

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Atividade antibacteriana e mecanismos de ação da melitina e
sua associação com oxacilina frente ao *Staphylococcus aureus*
meticilina resistente (MRSA)

Ana Flávia Marques Pereira

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Atividade antibacteriana e mecanismos de ação da melitina e sua
associação com oxacilina frente ao *Staphylococcus aureus* metilina
resistente (MRSA)

Ana Flávia Marques Pereira

Orientador: Prof. Assoc. Ary Fernandes Júnior

Coorientador: Prof. Dra. Carla dos Santos Riccardi

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biologia de Parasitas e Microrganismos.

Prof. Assoc. Ary Fernandes Júnior

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pereira, Ana Flávia Marques.

Atividade antibacteriana e mecanismos de ação da melitina e sua associação com oxacilina frente ao *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) / Ana Flávia Marques Pereira. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ary Fernandes Júnior

Coorientador: Carla dos Santos Riccardi

Capes: 21201005

1. Proteômica. 2. Biofilmes. 3. Citometria de fluxo. 4. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. 5. Sinergismo farmacológico.

Palavras-chave: Análise proteômica; Atividade hemolítica; Biofilme; Citometria de fluxo; Sinergismo.

Dedico esta tese

*Aos meus pais **Denise Marques Caldeira Pereira** e **José Carlos Pereira**,*

*pelo amor incondicional, por sempre acreditarem e incentivarem a
seguir os meus sonhos. Obrigada por tudo! Amo vocês!*

*Aos meus avós **Jasmire Floriano Caldeira** e **Geraldo Marques Caldeira**,*

por todos os ensinamentos e por todo o apoio sempre. Vocês são uma inspiração!

*Aos meus avós **Maria Aparecida de Lorençato Pereira** e **Quirino de Freitas Pereira***

(in memoriam), que não estão mais presentes, mas deixaram marcas em minha vida.

*Aos meus tios **Roseli Marques Caldeira** e **Arnaldo Jesus da Silva***

por sempre estarem presentes.

Agradecimentos

Aos amigos que fiz no laboratório de Bacteriologia e Produtos Naturais: Alessandra Sani, Débora Souza, Nicolas Ripari e Tatiane Zapata, obrigada pela ajuda e pelos momentos de alegria no laboratório. E as amigas que já saíram do laboratório e deixaram suas marcas: Alessandra Furlanetto, Bruna Andrade, Fernanda Alves, Lidiane Nunes e Mariana Albano. Com certeza o trabalho ficou mais leve e divertido com vocês.

As minhas amigas da República Albergue: Agda, Doku, Thaís e Daisy, com certeza o meu dia a dia foi mais feliz com vocês. E sem esquecer das amigas que agora são ex-moradoras da República: Coca, Novinha, Pri Condor, Sol, Tinder, Tucura, Vitória e Zina. Obrigada pela amizade e pelo companheirismo. Um dos motivos de eu ter continuado aqui em Botucatu foi morar nessa república. Nunca esquecerei de vocês!

A todos os professores, funcionários e técnicos do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas do Setor Microbiologia e Imunologia, em especial a Prof. Dra. Vera Lúcia Mores Rall pela disponibilidade e ajuda sempre.

A todos os professores da banca que aceitaram o meu convite e que irão acrescentar tanto ao meu trabalho! Obrigada Prof. Dra. Lidiane Nunes Barbosa, Prof. Dra. Lucilene Delazari dos Santos, Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi e Prof. Vera Lúcia Mores Rall.

A Prof. Dra. Lucilene Delazari dos Santos por toda ajuda com a análise proteômica, sempre solícita e disposta a me ensinar.

A minha coorientadora, Prof. Dra. Carla dos Santos Riccardi, que aceitou fazer parte desse projeto, se empenhou e disponibilizou-se a me ensinar novas técnicas e metodologias. Obrigada pelos ensinamentos, professora!

Ao Professor Doutor Ary Fernandes Júnior por todos os anos de ensinamento e paciência. Cheguei no laboratório de Bacteriologia e Produtos Naturais em 2015 para fazer a minha iniciação científica e nunca imaginei que chegaria ao doutorado. Sou muito grata pelos conhecimentos e habilidades adquiridas durante esse tempo. Obrigada por sempre estar presente, me apoiando e ajudando nos momentos bons e ruins. Quando parecia que nada iria dar certo, sempre surgíamos com uma solução. E deu certo, professor! A sua vontade de ensinar me inspira, Ary Fernandes! Obrigada por tudo!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, com número de processo 88882.183588/2018-01. Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio com número de processo 2019/24850-0.

“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”. (Leonardo da Vinci)

“Ao expandirmos o campo do conhecimento, apenas aumentamos o horizonte da ignorância”. (Henry Miller)

Resumo

A resistência bacteriana é um problema de saúde pública mundial e isolados resistentes como o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), frequentemente causam infecções graves e de difícil tratamento. A pesquisa por novos agentes antimicrobianos é necessária e produtos naturais como os peptídeos antimicrobianos têm sido evidenciados, como é o caso da melitina, uma fração do veneno da abelha *Apis mellifera*, que já possui ação antimicrobiana reportada. A melitina pode apresentar atividade hemolítica, sendo ideais novas estratégias como um sinergismo com antibióticos ou associada a sistemas nanocarreados, como nanopartículas ou nanoemulsões. Os objetivos desse trabalho foram sintetizar uma nanopartícula de ouro conjugada com melitina (AuNPs melitina) e duas formulações diferentes de nanoemulsões contendo melitina, avaliar a atividade antibacteriana da melitina, da sua associação com oxacilina, dos antibióticos oxacilina e cefalotina, da AuNPs melitina e das nanoemulsões sobre MRSA ATCC 33591 e um MRSA isolado clínico, avaliar atividade antibiofilme dos produtos que apresentaram atividade antibacterina e investigar os seus mecanismos de ação sobre MRSA. As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram funcionalizadas com citrato de sódio e ativadas com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) e posterior conjugação da melitina; também foi realizada a síntese de duas formulações diferentes de nanoemulsões contendo melitina. A atividade antibacteriana sobre os isolados foi realizada de acordo com a metodologia *Resazurin Microtiter Assay* (REMA), para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da melitina, antibióticos, AuNPs melitina e nanoemulsões com melitina. O sinergismo da melitina com antibióticos (oxacilina e cefalotina) foi testado por meio da curva de sobrevivência (*time kill curve*). A ação antibiofilme de melitina, oxacilina e da associação de melitina com oxacilina (mel+oxa) e a ação desses produtos sobre a membrana celular dos isolados foram verificadas. Ensaio de atividade hemolítica e de citometria de fluxo, citotoxicidade em células HaCaT, foram realizados. Os mecanismos de ação dos produtos testados com atividade antibacteriana foram investigados por meio da análise proteômica, sendo que a cepa MRSA ATCC foi tratada com concentrações subinibitórias dos tratamentos. As AuNPs melitina e as duas nanoemulsões diferentes contendo melitina foram sintetizadas, obtendo uma concentração final de 250 µg/mL de melitina em cada nanoestruturado, sendo que nenhum nanoestruturado apresentou ação antibacteriana frente à MRSA. A melitina apresentou uma CIM de 5,3 µg/mL sobre MRSA ATCC e de 4,0 µg/mL para MRSA isolado clínico; já a oxacilina apresentou CIM de 16 µg/mL para MRSA ATCC e de 8 µg/mL para

MRSA isolado. A associação mel+oxa mostrou ser sinérgica e bactericida para ambos MRSA. Concentrações subinibitórias da mel+oxa foram capazes de reduzir a formação de biofilme de MRSA ATCC e concentrações suprainibitórias foram capazes de erradicar biofilmes estabelecidos. A melitina e mel+oxa mostraram ter ação sobre a permeabilidade da membrana celular pelo aumento na condutividade elétrica relativa, extravasamento de proteínas, liberação de ácidos nucleicos e efluxo de íons potássio e fosfato. A taxa de hemólise da melitina em sua CIM foi de 0,2%, já a combinação de mel+oxa, em sua CIM não apresentou hemólise em eritrócitos humanos. A melitina e mel+oxa não causaram apoptose ou morte tardia em células de queratinócitos HaCaT. A análise proteômica sobre MRSA ATCC mostrou que a melitina, oxacilina e mel+oxa causaram uma expressão diferencial de proteínas em relação ao controle, indicando ação sobre a síntese proteica e metabolismo energético. Os nanoestruturados contendo a melitina não apresentaram atividade antibacteriana nas concentrações e formulações testadas sobre MRSA. O tratamento mel+oxa mostrou atividade antibacteriana e antibiofilme sobre MRSA, não apresentou hemólise no valor da CIM e nem citotoxicidade em células HaCaT e mostrou ação sobre a membrana celular de MRSA e sobre diferentes alvos intracelulares, afetando principalmente o metabolismo energético e a síntese proteica de MRSA. A associação de melitina e oxacilina apresenta considerável potencial para o desenvolvimento de agentes antibacterianos ou de novos tratamentos contra MRSA.

Palavras-chave: análise proteômica; atividade hemolítica; biofilme; citometria de fluxo; sinergismo

Antibacterial activity and mechanisms of action of melittin and its association with oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Abstract

Bacterial resistance is a global public health problem and resistant isolates such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) often cause serious and difficult-to-treat infections. Research for new antimicrobial agents is necessary and natural products such as antimicrobial peptides have been evidenced, such as melittin, a fraction of the venom of *Apis mellifera* bee, which already has reported antimicrobial action. Melittin may have hemolytic activity and new strategies are ideal such as synergism with antibiotics or associated with nanocarried systems, such as nanoparticles or nanoemulsions. The objectives were to synthesize a gold nanoparticle conjugated with melittin (melittin AuNPs) and two different formulations of nanoemulsions containing melittin, to evaluate the antibacterial activity of melittin, its association with oxacillin, antibiotics oxacillin and cephalothin, AuNPs melittin and nanoemulsions on ATCC 33591 MRSA and a clinical isolate MRSA, to evaluate the antibiofilm activity of the products that showed antibacterial activity and investigate its mechanisms of action on MRSA. Gold nanoparticles (AuNPs) were functionalized with sodium citrate and activated with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) and subsequent conjugation of melittin; the synthesis of two different formulations of nanoemulsions containing melittin was also carried out. Antibacterial activity against the bacterial isolates was performed according to the Resazurin Microtiter Assay (REMA) to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of melittin, antibiotics, melittin AuNPs and melittin nanoemulsions. The synergism of melittin with antibiotics (oxacillin and cephalothin) was tested using the time kill curve. The antibiofilm action of melittin, oxacillin and the association of melittin with oxacillin (mel+oxa) were tested and the mechanisms of action of these products on the bacterial isolates cell membrane were verified. Hemolytic activity and flow cytometry assays, cytotoxicity in HaCaT cells, were performed. The proteomics analysis investigated the mechanisms of action of the tested products with antibacterial activity; the MRSA ATCC was treated with subinhibitory concentrations of the treatments. The synthesized AuNPs melittin and the two different nanoemulsions containing melittin, with a final concentration of 250 µg/mL of melittin in each nanostructure, showed no antibacterial action against MRSA. Melittin had a MIC of 5.3 µg/mL for MRSA ATCC and 4.0 µg/mL for isolate MRSA;

oxacillin presented a MIC of 16 µg/mL for MRSA ATCC and 8 µg/mL for isolate MRSA. The mel+oxa association proved to be synergistic and bactericidal for both MRSA. Subinhibitory concentrations of mel+oxa reduced the biofilm formation of both MRSA and suprainhibitory concentrations eradicate established biofilms. Melittin and mel+oxa showed action on the permeability of the cell membrane, increased the relative electrical conductivity, promoted protein extravasation, released nucleic acids and caused efflux of potassium and phosphate ions. The hemolysis rate of melittin in its MIC was 0.2%, whereas the combination of mel+oxa, in its MIC, did not present hemolysis in human erythrocytes. Melittin and mel+oxa did not cause apoptosis or necrosis in HaCaT keratinocyte cells. Proteomic analysis on MRSA ATCC showed that melittin, oxacillin and mel+oxa caused a differential expression of proteins in relation to the control, indicating action on protein synthesis and energy metabolism. The mel+oxa treatment showed antibacterial and antibiofilm activity on MRSA, showing no hemolysis in its MIC value and no cytotoxicity in HaCaT cells and presented action on the MRSA cell membrane and on different targets, mainly affecting energy metabolism and protein synthesis. The association of melittin and oxacillin presents considerable potential for the development of antibacterial agents or new treatments against MRSA.

Keywords: biofilm; flow cytometry; hemolytic activity; proteomic analysis; synergism

Lista de Figuras

Figura 1. Modelos do modo de ação dos peptídeos antimicrobianos em membranas plasmáticas: modelo barrel-stave, modelo poro toroidal e modelo de carpete (Fonte: PASUPULETI et al., 2012).	29
Figura 2. Mudança de coloração durante o preparo da solução de AuNPs. A: solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sob agitação magnética; B: adição da solução de citrato de sódio; C: tempo 0: logo após a adição da solução; D: 5 minutos após; E: 20 minutos após; F: 45 minutos após (PEREIRA, A.F.M., 2022).	38
Figura 3. Espectros de absorção de absorção obtidas nas formulações de AuNPs e AuNPs + Melitina.....	50
Figura 4. Curva de sobrevivência da atividade inibitória, em densidade óptica 600 nm, de MRSA ATCC (A) e MRSA Isolado (C) e curva de sobrevivência da atividade bactericida, em Log UFC/mL, de MRSA ATCC (B) e MRSA Isolado (D).	54
Figura 5. Condutividade elétrica, em porcentagem (%), após 4 horas do tratamento de MRSA ATCC (A) e MRSA Isolado (B) com 1x CIM e 2x CIM melitina, oxacilina e a associação de melitina e oxacilina.....	55
Figura 6. Extravasamento de proteínas, expresso em $\mu\text{g/mL}$, após 4 horas do tratamento de MRSA ATCC (A) e MRSA Isolado (B) com 1x CIM e 2x CIM melitina, oxacilina e a combinação de melitina e oxacilina.....	56
Figura 7. Liberação de ácidos nucleicos, em densidade óptica de 260 nm, após 4 horas do tratamento de MRSA ATCC (A) e MRSA Isolado (B) com 1x CIM e 2x CIM melitina, oxacilina e a combinação de melitina e oxacilina.	57
Figura 8. Valores, em porcentagem (%), de inibição do biofilme por concentrações subinibitórias de 25%, 50% e 75% da CIM de melitina, oxacilina e associação de melitina com oxacilina sobre MRSA ATCC (A) e MRSA Isolado (B).	60
Figura 9. Ação antibiofilme maduro, em densidade óptica 600 nm, da CIM, 5x CIM, 15x CIM e 20x CIM de melitina, oxacilina e da associação de melitina com oxacilina sobre MRSA ATCC (A) e MRSA Isolado (B).	62
Figura 10. Análise de efeito citotóxico por indução de apoptose e morte tardia em células HaCaT usando marcação por Anexina V (FITC) e Iodeto de Propídeo.....	66

Figura 11. Diagrama de Venn de todas as proteínas identificadas pela análise proteômica nos tratamentos (melitina, oxacilina e mel+oxa) em relação as proteínas identificadas no grupo controle.	68
Figura 12. Função molecular (A, melitina, C, oxacilina e E, mel+oxa) e processo biológico (B, melitina, D, oxacilina e F, mel+oxa) das proteínas diferencialmente expressas (up e down regulation) de MRSA exposto aos tratamentos em comparação ao controle.	72

Lista de Tabelas

Tabela 1. Interpretação dos resultados de citotoxicidade por citometria de fluxo, levando-se em conta o perfil de coloração e de morfologia da população celular analisada.	46
Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) da melitina e dos antibióticos, expressa em µg/mL, frente à MRSA ATCC e Isolado.....	51
Tabela 3. Concentração bactericida mínima (CBM) da melitina e dos antibióticos, expressa em µg/mL, frente à MRSA ATCC e Isolado.....	51
Tabela 4. Efluxo de íons potássio e fosfato, em mg/L, após o tratamento de MRSA ATCC com CIM e 2x CIM de melitina, oxacilina e a combinação de ambas nos tempos 0, 2 e 4 horas.	58
Tabela 5. Efluxo de íons potássio e fosfato, em mg/L, após o tratamento de MRSA isolado com CIM e 2x CIM de melitina, oxacilina e a combinação de ambas nos tempos 0, 2 e 4 horas.	58
Tabela 6. Valores, em porcentagem (%), da atividade hemolítica causada pelos tratamentos nas cinco diferentes concentrações testadas de melitina, oxacilina e mel+oxa.....	64
Tabela 7. Resultado em percentual da população de células viáveis, de apoptose e morte tardia de células HaCaT após exposição a CIM e 2x CIM de melitina, oxacilina e mel+oxa.	65
Tabela 8. Proteínas de MRSA expressas em up ou down-regulation após os tratamentos T1 - Melitina, T2 - Oxacilina, T3 - Melitina/Oxacilina em comparação ao C - Controle (MRSA sem tratamento) segundo o teste de volcano plot e vips scores.....	70

Lista de Abreviaturas

2DE	Eletroforese em gel bidimensional
6PGDH	<i>6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating</i>
11-MUA	ácido 11-mercaptoundecanóico
acetil-CoA	acetil coenzima A
ADHE	<i>aldehyde-alcohol dehydrogenase</i>
agr	Gene acessório regulador
AspRS	<i>Aspartate-tRNA ligase</i>
AuNPs	Nanopartículas de ouro
BEC	Concentração de erradicação do biofilme
BSA	Albumina sérica bovina
CBM	Concentração bactericida mínima
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CIM	Concentração inibitória mínima
CM	<i>chorismate mutase</i>
CSM	Concentração subletal máxima
DAHP	3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato
DnaK	<i>chaperone protein DnaK</i>
DO	Densidade óptica

dTMP	<i>2'-deoxythymidine-5'-monophosphate</i>
dUMP	<i>2'-deoxyuridine-5'-monophosphate</i>
EDC	1-etil-3-(3- dimetilaminopropil)carbodiimida
EF-G	<i>elongation factor G</i>
ESI	Ionização por eletrospray
EUA	Estados Unidos da América
FDR	False Discovery Rate
FtsZ	<i>Cell division protein FtsZ</i>
GMP reductase	Guanosina monofosfato redutase
HaCaT	Queratinócitos epidermais humanos
HAuCl ₄ · 3H ₂ O	Ácido tetraclooroáurico triidratado
HCl	Ácido clorídrico
IMP	Inosina monofosfato
LC	Cromatografia líquida
LSPR	Ressonância plasmônica de superfície localizada
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	Mueller Hinton caldo
MHCII	Mueller Hinton caldo II
MPTs	Modificações pós-traducionais
mRNA	RNAs mensageiros

MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
MSCRAMMs	Componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> suscetível à meticilina
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NHS	N-hidroxisuccinimida
NPs	Nanopartículas
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
PBP2a	Proteína de ligação da penicilina
PBS	Tampão fosfato salino
PCS	Espectroscopia de correlação de fótons
PDI	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
PIA	Polissacarídeo intercelular adesina
PK	<i>piruvate kinase</i>
PPP	via das pentoses-fosfato
REMA	<i>Resazurin microtiter assay</i>
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

ROS	espécies reativas de oxigênio
rRNA	RNAs ribossomais
SCCmec	Cassete cromossômico estafilocócico
SHMT	<i>serine hydroxymethyltransferase</i>
TCA cycle	<i>tricarboxylic acid cycle</i>
tRNA	RNAs de transferência
TS	<i>thymidylate synthase</i>
TSA	Ágar triptona de soja
TSB	Caldo triptona de soja
UFC	Unidade formadora de colônia
VISA	<i>S. aureus</i> com resistência intermediária a vancomicina
VRE	<i>Enterococcus</i> vancomicina resistente
VRSA	<i>S. aureus</i> vancomicina resistente
VSSA	<i>S. aureus</i> sensíveis à vancomicina
XMP	Xantosina monofosfato
YchF	<i>Ribosome-binding ATPase YchF</i>

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
Å	Angstrom
°C	Graus Celsius
A	Ampère
g	Força g
h	Hora
kDa	Quilodalton
kHz	Quilohertz
Log	Logaritmo
M	Molar
m/v	Massa/volume
m/z	Massa/carga
mA	Miliampère
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ms	Milissegundo
nL/min	Litros normais por minuto

nm	Nanômetro
ppm	Partes por milhão
s	Segundo
V	Volt
v/v	Volume/volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro

Sumário

1. Introdução	24
1.1. Aspectos gerais de resistência bacteriana	24
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	25
1.2.1. Biofilme	26
1.3. Peptídeos antimicrobianos	28
1.3.1. Melitina	30
1.4. Sinergismo com antibióticos	32
1.5. Nanoemulsões	32
1.6. Nanopartículas de ouro	34
1.7. Análise Proteômica	36
2. Objetivos	37
3. Material e métodos	37
3.1. Linhagens bacterianas	37
3.2. Produtos testados	37
3.3. Síntese de Nanopartículas de ouro conjugadas com melitina	37
3.4. Síntese de Nanoemulsões com melitina	39
3.5. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	40
3.6. Curva de sobrevivência (atividade inibitória e atividade bactericida)	40
3.7. Ação sobre a membrana celular	41
3.7.1. Permeabilidade da membrana celular	41
3.7.2. Integridade da membrana celular	42
3.7.3. Efluxo de íons potássio e fosfato	42
3.8. Efeito dos tratamentos na formação do biofilme	43
3.9. Efeito dos tratamentos em biofilmes estabelecidos	43

3.10. Atividade hemolítica.....	44
3.11. Análise da citotoxicidade da melitina e oxacilina por citometria de fluxo	44
3.12. Análise proteômica de MRSA submetida a concentrações subletais de melitina e de sua associação com oxacilina	46
3.12.1. Extração e quantificação de proteínas	46
3.12.2. Eletroforese unidimensional	47
3.12.3. Digestão Enzimática das proteínas	47
3.12.4. Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas	48
3.12.5. Análise dos dados de espectrometria de massas.....	48
3.13. Análise estatística	49
4. Resultados e Discussão.....	50
4.1. Síntese de nanopartículas de ouro conjugadas com melitina	50
4.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	51
4.3. Curva de sobrevivência (atividade inibitória e atividade bactericida)	53
4.4. Ação sobre a membrana celular.....	55
4.4.1. Permeabilidade da membrana celular.....	55
4.4.2. Integridade da membrana celular	56
4.4.3. Efluxo de íons potássio e fosfato	57
4.5. Efeito dos tratamentos na formação do biofilme.....	60
4.6. Efeito dos tratamentos em biofilmes estabelecidos.....	61
4.7. Atividade hemolítica.....	63
4.8. Análise da citotoxicidade da melitina e oxacilina por citometria de fluxo	64
4.9. Análise proteômica de MRSA submetida a concentrações subletais de melitina e de sua associação com oxacilina.....	68
4.9.1. MRSA tratado com melitina.....	69
4.9.2. MRSA tratado com oxacilina	76

4.9.3. MRSA tratado com melitina em associação com oxacilina	77
5. Conclusões.....	80
6. Referências Bibliográficas.....	82
Apêndice	99

1. Introdução

1.1. Aspectos gerais de resistência bacteriana

As pesquisas por alternativas terapêuticas para as doenças infecciosas são necessárias e devem ser constantes. Além disto, a resistência bacteriana tornou-se um problema de saúde pública mundial devido ao uso intenso dos antibióticos. Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC, 2019), essa resistência vem elevando a mortalidade, morbidade e os custos com saúde sendo que ao redor de 2,8 milhões de pessoas foram acometidas com infecções por bactérias resistentes aos antibióticos com um custo estimado em mais de 20 bilhões de dólares por ano. Em 2019, cerca de cinco milhões de mortes ocorreram no mundo associadas a infecções causadas por bactérias resistentes (LAXMINARAYAN, 2022).

Algumas bactérias oportunistas Gram-positivas e Gram-negativas apresentam grande resistência aos antibióticos, como é o caso das denominadas ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e algumas espécies de *Enterobacter* spp, sendo consideradas potenciais causadoras de infecções com alta risco de mortalidade. Das bactérias Gram-positivas as que mais podem causar infecções de difícil tratamento são o *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA), *S. aureus* vancomicina resistente (VRSA) e o *Enterococcus* vancomicina resistente (VRE) (PFALZGRAFF; BRANDENBURG; WEINDL, 2018; TSAKOU et al., 2020).

Os genes de resistência aos antibióticos podem ser inatos da bactéria ou podem ser adquiridos. A aquisição de genes de resistência pode ocorrer por meio de mutações cromossomais que acontecem aleatoriamente, em uma frequência estimada de 10^{-9} por gene, sendo que o rearranjo de sequências de nucleotídeos pode acontecer por inversões, duplicações, inserções, deleções e transposições. As bactérias também podem adquirir genes de resistência por meio de plasmídeos e outros tipos de elementos genéticos móveis por meio de três processos: via bacteriófagos na transdução, na transformação quando há aquisição de elementos genéticos que estão no ambiente que foram liberados por bactérias mortas ou pela conjugação, processo em que bactérias adquirem os elementos genéticos móveis contendo genes de resistência, geralmente por meio do pili (LAI et al., 2022).

Os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos são distintos com destaque para a inativação enzimática dos antibióticos, alteração dos sítios alvos do fármaco, alteração da permeabilidade do fármaco (diminuindo a concentração intracelular dos antimicrobianos) e pelo uso de bombas de efluxo (expulsão do fármaco do interior da célula) (UDDIN et al. 2021).

Algumas práticas podem ser aplicadas para tentar controlar a resistência bacteriana, como regular e controlar a administração de antibióticos para que não haja o uso incorreto e/ou prescrições erradas de antibióticos na clínica; necessidade de minimizar o uso na criação animal restringindo apenas o uso em animais doentes e sob supervisão veterinária; reportar e monitorar o uso de antibióticos e o aparecimento de isolados resistentes; desenvolvimento de agentes antibacterianos e pesquisa por novos modelos de liberação controlada desses fármacos como nanopartículas, nanoemulsões e lipossomas (UDDIN et al., 2021).

A resistência antimicrobiana estava restrita aos ambientes hospitalares, até que em meados de 1990, começaram a aparecer isolados de origem comunitária, com destaque para o *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) USA300 que emergiu como um dos mais prevalentes nos EUA, depois se espalhando para o resto do mundo (LAI et al., 2022).

1.2. *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é uma bactéria Gram-positiva e comensal, presente na pele e mucosas, sendo carregada por 30 a 50% da população, principalmente alojada na mucosa nasal. O *S. aureus* apresenta capacidade de formação de biofilme e produção de toxinas e é oportunista, podendo causar infecções de pele e em tecidos moles, infecções crônicas de feridas, endocardites, bacteremias nosocomiais, infecções sanguíneas, pneumonias, osteomielite, infecções associadas a dispositivos implantáveis como cateteres, podendo ocasionar quadros de sepse e até levar os pacientes a óbito (PARASTAN et al., 2020; LIU, W. et al., 2021).

A partir de 1961, isolados de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) associados aos ambientes hospitalares emergiram no Reino Unido e novos clones apareceram e se espalharam pelo mundo. No final de 1980 e começo de 1990, isolados resistentes de origem comunitária começaram a surgir. As infecções por MRSA são as mesmas que as de *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina (MSSA), porém são de difícil tratamento, alta

mortalidade e alto custo com maiores estadias no hospital (LIU, Y. et al., 2021; LAI et al., 2022).

Segundo o CDC, o número de casos reportados de MRSA ultrapassaram 323 mil e mais de 10 mil óbitos anuais (CDC, 2019); no Reino Unido, mais de 12 mil casos anuais de bacteremias por MRSA foram relatados (PHE, 2020). MRSA apresenta resistência aos macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas, sendo as opções mais viáveis de tratamento: tigeciclina, linezolida, ceftarolina, teicoplanina, daptomicina e vancomicina (LIU, W. et al., 2021).

