**, London, v. 7, n. 4, p. 493–512, 2015.
- 23 RAILEANU, M.; BORLAN, R.; CAMPU, A.; JANOSI, L.; TURCU, I.; FOCSAN, M.;
24 BACALUM, M. No country for old antibiotics! Antimicrobial peptides (AMPs) as next-
25 generation treatment for skin and soft tissue infection. **International Journal of**
26 **Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 642, p. 123169, 2023.
- 27 ROSENTHAL, M.; GOLDBERG, D.; AIELLO, A.; LARSON, E.; FOXMAN, B. Skin
28 microbiota: Microbial community structure and its potential association with health
29 and disease. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 839–
30 848, 2011.
- 31 SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in
32 ESKAPE pathogens. **BioMed Research International**, New York, v. 2016, p. 1–8,
33 2016.
- 34 SANTOS, J. F. S.; ROCHA, J. E.; BEZERRA, C. F.; SILVA, M. K. N.; DE MATOS, Y.
35 M. L. S.; FREITAS, T. S.; SANTOS, A. T. L.; CRUZ, R. P.; MACHADO, A. J. T.;
36 RODRIGUES, T. H. S.; BRITO, E. S.; SALES, D. L.; ALMEIDA, W. O.; COSTA, J. G.
37 M.; COUTINHO, H. D. M.; MORAIS-BRAGA, M. F. B. Chemical composition,
38 antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora*
39 essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, Washington, v. 261, p. 233–239,
40 2018.

- 1 SEGRE, J. A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **The**
2 **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 116, n. 5, p. 1150–1158, 2006.
- 3 SHIN, J. M.; GWAK, J. W.; KAMARAJAN, P.; FENNO, J. C.; RICKARD, A. H.;
4 KAPILA, Y. L. Biomedical applications of nisin. **Journal of Applied Microbiology**,
5 Oxford, v. 120, n. 6, p. 1449–1465, 2016.
- 6 SIBEL, S. D.; GERÇEKER, A. A. *In vitro* activities of antimicrobial cationic peptides;
7 melittin and nisin, alone or in combination with antibiotics against Gram-positive
8 bacteria. **Journal of Chemotherapy**, Firenze, v. 24, n. 3, p. 137–143, 2012.
- 9 SILVA, B. D.; BERNARDES, P. C.; PINHEIRO, P. F.; FANTUZZI, E.; ROBERTO, C.
10 D. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential
11 oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. **Meat Science**,
12 Oxford, v. 176, p. 108463, 2021.
- 13 SOLANO, C.; ECHEVERZ, M.; LASA, I. Biofilm dispersion and quorum sensing.
14 **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 18, p. 96–104, 2014.
- 15 STEVENS, D. L.; BISNO, A. L.; CHAMBERS, H. F.; DELLINGER, E. P.;
16 GOLDSTEIN, E. J. C.; GORBACH, S. L.; HIRSCHMANN, J. V.; KAPLAN, S. L.;
17 MONTOYA, J. G.; WADE, J. C. Executive summary: practice guidelines for the
18 diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 Update by the
19 Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.
20 59, n. 2, p. 147–159, 2014.
- 21 SWAMY, M. K.; SINNIHA, U. A. A comprehensive review on the phytochemical
22 constituents and pharmacological activities of pogostemon cablin benth.: an aromatic
23 medicinal plant of industrial importance. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 5, p. 8521–8547,
24 2015.
- 25 TEEPE, R. G. C.; KOEBRUGGE, E. J.; LÖWIK, C. W. G. M.; PETIT, P. L. C.;
26 BOSBOOM, R. W.; TWISS, I. M.; BOXMA, H.; VERMEER, B. J.; PONEC, M.
27 Cytotoxic effects of topical antimicrobial and antiseptic agents on human
28 keratinocytes in vitro. **The Journal of Trauma**, Baltimore, v. 35, n. 1, p. 8–19, 1993.
- 29 TOBOUTI, P. L.; MARTINS, T. C. A.; PEREIRA, T. J.; MUSSI, M. C. M. Antimicrobial
30 activity of copaiba oil: A review and a call for further research. **Biomedicine &**
31 **Pharmacotherapy**, Paris, v. 94, p. 93–99, 2017.
- 32 TRINDADE, R.; SILVA, J.; SETZER, W. Copaifera of the Neotropics: a review of the
33 phytochemistry and pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences**,
34 Basel, v. 19, n. 5, p. 1511, 2018.
- 35 TRYON, T. A. H.; GRICE, E. A. Microbiota and maintenance of skin barrier function.
36 **Science**, New York, v. 376, n. 6596, p. 940–945, 2022.
- 37 VALDERRAMA-BELTRÁN, S.; GUALTERO, S.; ÁLVAREZ-MORENO, C.; GIL, F.;
38 RUIZ, A. J.; RODRÍGUEZ, J. Y.; OSORIO, J.; TENORIO, I.; GÓMEZ QUINTERO, C.;
39 MACKENZIE, S.; CARO, M. A.; ZHONG, A.; ARIAS, G.; BERRIO, I.; MARTINEZ, E.;
40 CORTÉS, G.; DE LA HOZ, A.; ARIAS, C. A. Risk factors associated with methicillin-