A resistência de MRSA está relacionada com o gene *mecA* e *mecC* que é carregado pelo elemento móvel conhecido como cassete cromossômico estafilocócico (*SCCmec*). Existem 12 tipos de *SCCmec* (I-XII) e todos contêm o gene *mecA* (com exceção do tipo XI que contém o homólogo *mecC*) e esse gene codifica a proteína de ligação à penicilina 2a (PBP2a). A PBP2a possui uma baixa afinidade para os antibióticos β -lactâmicos e na presença desses antibióticos há inibição da função das quatro proteínas nativas de ligação à penicilina de *S. aureus* (PBP1, PBP2, PBP3 e PBP4), fazendo com que esses antibióticos não sejam eficazes (LEE et al., 2018; LIU, W. et al., 2021).

1.2.1. Biofilme

O biofilme é uma comunidade de microrganismos sésseis que se instala em superfícies abióticas ou bióticas e está envolto por uma camada de matriz extracelular produzida por essas bactérias. A composição da matriz polimérica inclui: proteínas, polissacarídeos e DNA externo (eDNA), conferindo a estabilidade e proteção do biofilme. O biofilme pode ser formado por uma ou mais espécies bacterianas (HØIBY et al., 2010; PARASTAN et al., 2021). O biofilme bacteriano costuma causar infecções crônicas com antibioticoterapia persistente, inflamação e danos teciduais; e geralmente ocorre nos dentes, válvulas do coração (endocardite), feridas crônicas e em dispositivos implantáveis como cateteres e stents (HØIBY et al., 2010).

A comunidade bacteriana do biofilme altera algumas características como expressão gênica, produção de proteínas e a susceptibilidade aos antibióticos em relação às células planctônicas. As bactérias presentes no biofilme apresentam maior resistência, cerca de 100 a 1000 vezes mais resistentes aos antibióticos do que as bactérias na forma planctônica e são

1 menos susceptíveis a ação do sistema imune do hospedeiro. Os fatores que determinam essa
2 maior resistência são: camada de matriz polimérica extracelular no qual as células estão
3 embebidas; taxa de crescimento reduzida dentro dos biofilmes devido à baixa concentração de
4 oxigênio; baixa síntese proteica e baixa atividade metabólica (na superfície essas condições
5 são favoráveis, mas no centro do biofilme há baixa atividade); e a presença de células
6 persistentes (células dormentes e não crescentes na matriz do biofilme que são de difícil
7 erradicação). Nos biofilmes há elevadas taxas de mutação e ocorrem transmissões horizontais
8 de genes, contribuindo também para a sua resistência aos antimicrobianos (HØIBY et al.,
9 2010; REFFUVEILLE et al., 2014; PARASTAN et al., 2021).

10 O início da formação do biofilme começa com a bactéria planctônica se aderindo a
11 uma superfície (biótica ou abiótica) por meio de forças de van der Waals, interações estéricas
12 e eletrostáticas e interações hidrofóbicas e hidrofílicas, sendo essa adesão irreversível; depois
13 ela se adere a matriz do hospedeiro por meio dos componentes da superfície microbiana que
14 reconhecem moléculas adesivas da matriz (MSCRAMMs) e de moléculas adesivas de
15 repertório expandido (SERAMs). As MSCRAMMs são proteínas que são ancoradas na parede
16 celular de *S. aureus* e desempenham função de adesão, invasão de células hospedeiras, evasão
17 do sistema imune e formação de biofilme. O polissacarídeo intercelular adesina (PIA) ou
18 poly-N-succinil- β -1,6-glucosamina (PNAG) tem sua síntese controlada pelo *locus* adesão
19 intercelular (*ica*): genes *icaADBC* e *icaR* são responsáveis pela adesão intercelular das células
20 bacterianas e pela adesão das células bacterianas com a superfície. O *locus ica* está presente
21 na maioria dos *S. aureus*, sendo um possível gene acessório (RUMBAUGH; SAUER, 2020;
22 PARASTAN et al., 2021).

23 Após a adesão, ocorre a formação das microcolônias que se ligam umas às outras e
24 começam a produzir a matriz polimérica extracelular que irá recobrir todo o biofilme. O
25 quarto passo da formação é a maturação das microcolônias e o estabelecimento de canais para
26 circulação de nutrientes dentro do biofilme, sendo que diferentes lugares do biofilme
27 apresentam diferentes condições de oxigênio, substrato, pH e diferentes expressões gênicas.
28 Após sua formação, algumas células bacterianas sésseis conseguem se converter a células
29 planctônicas e se dispersam em novos locais podendo desenvolver outros biofilmes
30 (RUMBAUGH; SAUER, 2020; PARASTAN et al., 2021).

No *S. aureus* o gene acessório regulador (*agr*) do sistema de *quorum sensing* (*locus* cromossomal *agrBDCA*) funciona como uma comunicação entre as células bacterianas do biofilme, sendo capaz de perceber a quantidade de moléculas sinalizadoras e de identificar sua densidade populacional e podendo alterar a expressão de genes de acordo. Esse gene é responsável por regular a formação do biofilme de *S. aureus*, regular os fatores de virulência, síntese de enzimas e a resistência aos antibióticos (LIU, W. et al., 2021; PARASTAN et al., 2021).

1.3. Peptídeos antimicrobianos

Os produtos naturais são uma fonte de compostos ativos, apresentando grande diversidade estrutural e química e muitos mecanismos de ação, sendo ideais para o desenvolvimento de novos fármacos e agentes terapêuticos. Os compostos ativos ainda podem passar por modificações químicas e estruturais visando uma melhor ação antibacteriana. Cerca de 60% dos compostos químicos com ação antibacteriana são originários de produtos naturais (ZHANG et al., 2020; MIETHKE et al., 2021).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas de defesa derivadas de vários tipos de organismos vivos desde insetos, plantas, anfíbios, microrganismos até mamíferos. Em geral, os peptídeos costumam ser anfipáticos, catiônicos, pequenos (12 a 50 aminoácidos) e apresentam amplo espectro de ação contra bactérias, fungos, vírus e parasitas (PFALZGRAFF; BRANDENBURG; WEINDL, 2018). A melitina, uma fração do veneno da abelha *Apis mellifera*, é um exemplo de peptídeo antimicrobiano que vem sendo estudado devido a sua rápida e eficiente ação contra uma grande variedade de microrganismos.

São conhecidos mais de 3000 PAMs e alguns são aprovados pela FDA (U.S. Food and Drug Administration): colistina, gramicidina D, daptomicina, vancomicina, oritavancina, dalbavancina e telavancina (LI et al., 2021). Os PAMs podem ser classificados em três tipos: (1) peptídeos lineares que formam α -hélice e não contém resíduos de cisteína; (2) peptídeos que contém muitos resíduos de prolina e/ou glicina e (3) peptídeos que contém resíduos de cisteína e formam pontes de dissulfeto internamente (ELEFThERIANOS et al., 2021).

Existem mecanismos que demonstram como os peptídeos ativos podem romper uma membrana plasmática: modelo de carpete ou modelo detergente (*carpet-like* ou *detergent-*

like), modelo poro *barrel-stave* e modelo poro toroidal (**Figura 1**). Os modelos de ação estão relacionados com a constituição dos PAMs e com suas estruturas secundárias (LI et al., 2021).

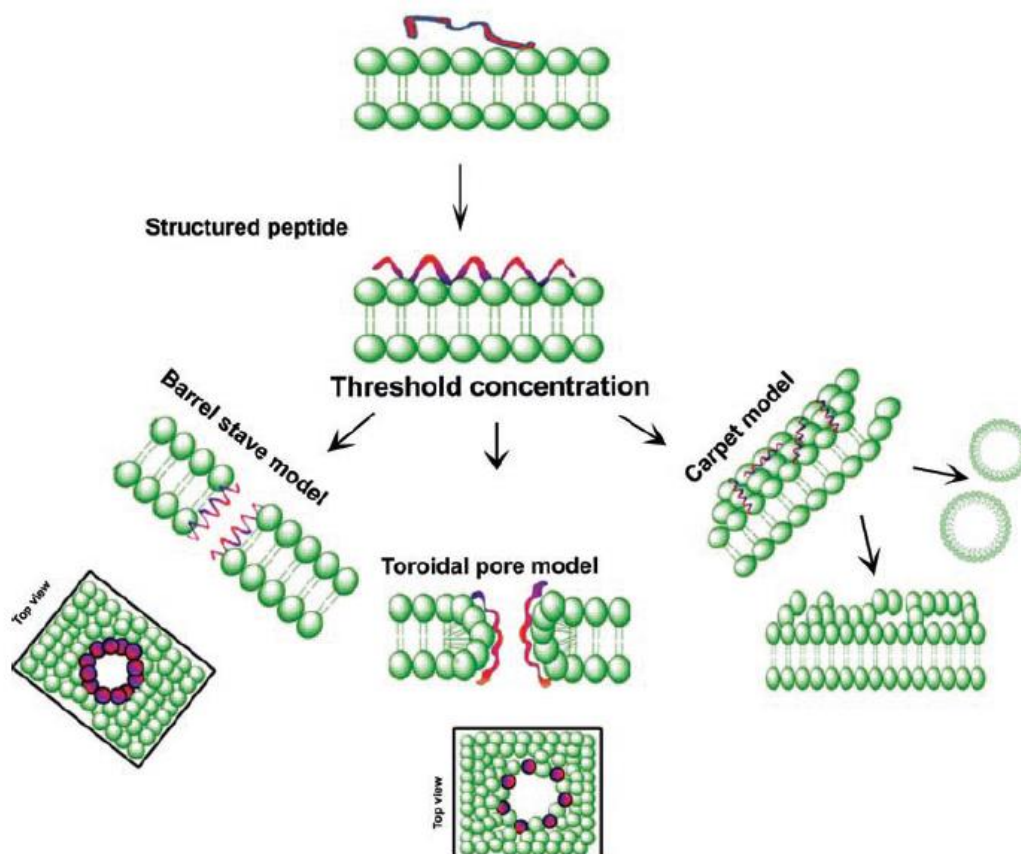


Figura 1. Modelos do modo de ação dos peptídeos antimicrobianos em membranas plasmáticas: modelo *barrel-stave*, modelo poro toroidal e modelo de tapete (Fonte: PASUPULETI et al., 2012).

No modelo de tapete ou detergente, os peptídeos se acumulam na bicamada lipídica e acabam perturbando a tensão superficial, gerando poros ou defeitos na membrana celular das bactérias. Para esse modelo ocorrer são necessárias muitas moléculas do peptídeo que acabam recobrando a superfície da membrana justificando por isso o nome de tapete. Nessa interação, os peptídeos ficam orientados de modo paralelo às membranas e acabam perturbando a ordenação lipídica, facilitando a penetração de água e promovendo a distorção celular seguida de morte (LI et al., 2021).

Os PAMs no modelo detergente ou tapete estão em uma alta concentração de e se acumulam na membrana celular, causando um rompimento e formação de micelas. Nos modelos *barrel-stave* e poro toroidal, os peptídeos acabam se inserindo na membrana celular; no *barrel-stave* ocorre a formação de um poro em forma de barril, onde em seu centro há

somente a superfície hidrofílica dos peptídeos e sua parte hidrofóbica fica aderida a membrana celular, funcionando como um canal de íons; já no poro toroidal, os peptídeos e as cabeças dos lipídios da membrana interagem e se alinham para formar poros hidrofílicos (EBENHAN et al., 2014; LI et al., 2021).

Os PAMs que são catiônicos apresentam uma afinidade pelas membranas plasmáticas aniônicas das bactérias (ricas em fosfolipídeos, fosfatidilglicerol, cardiolipina e fosfatidilserina) e também ocorrem interações hidrofóbicas entre os domínios anfipáticos dos peptídeos e cadeias-acil da membrana lipídica (BROWN; HANCOCK, 2006; WIRADHARMA; LIU; YANG, 2012; LI et al., 2021). A ação dos PAMs sobre as bactérias provoca lise celular devido ao extravasamento de íons e conteúdos intracelulares, despolarização do potencial da membrana e rompimento da membrana celular (LIU, Y. et al., 2021). Os PAMs apresentam vários mecanismos de ação, não atuando somente nas membranas celulares das bactérias, mas também sobre alvos intracelulares. Um potencial alvo dos peptídeos é o DNA genômico que afeta a expressão gênica e inibição da síntese de macromoléculas ou destruição de substâncias necessárias para o metabolismo celular. Os PAMs também podem agir sobre os ribossomos impedindo a síntese protéica além de poder atuar sobre enzimas intracelulares e organelas (LI et al., 2021).

1.3.1.Melitina

O veneno da abelha *Apis mellifera* contém diversos compostos ativos e há dois que são mais abundantes: a melitina, que representa cerca de 50% do peso seco do veneno e a fosfolipase A2 que representa em média de 10 a 12% do peso seco. Também estão presentes substâncias como: aminas biogênicas (histamina, dopamina, noradrenalina), peptídeos ativos (apamina e peptídeo degranulador de mastócitos – MCD), componentes enzimáticos (hialuronidase e fosfatase), entre outros componentes. Alguns peptídeos derivados desse veneno já tem ação antimicrobiana reportada na literatura: melitina, apamina e secapina, sendo a melitina destacada por suas várias atividades biológicas e efeitos terapêuticos relatados, porém com elevada toxicidade (RADY et al., 2017; CARPENA et al., 2020).

A melitina é um peptídeo linear, catiônico, anfipático e pequeno que apresenta 26 resíduos de aminoácidos (PARAY et al., 2021). Possui atividade hemolítica, devido a sua capacidade de se ligar aos eritrócitos induzindo a liberação de hemoglobina e promovendo liberação de conteúdos citoplasmáticos (GUHA et al., 2021). A melitina apresenta várias

propriedades biológicas já reportadas na literatura tais como antibacteriana, antiviral, antifúngica, anticâncer, antiparasitária além de poder desempenhar um papel imunoterapêutico e ter efeitos anti-inflamatório e analgésico (GUHA et al., 2021; PARAY et al., 2021).

A capacidade de redução da formação de biofilmes da melitina em algumas bactérias já vem sendo relatada (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*), podendo inclusive ocasionar a destruição de biofilmes, impedir a ligação das bactérias com a superfície e matar as bactérias que estão na matriz extrapolimérica (DOSLER; KARAASLAN; GERCEKER, 2016; BARDBARI et al., 2018; PICOLI et al., 2017; GUHA et al., 2021).

A estrutura da melitina em soluções foi determinada por meio da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Na sequência primária a melitina é anfipática, a parte N-terminal é mais hidrofóbica que a porção C-terminal, essa parte é polar e catiônica. Quando a melitina se dobra e fica em conformação α -hélice, ela continua apresentando uma parte hidrofóbica na superfície e uma parte polar na superfície oposta (GUHA et al., 2021). Em soluções onde a melitina se encontra com baixa força iônica e/ou em pouca concentração, ela se conforma como monômero e quando se encontra em alta concentração e/ou com alta força iônica, ela se conforma em um tetrâmero de estrutura α -hélice. Quando a melitina interage com as membranas da bicamada lipídica, ela apresenta conformação em α -hélice, podendo causar rompimento na membrana (GUHA et al., 2021; PARAY et al., 2021).

A interação da melitina com membranas plasmáticas causa uma permeabilização dessa, permitindo a passagem de íons, água e metabólitos através da membrana, causando morte celular. A ação da melitina em membranas vai variar de acordo com a composição dos lipídios, concentração de lipídios, temperatura e a concentração de melitina. Então não há uma certeza de qual modo a melitina age no rompimento das membranas e nem dos processos moleculares que levam a esse rompimento (PANDIDAN; MECHLER, 2019; GUHA et al., 2021).

A melitina pode apresentar atividade hemolítica em eritrócitos humanos e também é citotóxica para vários tipos celulares (PARAY et al., 2021), sendo que essa citotoxicidade pode ser avaliada por meio da citometria de fluxo, identificando a apoptose e necrose das células. Visando evitar os seus efeitos colaterais, a melitina pode ser utilizada em associação

com antibióticos ou em sistemas nanocarreadores como nanopartículas ou nanoemulsões para uma melhor estabilidade e eficiência (LI et al., 2021)

1.4. Sinergismo com antibióticos

O sinergismo de produtos com ação antimicrobiana e antibióticos convencionais visa o aumento da eficácia da atividade antibacteriana; redução da dose dos antimicrobianos; diminuição dos efeitos colaterais e evitando o desenvolvimento de resistência já que a associação utiliza diferentes mecanismos de ação (LAI et al., 2022).

O uso combinado de antimicrobianos pode ser uma boa alternativa quando há atividade sinérgica como por exemplo: o uso de gentamicinas com beta-lactâmicos para o tratamento de endocardite por *Streptococcus* sp.; para evitar o risco de resistência aos antibióticos; em infecções com mais de uma bactéria envolvida; e também visando aumentar o espectro de ação em casos de infecções por bactérias resistentes (EDWARDS et al., 2021).

Os peptídeos antimicrobianos em associação com os antibióticos podem ser uma combinação eficiente devido a ação dos peptídeos sobre membranas como formação de poros e com isto permitindo a permeabilização da membrana e consequente morte celular. Isto também pode atuar facilitando a entrada dos antibióticos no interior das células bacterianas agindo sobre alvos intracelulares (LI et al., 2021; LIU, Y. et al., 2021).

A melitina apresenta sinergismo com outros peptídeos ativos, como a nisina e com antibióticos convencionais e possui atividade bactericida contra bactérias resistentes aos antibióticos convencionais (DOSLER; GERCEKER, 2012; DOSLER; KARAASLAN; GERCEKER, 2016 BARDBARI et al., 2018; GUHA et al., 2021).

1.5. Nanoemulsões

Os compostos ativos de produtos naturais podem ter sua ação melhorada pela nanotecnologia por ser possível a sua conjugação em nanopartículas ou nanoemulsões, podendo obter maior solubilidade e aumento dos efeitos farmacológicos com melhor eficácia e menos efeitos indesejados (ZHANG et al., 2020).

A nanoemulsão é uma dispersão coloidal composta de dois líquidos não solúveis que são estabilizados por um agente surfactante. As nanoemulsões podem atuar como sistemas de

liberação controlada de fármacos e possuem tamanho médio que varia de 50 a 1000 nm (CHANGEDIYA; JANI; KAKDE, 2019).

A diferença entre nanoemulsões e emulsões se dá pelo tamanho e formato das partículas na solução. Existem duas formas clássicas de preparação de nanoemulsão sendo estes métodos de alta energia ou baixa energia. No método de alta energia, são necessárias energias mecânicas e/ou químicas, fazendo com que haja uma homogeneização de alta pressão, sendo comum o uso de ultrassonicadores; enquanto o de baixa energia só se aproveita das características físico-químicas do sistema (CHANGEDIYA; JANI; KAKDE, 2019).

Existem alguns métodos de preparação de nanoemulsões, sendo eles:

- Inversão de fase: a nanoemulsão é gerada por meio da energia química resultante do processo de emulsificação;
- Inversão de fase por temperatura: a composição é constante, apenas a temperatura é alterada, modificando as afinidades dos surfactantes pela água e pelo óleo;
- Composição da Inversão de fase: a composição da nanoemulsão é alterada em temperatura constante. Nesse método a água ou óleo é adicionado frequentemente sobre a misturas de óleo/surfactante ou água/surfactante;
- Sonicação: tamanho da gotícula é reduzido por meio da sonicação;
- Ultrassonicação: a sonda do ultrassonicador entra diretamente em contato com o líquido provocando vibração mecânica e induzindo a cavitação (fenômeno físico em que ocorre a vaporização de um líquido, formando bolhas de vapor em um meio fluido, por causa da redução da pressão);
- Microfluidizador: processa fluidos em altas pressões, nesse sistema são produzidos impacto, cisalhamento e cavitação, produzindo então a nanoemulsão;
- Emulsificação de alta energia: algumas nanoemulsões precisam de energias mecânicas ou químicas para serem formadas. Nos métodos de alta energia, a energia mecânica é aplicada por homogeneizadores de alta pressão, agitação de alto cisalhamento e/ou geradores de ultrassom, fazendo com que haja o rompimento das fases de água e óleo e a formação de nanoemulsões;

- Homogeneizador de alta pressão: utiliza o homogeneizador para produzir nanoemulsões de até 1 nm, através de forças de cisalhamento hidráulico, turbulência intensa e cavitação, pode ser utilizado para gerar gotas do tamanho desejado;
- Agitação de alto cisalhamento: as gotículas podem ser reduzidas utilizando esse processo, porém o tamanho médio delas não irá passar de 200 nm;
- Emulsificação de baixa energia: nesse método há formação de gotículas pequenas e uniformes em relação ao processo de alta energia. Nesse método são usadas altas concentrações de emulsificantes sintéticos;
- Nanoemulsificação espontânea: ocorre de maneira espontânea por meio da diluição em temperaturas constantes não havendo transição de fases durante a síntese. A fase oleosa contém uma substância solúvel em água e quando misturada com a água são formadas gotículas de óleo em água (CHANGEDIYA; JANI; KAKDE, 2019).

O índice de polidispersão (PDI) sugere a homogeneidade do sistema, quanto mais alto o PDI, menor é a uniformidade do tamanho da gota das nanoemulsões. O PDI e o tamanho das partículas são avaliados por meio da espectroscopia de correlação de fótons (PCS). Também devem ser analisadas a estabilidade das nanoemulsões frente a mudanças de temperatura, umidade e luz (CHANGEDIYA; JANI; KAKDE, 2019).

1.6. Nanopartículas de ouro

As nanopartículas (NPs) são partículas com diâmetro que pode variar de 1 a 100 nm, sendo diferenciadas de *materiais bulk* por suas características físicas, químicas, mecânicas (dispersão de tamanho, área e razão de volume, estruturas de superfície, forma e aglomeração) e terapêuticas. As nanopartículas na biologia são muito utilizadas para detecção de imagens médicas (exemplo de uso em ressonância magnética); em ensaios biomoleculares; na distribuição de medicamentos em um alvo específico; e no rastreamento celular (HAMMAMI et al., 2021).

As nanopartículas de ouro (AuNPs) costumam ser melhores que outras nanopartículas metálicas, pois apresentam alta estabilidade, boa solubilidade, biocompatibilidade e são inertes (HAMMAMI et al., 2021). As AuNPs quando expostas a luz formam espectros de absorção na UV-Visível, pois o campo elétrico oscilante (fóton incidente) é constante com a

excitação coletiva dos elétrons de condução, absorvendo radiação eletromagnética em uma certa energia sendo esse fenômeno conhecido como ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR). (PHILIP, 2008; KHAN; SAEED; KHAN, 2019). A mudança de cor que ocorre na formação das AuNPs, de vermelho escuro para roxo, se deve ao aumento do tamanho das partículas e isso ocorre devido LSPR e está na região visível do espectro eletromagnético, podendo ser avaliada através da espectroscopia UV-Visível (MENON; RAJESHKUMAR; KUMAR, 2017).

A síntese de AuNPs pode ocorrer por meio de diferentes processos físicos, químicos e/ou biológicos. Alguns parâmetros podem modificar o tamanho das AuNPs: pH, temperatura da reação, tempo de incubação, concentração do extrato de plantas (síntese verde), concentração do sal metálico, entre outros. Alguns dos processos clássicos de síntese das AuNPs são:

- Síntese verde: os extratos de plantas são utilizados como redutores do ouro, convertendo o Au^{3+} para Au^0 e estabilizando as AuNPs. Os extratos de plantas que contém algumas biomoléculas de polifenóis, flavonoides, polissacarídeos, amionoácidos, fenóis e proteínas podem ser utilizados para esse fim;
- Método de Turkevich-Frens: AuNPs podem ser sintetizadas com o agente redutor citrato de sódio que tem uma boa atividade de peroxidase, o citrato é negativamente carregado e apresenta um grande número de grupos carboxila na superfície das AuNPs. Nessa reação, o citrato de sódio mais o ácido tetracloroáurico na presença de água, sendo então o citrato oxidado a acetona dicarboxílica (funciona como estabilizador) e o ácido tetracloroáurico é reduzido a ouro metálico, formando as AuNPs estabilizadas;
- Método de Brust-Schiffrin: nessa síntese há a formação de AuNPs estabilizadas por tiolato. É uma metodologia simples, AuNPs com alta estabilidade e é fácil para funcionalizar as AuNPs;
- Método de Martin: o agente redutor é o borohidreto de sódio (NaBH_4) e o ácido clorídrico (HCl) e o hidróxido de sódio (NaOH) são utilizados como agentes estabilizadores (FAN; CHENG; SUN, 2020; HAMMAMI et al., 2021).

A conjugação de PAMs com nanopartículas podem apresentar certas vantagens como aumento da afinidade e da especificidade aos alvos das bactérias; efeito sinérgico com ação

bactericida, inclusive contra bactérias resistentes; facilitar a entrada dos PAMs; garantir a ação sob os alvos intracelulares; menor toxicidade; alto espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; e baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência devido aos vários mecanismos de ação dos PAMs (GERA; KANKURI; KOGERMANN, 2021; HAN et al., 2021).

1.7. Análise Proteômica

A análise proteômica serve para o estudo de uma mistura de proteínas complexas, como por exemplo um lisado de bactéria, podendo quantificar e identificar as proteínas de uma amostra. Para a realização desse estudo, a amostra precisa ter as suas proteínas e/ou peptídeos separados antes da inserção no espectrômetro de massas. Um dos métodos utilizados para essa separação é a separação de proteínas por meio da eletroforese em gel bidimensional (2DE), seguida pela digestão da amostra com tripsina e por fim a amostra é separada por cromatografia líquida (LC), tipicamente de fase reversa, podendo já ser acoplado com um instrumento de ionização por eletrospray (ESI) ou por meio do Orbitrap, as amostras podem só passar pela digestão por tripsina e já passarem pelo espectrômetro (TSAKOU et al., 2020).

Para o estudo de lisados bacterianos, as modificações pós-traducionais (MPTs) de proteínas costumam apresentar uma relevância biológica, podendo ser utilizadas para avaliar diferenças entre tratamentos, sendo interessante não só a identificação, como a quantificação das proteínas presentes na amostra, fornecendo um melhor entendimento do mecanismo biológico investigado. Existem duas técnicas para o estudo de lisados bacterianos, sendo a iTRAQ (método baseado na marcação de peptídeos) e a label-free (baseada na intensidade do sinal precursor ou na contagem espectral) (TSAKOU et al., 2020).

A proteômica pode servir para identificar os perfis de proteínas em bactérias resistentes; descobrir novos biomarcadores; analisar as interações patógeno e célula hospedeira; avaliar a resposta das bactérias frente aos antimicrobianos e verificar ação das nanotecnologias sobre as bactérias. Alterações dos perfis proteicos de um isolado bacteriano podem demonstrar os níveis de resistência ou as diferentes reações fenotípicas da bactéria frente a um antimicrobiano, podendo ser realizado um estudo comparativo (TSAKOU et al., 2020).

2. Objetivos

Os objetivos desse estudo foram realizar a síntese de uma nanopartícula de ouro conjugada com melitina e duas formulações de nanoemulsões contendo melitina, verificar o sinergismo entre a melitina e antibióticos (oxacilina e cefalotina), testar a ação antibacteriana da melitina, oxacilina, cefalotina, melitina em combinação com oxacilina e das nanopartículas e nanoemulsões contendo melitina sobre isolados de MRSA, avaliar a atividade antibiofilme e investigar os possíveis mecanismos de ação dos tratamentos que apresentaram ação antibacteriana frente a MRSA.

3. Material e métodos

3.1. Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas testadas foram: MRSA ATCC 33591 e um isolado clínico de MRSA proveniente do Hospital das Clínicas de Botucatu e que se encontram armazenadas no Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, sendo ambas linhagens fortes produtoras de biofilme.

3.2. Produtos testados

A melitina utilizada foi obtida através do veneno da abelha *Apis mellifera* e adquirida da Sigma-Aldrich (Merck®) (pureza $\geq 65\%$). A oxacilina foi obtida também da Sigma-Aldrich (pureza 815-950 $\mu\text{g}/\text{mg}$). A cefalotina foi fornecida pela empresa Teuto®.

Os produtos utilizados na síntese de nanopartículas: ácido tetracloroáurico triidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), e N-hidroxisuccinimida (NHS) e tampão salina fosfato (PBS) foram todos adquiridos da empresa Sigma-Aldrich.

3.3. Síntese de Nanopartículas de ouro conjugadas com melitina

A metodologia foi adaptada de Xie et al., 2009. O ouro proveniente do ácido tetracloroáurico triidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), é reduzido a ouro metálico por ação do citrato de sódio, que atua como um agente redutor fraco e que também é um agente de revestimento das nanopartículas de ouro (AuNPs).

Em uma solução de 95 mL de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, de $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L a 80 °C, foi adicionada uma solução de 5 mL de citrato de sódio 1% e a mistura permaneceu sob agitação magnética a 95-100 °C por 45 minutos. Houve uma mudança de coloração, de amarelo para vermelho (**Figura 2**), indicando a formação de nanopartículas de ouro. As AuNPs obtidas foram centrifugadas a 1500 g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 3 mL de água deionizada.

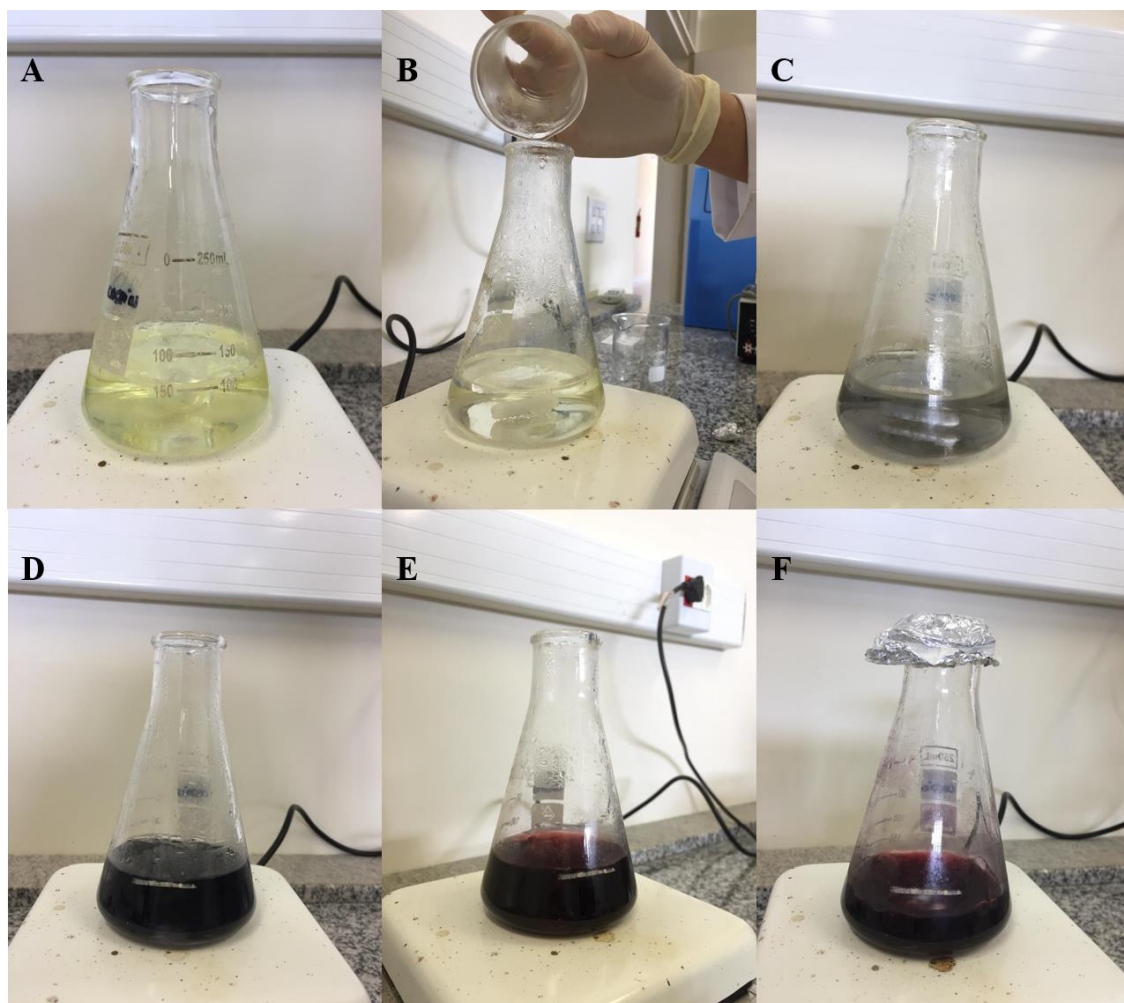


Figura 2. Mudança de coloração durante o preparo da solução de AuNPs. **A:** solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sob agitação magnética; **B:** adição da solução de citrato de sódio; **C:** tempo 0: logo após a adição da solução; **D:** 5 minutos após; **E:** 20 minutos após; **F:** 45 minutos após (PEREIRA, A.F.M., 2022).

Posteriormente, as nanopartículas foram submetidas a 5 minutos em ponteira ultrassônica. Para a funcionalização da superfície das AuNPs, foram adicionados 30 μL de uma solução de ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) [$1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, diluído em álcool etílico absoluto] em 3 mL de AuNPs e ficaram sob incubação a 25 °C por 1 hora.

Foram preparadas duas soluções: uma de 5 µL de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) [$1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, diluído em tampão fosfato salino- PBS com pH 7,4] e uma de 2 µL de N-hidroxisuccinimida (NHS) [$1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, diluído em PBS com pH 7,4] e estas foram misturadas e imediatamente adicionadas à solução de AuNPs funcionalizada. Após isso, as AuNPs ficaram sob incubação a 25 °C por 1 hora.

Por fim, foi adicionado 1,5 mg de melitina pura nas AuNPs e as nanopartículas de ouro contendo melitina foram incubadas a 4 °C por 24 horas. Após o tempo de incubação, as AuNPs com melitina foram centrifugadas a 1500 g por 30 minutos, o sobrenadante foi armazenado e as AuNPs com melitina foram resuspendidas em tampão salina fosfato - PBS (pH 7,4). O sobrenadante foi utilizado para quantificar a melitina que ficou presente nas AuNPs, por meio da metodologia de Bradford (1976), sendo obtida a concentração final de aproximadamente 250 µg/mL de melitina nas AuNPs resuspendidas com PBS.

Para a caracterização das propriedades ópticas e da estrutura eletrônica das AuNPs foi utilizada a espectrofotometria na região de UV-visível, as formulações AuNPs e AuNPs conjugadas com melitina foram lidas no equipamento UV-M51 da BEL Engineering, essa leitura foi realizada em um intervalo de comprimento de onda de 300 nm a 1000 nm. Essa metodologia foi adaptada de Philip (2008).

3.4. Síntese de Nanoemulsões com melitina

Foram preparadas duas nanoemulsões diferentes modificando os agentes surfactantes, feitas conforme metodologias adaptadas: nanoemulsão 1 utilizou 2,0% de óleo de soja, 2,0% de tween 80, 1,0% de lecitina de soja e água destilada, conforme volume final desejado (MEHMOOD; AHMED, 2020); já a nanoemulsão 2 utilizou 1,5% de óleo soja, 2,0% de tween 20, 3,0% de span 80 e água (volume final desejado) (GOYAL et al., 2017; YOUSEFPOOR et al., 2022). As duas nanoemulsões foram preparadas da mesma maneira, a melitina foi diluída diretamente na água destilada e a fase oleosa das nanoemulsões foi gotejada lentamente sobre o volume de água contendo melitina, em um recipiente em banho de gelo, por ultrassonicação. Após a adição da fase oleosa, as nanoemulsões ficaram sobre ultrassonicação por 5 min. Todo o processo de preparo e armazenamento das formulações se deu sob abrigo da luz, para evitar a oxidação dos seus componentes, e após a formulação, elas foram armazenadas em temperatura de geladeira (± 4 °C). Foram preparados 12 mL de cada

nanoemulsão contendo 3 mg de melitina incorporada, obtendo nanoemulsões com concentração final de 250 µg/mL de melitina.

3.5. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Foram realizados os ensaios de sensibilidade de acordo com a metodologia *Resazurin Microtiter Assay (REMA)* adaptada de Martin et al. (2003), em microplacas de elisa de 96 poços, sendo as concentrações obtidas em Mueller Hinton caldo (MHC) em um volume final de 200 µL. Os ensaios foram realizados em triplicata, conforme preconizado por *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (CLSI, 2018). Volumes de 100 µL dos produtos testados foram colocados na placa de 96 poços, nas concentrações desejadas. Foram preparadas suspensões bacterianas de acordo com a escala 0,5 de McFarland que corresponde a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), seguido de inoculação das bactérias nos respectivos poços das microplacas (100 µL) com uma concentração bacteriana corrigida para o equivalente a 10^5 UFC/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Controles negativos foram feitos em todos os ensaios (MHC caldo sem inóculo) e os controles de esterilidade dos produtos testados (MHC caldo com os antibacterianos).

Após incubação, foram realizadas leituras dos respectivos valores de concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração de cada tratamento capaz de inibir o crescimento bacteriano, por meio da impressão visual com a adição do composto revelador de oxirredução resazurina (0,01%), sendo verificado o crescimento quando a coloração mudar da cor violeta para rosa.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi obtida por meio de subculturas das concentrações testadas nos ensaios de microdiluição utilizando placas de ágar Mueller Hinton (MHA). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas, sendo a CBM a menor concentração em que não foi visualizada a formação de colônias.

3.6. Curva de sobrevivência (atividade inibitória e atividade bactericida)

Foram realizados os ensaios para obtenção das curvas de sobrevivência (*time kill curve*) de atividade inibitória e atividade bactericida visando interação sinérgica dos antibióticos

oxacilina e cefalotina com a melitina sobre isolados de MRSA. Foram testados nesse ensaio apenas os produtos que apresentaram atividade antibacteriana em MRSA.

A metodologia foi realizada de acordo com Pashaei et al. (2019) com modificações. Para os ensaios de atividade inibitória foram realizados em microplacas de elisa de 96 poços, utilizando o MHC com um volume final de 200 μ L. Foram utilizadas as concentrações de CIM para os produtos isoladamente (melitina, oxacilina e cefalotina) e combinações nas proporções de 25% da CIM da melitina com 25% da CIM de oxacilina e 25% da CIM da melitina com 25% da CIM de cefalotina. A combinação entre dois antibacterianos mostra sinergismo quando a CIM para cada produto na combinação é menor ou igual a 25% das CIMs de um produto isolado (MAHON; LEHMAN, 2019). Posteriormente foi adicionado o inóculo de MRSA padronizado pela escala 0,5 de McFarland com uma concentração bacteriana corrigida para o equivalente a 10^5 UFC/mL. Um controle contendo apenas o inóculo de MRSA com meio de cultura também foi feito. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas em leitor de microplacas (Epoch 2 – BioTek) e leituras de contagem foram feitas a cada 2 horas por 24 horas a 600 nm. Os ensaios foram feitos em triplicata.

Para determinação da atividade bactericida ou bacteriostática, alíquotas de outra placa feita nas mesmas condições da incubada no leitor, foram inoculadas em MHA e incubadas a 37 °C por 24 horas. As UFC/mL foram expressas em log 10 UFC/mL. Os efeitos dos agentes antimicrobianos (após 24 horas), foram considerados sinérgicos bacteriostáticos quando a redução foi ≥ 2 e ≤ 3 log10 UFC/mL e bactericidas quando houve uma redução ≥ 3 log10 UFC/mL em relação ao controle (meio de cultura com inóculo de MRSA) (DOSLER, S.; KARAASLAN; GERCEKER, 2016).

3.7. Ação sobre a membrana celular

3.7.1. Permeabilidade da membrana celular

A permeabilidade da membrana celular bacteriana foi determinada por meio de metodologia adaptada descrita por Diao et al. (2014) e expressa em forma de condutividade elétrica relativa. Após incubação à 37 °C por 24 horas, a cultura de MRSA foi centrifugada a 3100 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com solução de glicose 5% até que sua condutividade elétrica ficou próxima da condutividade elétrica da solução de glicose 5% não inoculada. Concentrações no valor da CIM e 2 vezes o valor da

CIM (2x CIM) da melitina, oxacilina e da combinação de melitina + oxacilina foram adicionadas à solução de glicose 5% e os valores de condutividade elétrica, assumidos como L₁. Foram adicionadas as mesmas concentrações dos produtos testados à solução isotônica de MRSA e a cultura foi incubada a 37 °C por 4 horas e depois foram realizadas as medições da condutividade elétrica e os valores foram assumidos como L₂. O controle foi obtido pela condutividade elétrica de solução de glicose 5% contendo a cultura bacteriana e fervida em banho-maria por 5 minutos (este valor foi considerado o L₀). Essa foi a fórmula utilizada para o cálculo da condutividade:

$$\text{Condutividade elétrica relativa (\%)} = (L_2 - L_1) / L_0 \times 100$$

3.7.2. Integridade da membrana celular

A integridade da membrana celular de MRSA foi verificada por meio da determinação dos constituintes intracelulares liberados no meio extracelular, incluindo extravasamento de proteínas, medida por meio da metodologia de Bradford (1976) e liberação de ácidos nucleicos de acordo com o método de Lv et al. (2011) modificado. Uma cultura de 50 mL de MRSA foi centrifugada (15 min, 5000 g), lavada 3 vezes com tampão fosfato e ressuspendida em tampão fosfato 0,1 M. Cinco mL da suspensão celular foi incubada a 37 °C sob agitação por 4 horas na presença de diferentes concentrações (CIM e 2x CIM) de melitina, oxacilina e da combinação de melitina + oxacilina. Dois mililitros de cada amostra foram coletados e centrifugados a 10000 g por 7 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para uma microplaca de 48 poços e foram determinadas as concentrações de proteínas extravasadas pelo método de Bradford com densidade óptica (DO) lida a 595 nm e também foram determinados os ácidos nucleicos liberados nos sobrenadantes medindo-se a absorção UV a 260 nm em espectrofotômetro.

3.7.3. Efluxo de íons potássio e fosfato

A concentração de íons potássio e fosfato foi determinada de acordo com a metodologia modificada de Bajpai et al. (2016). Células de MRSA foram expostas a diferentes concentrações de melitina, oxacilina e da combinação melitina + oxacilina (CIM e 2x CIM) em água peptonada (8,5 g de NaCl + 1 g de peptona + 1 litro de água destilada) nos tempos 0, 2 e 4 horas. A cada intervalo de tempo, as concentrações de íons potássio e fosfato foram medidas através dos kits de reação colorimétrica com tiras de teste e reagentes: MQuant™

Potassium test e MQuantTM Phosphate test, de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A concentração de fosfato (PO_4^{3-}) e potássio (K) foi medida de modo semiquantitativo por meio da comparação visual da zona de reação da fita com as escalas de cores presentes no kit. O kit de potássio apresenta uma faixa de medição de: 250 – 450 – 700 – 1000 – 1500 mg/L K e a faixa do kit de fosfato é de: 10 – 25 – 50 – 100 – 250 – 500 mg/L PO_4^{3-} . Os resultados foram expressos em quantidade de íons (mg/L) livres medidos em cada intervalo de tempo.

3.8. Efeito dos tratamentos na formação do biofilme

Diferentes concentrações subinibitórias, no valor de 25%, 50% e 75% da CIM, de melitina, oxacilina e a combinação de ambas foram testadas na formação de biofilme de MRSA por meio da metodologia adaptada de Stepanovic' et al. (2007). Os isolados foram cultivados overnight em 4 mL de caldo triptona de soja (TSB) contendo 1% de glicose e padronizadas pela escala 0,5 de McFarland. 100 μL do inóculo foram dispensados em cada poço de uma placa de 96 poços de fundo chato contendo 100 μL de diferentes concentrações subinibitórias dos produtos testados ou 100 μL de TSB 1% glicose (para controle). Após incubação estática (37 °C/48 h), cada poço foi lavado três vezes com 200 μL de tampão PBS estéril (pH 7,4) e a placa foi incubada a 25 °C por 4h. O biofilme formado no fundo do poço foi fixado com 150 μL de metanol absoluto por 20 min e após secagem overnight em temperatura ambiente, o biofilme foi corado com 150 μL de cristal violeta 1% por 15 min, posteriormente, a placa foi lavada em água corrente para retirada do excesso de corante e os biofilmes corados foram ressuspensos em 150 μL de ácido acético glacial (33%) para a realização da 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 (Nostro et al., 2007).

3.9. Efeito dos tratamentos em biofilmes estabelecidos

Diferentes concentrações suprainibitórias, variando do valor da CIM a 20 vezes o valor da mesma, de melitina, oxacilina e da combinação de ambas foram testadas na erradicação de biofilme de MRSA por meio da metodologia adaptada de Johnson et al. (2002). As linhagens foram cultivadas em 4 mL de TSB acrescido de 1% de glicose, padronizadas pela escala 0,5 de McFarland. 200 μL do inóculo foram dispensados em cada poço de uma placa de 96 poços de fundo chato e a placa foi incubada a 37 °C por 48 h, depois as células planctônicas foram

removidas e cada poço foi lavado três vezes com tampão PBS estéril (pH 7,4). Em seguida, cada poço recebeu 200 µL de TSB contendo diferentes concentrações dos produtos testados e 200 µL de TSB (controle). As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C e depois lidas em espectrofotômetro a 600 nm. Os valores de OD₆₀₀ foram utilizados para verificar a capacidade de remoção do biofilme maduro em relação ao controle. Amostras dos biofilmes foram coletadas do fundo dos poços com auxílio de alças, semeadas em placas de ágar triptona de soja (TSA) e incubadas (72 h/37 °C). A mínima concentração de erradicação do biofilme (BEC) foi determinada como a menor concentração na qual não houve crescimento nas placas de TSA.

3.10. Atividade hemolítica

Para a realização do ensaio de atividade hemolítica, foi utilizado sangue de um doador e esse experimento passou por avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP (Número do parecer: 3.720.202).

A atividade hemolítica foi avaliada conforme metodologia de Zarrinnahad et al. (2017). O sangue heparinizado foi centrifugado a 1500 g por 10 min e depois foi lavado 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS). O sobrenadante foi descartado e uma suspensão de 2% dos eritrócitos foi preparada com PBS. Diferentes concentrações de melitina, oxacilina e a combinação de ambas (4x CIM, 2x CIM, CIM, 50% CIM e 25% CIM) foram diluídas em PBS para se obter diferentes concentrações e foram pipetadas em uma placa de 96 poços junto com 100 µL dos eritrócitos a 2%. O PBS e o Triton X-100 (1%) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. A placa foi incubada a 37 °C por 2 horas e depois centrifugada a 1100 g por 10 min. 100 µL do sobrenadante foram transferidos em outra placa de 96 poços e a densidade óptica (DO) foi lida a 540 nm. A porcentagem hemolítica foi calculada por meio da fórmula:
$$\frac{[DO \text{ amostra} - DO \text{ controle negativo}]}{(DO \text{ controle positivo} - DO \text{ controle negativo})} \times 100.$$

3.11. Análise da citotoxicidade da melitina e oxacilina por citometria de fluxo

Os produtos utilizados nesse ensaio foram testados de acordo com a CIM determinada para a cepa MRSA ATCC. Para o ensaio, foram utilizados os valores de CIM e 2x CIM dos tratamentos melitina, oxacilina e mel+oxa. E os tempos utilizados para o contato com a célula

testada foram determinados nos ensaios de curva de sobrevivência, sendo levado em conta o tempo em que os produtos mostraram ser bactericidas.

Foram utilizadas as células, de linhagem comercial, aneuploides imortalizadas derivadas de queratinócitos epidermais humanos (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 75 cm². As células foram tratadas nas concentrações 5 e 10 µg/ mL de Melitina, por 4 horas, Oxacilina 16 e 32 µg/ mL por 4 horas, Melitina 2 µg/ mL + Oxacilina 4 µg/ mL por 8 horas e Melitina 4 µg/ mL + Oxacilina 8 µg/ mL por 8 horas. A viabilidade da suspensão celular pré-exposição aos tratamentos foi determinada por contador automatizado Countess®. Realizou-se exposição em diferentes tempos.

Após a exposição, as células foram marcadas com Anexina V (FITC) e Iodeto de Propídeo (BD, Pharmingen®) conforme especificações do fabricante. Após marcação, procedeu-se a leitura em citômetro de fluxo FACSCalibur BD® e análise em Cell Quest Pro PAINT-A-GATE BD®. Após leitura, gerou-se gráficos em formato dot plot cuja distribuição da população de células analisada foi feita em quatro quadrantes. No gráfico de perfil morfológico, eixo horizontal Forward Scatter (FSC-H) representa o tamanho das células. O eixo vertical Side Scatter (SSC-H), por sua vez, mostra-nos a granulosidade celular. Para os experimentos foram utilizados controle negativo (CTL) sem a presença dos produtos avaliados (HENRY; HOLLVILLE; MARTIN, 2013).

A **Tabela 1** apresenta os dados para a interpretação das imagens geradas na citometria de fluxo.

1 **Tabela 1.** Interpretação dos resultados de citotoxicidade por citometria de fluxo, levando-se
 2 em conta o perfil de coloração e de morfologia da população celular analisada.

Marcação	Estado da população das células	Quadrante
Anexina V (-) Iodeto de propídeo (-)	Células duplo negativos (sem processo de morte)	LL
Anexina V (-) Iodeto de propídeo (+)	Células positivas para IP (morte tardia)	UL
Anexina V (+) Iodeto de propídeo (-)	Células positivas para Anexina V (apoptose)	LR
Anexina V (+) Iodeto de propídeo (+)	Células duplo-positivas (morte tardia)	UR

3 **3.12. Análise proteômica de MRSA submetida a concentrações subletais de**
 4 **melitina e de sua associação com oxacilina**

5 **3.12.1. Extração e quantificação de proteínas**

6 Para esse ensaio foi utilizada apenas a cepa MRSA ATCC e os ensaios foram
 7 realizados em triplicata em toda a análise proteômica. A metodologia utilizada na análise
 8 proteômica foi a de Cavalcante et al. (2022). As quatro amostras utilizadas para a análise
 9 proteômica foram: MRSA (controle) e MRSA juntamente com concentrações subinibitórias
 10 no valor de 25% CIM de melitina (1,3 µg/mL), 25% da CIM de oxacilina (4 µg/mL) e 25% da
 11 CIM da associação melitina e oxacilina (0,5 µg/mL de melitina + 1 µg/mL de oxacilina).

12 Os isolados de MRSA foram inoculados em Mueller Hinton Caldo II (MHCII),
 13 incubados a 35 °C por 24 horas e padronizados na escala 0,5 de MacFarland e incubados em
 14 erlenmeyers contendo 100 mL de MHCII a 37 °C por 18 horas juntamente com os tratamentos.
 15 Após 18 horas, 50 mL de cada tratamento foram centrifugados por 15 minutos, 3220 g, a 4° C.
 16 O sobrenadante foi removido e os pellets bacterianos foram lavados três vezes com PBS (10
 17 mM, pH 7.4). Por fim, os pellets foram ressuspensos com 200 uL de tampão de lise (Uréia
 18 8 M, NaCl 75 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, MgCl₂ 2 mM, Inibidor de Protease Roche 1x,

1 Benzonase 1 U) para rompimento celular osmótico das 4 amostras testadas. Para o
2 rompimento celular mecânico, as amostras foram submetidas ao ultrassom com probe:
3 equipamento Sonics Vibra-Cell VCX-600 Ultrasonic Processor, utilizando 5 pulsos de 1
4 minuto (Potência: 25 kHz, Amplitude: 20%, com 1 minuto de intervalo entre os ciclos de
5 sonificação) na presença de gelo moído. Ao final desse processo, as amostras foram
6 centrifugadas a 14.000 g por 30 minutos e os sobrenadantes (200 µL) foram coletados e
7 transferidos para microtubos plásticos novos.

8 As proteínas presentes nas amostras foram quantificadas pelo método de Bradford
9 (Bradford, 1976), utilizando o kit BioRad® Protein Assay, tendo soro de albumina bovina
10 (BSA), como proteína padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm (1
11 µL da amostra em cada poço).

12 3.12.2. Eletroforese unidimensional

13 O controle de qualidade das extrações de proteínas foi realizado por meio da
14 eletroforese unidimensional, sob condições desnaturantes em sistema vertical (Mini VE, GE
15 Healthcare, Uppsala, Suécia), conforme metodologia de Laemmli, 1970. O gel de separação à
16 12% (m/v) e de empilhamento à 5% (m/v) de poliacrilamida foram utilizados para separação
17 das proteínas. Foram utilizados 100µg/10µL de proteína total de cada amostra por poço,
18 diluída (1:5) em tampão de corrida, contendo TRIS-HCl 60 mM, pH 6.8, 50% (v/v) glicerol, 2%
19 (m/v) SDS, 23 mM 2-mercapetanol e 0,1% (m/v) azul de bromofenol. As amostras foram
20 homogeneizadas e submetidas à 70 °C em banho seco durante 7 minutos. O marcador de
21 massa molecular (*Low Molecular Weight Markers*, 96-14,4 kDa, GE Healthcare, Uppsala,
22 Suécia) foi utilizado para monitorar a corrida. A separação proteica foi efetuada sob
23 amperagem constante (15 mA/gel) e voltagem aberta (máximo de 300V). Os géis foram
24 corados com Coomassie coloidal G-250 e armazenados em ácido acético 10% (v/v).

25 3.12.3. Digestão Enzimática das proteínas

26 Inicialmente, 50 µg de proteínas totais de cada amostra foram diluídos em 60 µL de
27 bicarbonato de amônio 50 mM e em seguida, 25 µL do surfactante Padrão RapiGest SF
28 (Waters) foram adicionados às amostras, as quais foram incubadas a 37 °C por 60 minutos.
29 Em seguida, as amostras foram submetidas às etapas de redução e alquilação, utilizando DTT
30 10 mM e iodoacetamida 45 mM, respectivamente. A digestão enzimática em solução foi
31 realizada por meio da enzima tripsina na concentração 1:50 (enzima:amostra) solubilizada em

tampão bicarbonato de amônio (50 mM, pH 7.8). A hidrólise ocorreu durante 18 horas e foi interrompida com a adição de 10 µL de ácido fórmico 5% (v/v). As amostras foram incubadas por 90 minutos em temperatura ambiente e posteriormente, centrifugadas a 14.000 g, a 6 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi removido para um tubo novo. Os digestos trípticos contidos em cada amostra foram submetidos às colunas de dessalinização Peptide Cleanup C18 Spin (Agilent Technologies) seguindo as recomendações do fabricante.

3.12.4. Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas por meio de um equipamento de nanocromatografia líquida Ultimate 3000 LC (Dionex, Germering, Germany) acoplado ao equipamento de espectrometria de massas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). As fases móveis utilizadas foram: A) ácido fórmico 0,1% (v/v) em água LCMS e B) ácido fórmico 0,1% (v/v) em acetonitrila 80% (v/v). As amostras foram carregadas em uma pré-coluna C18 - 30 µm x 5 mm (ThermoFisher Scientific), e desalinizadas em um gradiente isocrático de 4%B por 3 minutos à um fluxo de 300 nL/min. Em seguida, as amostras foram fracionadas por uma coluna analítica Reprosil-Pur C18-AQ (3 µm, 120 Å, 105mm) (PICOCHIP) utilizando um gradiente linear de 4-55%B por 30 min, 55% à 90%B por 1 min, mantido à 90%B por 5 minutos e reequilibrado à 4%B por 20 minutos à um fluxo de 300 nL/min. A ionização foi obtida utilizando uma fonte Nanospray ion source (PICOCHIP). O modo de operação foi a ionização positiva utilizando o método DDA. Os espectros MS foram adquiridos de m/z 200 a m/z 2000, resolução de 70.000 e 100 ms de tempo de injeção. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão entre 29 a 35% com resolução de 17.500, 50 ms de tempo de injeção, 4,0 m/z de janela de isolamento e exclusão dinâmica de 10s. Os dados de espectrometria foram adquiridos por meio do software Thermo Xcalibur (versão 4.0.27.19, ThermoFisher Scientific).