- 1 resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in hospitalized
2 patients in Colombia. **International journal of infectious diseases**, Hamilton, v. 87,
3 p. 60–66, 2019.
- 4 VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system
5 including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography.
6 **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 11, p. 463–471, 1963.
- 7 VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *copaifera* L. **Química Nova**, São
8 Paulo, v. 25, n. 2, p. 273–286, 2002.
- 9 VENKATESAN, N.; PERUMAL, G.; DOBLE, M. Bacterial resistance in biofilm-
10 associated bacteria. **Future Microbiology**, London, v. 10, n. 11, p. 1743–1750,
11 2015.
- 12 VIVAS, R.; BARBOSA, A. A. T.; DOLABELA, S. S.; JAIN, S. Multidrug-resistant
13 bacteria and alternative methods to control them: an overview. **Microbial Drug**
14 **Resistance**, Larchmont, v. 25, n. 6, p. 890-908, 2019.
- 15 VRABL, P.; SIEWERT, B.; WINKLER, J.; SCHÖBEL, H.; SCHINAGL, C. W.; KNABL,
16 L.; ORTH-HÖLLER, D.; FIALA, J.; MEIJER, M. S.; BONNET, S.; BURGSTALLER, W.
17 Xanthoepocin, a photolabile antibiotic of *Penicillium ochrochloron* CBS 123823 with
18 high activity against multiresistant gram-positive bacteria. **Microbial Cell Factories**,
19 London, v. 21, n. 1, p. 1, 2022.
- 20 WANG, J.; MA, X.; LI, J.; SHI, L.; LIU, L.; HOU, X.; JIANG, S.; LI, P.; LV, J.; HAN, L.;
21 CHENG, Y.; HAN, B. The synergistic antimicrobial effect and mechanism of nisin and
22 oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal**
23 **of Molecular Sciences**, Basel, v. 24, n. 7, p. 6697, 2023.
- 24 WEI, M.; YU, H.; GUO, Y.; CHENG, Y.; XIE, Y.; YAO, W. Potent in vitro synergistic
25 antibacterial activity of natural amphiphilic Sapindoside A and B against
26 *Cutibacterium acnes* with destructive effect on bacterial membrane. **Biochimica et**
27 **biophysica acta. Biomembranes**, Amsterdam, v. 1863, n. 11, p. 183699, 2021.
- 28 ZASCHKE-KRIESCHE, J.; BEHRMANN, L. V.; REINERS, J.; LAGEDROSTE, M.;
29 GRÖNER, Y.; KALSCHEUER, R.; SMITS, S. H. J. Bypassing lantibiotic resistance by
30 an effective nisin derivative. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 27, n.
31 15, p. 3454–3462, 2019.
- 32 ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, London, v.
33 415, n. 6870, p. 389–395, 2002.
- 34 ZORZI, G. K.; CARVALHO, E. L. S.; VON POSER, G. L.; TEIXEIRA, H. F. On the
35 use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from
36 plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 25, n. 4, p.
37 426–436, 2015.

Apêndices A- Exsicata com folhas e flores de *Eugenia uniflora* (Pitanga)



Apêndices B- Exsicata com folhas e fruto de *Copaifera langsdorffii* (Copaíba)