3.12.5. Análise dos dados de espectrometria de massas

Os dados brutos de espectrometria de massas no formato.RAW foram submetidos ao software PatternLab [versão 4.0.0.84] (CARVALHO et al., 2016) para a identificação das proteínas totais. Os principais parâmetros utilizados nessa ferramenta foram: banco de dados UNIPROT (Taxonomy *Staphylococcus aureus* MRSA - 22.492 seqüências em 26/12/2021); enzima tripsina; permissão de 2 clivagens perdidas; modificação pós-traducional carbamidometilação dos resíduos de cisteínas; modificação pós-traducional variável oxidação

dos resíduos de metionina; erros de tolerância MS e MS/MS de 0,0200 ppm. A taxa de FDR (*False Discovery Rate*) máxima foi considerada $\leq 1\%$.

Uma matriz compatível com o software MetaboAnalyst 4.0® (<https://www.metaboanalyst.ca/>) foi elaborada a partir dos dados proteômicos utilizando as contagens espectrais de cada proteína identificada, as quais foram normalizadas para cada proteína pela média ponderada das triplicatas técnicas de cada amostra (CHONG et al., 2014). Análises T-student e Fold-change foram utilizadas baseadas no $p < 0,05$ e $Fc \geq 1,5$, respectivamente, em cada comparação amostral. Os dados evidenciados pela análise *Volcano Plot* foram expressos em Log2-Fc.

A análise *volcano plot* forneceu as proteínas que foram expressas diferencialmente em *up-regulation* (maior expressão da proteína) ou *down-regulation* (menor expressão proteica) nos tratamentos em relação ao controle e a análise de importância da variável na projeção (*vip scores*) permitiu a identificação das proteínas mais explicativas ou mais relevantes que foram expressas em *up-regulation* ou *down-regulation* em relação ao controle ($\alpha \geq 1,5$), incluindo as que já apareceram no *volcano plot*, acrescentando mais informações sobre os mecanismos de ação dos tratamentos (BOUDON et al., 2020; ARAUJO et al., 2022).

As proteínas foram submetidas à análise de enriquecimento por meio da classificação de Ontologia Genética (*Gene Ontology* - GO) tais como “função molecular”, “processo biológico” e “componente celular” no UNIPROT. O diagrama de venn foi feito por meio do software disponível em (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

3.13. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados dos experimentos foram submetidos ao teste de One-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados para denotar diferença estatística significativa. As análises foram feitas no GraphPad Prism 9.2®.

4. Resultados e Discussão

4.1. Síntese de nanopartículas de ouro conjugadas com melitina

As formulações de AuNPs e a AuNPs conjugada com melitina (AuNPs + Melitina) foram lidas em espectrofotômetro em UV-Visível, com intervalo de comprimento de onda de 300 a 1000 nm e as suas bandas de absorbância se encontram na **Figura 3**.

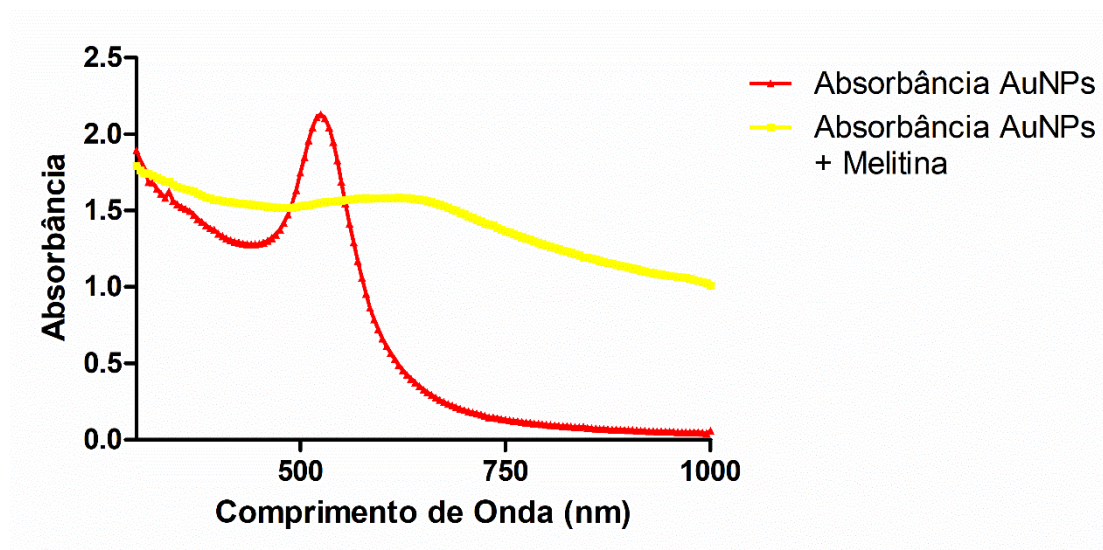


Figura 3. Espectros de absorção de absorção obtidas nas formulações de AuNPs e AuNPs + Melitina.

A AuNPs apresentou uma banda de absorbância em 525 nm, sendo isso referente ao fenômeno da LSPR, estando dentro do padrão esperado para nanopartículas metálicas de ouro. Essa banda de absorbância encontrada foi semelhante ao evidenciado na síntese de AuNPs feita por Mythili et al. (2018), que apresentou uma banda de 530 nm e os espectros de absorção encontrados por Borse e Konwar (2020) que variaram de 520 a 540 nm. Existem alguns fatores que podem influenciar na frequência e na intensidade a banda de absorbância como o tamanho das nanopartículas, forma das nanopartículas, espaçamento entre as partículas das nanopartículas, funcionalização do solvente e/ou da superfície da nanopartícula, entre outros (PHILIP, 2008; KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

4.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A **Tabela 2** e **Tabela 3** apresentam os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM), respectivamente. A melitina apresentou ação antibacteriana (5,3 µg/mL para MRSA ATCC e 4,0 µg/mL para o isolado) e efeito bactericida em 8,0 µg/mL para ambos isolados. A cepa MRSA ATCC apresentou valores de CIM de 16,0 µg/mL para oxacilina e cefalotina, enquanto o MRSA isolado apresentou CIM de 8,0 µg/mL para oxacilina e 2,0 µg/mL para cefalotina, porém ambos isolados apresentaram o mesmo valor de CBM (16 µg/mL) para oxacilina. Por outro lado, a CBM obtida com cefalotina foi superior para MRSA ATCC (32 µg/mL) do que para o isolado (2,0 µg/mL).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) da melitina e dos antibióticos, expressa em µg/mL, frente à MRSA ATCC e Isolado.

MRSA	Melitina	Oxacilina	Cefalotina	AuNPs +melitina	Nano 1+melitina	Nano 2+melitina
ATCC	5,3 ± 2,3 ^{aA}	16,0 ± 8,0 ^{aA}	16 ± 4,0 ^{aA}	>125,0 ^{bA}	>125,0 ^{bA}	>125,0 ^{bA}
Isolado	4,0 ± 4,0 ^{aA}	8,0 ± 0,0 ^{aA}	2,0 ± 1,0 ^{aB}	>125,0 ^b	>125,0 ^{bA}	>125,0 ^{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 3. Concentração bactericida mínima (CBM) da melitina e dos antibióticos, expressa em µg/mL, frente à MRSA ATCC e Isolado.

Bactérias	Melitina	Oxacilina	Cefalotina	AuNPs +melitina	Nano 1+melitina	Nano 2+melitina
ATCC	8,0 ± 2,0 ^{aA}	16,0 ± 4,0 ^{aA}	32 ± 0,0 ^{bA}	>125,0 ^{cA}	>125,0 ^{cA}	>125,0 ^{cA}
Isolado	8,0 ± 2,0 ^{abA}	16,0 ± 8,0 ^{aA}	2,0 ± 1,0 ^{bB}	>125,0 ^{cA}	>125,0 ^{cA}	>125,0 ^{cA}

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 $p \leq 0,05$.

A AuNPs conjugada com melitina e as nanoemulsões 1 e 2 contendo melitina não apresentaram ação antibacteriana sobre os isolados de MRSA quando testadas em concentrações de melitina de até 125 µg/mL. Todos os brancos - formulações sem a presença de melitina - (nanopartícula de ouro, nanoemulsão 1 e nanoemulsão 2) foram testados e também não apresentaram ação antibacteriana frente as bactérias estudadas. As formulações AuNPs+melitina, Nano1+melitina e Nano2+melitina não mostraram eficácia contra as linhagens de MRSA testadas, por isso elas não foram utilizadas para a realização dos demais ensaios.

Os nanoestruturados sintetizados não apresentaram atividade antibacteriana frente a MRSA, existem alguns fatores que podem afetar essa atividade como os agentes químicos utilizados na síntese, o tamanho das partículas e o formato das nanopartículas (CARROUEL et al., 2010; WEBSTER; SEIL, 2012; AHMED et al., 2021; ÁLVAREZ-CHIMAL et al., 2022). O modo de preparo dos nanoestruturados pode também modificar a sua resposta em meios biológicos sob pH diferentes, atividades enzimáticas e oxidativas e até variação de temperaturas (ELSABAHY; WOOLEY, 2012). E ainda há outras condições que podem influenciar a estabilidade de nanoestruturados sendo elas a aglomeração, partículas têm uma alta energia superficial devido ao seu pequeno tamanho e então elas tendem a se aglomerar para diminuir essa energia; e a sedimentação, o tamanho das partículas, sua densidade média e a viscosidade podem contribuir para elas se sedimentarem (WU et al., 2011; SHAO et al., 2015).

As CIM e CBM de melitina determinadas em MRSA variaram de 4,0 a 5,3 µg/mL e de 8 µg/mL, respectivamente. Bevalian et al. (2019) obtiveram CIM e CBM de melitina em isolados de *S. aureus* sensíveis à vancomicina (VSSA), *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) e *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA), variando de 0,125 a 2 µg/mL e 0,125 a 4 µg/mL, respectivamente.

Alni et al. (2020) testaram a ação de melitina sobre isolados de MRSA e MSSA tendo obtido média de CIM de 4,4 µg/mL e de 8,8 µg/mL para a CBM, valores estes semelhantes aos obtidos em nosso estudo, sendo a média da CIM de melitina para os isolados de MRSA de 4,7 µg/mL e 8,0 µg/mL para CBM. Outros estudos também demonstraram valores de CIM para a melitina sobre *S. aureus* similares aos encontrados em nosso estudo (DOSLER, GERCEKER; 2012; PICOLI et al., 2017; PEREIRA et al., 2020).

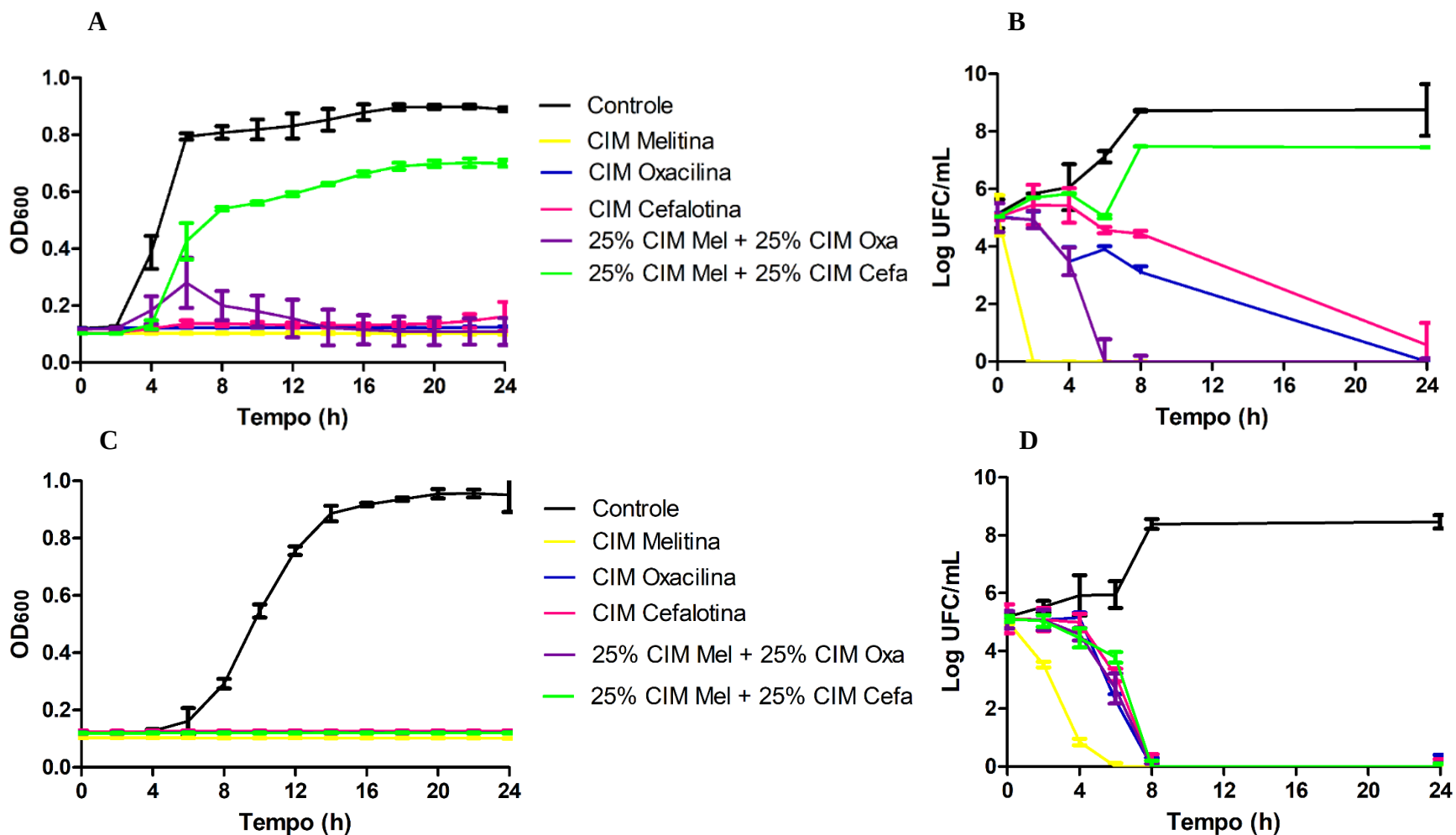
4.3. Curva de sobrevivência (atividade inibitória e atividade bactericida)

Na **Figura 4** são apresentadas as curvas de sobrevivência da atividade inibitória e a da atividade bactericida dos antimicrobianos testados para MRSA ATCC e MRSA Isolado.

A melitina mostrou uma rápida ação inibitória, sendo essa ação também bactericida em 2 horas para MRSA ATCC e em 4 horas para MRSA isolado. Já os antibióticos apresentaram atividades inibitórias mais lentas e ação bactericida em 6 horas para oxacilina e em 8 horas para cefalotina para ambos isolados. A associação entre melitina e cefalotina só mostrou ser sinérgica e bactericida, depois de 8 horas em contato, apenas para MRSA isolado. A associação entre melitina (25% CIM) e oxacilina (25% CIM) mostrou ação sinérgica e bactericida após 6 horas para os dois isolados testados. A cefalotina associada a melitina apresentou um efeito antagonista para MRSA ATCC, que significa um antimicrobiano impedir o efeito de outro. Outras combinações entre fármacos antibacterianos já se mostraram antagonistas, como exemplo penicilina com tetraciclina ou cloranfenicol que atua de maneira antagonica frente a infecções pneumocócicas (ACAR, 2000).

Bevalian et al. (2019) também verificaram que a melitina contra isolados de VRSA apresenta uma rápida e longa ação inibitória, mostrando ação bactericida nesses isolados no intervalo de 15 minutos a 3 horas. Devido à ação bactericida da melitina, muitos pesquisadores já demonstraram ação sinérgica da melitina em combinação com diferentes antibióticos sobre MRSA (DOSLER, GERCEKER, 2012; AL-LANI et al., 2015; MAHMOUDI, ALIKHANI, FOOLADI et al., 2020; PEREIRA et al., 2020). Também recentemente, Alni et al. (2020) demonstraram atividade sinérgica da melitina com o fármaco mupirocina testados em MRSA e MSSA.

O sinergismo entre um antibiótico e outro antimicrobiano pode afetar diferentes alvos de uma bactéria, ajudando a superar os mecanismos de resistência, melhorando a ação bactericida em relação aos produtos de forma isolada, diminuindo a concentração de antibiótico necessária para ação antibacteriana, diminuindo a toxicidade, prolongando o tempo de vida útil do antimicrobiano e podendo restaurar a eficácia daqueles que já não eram indicados para o tratamento dessas bactérias resistentes (BROOKS, BROOKS, 2014; BROWN, WRIGHT, 2016; CALZETTA, KOZIOL-WHITE, 2021).



1 **Figura 4.** Curva de sobrevivência da atividade inibitória, em densidade óptica 600 nm, de MRSA ATCC (A) e MRSA Isolado (C) e curva de
 2 sobrevivência da atividade bactericida, em Log UFC/mL, de MRSA ATCC (B) e MRSA Isolado (D).

Terapias combinadas vem sendo utilizadas para tratamentos de câncer, HIV e até em infecções bacterianas como é o caso de combinações de antibióticos β -lactâmicos e inibidores da β -lactamase (BROWN, WRIGHT, 2016). Akbari et al. (2019) obtiveram êxito no sinergismo entre a melitina e o antibiótico doripenem (β -lactâmico) para o tratamento de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, que como a oxacilina, também atua na parede celular das bactérias.

A associação entre melitina e a oxacilina (mel+oxa), antibiótico β -lactâmico, mostrou ser sinérgica e bactericida para MRSA, podendo ser uma possível alternativa para o desenvolvimento de um agente terapêutico para MRSA já que essa associação proporcionou a utilização de uma dose menor tanto do antibiótico como da melitina para ocasionar a ação bactericida sobre essa bactéria.

4.4. Ação sobre a membrana celular

4.4.1. Permeabilidade da membrana celular

A permeabilidade da membrana celular de MRSA frente aos tratamentos estudados foi avaliada através da condutividade elétrica apresentada na **Figura 5**.

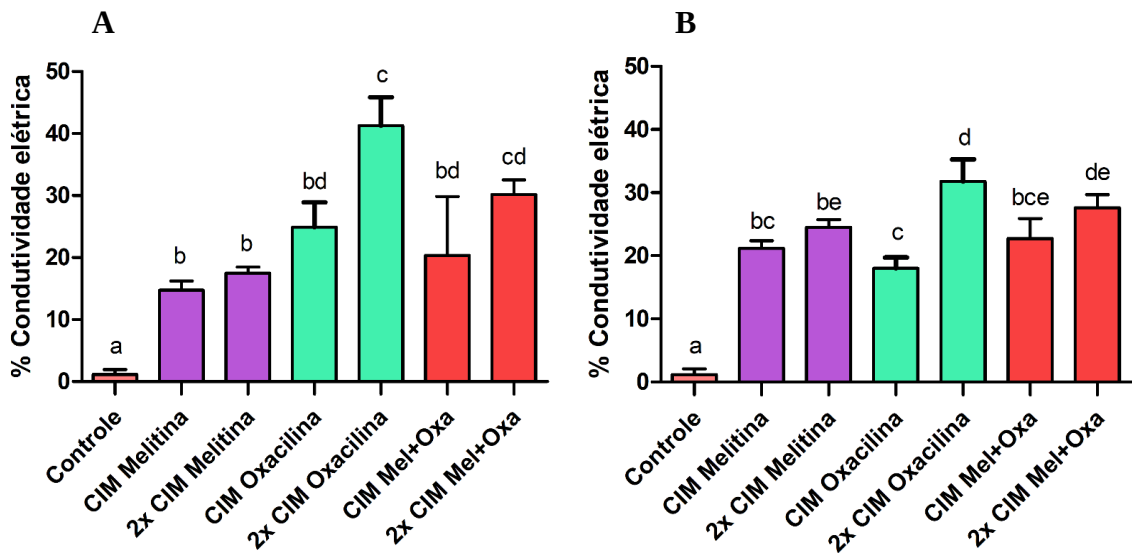


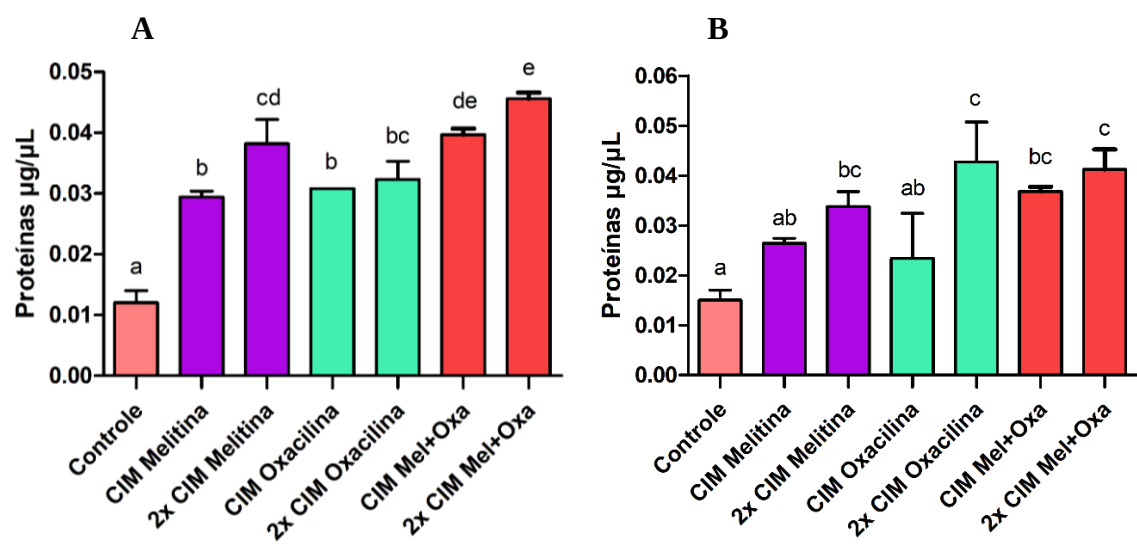
Figura 5. Condutividade elétrica, em porcentagem (%), após 4 horas do tratamento de MRSA ATCC (A) e MRSA Isolado (B) com 1x CIM e 2x CIM melitina, oxacilina e a associação de melitina e oxacilina.

Para ambos isolados, todos os tratamentos mostraram um aumento da condutividade elétrica em relação ao controle, com destaque para 2x CIM (2 vezes o valor da CIM) de

1 oxacilina e 2x CIM de mel+oxa que apresentaram os maiores percentuais de condutividade
2 elétrica, sendo respectivamente 41,3% e 30,2% para MRSA ATCC e 31,8% e 26,6% para
3 MRSA Isolado.

4 4.4.2. Integridade da membrana celular

5 Para avaliar se os tratamentos testados afetavam a integridade da membrana celular de
6 MRSA, o extravasamento de proteínas foi medido e encontra-se na **Figura 6** e a liberação de
7 ácidos nucleicos evidenciada na **Figura 7**.



8 **Figura 6.** Extravasamento de proteínas, expresso em µg/mL, após 4 horas do tratamento de
9 MRSA ATCC (A) e MRSA Isolado (B) com 1x CIM e 2x CIM melitina, oxacilina e a
10 combinação de melitina e oxacilina.

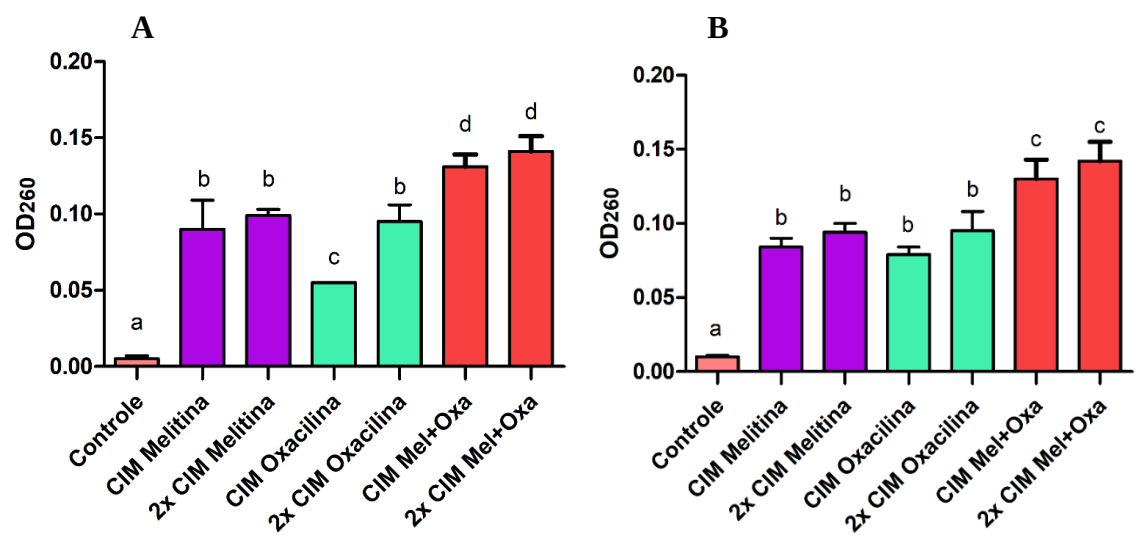


Figura 7. Liberação de ácidos nucleicos, em densidade óptica de 260 nm, após 4 horas do tratamento de MRSA ATCC (A) e MRSA Isolado (B) com 1x CIM e 2x CIM melitina, oxacilina e a combinação de melitina e oxacilina.

De acordo com as **Figuras 6 e 7**, após 4 horas do contato das linhagens com os tratamentos (melitina, oxacilina e mel+oxa) nas CIM e 2x CIM é possível verificar extravasamento de proteínas e ácidos nucleicos, sendo essas liberações de conteúdo citoplasmático estatisticamente significativas. Para MRSA ATCC, a combinação mel+oxa foi a que ocasionou maior liberação de proteínas e ácidos nucleicos, sendo a CIM de mel+oxa responsável por liberar 0,040 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($\pm 0,001$) de proteínas e OD₂₆₀ de 0,131 ($\pm 0,008$) de ácidos nucleicos enquanto que para o tratamento de 2x CIM, houve o extravasamento de 0,046 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($\pm 0,001$) de proteínas e OD₂₆₀ de 0,141 ($\pm 0,010$) para ácidos nucleicos. Para MRSA isolado, os tratamentos de 2x CIM da melitina, 2x CIM da oxacilina e 2x de mel+oxa apresentaram maior extravasamento de proteínas, com variação de 0,034 a 0,043 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sendo que a combinação de mel+oxa (CIM e 2x CIM), promoveu maior liberação de ácidos nucleicos, liberando em OD₂₆₀ entre 0,130 a 0,142.

4.4.3. Efluxo de íons potássio e fosfato

O efluxo de íons potássio e fosfato foi medido após 2 e 4 horas para todos os tratamentos, sendo os resultados apresentados nas **Tabelas 4 e 5**.

Para ambos MRSA, no tempo 0h não houve liberação de íons potássio e fosfato enquanto após 2 horas em todos os tratamentos (melitina, oxacilina e mel+oxa) com a concentração de 2x CIM ocorreu a liberação de 250 mg/L de potássio e de 10 mg/L de fosfato e apenas o tratamento melitina na sua CIM foi capaz de causar a liberação de 10 mg/L de fosfato para os dois isolados testados e a liberação de 250 mg/L de potássio apenas para MRSA ATCC. Após 4 horas de exposição, todos os tratamentos nas concentrações de CIM e 2x CIM promoveram efluxo de 250 mg/L de potássio e de 10 mg/L de fosfato para ambos isolados de MRSA.

1 **Tabela 4.** Efluxo de íons potássio e fosfato, em mg/L, após o tratamento de MRSA ATCC
2 com CIM e 2x CIM de melitina, oxacilina e a combinação de ambas nos tempos 0, 2 e 4 horas.

MRSA ATCC	Íons potássio						Íons fosfato					
	T0h		T2h		T4h		T0h		T2h		T4h	
Controle	0		0		0		0		0		0	
CIM	1x	2x	1x	2x	1x	2x	1x	2x	1x	2x	1x	2x
Melitina	0	0	0	250	250	250	0	0	10	10	10	10
Oxacilina	0	0	0	250	250	250	0	0	0	10	10	10
Mel+Oxa	0	0	0	250	250	250	0	0	0	10	10	10

3 As CIM utilizadas foram de 5,3 µg/mL para melitina, 16 µg/mL para oxacilina e de 2 µg/mL de melitina + 4 µg/mL
4 de oxacilina para mel+oxa.

5 **Tabela 5.** Efluxo de íons potássio e fosfato, em mg/L, após o tratamento de MRSA isolado
6 com CIM e 2x CIM de melitina, oxacilina e a combinação de ambas nos tempos 0, 2 e 4 horas.

MRSA Isolado	Íons potássio						Íons fosfato					
	T0h		T2h		T4h		T0h		T2h		T4h	
Controle	0		0		0		0		0		0	
CIM	1x	2x	1x	2x	1x	2x	1x	2x	1x	2x	1x	2x
Melitina	0	0	250	250	250	250	0	0	10	10	10	10
Oxacilina	0	0	0	250	250	250	0	0	0	10	10	10
Mel+Oxa	0	0	0	250	250	250	0	0	0	10	10	10

7 As CIM utilizadas foram de 5,3 µg/mL para melitina, 16 µg/mL para oxacilina e de 2 µg/mL de melitina + 4
8 µg/mL de oxacilina para mel+oxa.

1 A integridade da membrana celular pode ser determinada pela avaliação do efluxo de
2 íons potássio. O aumento da quantidade de efluxo de íons potássio após o tratamento por
3 PAMs nas bactérias pode reforçar a afirmação de que ocorram danos na membrana celular
4 com conseqüente efluxo de íons (LI et al., 2021). Desta forma, os resultados apresentados
5 indicam também que a melitina e oxacilina, além da associação de ambas, foram capazes de
6 agir sobre a membrana plasmática de MRSA e ocasionar o extravasamento de potássio e
7 fosfato.

8 A melitina, oxacilina e a associação mel+oxa ocasionaram aumento na condutividade
9 elétrica, extravasamento de proteínas, liberação de ácidos nucleicos e efluxo de íons potássio
10 e fosfato, tornando ainda mais evidente a ação da melitina sobre a permeabilidade da
11 membrana celular de MRSA e podendo a melitina ter facilitado a ação da oxacilina sobre a
12 parede celular de MRSA, quando em sinergismo com esse fármaco.

13 Bajpai et al. (2016) testaram a ação de produtos gerados no metabolismo da bactéria
14 do ácido láctico *Pediococcus pentosaceus* 4I1 sobre linhagens de *S. aureus* e *E. coli*. Foi
15 verificada ação inibidora frente a essas bactérias e a sua ação sobre a integridade da
16 membrana foi confirmada através do aumento de efluxo de potássio, pelo extravasamento de
17 ácidos nucleicos (medidos em OD₂₆₀) e pelo aumento da condutividade elétrica, promovendo
18 danos e perda da integridade. Hao et al. (2021) também testaram valores da CIM e 2x CIM de
19 um óleo essencial de *Litsea cubeba* sobre *A. baumannii* e verificaram a integridade e
20 permeabilidade da membrana por meio da porcentagem de condutividade elétrica relativa e
21 pela liberação de ácidos nucleicos (OD₂₆₀).

22 Em 1982, foi constatado pela primeira vez que a melitina interage com membranas
23 fosfolipídicas (TERWILLIGER; EISENBERG, 1982) e desde então os seus mecanismos de
24 ação sobre membranas têm sido investigados. A melitina, que é um peptídeo catiônico,
25 consegue interagir com a superfície das membranas carregadas negativamente de bactérias,
26 podendo acarretar despolarização, permeabilização e ruptura das membranas citoplasmáticas
27 das bactérias (GUHA et al., 2021).

28 O mecanismo pelo qual a melitina é capaz de interagir com as membranas
29 fosfolipídicas pode variar conforme a composição da bicamada lipídica e a quantidade de
30 melitina ligada a membrana ou se inserindo na superfície (ALLENDE; SIMON; MCINTOSH,
31 2005; PANDIDAN; MECHLER, 2019). Há divergências na literatura quanto a forma de ação

da melitina nas membranas: alguns estudos apontam que a melitina age formando *barrel-stave* poros (REX, 1996; GUHA et al., 2019); outros sugerem que a ação ocorre pela formação de poros toroidais (ALLENDE; SIMON; MCINTOSH, 2005; MIHAJLOVIC; LAZARIDIS, 2010; IRUDAYAM; BERKOWITZ, 2011; LEE et al., 2014; GUHA et al., 2019); e a maioria dos estudos demonstram que a melitina se insere nas membranas, agindo de maneira detergente (*detergent-like*) sobre as membranas aniônicas (LADOKHIN; WHITE; 2001; PAPO; SHAI, 2013; PANDIDAN; MECHLER, 2019; WICHMANN et al., 2022).

Pashaei et al. (2019) verificaram a ação da melitina sobre *Acinetobacter baumannii* na microscopia eletrônica de varredura e relataram a formação de grandes poros na membrana citoplasmática da bactéria, possivelmente devido ao fato das regiões N-terminal e central da melitina que são muito hidrofóbicas e que após a melitina se ligar, outras podem se ligar por meio da ligação hidrofóbica mais facilmente que a anterior, ocorrendo um acúmulo de melitina sobre a membrana da bactéria e facilitando a ruptura da membrana ou a formação de poros.

4.5. Efeito dos tratamentos na formação do biofilme

A ação da melitina, da oxacilina e associação de ambas sobre a formação de biofilme de MRSA estão representados na **Figura 8**.

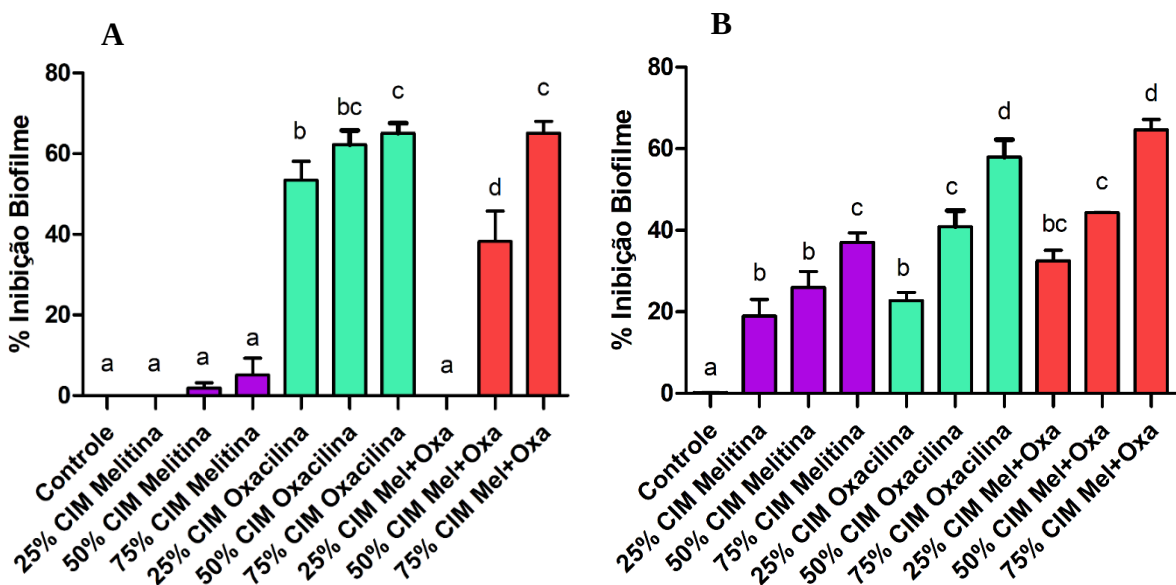


Figura 8. Valores, em porcentagem (%), de inibição do biofilme por concentrações subinibitórias de 25%, 50% e 75% da CIM de melitina, oxacilina e associação de melitina com oxacilina sobre MRSA ATCC (A) e MRSA Isolado (B).

A oxalina e sua combinação com melitina apresentaram inibição de biofilmes de MRSA, sendo que para 75% da CIM de oxacilina e 75% da CIM de mel+oxa ocorreu uma inibição em cerca de 65% na formação de biofilme para ambos isolados de MRSA. No biofilme as bactérias não são inibidas nas mesmas concentrações terapêuticas que as células planctônicas. Desta forma, o sinergismo entre PAMs e antibióticos pode ajudar a superar a resistência associada ao biofilme, elevando a atividade antibiofilme dos antimicrobianos e podendo prevenir ou retardar o surgimento da resistência (GRASSI et al., 2017; GALDIERO et al., 2019). Alguns estudos já demonstraram que a associação entre PAMs e antibióticos pode inibir a formação de biofilmes bacterianos (DOSLER; KARAASLAN; ALEV GERCEKER; 2016; MARTINEZ, et al., 2019; KOPPEN et al., 2019). Os antibacterianos com ação antibiofilme geralmente evitam a adesão das células na superfície ou inibem a formação do biofilme ao invés de remover os biofilmes já formados (MIQUEL et al., 2016).

No estudo de Mirzaei et al. (2022a), a melitina apresentou sinergismo com vancomicina e rifampicina, sendo essas combinações capazes de combater a formação de biofilmes de MRSA. Também foi constatada a ação de inibição na formação de biofilme de MRSA por parte do sinergismo de melitina com oxacilina sendo que isto pode ser explicado pelo fato da melitina inibir o biofilme de MRSA por mecanismos diferentes daqueles realizados por antibióticos utilizados.

Ao contrário dos resultados mostrados em nosso estudo, outros pesquisadores mostraram ação antibiofilme da melitina sobre *S. aureus*. Alni et al. (2020) também testaram a ação de concentrações subinibitórias da CIM de melitina sobre a formação de biofilmes em MSSA e MRSA, tendo verificado que valores correspondentes a 12,5%, 25% e 50% das CIM obtidas foram capazes de diminuir a formação de biofilme. Outros estudos também demonstraram a atividade da melitina sobre a formação de biofilme em *S. aureus* (PICOLI et al., 2017; MIRZAEI et al., 2022a). Como foram utilizadas concentrações subinibitórias, ou seja, abaixo da CIM dos tratamentos, podemos supor que elas não foram eficazes frente ao biofilme decorrente da maior resistência nas células do biofilme de MRSA.

4.6. Efeito dos tratamentos em biofilmes estabelecidos

A ação da melitina, antibióticos e da combinação de melitina com oxacilina sobre os biofilmes maduros de MRSA estão evidenciados na **Figura 9**.

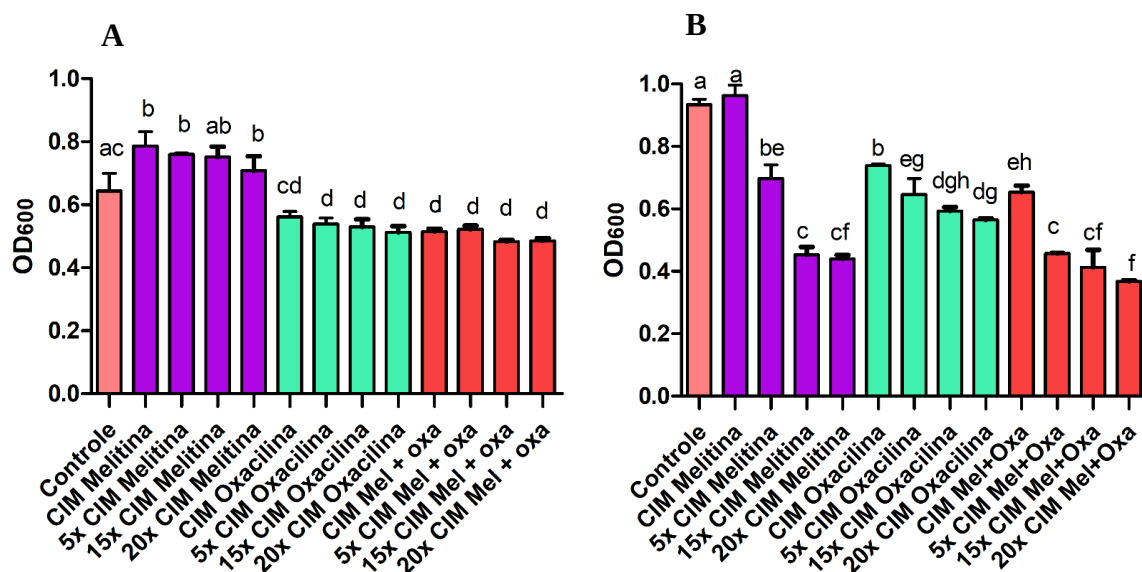


Figura 9. Ação antibiofilme maduro, em densidade óptica 600 nm, da CIM, 5x CIM, 15x CIM e 20x CIM de melitina, oxacilina e da associação de melitina com oxacilina sobre MRSA ATCC (A) e MRSA Isolado (B).

De acordo com os dados obtidos na OD₆₀₀, a combinação mel+oxa possibilitou uma redução dos biofilmes estabelecidos para ambos isolados de MRSA na concentração de 20 vezes a CIM sobre MRSA ATCC e a partir de 5x CIM para MRSA isolado. As concentrações de 15x e 20x CIM da oxacilina para ambos isolados foram apenas capazes de reduzir os biofilmes já estabelecidos em relação ao controle, não sendo capazes de erradicar o biofilme. Já a melitina não apresentou atividade inibitória para MRSA ATCC sendo que somente 15x e 20x CIM da melitina reduziram os biofilmes estabelecidos do MRSA isolado, porém sem sucesso em erradicar o biofilme.

Além da atividade inibidora dos biofilmes estabelecidos demonstrada na **Figura 9**, todos os tratamentos foram semeados em TSA para verificar a atividade bactericida. Para ambos isolados de MRSA, apenas o sinergismo mel+oxa apresentou concentração bactericida de biofilme (BEC), sendo a menor concentração de 15x CIM para MRSA ATCC e de 20x CIM para MRSA Isolado.

Picoli et al. (2017) já haviam demonstrado que a melitina foi capaz de erradicar biofilmes de *S. aureus* já formados ao contrário do que foi observado no estudo, pois a melitina não conseguiu erradicar os biofilmes maduros de MRSA mesmo na concentração de 20x CIM.

Reffuveille et al. (2014) demonstraram o potencial de ação de um peptídeo (denominado 1018) em sinergismo com quatro antibióticos (ceftazidima, ciprofloxacina, imipenem ou tobramicina) tendo verificado que esse sinergismo foi capaz de inibir a formação de biofilme e erradicar biofilmes já formados de *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e MRSA, mostrando o potencial de combinações entre peptídeos e antibióticos sobre bactérias produtoras de biofilme.

Para resultar em ação sobre biofilmes já estabelecidos, são necessárias maiores concentrações de antimicrobianos ou combinações sinérgicas entre eles, como demonstrado nos resultados deste estudo. Isso ocorre possivelmente devido às células bacterianas presentes na matriz polimérica extracelular do biofilme serem mais resistentes do que as células planctônicas fazendo com que ocorram mudanças fenotípicas no biofilme quanto ao seu comportamento tais como a difusão limitada dos antibióticos, o crescimento e metabolismo limitados nas células mais profundas da matriz, a presença de células persistentes, a *upregulation* de mecanismos de resistência e ocorrência de mutações devido ao estresse e transferência de genes de forma horizontal devido à proximidade entre as células do biofilme e como isto resultando na maior resistência aos antibacterianos (REFFUVEILLE et al. 2014; GRASSI et al., 2017).

4.7. Atividade hemolítica

A porcentagem de hemólise dos tratamentos estudados sobre hemácias humanas encontra-se na **Tabela 6**.

As concentrações de 4x CIM de melitina (21 µg/mL) e mel+oxa (8 µg/mL de melitina + 16 µg/mL de oxacilina) provocaram a hemólise de 100% de hemácias humanas. A melitina apresentou uma porcentagem de 4,2% de hemólise na concentração de 2x CIM (10,6 µg/mL) e essa porcentagem diminuiu para 0,2% a partir da CIM até 25% da CIM, mostrando não haver atividade hemolítica nessa faixa. Já a associação de mel+oxa não ocasionou hemólise a partir de 2x CIM até 25% CIM, resultando então numa menor taxa de hemólise em relação a melitina. A oxacilina foi a única que não apresentou atividade hemolítica em qualquer uma das concentrações testadas.

Tabela 6. Valores, em porcentagem (%), da atividade hemolítica causada pelos tratamentos nas cinco diferentes concentrações testadas de melitina, oxacilina e mel+oxa.

	4x CIM	2x CIM	CIM	50% CIM	25% CIM
Melitina	100 ± 0,9 ^{aA}	4,2 ± 7,2 ^{bA}	0,2 ± 0,2 ^{cA}	0,2 ± 0,4 ^{cA}	0,2 ± 0,5 ^{cA}
Oxacilina	0 ± 0,8 ^{aB}	0 ± 0,5 ^{aB}	0 ± 0,2 ^{aA}	0 ± 0,0 ^{aA}	0 ± 0,0 ^{aA}
Mel+Oxa	100 ± 3,8 ^{aA}	0 ± 0,2 ^{bB}	0 ± 0,5 ^{bA}	0,0 ± 0,1 ^{aA}	0,0 ± 0,0 ^{aA}

As CIM utilizadas foram de 5,3 µg/mL para melitina, 16 µg/mL para oxacilina e de 2 µg/mL de melitina + 4 µg/mL de oxacilina para mel+oxa. Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas de atividade hemolítica entre as concentrações testadas de um mesmo produto quando $p \leq 0,05$ e letras maiúsculas diferentes nas colunas representam diferenças significativas de atividade hemolítica entre os produtos testados quando $p \leq 0,05$.

Pashaei et al. (2019) e Bevalian et al. (2019) verificaram que a melitina (32 µg/mL) *in vivo* em ratos saudáveis não causou hemólise. Em outro estudo (MAHMOUDI, ALIKHANI, FOOLADI et al., 2020), a melitina mostrou não ser hemolítica até 1 µg/mL, porém houve hemólise *in vitro* de 50% das células quando utilizada concentração de 2 µg/mL. Mirzaei et al. (2022a), demonstraram que 5 µg/mL de melitina causava hemólise em 96% de hemácias humanas sendo este resultado diferente do verificado no nosso estudo em que a concentração de 5,3 µg/mL só causou hemólise em 0,2% das hemácias humanas.

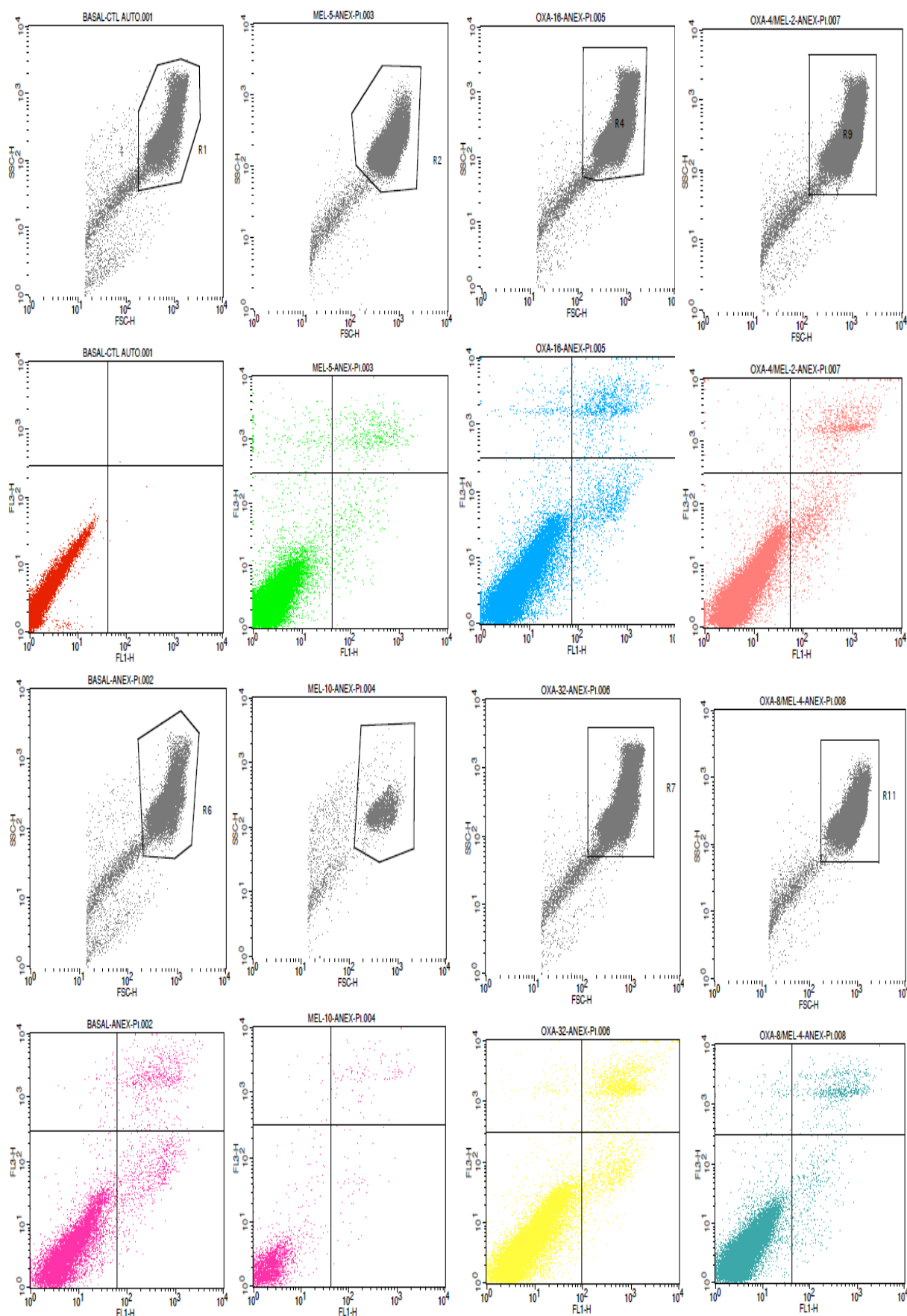
4.8. Análise da citotoxicidade da melitina e oxacilina por citometria de fluxo

A citometria de fluxo mostrou que a melitina e a oxacilina não exerceram indução de apoptose de células HaCaT (**Figura 10**). Para determinação da porcentagem de morte celular por apoptose (LR) e morte celular tardia (UL e UR) causada pela melitina e oxacilina (**Tabela 7**), as células foram submetidas aos tratamentos com valores de CIM e 2x CIM da melitina, oxacilina e mel+oxa, seguido de análise em citômetro de fluxo com marcação para anexina VFITC/PI.

- 1 **Tabela 7.** Resultado em percentual da população de células viáveis, de apoptose e morte
 2 tardia de células HaCaT após exposição a CIM e 2x CIM de melitina, oxacilina e mel+oxa.

Tratamentos	UL (morte tardia) %	UR (morte tardia) %	LL (sem processo de morte) %	LR (apoptose) %
Basal Controle Negativo (autofluorescência)	0	0,01	99,97	0,02
Basal Controle Negativo	0,5	5,4	87,99	6,11
CIM Melitina	0,77	1,64	96,52	1,06
2x CIM Melitina	0,78	3,94	93,62	1,66
CIM Oxacilina	0,89	3,95	90,88	4,29
2x CIM Oxacilina	0,55	5,94	89,42	4,1
CIM Mel+Oxa	0,21	3,53	92,22	4,04
2x CIM Mel+Oxa	0,36	2,54	95,65	1,44

- 3 As CIM utilizadas foram de 5,3 µg/mL para melitina, 16 µg/mL para oxacilina e de 2 µg/mL de melitina + 4
 4 µg/mL de oxacilina para mel+oxa.



1 **Figura 10.** Análise de efeito citotóxico por indução de apoptose e morte tardia em células
 2 HaCaT usando marcação por Anexina V (FITC) e Iodeto de Propídeo.

1 As células HaCaT incubadas por 4 e 8 horas com os tratamentos melitina, oxacilina e
2 mel+oxa (CIM e 2x CIM) apresentaram uma porcentagem de apoptose variando de 1,06% a
3 6,11% para as concentrações avaliadas. A indução de apoptose ou morte celular tardia não foi
4 influenciada com as concentrações da CIM e 2x CIM da melitina, oxacilina e mel+oxa no
5 intervalo de incubação estudado, demonstrando que os compostos estudados não apresentam
6 ação apoptótica.

7 Alni et al. (2020) testaram a citotoxicidade em células Vero e reportam que a melitina
8 não apresentou citotoxicidade. A melitina em sinergismo com o antibiótico doripenem,
9 promoveu redução significativa na dose dos compostos isolados, obtendo efeito antibacteriano
10 e diminuindo também significativamente a citotoxicidade em células normais de rim
11 (HEK293) (AKBARI et al., 2019). O sinergismo entre melitina e rifampicina e vancomicina
12 em ensaios com isolados de *Staphylococcus epidermidis* metilicina resistente (MRSE) revelou
13 que as concentrações de melitina utilizadas no sinergismo não causaram hemólise em
14 eritrócitos humanos e nem citotoxicidade em células HEK293 (MIRZAEI et al., 2022b).

15 O desafio para o uso de PAMs é que eles podem possuir atividade hemolítica e serem
16 citotóxicos para as células do hospedeiro da bactéria (AOKI; UEDA, 2013), mas o sinergismo
17 entre melitina e oxacilina não demonstrou atividade hemolítica em eritrócitos humanos e não
18 mostrou toxicidade em células HaCaT, demonstrando a efetividade de combinações entre
19 PAMs e antibióticos, visando maior eficácia, menor toxicidade e possivelmente evitar
20 mecanismos de resistência.

21 Bevalian et al. (2019) testaram a ação antibacteriana de melitina *in vivo* em ratos com
22 queimaduras de terceiro grau colonizadas por VRSA. Notaram que uma única dose de
23 melitina nas lesões foi responsável pela erradicação de VRSA. Também testaram a toxicidade
24 *in vivo* da melitina nos locais de queimadura e na pele de ratos saudáveis e verificaram que a
25 melitina não apresentou ação citotóxica, bem como não demonstrou ação hemolítica sobre
26 eritrócitos de ratos, mostrando que a melitina foi capaz de erradicar VRSA presente nas lesões
27 na pele de ratos sem induzir a citotoxicidade.

28 Pashaei et al. (2019) também testaram ação da melitina (32 µg/mL) *in vivo* na pele de
29 ratos com queimaduras colonizadas com *Acinetobacter baumannii* e também em ratos
30 saudáveis e tendo verificado que a melitina novamente não apresentou ação tóxica nesses dois
31 grupos. Nos dois estudos citados, a melitina apresentou ação bactericida tópica em ratos com

queimaduras colonizadas por bactérias sem apresentar atividade hemolítica ou qualquer citotoxicidade quando aplicada diretamente em ratos de ambos grupos estudados. Isso demonstra o potencial da melitina para o desenvolvimento de um produto antimicrobiano para uso tópico para o tratamento de feridas e/ou queimaduras que estejam colonizadas pelas bactérias *S. aureus* e *A. baumannii*.

4.9. Análise proteômica de MRSA submetida a concentrações subletais de melitina e de sua associação com oxacilina

A análise proteômica do MRSA ATCC 33591 frente aos tratamentos, permitiu a identificação de 72 proteínas no grupo controle, 96 proteínas no tratamento melitina (68 proteínas em comum com o controle), 43 proteínas no tratamento oxacilina (28 em comum com o controle) e 112 proteínas no tratamento mel+oxa (67 em comum com o controle) (**Figura 11**).

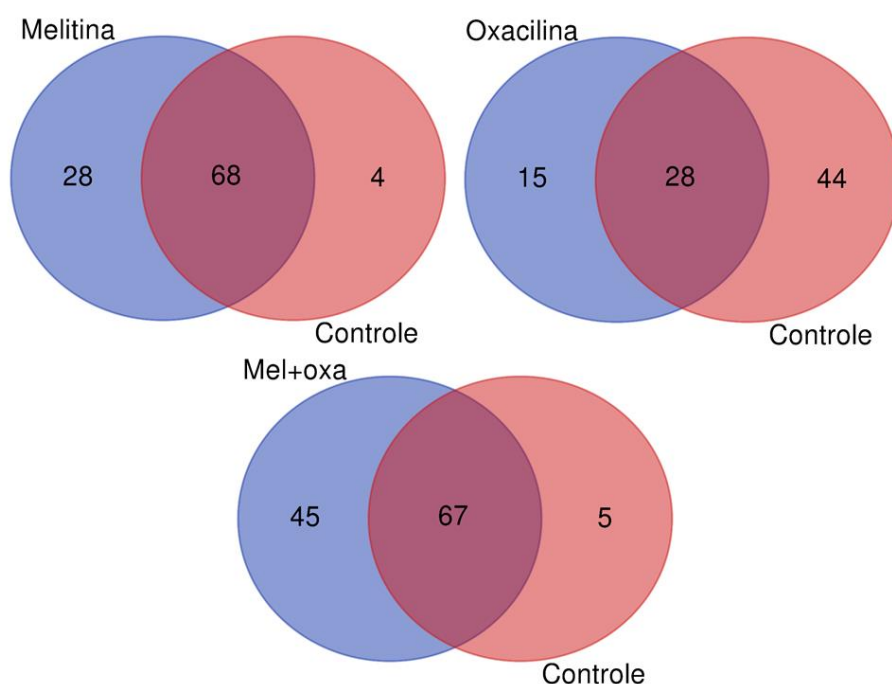


Figura 11. Diagrama de Venn de todas as proteínas identificadas pela análise proteômica nos tratamentos (melitina, oxacilina e mel+oxa) em relação as proteínas identificadas no grupo controle.

De acordo com a análise *volcano plot*, 17 proteínas foram expressas diferencialmente estando em *up-regulation* (maior expressão da proteica) ou *down-regulation* (menor expressão proteica), entre o controle e os três tratamentos com concentrações subletais de

1 melitina, oxacilina e da associação melitina com oxacilina, sendo C, controle, T1, tratamento
2 com melitina, T2, tratamento com oxacilina e T3, tratamento mel+oxa (**Tabela 8**). E,
3 conforme a análise vip scores, 33 proteínas mais relevantes foram destacadas em *up-*
4 *regulation* ou *down-regulation*, entre o controle e os três tratamentos.

5 Os três tratamentos modificaram o perfil proteico de MRSA em relação ao controle,
6 sendo as proteínas expressas de cada tratamento categorizadas conforme sua função molecular
7 e processo biológico (**Figura 12**). As funções moleculares que mais demonstraram alterações
8 na expressão de proteínas foram a de ligação, principalmente ligação a íons, ATP e/ou ácidos
9 nucleicos, seguida por proteínas com atividade catalítica, com destaque para atividade de
10 transferase e oxidoreductase e também houve interferência em proteínas de componentes
11 estruturais, como o ribossomo e membrana celular. Os processos biológicos que apresentaram
12 maiores alterações na expressão das proteínas foram relacionados ao metabolismo bacteriano,
13 afetando principalmente aquelas relacionadas com a tradução e envolvidas com a síntese
14 proteica e associadas ao metabolismo energético.

15 **4.9.1. MRSA tratado com melitina**

16 O tratamento melitina sobre MRSA resultou em 9 proteínas diferencialmente
17 expressas em relação ao controle, sendo 5 em maior expressão - *up-regulation* (*30S ribosomal*
18 *protein S19*, *6-phosphogluconate dehydrogenase*, *decarboxylating*, *aldehyde-alcohol*
19 *dehydrogenase*, *enolase* e *thymidylate synthase*) e 4 em menor expressão - *down-regulation*
20 (*30S ribosomal protein S3*, *50S ribosomal protein L9*, *50S ribosomal protein L11* e *Serine*
21 *hydroxymethyltransferase*). No vip scores, foram identificadas 14 proteínas, sendo 6 proteínas
22 em *up-regulation* e 8 em *down-regulation*.

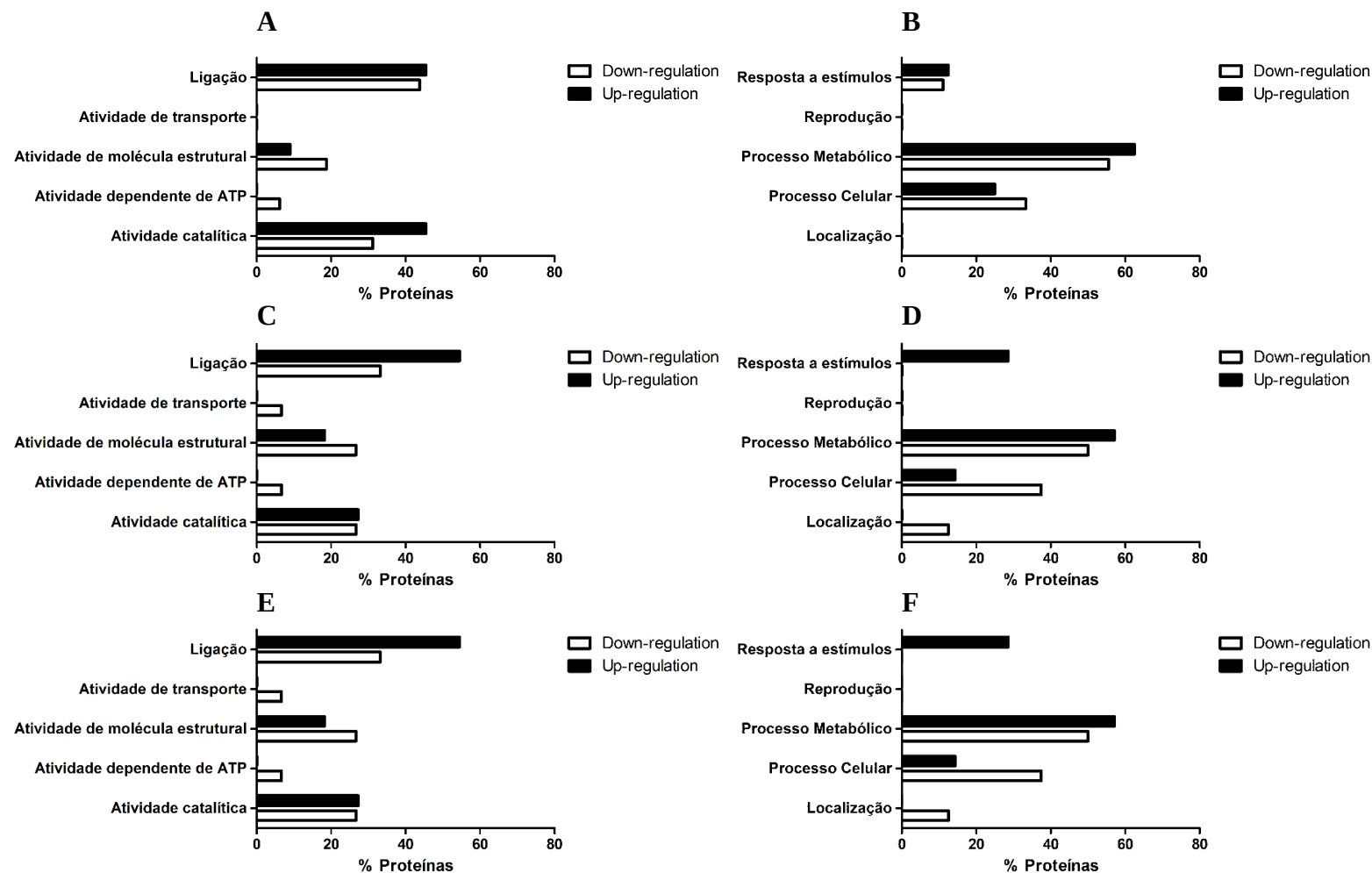
23 Esse tratamento diminuiu principalmente a expressão de proteínas relacionadas a
24 síntese proteica, como as proteínas do ribossomo *30S ribosomal protein S3*, *50S ribosomal*
25 *protein L9*, *50S ribosomal protein L11* que fazem parte do processo de tradução e a proteína
26 *elongation factor G* (EF-G) que atua como um fator da tradução. *Pyruvate kinase* e *Serine*
27 *hydroxymethyltransferase* são relacionadas a glicólise e metabolismo de um carbono,
28 respectivamente, e foram *down-regulated* no tratamento de MRSA com melitina. Outra
29 proteína *down-regulated* foi a *Chaperone protein DnaK*, que atua como resposta ao estresse.

1 **Tabela 8.** Proteínas de MRSA expressas em *up* ou *down-regulation* após os tratamentos T1 - Melitina, T2 - Oxacilina, T3 - Melitina/Oxacilina
2 em comparação ao C - Controle (MRSA sem tratamento) segundo o teste de *volcano plot* e *vips scores*.

Proteínas	Função Molecular	Processo Biológico	Componente celular	Expressão das Proteínas			
				C	T1	T2	T3
<u>30S ribosomal protein S2</u>	Componente estrutural; Ligação – ácido nucleico	Tradução	Ribossomo	✓		<i>down</i>	
<u>30S ribosomal protein S3</u>	Componente estrutural; Ligação – ácido nucleico	Tradução	Ribossomo	✓	<i>down</i>		
<u>30S ribosomal protein S19</u>	Componente estrutural; Ligação – ácido nucleico	Tradução	Ribossomo	✓	<i>up</i>	<i>up</i>	
<u>50S ribosomal protein L9</u>	Componente estrutural; Ligação – ácido nucleico	Tradução	Ribossomo		<i>down</i>	<i>down</i>	
50S ribosomal protein L10	Componente estrutural; Ligação – ácido nucleico	Tradução	Ribossomo			<i>up</i>	
<u>50S ribosomal protein L11</u>	Componente estrutural; Ligação – ácido nucleico	Tradução	Ribossomo	✓	<i>down</i>		<i>down</i>
50S ribosomal protein L18	Componente estrutural; Ligação – ácido nucleico	Tradução	Citoplasma; Ribossomo				<i>up</i>
<u>6-phospho-beta-galactosidase</u>	Glicosidase; Hidrolase	Via catabólica da lactose	–	✓		<i>down</i>	
<u>6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating</u>	Ligação; Oxidoreductase	Utilização de gluconato; Via das pentoses-fosfato	–	✓	<i>up</i>		<i>up</i>
ABC transporter, ATP-binding protein	Hidrolase; Ligação – ATP; Transporte	Transporte de carboidratos	–				<i>up</i>
<u>Aldehyde-alcohol dehydrogenase</u>	Ligação; Oxidoreductase	Processo metabólico do álcool; Utilização de carbono	–	✓	<i>up</i>	<i>up</i>	
Aspartate–tRNA ligase	Ligação – ácido nucleico e ATP; Ligase	Biossíntese de proteína	Citoplasma	✓	<i>up</i>		
ATP synthase subunit beta	ATP-dependente; Ligase; Transporte	Síntese de ATP; Transporte	Membrana celular	✓		<i>down</i>	
Cell division protein FtsZ	Hidrolase; Ligação	Divisão celular	Citoplasma; Sítio de divisão celular				<i>down</i>
Chaperone protein DnaK	ATP-dependente; Chaperona; Hidrolase; Ligação	Resposta ao estresse	–	✓	<i>down</i>		

Cold shock protein CspA	Componente estrutural; Ligação – ácido nucleico	Resposta ao estresse	Citoplasma		<i>up</i>		
DAHP synthetase-chorismate mutase	Liase	Biossíntese de aminoácidos aromáticos; Processo metabólico do corismato	–			<i>up</i>	
Elongation factor G	Fator de tradução; Hidrolase	Biossíntese de proteína	Citoplasma	✓	<i>down</i>		
<u>Enolase</u>	Liase; Ligação	Glicólise	Região extracelular; Superfície celular		<i>up</i>	<i>up</i>	<i>up</i>
Extracellular matrix-binding protein ebh	Componente estrutural	–	Membrana celular	✓	<i>down</i>		
Formate acetyltransferase	Transferase	Metabolismo da glicose	Citoplasma				<i>up</i>
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Ligação; Oxidoreductase	Metabolismo da glicose	–	✓	<i>up</i>		
GMP reductase	Oxidoreductase	Processo metabólico de nucleotídeos	Complexo macromolecular				<i>up</i>
<u>Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*</u>	Ligação; Oxidoreductase	Biossíntese de GMP	–	✓			<i>down</i>
<u>N-acetyltransferase</u>	Transferase	–	–	✓	<i>down</i>	<i>down</i>	<i>down</i>
Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	Transferase	Transporte	Citoplasma	✓			<i>down</i>
PstB	ATP-dependente; Ligação – ATP	Transporte de fosfato	Membrana celular				<i>down</i>
Piruvate kinase	Ligação – ATP; Transferase	Glicólise	–		<i>down</i>		
Ribosomal RNA small subunit methyltransferase H	Ligação; Transferase	Processamento de rRNA	–				<i>down</i>
Ribosome-binding ATPase YchF	Ligação – ATP e íons; Hidrolase, ATP-dependente	–	–				<i>up</i>
S-adenosylmethionine synthase	Ligação – ATP; Transferase	Metabolismo de um carbono (1C)	Citoplasma	✓	<i>down</i>		<i>up</i>
<u>Serine hydroxymethyltransferase</u>	Ligação; Transferase	Metabolismo de um carbono; biossíntese de aminoácidos	Citoplasma	✓	<i>down</i>	<i>down</i>	
<u>Thymidylate synthase</u>	Transferase	Biossíntese de nucleotídeos	Citoplasma		<i>up</i>		
Uncharacterized protein	–	–	–			<i>up</i>	

- 1 Os símbolos indicam: ✓: presença; *down*: *down-regulation* no tratamento e *up*: *up-regulation* no tratamento. As proteínas em negrito e sublinhadas são as diferencialmente expressas segundo o volcano plot. *Única proteína que apareceu no *volcano plot*, mas não no *vip scores*.
- 2



1 **Figura 12.** Função molecular (A, melitina, C, oxacilina e E, mel+oxa) e processo biológico (B, melitina, D, oxacilina e F, mel+oxa) das
2 proteínas diferencialmente expressas (up e down regulation) de MRSA exposto aos tratamentos em comparação ao controle.

1 Outras proteínas associadas ao metabolismo energético tiveram sua expressão
2 aumentada, como a *6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, aldehyde-alcohol*
3 *dehydrogenase* e *enolase*. A *aspartate-tRNA ligase* e a *thymidylate synthase* também
4 apresentaram expressão aumentada, estando relacionadas a biossíntese proteica e a biossíntese
5 de DNA, respectivamente.

6 A ação dos PAMs na integridade das membranas celulares das bactérias pode não ser
7 o único mecanismo de ação, podendo também ter outros alvos intracelulares, afetando
8 diversos processos como a síntese de DNA, a síntese proteica, a síntese da parede celular e
9 ocasionar outras mudanças metabólicas (AOKI; UEDA, 2013), como é o caso da melitina
10 atuando sobre MRSA e afetando os processos de síntese proteica, metabolismo energético,
11 metabolismo de um carbono, síntese de DNA e ocasionando estresse para a célula.

12 O processo de tradução, reponsável pela síntese proteica, é realizado em etapas,
13 ocorrendo a iniciação, alongamento, terminação e reciclagem do ribossomo e em cada passo
14 há fatores de tradução envolvidos, sendo um deles o elongation factor G (EF-G). O EF-G atua
15 na etapa de alongamento, fazendo a translocação de RNAs mensageiros (mRNA) e RNAs de
16 transferência (tRNA) nos ribossomos e na etapa reciclagem de ribossomos, sendo uma
17 proteína essencial para a síntese proteica e um potencial alvo para ação de agentes
18 antibacterianos (FERNANDES, 2016; RODNINA, 2018).

19 Na tradução em bactérias é necessária a montagem de um complexo macromolecular
20 70S que é composto pelas subunidades ribossômicas pequena 30S, podendo consistir em 21
21 proteínas ribossomais (S1-S21), e pela subunidade grande 50S, que pode consistir em 33
22 proteínas ribossomais (L1-L36) (WILSON; NIERHAUS, 2005; BENNISON et al., 2021). No
23 tratamento com melitina, a maior parte das proteínas ribossomais e o EF-G foram menos
24 expressos, mostrando uma ação sobre a síntese proteica.

25 *Aspartate-tRNA ligase* (AspRS) teve sua expressão aumentada, sendo uma enzima
26 que liga aminoácidos aspartato a tRNA específicos e esses participam dos estágios iniciais da
27 tradução sendo importantes para a síntese proteica, sendo as aminoacyl-tRNA possíveis alvos
28 para novos antimicrobianos (HUOT et al., 2010; PANG; WEEKS; AERSCHOT, 2021).

29 A *6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating* (6PGDH) atua na via das
30 pentoses-fosfato (PPP) e está relacionada ao metabolismo de carboidratos, sendo uma via

1 alternativa a glicólise e que produz açúcares de 5 carbonos (ribose-5-fosfato) e NADPH.
2 Ocorreu uma maior expressão de 6PGDH frente ao tratamento de melitina e esse aumento
3 pode promover a eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS) e a síntese de
4 nucleotídeos para o reparo de danos ao DNA provocados pelo tratamento (RIGANTI et al.,
5 2012; LIU et al., 2019).

6 A *aldehyde-alcohol dehydrogenase* (ADHE) atua na síntese do álcool, reduzindo a
7 acetil coenzima A (acetil-CoA) a acetaldeído e reduzindo o acetaldeído a etanol. ADHE
8 participa do metabolismo energético e foi *up-regulated* no tratamento com melitina (VAN
9 LIS et al., 2017).

10 A *enolase* é uma enzima multifuncional que participa do processo biológico da
11 glicólise, ela também pode se encontrar na superfície celular atuando como receptor para
12 certos ligantes, como o plasminogênio, podendo promover a degradação da matriz
13 extracelular (CAPELLO et al., 2011; WU et al., 2015). Além disso, no *S. aureus* também
14 pode estar associada a patogenicidade e pertencente ao complexo degradosoma do RNA
15 mensageiro (mRNA), complexo de proteínas responsável pela degradação do mRNA (ROUX;
16 DEMUTH; DUNMAN, 2011; WU et al., 2015). Em todos os tratamentos essa proteína
17 apareceu em *up-regulation*.

18 O aumento da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo energético pode
19 indicar que a bactéria está precisando de mais energia para garantir sua sobrevivência.
20 (BALEMANS et al., 2012). No caso de MRSA tratada com melitina houve um aumento de
21 expressão em proteínas desse metabolismo (6PGDH, ADHE e enolase), com excessão da
22 *pyruvate kinase* (PK), indicando uma possível tentativa de sobrevivência de MRSA frente ao
23 tratamento.

24 A proteína PK participa do metabolismo dos carboidratos, catalisando a reação final
25 na glicólise de conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato e a fosforilação de ADP em ATP.
26 O piruvato irá participar do tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) que está associado com a
27 patogenicidade de bactérias (VASU et al., 2015). A PK foi *down-regulated* pela melitina e
28 interferindo com a glicólise e produção de piruvato.

29 A proteína *serine hydroxymethyltransferase* (SHMT) teve sua expressão diminuída no
30 tratamento com melitina e ela é fundamental para o metabolismo de um carbono, promovendo

a interconversão reversível de serina e glicina, sendo essa proteína considerada um potencial determinante para a virulência de *S. aureus* resistentes (BATOOL et al., 2020).

A *thymidylate synthase* (TS), é uma enzima transferase, essencial para a conversão de 2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (dUMP) para 2'-deoxythymidine-5'-monophosphate (dTMP), sendo fundamental para a síntese de DNA e a sobrevivência da bactéria e sua replicação, podendo ter tido sua expressão aumentada devido a um mecanismo de sobrevivência a concentração subletal de melitina (POZZI et al., 2019). A SHMT e TS fazem parte da via do metabolismo de um carbono, sendo uma via necessária para a biossíntese de purinas e timidinas e importantes para o crescimento e proliferação celular e a melitina foi capaz de atuar sobre essas proteínas (NONAKA et al., 2019).

As chaperonas atuam em resposta ao estresse, podendo realizar o dobramento de proteínas, evitar a agregação de proteínas durante o estresse e ajudar na reparação de proteínas danificadas pelo estresse (FOURIE; WILSON, 2020). A *chaperone protein DnaK* (DnaK), teve sua expressão *down-regulated* na presença da melitina, isso pode ocorrer em situações de estresse frente a altas temperaturas, exposição de antibióticos como a tetraciclina e em tratamentos de MRSA com mel de abelha, afetando o ciclo celular da bactéria e suprimindo a expressão de proteínas de resposta ao estresse, fazendo com que os antimicrobianos possam agir em tal bactéria (KVINT et al., 2003; JENKINS et al., 2011).

As *N-acetyltransferases* são enzimas responsáveis pela acetilação promovendo a transferência de um grupo acetil da acetilcoenzima A para a amina primária de substratos como antibióticos aminoglicosídeos, peptídeos e outras moléculas pequenas. As *N-acetyltransferases* atuam em vários processos biológicos, como resistência a antibióticos aminoglicosídeos, transcrição, tradução e resposta ao estresse (HENTCHEL; ESCALANTE-SEMERENA, 2015; REN et al., 2017). Em todos os tratamentos, essa proteína estava em *down-regulation*, mostrando ação sobre essa enzima transferase que atua em vários processos importantes para o *S. aureus*.

A análise proteômica de MRSA após tratamento com melitina demonstrou que a melitina não somente atua na membrana celular da bactéria como também em vários outros alvos, como por exemplo no metabolismo energético, síntese de proteínas e na resposta ao estresse.

4.9.2. MRSA tratado com oxacilina

O tratamento oxacilina provocou a expressão diferencial de 3 proteínas em down-regulation, sendo elas a *N-acetyltransferase*, *30S ribosomal protein S2* e *6-phospho-beta-galactosidase*. E segundo a análise de *vip scores*, 15 proteínas foram encontradas, sendo 7 em up-regulation e 8 em down-regulation em relação ao controle.

Esse tratamento afetou proteínas associadas ao metabolismo energético, sendo as proteínas *6-phospho-beta-galactosidase* (atua na via catabólica da lactose, utilizando a lactose como fonte de carboidrato por meio da via *D-tagatose-6-phosphate pathway* - MIALLAU et al., 2007), *ATP synthase subunit beta*, todas down-regulated no tratamento e com aumento significativo das proteínas *aldehyde-alcohol dehydrogenase*, *enolase* e *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (atua na via da glicólise) que também atuam para o suprimento energético. Em relação a proteínas associadas a síntese proteica, que fazem parte do ribossomo e atuam no processo da tradução, o tratamento ocasionou uma maior expressão a *30S ribosomal protein S19* e *50S ribosomal protein L10* e em menor expressão a *30S ribosomal protein S2* e *50S ribosomal protein L9*. Duas proteínas do metabolismo de um carbono foram down-regulated *S-adenosylmethionine synthase* e *serine hydroxymethyltransferase*.

Duas proteínas tiveram uma menor expressão e fazem parte da membrana celular, sendo elas a *extracellular matrix-binding protein ebh* e a *ATP synthase subunit beta*, sendo que essa última faz parte do metabolismo energético e responsável pela síntese de ATP e transporte transmembrana, portanto importante para o crescimento e o metabolismo de *S. aureus* (BALEMANS et al., 2012). Outra proteína encontrada em up-regulation foi a *cold shock protein CspA* que atua na resposta ao estresse, podendo dessa forma indicar resposta ao estresse ocasionado pela oxacilina. Esse tratamento também ocasionou a alteração da *N-acetyltransferase* que apresenta atividade transferase.

O tratamento de oxacilina ocasionou alteração em proteínas relacionadas aos processos de metabolismo energético, síntese proteica, localização e resposta ao estresse. A ação da oxacilina, sobre *S. aureus* já está definida, atuando sobre as proteínas de ligação à penicilina (PBPs), sendo 4 proteínas nativas (PBP1, PBP2, PBP3 e PBP4), e MRSA ainda pode expressar a PBP2a. As PBPs são responsáveis pelas etapas finais da síntese da parede celular das bactérias, sendo que os β -lactâmicos interrompem a formação dessa parede

(WILKE; LOVERING; STRYNADKA, 2005; FISHOVITZ et al., 2014; BUSH; BRADFORD, 2016).

4.9.3. MRSA tratado com melitina em associação com oxacilina

Na associação de melitina com oxacilina (mel+oxa) houve a expressão diferencial de 5 proteínas em relação ao controle, 4 em *down-regulation* (50S ribosomal protein L11, Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, N-acetyltransferase, phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase) e 1 *up-regulated* (6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating). Segundo o *vip scores*, 15 proteínas foram identificadas, sendo 9 em *up-regulation* e 6 em *down-regulation* em relação ao controle. Todos os processos biológicos (metabolismo, celular, reprodução, localização e resposta a estímulos) foram sinalizados nesse tratamento, sendo a síntese proteica o processo biológico mais afetado, seguido pelo metabolismo energético com maior expressão de proteínas.

A associação entre melitina e oxacilina demonstrou ação sobre proteínas comuns aos três tratamentos, sendo a *enolase*, uma proteína em maior expressão e que está relacionada ao processo de glicólise e sobre a *N-acetyltransferase, down-regulated*, tendo essa a atividade de transferase. As proteínas alteradas em comum com o tratamento da melitina foram a: 50S ribosomal protein L11 (síntese proteica), 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (metabolismo de carboidratos) e a proteína em comum com MRSA tratada com oxacilina foi a *S-adenosylmethionine synthase* (metabolismo energético).

Das proteínas identificadas, no tratamento do sinergismo de melitina com oxacilina, foram encontradas proteínas relacionadas ao metabolismo energético (6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, enolase, formate acetyltransferase); proteínas relacionadas ao transporte (ABC transporter, ATP-binding protein, phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase, PstB); proteínas relacionadas ao processo de tradução, regulação desse processo e/ou síntese proteica (50S ribosomal protein L11, 50S ribosomal protein L18, DAHP synthetase-chorismate mutase, Ribosomal RNA small subunit methyltransferase H e Ribosome-binding ATPase YchF); proteínas do metabolismo da purina (GMP reductase e Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase), S-adenosylmethionine synthase relacionada ao metabolismo de um carbono e uma proteína que atua na divisão celular (cell division protein FtsZ).

1 A *cell division protein FtsZ* (FtsZ), uma proteína essencial para a divisão celular, se
2 polimeriza no interior da célula bacteriana gerando um anel chamado anel Z, que determina o
3 local do sítio de divisão celular, recrutando outras proteínas necessárias para a divisão e
4 formando o complexo divisomo, que promove a constrição da membrana celular, a formação
5 de septo na parede celular e então a divisão celular. Quando há alguma alteração na FtsZ
6 ocorre a inibição da divisão celular que depois leva a morte celular, por isso essa proteína é
7 um possível alvo para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos (KAPOOR,
8 PANDA, 2009; PRADHAN, MARGOLIN, BEURIA, 2021). No tratamento mel+oxa, a FtsZ
9 foi menos expressa, mostrando o potencial uso desse sinergismo frente a MRSA.

10 Ferrer-González et al. (2017) verificou o sinergismo entre um agente TXA707 com β -
11 lactâmicos mostrando que a atuação sobre FtsZ garante uma oportunidade de β -lactâmicos
12 atuarem nas PBP2 de MRSA, já que as funções das PBPs são controladas pelo ciclo celular e
13 uma das proteínas chaves desse ciclo é a FtsZ que também é responsável pela localização das
14 PBPs durante o processo de divisão celular.

15 A associação entre melitina e oxacilina alterou a proteína de divisão celular FtsZ e a
16 divisão celular faz com que as células bacterianas apresentem respostas rápidas quanto a
17 disponibilidade de nutrientes fazendo com que o metabolismo energético produza uma maior
18 parte de energia para a síntese proteica (SIDDIQUI, 2021), no caso a melitina ocasionou uma
19 maior expressão em proteínas relacionadas ao metabolismo energético. A *formate*
20 *acetyltransferase* é uma proteína relacionada ao suporte energético que estava em *up-*
21 *regulation*, podendo atuar quando há piruvato disponível, podendo estar mais expresso em
22 situações de anaerobiose, em que a bactéria não tem oxigênio ou nitrato para produzir a sua
23 energia (LEIBIG et al., 2011).

24 A *S-adenosylmethionine synthase* catalisa a reação entre a metionina e ATP para gerar
25 *S-adenosylmethionine* e faz parte do metabolismo de um carbono, sendo importante para o
26 crescimento e desenvolvimento celular, participando de processos de síntese de purinas e
27 pirimidinas e metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos (DUCKER; RABINOWITZ, 2017;
28 DAVE; SUNDRANI; JOSHI, 2021).

29 A *Ribosome-binding ATPase YchF* (YchF) está associada a regulação da tradução
30 durante uma resposta estresse da célula, podendo ter o controle da iniciação da tradução e da
31 degradação de proteínas (LANDWEHR et al., 2021). A *Ribosomal RNA small subunit*

1 *methyltransferase H*, outra proteína associada a regulação da tradução responsável pelo
2 processamento de RNAs ribossomais (rRNA), promovendo a metilação de RNA com *S*-
3 *adenosylmethionine*, também foi afetada pelo tratamento mel+oxa, mostrando sua ação sobre
4 a tradução e a síntese proteica (SWINEHART; JACKMAN, 2015).

5 A *DAHP synthetase* e a *chorismate mutase* (CM) fazem parte da via do chiquimato
6 que é composta por enzimas que catalisam reações levando a biossíntese de compostos
7 aromáticos para a síntese proteica. A primeira parte da via do chiquimato é a síntese da 3-
8 desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP) que ocorre pela DAHP sintase, depois
9 ocorrem outras seis etapas enzimáticas e por fim a síntese de CM que é usado para biossíntese
10 de fenilalanina, tirosina e triptofano. A via chiquimato está presente em bactérias e não em
11 humanos, sendo um bom alvo para ação de agentes antibacterianos. A DAHP de bactérias
12 geralmente é inibida via feedback pela presença de aminoácidos aromáticos. (TZIN;
13 AHARONI, 2012). No tratamento mel+oxa, a DAHP sintase/corismato mutase se
14 encontraram super expressa, indicando uma possível falta de aminoácidos aromáticos em
15 MRSA.

16 A *GMP reductase* (guanosina monofosfato redutase) que catalisa a reação de
17 conversão de guanosina monofosfato (GMP) em inosina monofosfato (IMP), participa do
18 processo de síntese de nucleotídeos purina, mantendo o equilíbrio entre os nucleotídeos
19 adenina e guanina. E a *inosine-5'-monophosphate dehydrogenase* catalisa a reação para
20 formação de xantosina monofosfato (XMP) que depois se converte a GMP. A *GMP reductase*
21 e *inosine-5'-monophosphate dehydrogenase* participam da biossíntese de purinas que é
22 importante para a síntese de DNA e RNA, favorecendo o crescimento bacteriano e ativando
23 fatores de virulência (DENG et al., 2002; PROSISE; LUECKE, 2003; SAMANT et al., 2008;
24 LI et al., 2018).

25 As proteínas de transporte podem afetar a expressão de genes e o metabolismo de
26 bactérias. O tratamento mel+oxa afetou proteínas relacionadas ao transporte: *ABC transporter*,
27 *ATP-binding protein (up-regulated)*, *Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase*
28 *(down-regulated)* e *PstB (down-regulated)*. O transportador ABC possui domínios
29 transmembranas que geram um poro de translocação e domínios para ligação de nucleotídeos,
30 realizando transporte dependente de ATP, podendo transportar açúcares, íons, peptídeos,
31 agentes antimicrobianos, fator de tradução e outros substratos, podendo promover energia,

reparação de DNA e virulência, sendo *up-regulated*, podendo estar tentando secretar o tratamento mel+oxa. *Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase* geralmente atua no sistema de transporte de açúcares e o PstB tem papel no transporte de fosfato e é responsável pela hidrólise de ATP (DAVIDSON et al., 2008; EITINGER et al., 2011; VÄSTERMARK; SAIER, 2014).

A nisina, um peptídeo antimicrobiano produzido pela bactéria *Lactococcus lactis*, em associação com oxacilina também apresentou sinergismo contra MRSA e mostrou mecanismos de ação também relacionados a síntese proteica e metabolismo energético como os da associação de melitina com oxacilina frente a MRSA (ALVES et al., 2020).

A associação entre melitina e oxacilina indica que o mecanismo desse sinergismo não afeta somente a estrutura celular de MRSA, membrana e parede celular, como interfere também na tradução, afetando a síntese de proteínas, no metabolismo energético dessa bactéria, na divisão celular, nos processos de transporte e no metabolismo de purinas, atuando sobre a síntese de DNA, demonstrando que esse sinergismo entre melitina e oxacilina possui vários mecanismos de ação, afetando proteínas essenciais para diferentes processos biológicos de MRSA.

5. Conclusões

A melitina foi eficaz contra MRSA, mostrando ação bactericida rápida e com capacidade de agir na integridade da membrana celular dessa bactéria e ocasionar mudanças no seu metabolismo energético e na síntese de proteínas. Os nanoestruturados (nanopartículas de ouro e nanoemulsões) contendo a melitina não apresentaram uma atividade antibacteriana nas concentrações e formulações testadas sobre MRSA.

A combinação de melitina com oxacilina mostrou ser sinérgica e bactericida para MRSA, apresentando inibição na formação de biofilmes de MRSA e sem apresentar atividade hemolítica em eritrócitos humanos ou citotoxicidade sobre queratinócitos humanos (HaCaT). Essa associação também mostrou ação sobre a integridade e permeabilidade da membrana celular de MRSA e em vários alvos intracelulares como metabolismo energético, síntese proteica, divisão celular, transporte e síntese de DNA, causando distúrbios em mais alvos do que a melitina ou oxacilina isoladamente.

1 A associação entre melitina e oxacilina apresenta a vantagem da combinação de dois
2 antimicrobianos com mecanismos de ação distintos, visando a diminuição das doses dos
3 antimicrobianos, redução dos efeitos adversos e a amenização da resistência bacteriana, já que
4 a associação afeta diversos processos biológicos de MRSA. Essa associação apresenta
5 potencial para o desenvolvimento de um agente antibacteriano ou um novo tratamento contra
6 MRSA.

6. Referências Bibliográficas

- ACAR, J.F. Antibiotic synergy and antagonism. *Medical Clinics of North America*, v. 84, n. 6, p. 1391-1406, 2000.
- AHMED, M.K.; MOYDEEN, A.M.; ISMAIL, A.M.; EL-NAGGAR, M.E.; MENAZEHA, A.A.; EL-NEWEHY, M.H. Wound dressing properties of functionalized environmentally biopolymer loaded with selenium nanoparticles. *Journal of Molecular Structure*, v. 1225, a. 129138, 2021.
- AKBARI, R.; HAKEMI-VALA, M.; PASHAIE, F.; BEVALIAN, P.; HASHEMI, A.; BAGHERI, K.P. Highly synergistic effects of melittin with conventional antibiotics against multidrug-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Drug Resistance*, v. 25, n. 2, p. 193-202, 2019.
- ALLENDE, D.; SIMON, S.A.; MCINTOSH, T.J. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores. *Biophysical Journal*, v. 88, n. 3, p. 1828-1837, 2005.
- ALNI, R.H.; TAVASOLI, F.; BARATI, A.; BADARBANI, S.S.; SALIMI, Z.; BABAEKHOUE, L. Synergistic activity of melittin with mupirocin: A study against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) isolates. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 27, p. 2580-2585, 2020.
- ÁLVAREZ-CHIMAL, R.; GARCÍA-PÉREZ, V.I.; ÁLVAREZ-PÉREZ, M.A.; TAVERA-HERNÁNDEZ, R.; REYES-CARMONA, L.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, M.; ARENAS-ALATORRE, J.A. Influence of the particle size on the antibacterial activity of green synthesized zinc oxide nanoparticles using *Dysphania ambrosioides* extract, supported by molecular docking analysis. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 15, n. 6, a. 103804, 2022.
- ALVES, F.C.B.; ALBANO, M.; ANDRADE, B.F.M.T.; CHECHI, J.L.; PEREIRA A.F.M.; FURLANETTO, A.; RALL, V.L.M.; FERNANDES, A.A.H.; DOS SANTOS, L.D.; BARBOSA, L.N.; FERNANDES JUNIOR, A. Comparative Proteomics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Subjected to Synergistic Effects of the Lantibiotic Nisin and Oxacillin. *Microbial Drug Resistance*, v. 26, p. 179-189, 2020.

- 1 AOKI, W.; UEDA, M. Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of
2 Novel Antibiotics. *Pharmaceuticals*, v. 6, p. 1055-1081, 2013.
- 3 ARAUJO, M.S.; PAULO, O.L.O.H.; SCOTT, C.; PARANZINI, C.S.; CODOGNOTO, V.M.;
4 DELL'AQUA, C.P.F.; PAPA, F.O.; SOUZA, F.F. Insights into the influence of canine breed
5 on proteomics of the spermatozoa and seminal plasma. *Journal of Proteomics*, v. 257, a.
6 104508, 2022.
- 7 BAJPAI, V.K.; HAN, J-H.; RATHER, I.A.; PARK, C.; LIM, J.; PAEK, W.K.; LEE, J.S.;
8 YOO, J-I.; PARK, Y-H.Characterization and antibacterial potential of lactic acid bacterium
9 *Pediococcus pentosaceus* 4I1 isolated from freshwater fish *Zacco koreanus*. *Frontiers in*
10 *Microbiolgy*, v. 7, artigo 2037, p. 1-15, 2016.
- 11 BALEMANS, W.; VRANCKX, L.; LOUNIS, N.; POP, O.; GUILLEMONT, J.;
12 VERGAUWEN, K.; MOL, S.; GILISSEN, R.; MOTTE, M.; LANÇOIS, D.; DE BOLLE, M.;
13 BONROY, K.; LILL, H.; ANDRIES, K.; BALD, D.; KOUL, A. Novel antibiotics targeting
14 respiratory ATP synthesis in Gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrobial Agents and*
15 *Chemotherapy*, v. 56, n. 8, p. 4131-4139, 2012.
- 16 BARDBARI, A.M.; ARABESTANI, M.R.; KARAMI, M.; KERAMAT, F.; AGHAZADEH,
17 H.; ALIKHANI, M.Y.; BAGHERI, K.P. Highly synergistic activity of melittin with
18 imipenem and colistin in biofilm inhibition against multidrug-resistant strong biofilm
19 producer strains of *Acinetobacter baumannii*. *European Journal of Clinical Microbiolgy &*
20 *Infectious Diseases*, v. 37, n. 3, p. 443-454, 2018.
- 21 BATOOL, N.; KO, K.S.; CHAURASIA, A.K.; KIM, K.K. Functional Identification of Serine
22 Hydroxymethyltransferase as a Key Gene Involved in Lysostaphin Resistance and Virulence
23 Potential of *Staphylococcus aureus* Strains. *International Journal of Molecular Sciences*, v.
24 21, a. 9135, 2020.
- 25 BENNISON, D.J.; NAKAMOTO, J.A; CRAGGS, T.D.; MILÓN, P.; RAFFERTY, J.B.;
26 CORRIGAN, RM. (p)ppGpp inhibits 70S ribosome formation in *Staphylococcus aureus* by
27 impeding GTPase-ribosome interactions. *BioRxiv*, 2021.

- 1 BEVALIAN, P.; PASHAEI, F.; AKBARI, R.; BAGHERI, K.P. Eradication of vancomycin-
2 resistant *Staphylococcus aureus* on a mouse model of third-degree burn infection by melittin:
3 An antimicrobial peptide from bee venom. *Toxicon*, v. 199, p. 49-59, 2021.
- 4 BORSE, V.; KONWAR, A.N. Synthesis and characterization of gold nanoparticles as a
5 sensing tool for the lateral flow immunoassay development. *Sensors International*, v. 1, a.
6 100051, 2020.
- 7 BOUDON, S.; OUNAÏSSI, D.; VIALA, D.; MONTEILS, V.; PICARD, B.; CASSAR-
8 MALEK, I. Label free shotgun proteomics for the identification of protein biomarkers for
9 beef tenderness in muscle and plasma of heifers. *Journal of Proteomics*, v. 217, a. 103685,
10 2020.
- 11 BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities
12 of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p.
13 248-254, 1976.
- 14 BROOKS, B.D.; BROOKS, A.E. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance.
15 *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 78, p. 14-27, 2014.
- 16 BROWN, E.; WRIGHT, G. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, v. 529,
17 p. 336-343, 2016.
- 18 BROWN, K.L.; HANCOCK, R.E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current*
19 *Opinion in Immunology*, v. 18, p.24-30, 2006.
- 20 BUSH K, BRADFORD PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold*
21 *Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 6, n. 8, a. 025247, 2016.
- 22 CALZETTA, L.; KOZIOL-WHITE, C. Pharmacological interactions: Synergism, or not
23 synergism, that is the question. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, v. 2,
24 a. 100046, 2021.
- 25 CAPELLO, M.; FERRI-BORGOGNO, S.; CAPPELLO, P.; NOVELLI, F. α -Enolase: a
26 promising therapeutic and diagnostic tumor target. *The FEBS Journal*, v. 278, n. 7, p. 1064-
27 1074, 2011.

- 1 CARROUEL, F.; VIENNOT, S.; OTTOLENGHI, L.; GAILLARD, C.; BOURGEOIS, D.
2 Nanoparticles as Anti-Microbial, Anti-Inflammatory, and Remineralizing Agents in Oral Care
3 Cosmetics: A Review of the Current Situation. *Nanomaterials*, v. 10, n. 1, a. 140, 2010.
- 4 CARPENA, M.; NUÑEZ-ESTEVEZ, B.; SORIA-LOPEZ, A.; SIMAL-GANDARA, J. Bee
5 venom: An updating review of Its bioactive molecules and its health applications. *Nutrients*, v.
6 12, n. 3360, 2020.
- 7 CARVALHO, P.C.; LIMA, D.B.; LEPREVOST, F.V.; SANTOS, M.D.; FISCHER, J.S.;
8 AQUINO, P.F., MORESCO, J.J.; YATES, J.R.; BARBOSA, V.C. PatternLab for proteomics
9 4.0: A one-stop shop for analyzing shotgun proteomic data. *Nature protocols*, v. 11, n. 1, p.
10 102-117, 2016.
- 11 CAVALCANTE, J.S.; ALMEIDA, C.A.S.; CLASEN, M.A.; SILVA, E.L.; BARROS, L.C.;
12 MARINHO, A.D.; ROSSINI, B.C.; MARINO, C.L.; CARVALHO, P.C.; JORGE, R.J.B.;
13 DOS SANTOS, L.D. A fingerprint of plasma proteome alteration after local tissue damage
14 induced by *Bothrops leucurus* snake venom in mice. *Journal of Proteomics*, v. 253, a. 104464,
15 2022.
- 16 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Antibiotic resistance
17 threats in the United States, 2019.
- 18 CHANGEDIYA, V.V.; JANI, R.; KAKDE P. A Review on nanoemulsions: A recent drug
19 delivery tool. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, v. 9, n. 5, p. 185-191, 2019.
- 20 CHONG, J.; SOUFAN, O.; LI, C.; CARAUS, I.; LI, S.; BOURQUE, G.; WISHART, D.S.;
21 XIA, J. MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis.
22 *Nucleic Acids Research*, v. 46, p. 486-494, 2014.
- 23 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution
24 antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI Standard M07, 11
25 ed., CLSI, Wayne, P.A, 2018.
- 26 DAVE, K.; SUNDRANI, D.; JOSHI, S. Chapter 11 - Influence of nutrition on reproductive
27 health through epigenetic mechanisms. *Translational Epigenetics, Epigenetics and*
28 *Reproductive Health: Academic Press*, v. 21, p. 221-239, 2021.

- 1 DAVIDSON, A.L.; DASSA, E.; ORELLE, C.; CHEN, J. Structure, function, and evolution of
2 bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 72,
3 n. 2, p. 317-364, 2008.
- 4 DENG, Y.; WANG, Z.; YING, K.; GU, S.; JI, C.; HUANG, Y.; GU, X.; WANG, Y.; XU, Y.;
5 LI, Y.; XIE, Y.; MAO, Y. NADPH-dependent GMP reductase isoenzyme of human
6 (GMPR2). Expression, purification, and kinetic properties. *The International Journal of*
7 *Biochemistry & Cell Biology*, v. 34, p. 1035-1050, 2002.
- 8 DIAO, W. R.; HU, Q. P.; ZHANG, H.; XU, J. G. Chemical composition, antibacterial activity
9 and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.).
10 *Food Control*, v. 35, p. 109-116, 2014.
- 11 DOSLER, S.; GERCEKER, A.A. *In vitro* activities of antimicrobial cationic peptides;
12 melittin and nisin, alone or in combination with antibiotics against Gram-positive bacteria.
13 *Journal of Chemotherapy*, v. 24, n. 3, p. 137-143, 2012.
- 14 DOSLER, S.; KARAASLAN, E.; ALEV GERCEKER, A. Antibacterial and anti-biofilm
15 activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-
16 negative bacteria. *Journal of Chemotherapy*, v 28, n. 2, p. 95-103, 2016.
- 17 DUCKER, G.S.; RABINOWITZ, J.D. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell*
18 *Metabolism*, v. 25, n. 1, p. 27-42, 2017.
- 19 EBENHAN, T.; GHEYSENS, O.; KRUGER, H.G.; ZEEVAART, J.R.; SATHEKGE, M.M.
20 Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *Biomed*
21 *Research International*, V. 2014, a. 867381, 2014.
- 22 EDWARDS, F.; MACGOWAN, A.; MACNAUGHTON, E. Antimicrobial therapy: principles
23 of use. *Medicine*, v. 49, n. 10, p. 624-631, 2021.
- 24 EITINGER, T.; RODIONOV, D.A.; GROTE, M.; SCHNEIDER, E. Canonical and ECF-type
25 ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular
26 functions. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 35, n. 1, p. 3-67, 2011.

- 1 ELEFThERIANOS, I.; ZHANG, W.; HERYANTO, C.; MOHAMED, A.; CONTRERAS, G.;
2 TETTAMANTI, G.; WINK, M.; BASSAL, T. Diversity of insect antimicrobial peptides and
3 proteins - A functional perspective: A review. *International Journal of Biological*
4 *Macromolecules*, v. 191, p. 277-287, 2021.
- 5 ELSABAHY, M.; WOOLEY, K.L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical
6 delivery applications. *Chemical Society Reviews*, v. 41, n. 7, p. 2545-2561, 2012.
- 7 FAN, J.; CHENG, Y.; SUN, M. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, properties and
8 biomedical applications. *The Chemical Record*, v. 20, p. 1-32, 2020.
- 9 FERRER-GONZÁLEZ, E.; KAUL, M.; PARHI, A.K.; LAVOIE, E.J.; PILCH, D.S. β -Lactam
10 Antibiotics with a High Affinity for PBP2 Act Synergistically with the FtsZ-Targeting Agent
11 TXA707 against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and*
12 *Chemotherapy*, v. 61, n. 9, a. 00863-17, 2017.
- 13 FISHOVITZ, J.; HERMOSO, J.A.; CHANG, M.; MOBASHERY, S. Penicillin-binding
14 protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *IUBMB Life*, v. 66, p. 572-577,
15 2014.
- 16 FOURIE, K.R.; WILSON, H.L. Understanding GroEL and DnaK Stress Response Proteins as
17 Antigens for Bacterial Diseases. *Vaccines (Basel)*, v. 8, n. 4, a. 773, 2020.
- 18 GALDIERO, E.; LOMBARDI, L.; FALANGA, A.; LIBRALATO, G.; GUIDA, M.;
19 CAROTENUTO, R. Biofilms: Novel strategies based on antimicrobial
20 peptides. *Pharmaceutics*, v.11, a. 322, 2019.
- 21 GERA, S.; KANKURI, E.; KOGERMANN, K. Antimicrobial peptides – Unleashing their
22 therapeutic potential using nanotechnology. *Pharmacology & Therapeutics*, a. 107990, 2021.
- 23 GOYAL, G.; HWANG, J.; AVIRAL, J.; SEO, Y.; JO, Y.; SON, J.; CHOI, J. Green synthesis
24 of silver nanoparticles using β -glucan, and their incorporation into doxorubicin-loaded water-
25 in-oil nanoemulsions for antitumor and antibacterial applications. *Journal of Industrial and*
26 *Engineering Chemistry*, v. 47, p. 179-186, 2017.

- 1 GRASSI, L.; MAISETTA, G.; ESIN, S.; BATONI, G. Combination strategies to enhance the
2 efficacy of antimicrobial peptides against bacterial biofilms. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, a.
3 2409, 2017.
- 4 GUHA, S.; GHIMIRE, J.; WU, E.; WIMLEY, W.C. Mechanistic landscape of membrane-
5 permeabilizing peptides. *Chemical Reviews*, v. 119, p. 6040-6085, 2019.
- 6 GUHA, S.; FERRIE, R.P.; GHIMIRE, J.; VENTURA, C.R.; WU, E.; SUN, L.; KIM SY,
7 WIEDMAN GR, HRISTOVA K, WIMLEY WC. Applications and evolution of melittin, the
8 quintessential membrane active peptide. *Biochemical Pharmacology*, v. 193, n. 114769, 2021.
- 9 HAMMAMI, I.; ALABDALLAH, N.M.; JOMAA, A.A.; KAMOUN, M. Gold nanoparticles:
10 Synthesis properties and applications. *Journal of King Saud University - Science*, v. 33, a.
11 101560, 2021.
- 12 HAN, Y.; ZHANG, M.; LAI, R.; ZHANG, Z. Chemical modifications to increase the
13 therapeutic potential of antimicrobial peptides. *Peptides*, v. 146, a. 170666, 2021.
- 14 HANCOCK, R.E.; SAHL, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new antiinfective
15 therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, v. 24, p. 1551-1557, 2006.
- 16 HAO, K.; XU, B.; ZHANG, G.; LV, F.; WANG, Y.; MA, M.; SI, H. Antibacterial activity
17 and mechanism of *Litsea cubeba* L. essential oil Against *Acinetobacter baumannii*. *Natural*
18 *Product Communications*, v. 16, n. 3, p. 1–7, 2021.
- 19 HENRY, C.M.; HOLLVILLE, E.; MARTIN, S.J. Measuring apoptosis by microscopy and
20 flow cytometry. *Methods*, v. 61, n. 2, p. 90-97, 2013.
- 21 HENTCHEL, K.L.; ESCALANTE-SEMERENA, J.C. Acylation of biomolecules in
22 prokaryotes: A widespread strategy for the control of biological function and metabolic stress.
23 *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 79, p. 321-346, 2015.
- 24 HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic
25 resistance of bacterial biofilms. *Interntional Journal of Antimicrobial Agents*, v. 35, n. 4, p.
26 322-332, 2010.

- 1 HUOT, J.L.; LAPOINTE, J.; CHÊNEVERT, R.; BAILLY, M.; KERN, D. 5.14 - Glutaminyl-
2 tRNA and AsparaginytRNA Biosynthetic Pathways. *Comprehensive Natural Products II*:
3 Elsevier, v. 5, p. 383-431, 2010.
- 4 IRUDAYAM, S.J.; BERKOWITZ, M.L. Influence of the arrangement and secondary
5 structure of melittin peptides on the formation and stability of toroidal pores. *Biochimica et*
6 *Biophysica Acta*, v. 1808, p. 2258-2266, 2011.
- 7 JENKINS, R.; BURTON, N.; COOPER, R. Proteomic and genomic analysis of methicillin-
8 resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) exposed to manuka honey in vitro demonstrated
9 down-regulation of virulence markers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, n. 3, p.
10 603-615, 2013.
- 11 JOHNSON, S.A.; GODDARD, P.A.; ILIFFE, C.; TIMMINS, B.; RICKARD, A.H.;
12 ROBSON, G.; HANDLEY, P.S. Comparative susceptibility of resident and transient hand
13 bacteria to para-chloro-meta-xyleneol and triclosan. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p.
14 336-344, 2002.
- 15 KAPOOR, S.; PANDA, D. Targeting FtsZ for antibacterial therapy: a promising avenue.
16 *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v. 13, n. 9, p. 1037-1051, 2009.
- 17 KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities.
18 *Arabian Journal of Chemistry*, v. 12, n. 7, p. 908-931, 2019.
- 19 KOPPEN, B.C.; MULDER, P.P.G.; DE BOER, L.; RIOOL, M.; DRIJFHOUT, J.W.; ZAAT,
20 S.A.J. Synergistic microbicidal effect of cationic antimicrobial peptides and teicoplanin
21 against planktonic and biofilm-encased *Staphylococcus aureus*. *International Journal of*
22 *Antimicrobial Agents*, v. 53, n. 2, p. 143-151, 2019.
- 23 KVINT, K.; NACHIN, L.; DIEZ, A.; NYSTRÖM, T. The bacterial universal stress protein:
24 function and regulation. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, n. 2, p. 140-145, 2003.
- 25 LADOKHIN, A.S.; WHITE, S.H. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles
26 by melittin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, v. 1514, n. 2, p. 253-260,
27 2001.

- 1 LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
2 bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- 3 LAI, C.K.C; NG, R.W.Y.; LEUNG, S.S.Y.; HUI, M.; IP, M. Overcoming the rising incidence
4 and evolving mechanisms of antibiotic resistance by novel drug delivery approaches – An
5 overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 181, p. 2-19, 2022.
- 6 LANDWEHR, V.; MILANOV, M.; HONG, J.; KOCH, H.G. The role of the universally
7 conserved ATPase YchF/Ola1 in translation regulation during cellular stress. *Microorganisms*,
8 v. 10, n. 14, 2021.
- 9 LAXMINARAYAN, R. The overlooked pandemic of antimicrobial resistance. *The Lancet*, v.
10 399, n. 10325, p. 606-607, 2022.
- 11 LEE, A.S.; LENCASTRE, H.; GARAU, J.; KLUYTMANS, J.; MALHOTRA-KUMAR, S.;
12 PESCHEL, A.; HARBATH, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews*
13 – *Disease Primers*, v. 4, p 1-23, 2018.
- 14 LEE, M.T.; SUN, T.L.; HUNG, W.C.; HUANG, H. W. Process of inducing pores in
15 membranes by melittin. *Biophysical. Journal*, v. 106, n. 293, 2014.
- 16 LEIBIG, M.; LIEBEKE, M.; MADER, D.; LALK, M.; PESCHEL, A.; GÖTZ, F. Pyruvate
17 formate lyase acts as a formate supplier for metabolic processes during anaerobiosis in
18 *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, v. 193, n. 4, p. 952-962, 2011.
- 19 LI, L.; ABDELHADY, W.; DONEGAN, N.P.; SEIDL, K.; CHEUNG, A.; ZHOU, Y.;
20 YEAMAN, M.R.; BAYER, A.S.; XIONG, Y.Q. Role of Purine Biosynthesis in Persistent
21 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v.
22 218, p. 1367-1377, 2018.
- 23 LI, S.; WANG, Y.; XUE, Z.; JIA, Y.; LI, R.; HE, C.; CHEN, H. The structure-mechanism
24 relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. *Trends in Food Science*
25 & *Technology*, v. 109, p. 103-115, 2021.
- 26 LIU, R.; LI, W.; TAO, B.; WANG, X.; YANG, Z.; ZHANG, Y.; WANG, C.; LIU, R.; GAO,
27 H.; LIANG, J.; YANG, W. Tyrosine phosphorylation activates 6-phosphogluconate

- 1 dehydrogenase and promotes tumor growth and radiation resistance. *Nature Communications*,
2 v. 10, a. 991, 2019.
- 3 LIU, W.; CHEN, E.; YANG, L.; PENG, C.; WANG, Q.; XU, Z.; CHEN, D. Emerging
4 resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus*
5 *aureus*: A comprehensive review. *Microbial Pathogenesis*, v. 156, n. 104915, 2021.
- 6 LIU, Y.; SHI, J.; TONG, Z.; JIA, Y.; YANG, B.; WANG, Z. The revitalization of
7 antimicrobial peptides in the resistance era. *Pharmacological Research*, v. 163, n. 105276,
8 2021.
- 9 LV, F.; LIANG, H.; YUAN, Q.; LI, C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action
10 of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food*
11 *Research International*, v. 44, n. 9, p. 3057-3064, 2011.
- 12 MAHMOUDI, H.; ALIKHANI, M.Y.; FOOLADI, A.A.I. Synergistic antimicrobial activity
13 of melittin with clindamycin on the expression of encoding exfoliative toxin in
14 *Staphylococcus aureus*. *Toxicon*, v. 183, p. 11-19, 2020.
- 15 MAHON, C.R.; LEHMAN, D.C. Textbook of diagnostic microbiology. 6. ed. St. Louis,
16 Missouri, EUA: Elsevier Saunders, 2019.
- 17 MARTIN, A.; CAMACHO, M.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Resazurin microtiter
18 assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: Rapid,
19 simple and inexpensive method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 3616-
20 3619, 2003.
- 21 MARTINEZ, M.; GONÇALVES, S.; FELÍCIO, M.R.; MATURANA, P.; SANTOS, N.C.;
22 SEMORILE, L.; HOLLMANN, A.; MAFFÍA, P.C. Synergistic and antibiofilm activity of the
23 antimicrobial peptide P5 against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica*
24 *et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1861, n. 7, p. 1329-1337, 2019.
- 25 MEHMOOD, T.; AHMED, A. Tween 80 and Soya-Lecithin-Based Food-Grade
26 Nanoemulsions for the Effective Delivery of Vitamin D. *Langmuir*, v. 36, n. 11, p. 2886-2892,
27 2020.

- 1 MENON, S.; RAJESHKUMAR, S.; KUMAR, S.V. A review on biogenic synthesis of gold
2 nanoparticles, characterization, and its applications. *Resource-Efficient Technologies*, v. 3, n.
3 4, p. 516-527, 2017.
- 4 MIALLAU, L.; HUNTER, W.N.; MCSWEENEY, S.M.; LEONARD, G.A. Structures of
5 *Staphylococcus aureus* D-tagatose-6-phosphate kinase implicate domain motions in
6 specificity and mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 27, p. 19948-19957,
7 2007.
- 8 MIETHKE, M.; PIERONI, M.; WEBER, T. *et al.* Towards the sustainable discovery and
9 development of new antibiotics. *Nature Reviews Chemistry*, v. 5, p. 726-749, 2021.
- 10 MIHAJLOVIC, M.; LAZARIDIS, T. Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores.
11 *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1798, p. 1485-1493, 2010.
- 12 MIQUEL, S.; LAGRAFEUILLE, R.; SOUWEINE, B.; FORESTIER, C. Anti-biofilm
13 Activity as a Health Issue. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, a. 592, 2016.
- 14 MIRZAEI, R.; ALIKHANI, M.Y.; ARCIOLA, C.R.; SEDIGHI, I.; YOUSEFIMASHOUF, R.;
15 BAGHERI, K.P. Prevention, inhibition, and degradation effects of melittin alone and in
16 combination with vancomycin and rifampin against strong biofilm producer strains of
17 methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 3, n.
18 112670, 2022a.
- 19 MIRZAEI, R.; ALIKHANI, M.Y.; ARCIOLA, C.R.; SEDIGHI, I.; IRAJIAN, G.; JAMASBI,
20 E.; YOUSEFIMASHOUF, R.; BAGHERI, K.P. Highly Synergistic Effects of Melittin With
21 Vancomycin and Rifampin Against Vancomycin and Rifampin Resistant *Staphylococcus*
22 *epidermidis*. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, a. 869650, 2022b.
- 23 MYTHILI, R.; SELVANKUMAR, T.; SRINIVASAN, P.; SENGOTTAIYAN, A.;
24 SABASTINRAJ, J.; AMEEN, F.; AL-SABRI, A.; KAMALA-KANNAN, S.;
25 GOVARTHANAN, M.; KIM, H. Biogenic synthesis, characterization and antibacterial
26 activity of gold nanoparticles synthesised from vegetable waste. *Journal of Molecular Liquids*,
27 v. 262, p. 318-321, 2018.

- 1 NONAKA, H.; NAKANISHI, Y.; KUNO, S.; OTA, T.; MOCHIDOME, K.; SAITO, Y.;
2 SUGIHARA, F.; TAKAKUSAGI, Y.; AOKI, I.; NAGATOISHI, S.; TSUMOTO, K.;
3 SANDO, S. Design strategy for serine hydroxymethyltransferase probes based on retro-aldol-
4 type reaction. *Nature Communications*, v. 10, a. 876, 2019.
- 5 NOSTRO, A.; ROCCARO, A.S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M.A.;
6 PIZZIMENTI, F.C.; CIONI, P.L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A.R. Effects of oregano,
7 carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms.
8 *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, p. 519-523, 2007.
- 9 PANDIDAN, S.; MECHLER, A. Nano-viscosimetry analysis of the membrane disrupting
10 action of the bee venom peptide melittin. *Scientific Reports*, v. 9, n. 10841, 2019.
- 11 PANG, L.; WEEKS, S.D.; AERSCHOT, A.V. Aminoacyl-tRNA synthetases as valuable
12 targets for antimicrobial drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, a.
13 1750, 2021.
- 14 PAPO, N.; SHAI, Y. Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon
15 resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic
16 peptides. *Biochemistry*, v. 42, p. 458–466, 2003.
- 17 PARASTAN, R.; KARGAR, M.; SOLHJOO, K.; KAFILZADEH, F. *Staphylococcus aureus*
18 biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. *Gene Reports*, v. 20, n.
19 100739, 2020.
- 20 PARAY, B.A.; AHMAD, A.; KHAN, J.M.; TAUFIQ, F.; PATHAN, A.; MALIK, A.;
21 AHMED, M.Z. The role of the multifunctional antimicrobial peptide melittin in gene delivery.
22 *Drug Discovery Today*, v. 26, n. 4, p. 1053-1059, 2021.
- 23 PASHAEI, F.; BEVALIAN, P.; AKBARI, R.; BAGHERI, K.P. Single dose eradication of
24 extensively drug resistant *Acinetobacter* spp. in a mouse model of burn infection by melittin
25 antimicrobial peptide. *Microbial Pathogenesis*, v. 127, p. 60-69, 2019.
- 26 PASUPULETI, M.; SCHIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: key
27 components of the innate immune system. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 32, p. 143-
28 171, 2012.

- 1 PEREIRA, A.F.M.; ALBANO, M.; ALVES, F.C.B.; ANDRADE, B.F.M.T.; FURLANETTO,
2 A.; RALL, V.L.M.; DOS SANTOS, L.D.; ORSI, R.O.; FERNANDES JÚNIOR, A. Influence
3 of apitoxin and melittin from *Apis mellifera* bee on *Staphylococcus aureus* strains. *Microbial*
4 *Pathogenesis*, v. 141, a. 104011, 2020.
- 5 PFALZGRAFF, A.; BRANDENBURG, K.; WEINDL, G. Antimicrobial peptides and their
6 therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Frontiers in Pharmacology*, v.
7 9, a. 281, 2018.
- 8 PHILIP, D. Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles.
9 *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 71, n. 1, p. 80-85,
10 2008.
- 11 PICOLI, T.; PETER, C.M.; ZANI, J.L.; WALLER, S.B.; LOPES, M.G.; BOESCHE, K.N.;
12 VARGAS, G.D.A.; HÜBNER, S.O.; FISCHER, G. Melittin and its potential in the
13 destruction and inhibition of the biofilm formation by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia*
14 *coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine milk. *Microbial Pathogenesis*, v. 112,
15 p. 57-62, 2017.
- 16 POZZI, C.; LOPRESTI, L.; TASSONE, G.; MANGANI, S. Targeting Methyltransferases in
17 Human Pathogenic Bacteria: Insights into Thymidylate Synthase (TS) and Flavin-Dependent
18 TS (FDTS). *Molecules*, v. 24, n. 1638, 2019.
- 19 PRADHAN P.; MARGOLIN, W.; BEURIA, T.K. Targeting the Achilles Heel of FtsZ: The
20 Interdomain Cleft. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 1-25, 2021.
- 21 PROSISE, G.L.; LUECKE, H. Crystal Structures of *Tritrichomonas foetus* Inosine
22 Monophosphate Dehydrogenase in Complex with Substrate, Cofactor and Analogs: A
23 Structural Basis for the Random-in Ordered-out Kinetic Mechanism. *Journal of Molecular*
24 *Biology*, v. 326, p. 517-527, 2003.
- 25 PUBLIC HEALTH ENGLAND (PHE). English surveillance programme for antimicrobial
26 utilisation and resistance (ESPAUR) Report 2019 to 2020, 2020.

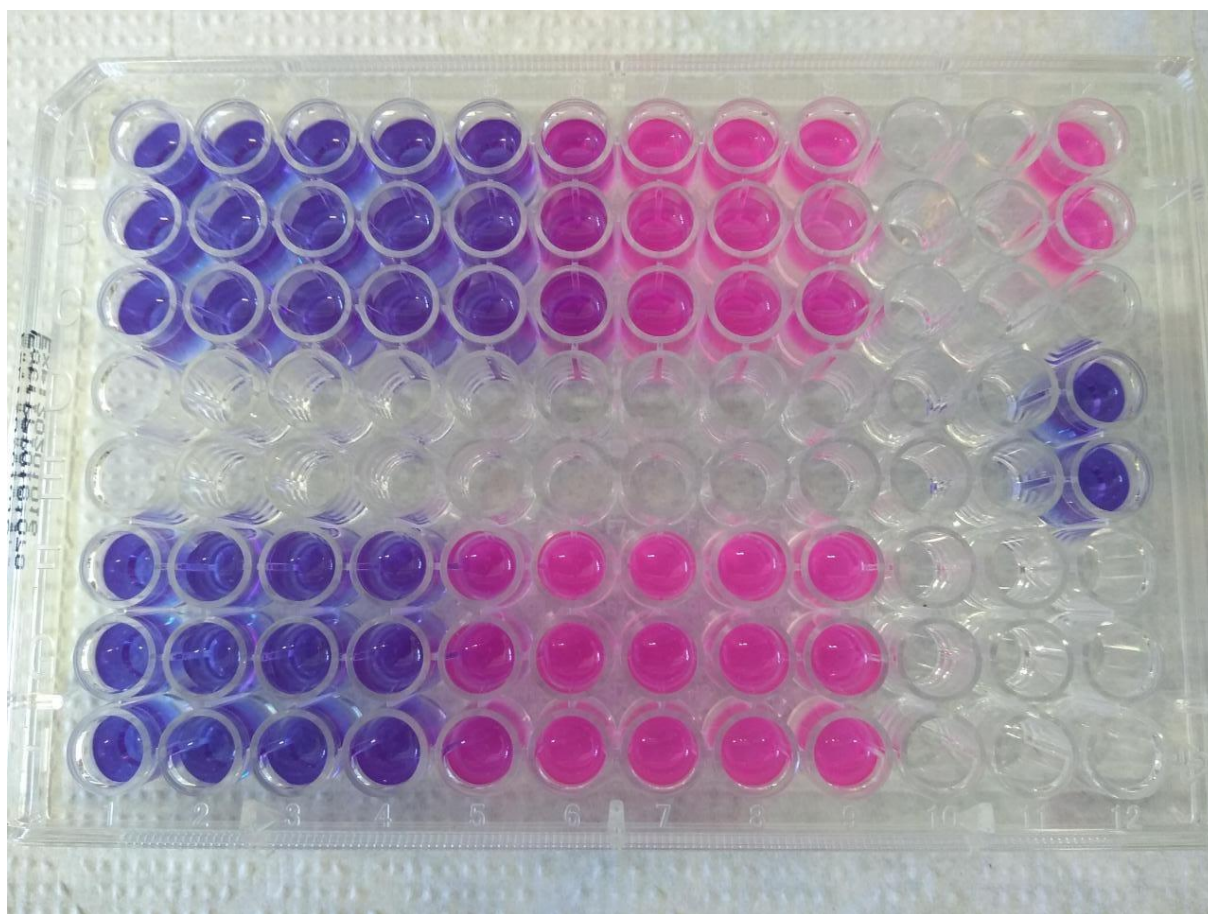
- 1 RADY, I.; SIDDIQUI, I.A.; RADY, M.; MUKHTAR, H. Melittin a major peptide
2 componente of bee venom and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Letters*, v. 402, p. 16-
3 31, 2017.
- 4 REFFUVEILLE, F.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; MANSOUR, S.; HANCOCK, R.E. A
5 broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial
6 biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 9, p. 5363-5371, 2014.
- 7 REN, J.; SANG, Y.; LU, J.; YAO, Y.F. Protein acetylation and its role in bacterial virulence.
8 *Trends in Microbiology*, v. 25, p. 768-779, 2017.
- 9 REX, S. Pore formation induced by the peptide melittin in different lipid vesicle membranes.
10 *Biophysical. Chemistry*, v. 58, p. 75-85, 1996.
- 11 RIGANTI, C.; GAZZANO, E.; POLIMENI, M.; ALDIERI, E.; GHIGO, D. The pentose
12 phosphate pathway: An antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radical*
13 *Biology and Medicine*, v. 53, n. 3, p. 421-436, 2012.
- 14 RODNINA, M.V. Translation in Prokaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v.
15 10, n. 9, a. 032664, 2018.
- 16 ROUX, C.M.; DEMUTH, J.P.; DUNMAN, P.M. Characterization of components of the
17 *Staphylococcus aureus* mRNA degradosome holoenzyme-like complex. *Journal of*
18 *Bacteriology*, v. 193, n. 19, p. 5520-5526, 2011.
- 19 RUMBAUGH, K.P.; SAUER, K. Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, v. 18, p.
20 571-586, 2020.
- 21 SAMANT, S.; LEE, H.; GHASSEMI, M.; CHEN, J.; COOK, J.L.; MANKIN, A.S.;
22 NEYFAKH, A.A. Nucleotide biosynthesis is critical for growth of bacteria in human blood.
23 *PLoS Pathogens*, v. 4, e37, 2008.
- 24 SHAO, X.R.; WEI, X.Q.; SONG, X.; HAO, L.Y.; CAI, X.X.; ZHANG, Z.R.; PENG, Q.; LIN,
25 Y.F. Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their
26 cytotoxicity and affinity to cells. *Cell Proliferation*, v. 48, n. 4, p. 465-474, 2015.

- 1 SIDDIQI, Z.I. Chapter 8 - Ribosome biogenesis in prokaryotes. Emerging Concepts in
2 Ribosome Structure, Biogenesis, and Function: Academic Press, p.151-181, 2021.
- 3 STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.;
4 ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of
5 testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by
6 staphylococci. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, v. 115, p. 891-899, 2007.
- 7 SUWALAK, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S.P. Morphological and ultrastructural changes in
8 the cell structure of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 following treatment with
9 *Quercus infectoria* nut galls. *Journal of Electron Microscopy*, v. 58, n.5, p. 315-320, 2009.
- 10 SWINEHART, W.E.; JACKMAN, J.E. Diversity in mechanism and function of tRNA
11 methyltransferases. *RNA Biology*, v. 12, n. 4, p. 398-411, 2015.
- 12 TERWILLIGER, T.C.; EISENBERG, D. The structure of melittin. II. Interpretation of the
13 structure. *Journal of Biological Chemistry*, v. 257, n. 11, p. 6016-6022, 1982.
- 14 TSAKOU, F.; JERSIE-CHRISTENSEN, R.; JENSSEN, H.; MOJSOSKA, B. The Role of
15 Proteomics in Bacterial Response to Antibiotics. *Pharmaceuticals (Basel)*, v. 13, n. 9, a. 214,
16 2020.
- 17 TZIN, V.; GALILI, G.; AHARONI, A. Shikimate pathway and aromatic amino acid
18 biosynthesis. *eLS*, v.8, a. 032, 2012.
- 19 UDDIN, T.M.; CHAKRABORTY, A.J.; KHUSRO, A.; ZIDAN, B.R.M.; MITRA, S.;
20 EMRAN, T.B.; DHAMA, K.; RIPON, M.K.H.; GAJDÁCS, M.; SAHIBZADA, M.U.K.;
21 HOSSAIN, M.J.; KOIRALA, N. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms,
22 therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, v. 14, n.
23 12, p. 1750-1766, 2021.
- 24 VAN LIS, R.; POPEK, M.; COUTÉ, Y.; KOSTA, A.; DRAPIER, D.; NITSCHKE, W.;
25 ATTEIA, A. Concerted Up-regulation of Aldehyde/Alcohol Dehydrogenase (ADHE) and
26 Starch in *Chlamydomonas reinhardtii* Increases Survival under Dark Anoxia. *Journal of*
27 *Biological Chemistry*, v. 292, n. 6, p. 2395-2410, 2017.

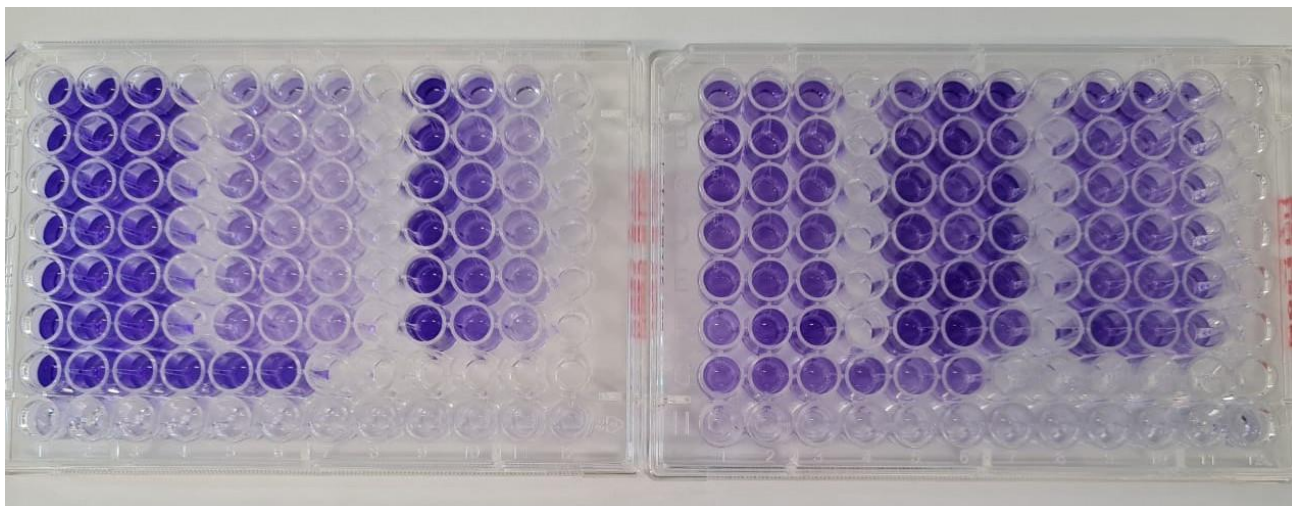
- 1 VÄSTERMARK, A.; SAIER, M.H.JR. The involvement of transport proteins in
2 transcriptional and metabolic regulation. *Current Opinion in Microbiology*, v. 18, p. 8-15,
3 2014.
- 4 VASU, D.; SUNITHA, M.M.; SRIKANTH, L.; SWARUPA, V.; PRASAD, U.V.;
5 SIREESHA, K.; YESWANTH, S.; KUMAR, P.S.; VENKATESH, K.; CHAUDHARY, A.;
6 SARMA, P.V. In *Staphylococcus aureus* the regulation of pyruvate kinase activity by
7 serine/threonine protein kinase favors biofilm formation. *3 Biotech*, v. 5, n. 4, p. 505-512,
8 2015.
- 9 WEBSTER, T.J.; SEIL, I. Antimicrobial Applications of Nanotechnology: Methods and
10 Literature. *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, p. 2767-2781, 2012.
- 11 WICHMANN, N.; LUND, P.M.; HANSEN, M.B.; HJØRRINGGAARD, C.U.; LARSEN,
12 J.B.; KRISTENSEN, K.; ANDRESEN, T.L.; SIMONSEN, J.B. Applying flow cytometry to
13 identify the modes of action of membrane-active peptides in a label-free and high-throughput
14 fashion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1864, n. 2, article 183820,
15 2022.
- 16 WILKE, M.S.; LOVERING, A.L.; STRYNADKA, N.C. Beta-lactam antibiotic resistance: a
17 current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, n. 5, p. 525-533, 2005.
- 18 WILSON, D.N.; NIERHAUS, K.H. Ribosomal Proteins in the Spotlight. *Critical Reviews in*
19 *Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40, n. 5, p. 243-267, 2005.
- 20 WIRADHARMA, N.; LIU, S.Q.; YANG, Y.Y. Branched and 4-arm starlike alpha-helical
21 peptide structures with enhanced antimicrobial potency and selectivity. *Small*, v. 8, p. 362-
22 366, 2012.
- 23 WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles.
24 *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 63, n. 6, p. 456-469, 2011.
- 25 WU, Y.; WANG, C.; LIN, S.; WU, M.; HAN, L.; TIAN, C.; ZHANG, X.; ZANG, J.
26 Octameric structure of *Staphylococcus aureus* enolase in complex with phosphoenolpyruvate.
27 *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, v. 71, n. 12, p. 2457-2470,
28 2015.

- 1 XIE, W.; WANG, L.; ZHANG, Y.; SU, L.; SHEN, A.; TAN, J.; HU, J. Nuclear targeted
2 nanoprobe for single living cell detection by surface-enhanced raman scattering. *Bioconjugate*
3 *Chemistry*, v. 20, n. 4, p. 768-773, 2009.
- 4 YEAMAN, M.R.; YOUNT, N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance.
5 *Pharmacology*, v. 55, p. 27-55, 2003.
- 6 YOUSEFPOOR, Y.; AMANI, A.; DIVSALAR, A.; VAFADAR, M. Topical delivery of bee
7 venom through the skin by a water-in-oil nanoemulsion. *Nanomedicine Journal*, v. 9, n. 2, p.
8 131-137, 2022.
- 9 ZHANG, L.; SONG, J.; KONG, L.; YUAN, T.; LI, W.; ZHANG, W.; HOU, B., LU, Y.; DU,
10 G. The strategies and techniques of drug discovery from natural products. *Pharmacology &*
11 *Therapeutics*, v. 216, n. 107686, 2020.
- 12 ZARRINNAHAD, H.; MAHMOODZADEH, A.; HAMIDI, M.P.; MAHDAVI, M.;
13 MORADI, A.; BAGHERI, K.P.; SHAHBAZZADEH, D. Apoptotic effect of melittin purified
14 from iranian honey bee venom on human cervical cancer HeLa cell line. *International*
15 *Journal of Peptide Research and Therapeutics*, p. 1-8, 2017.

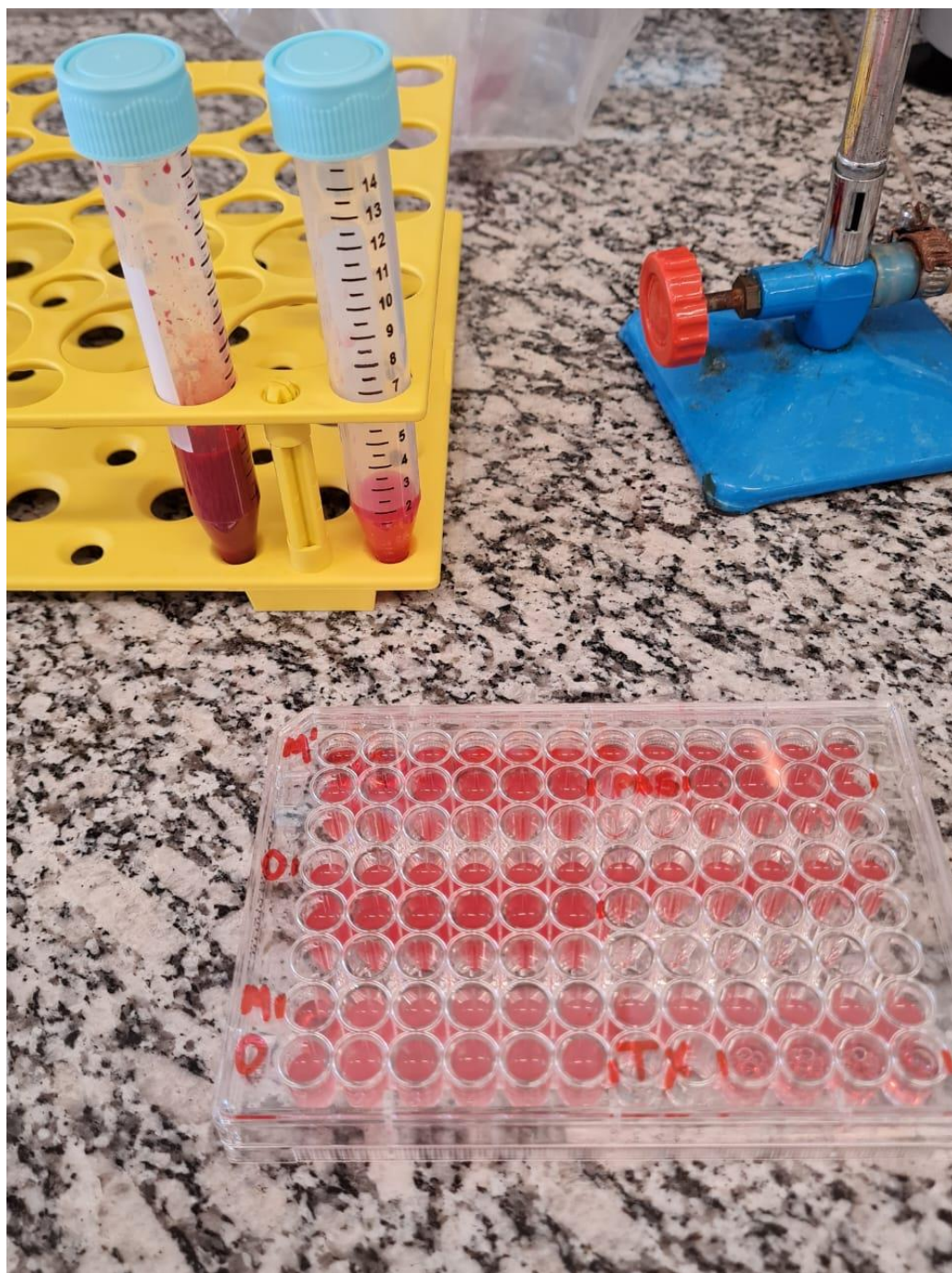
1 Apêndice



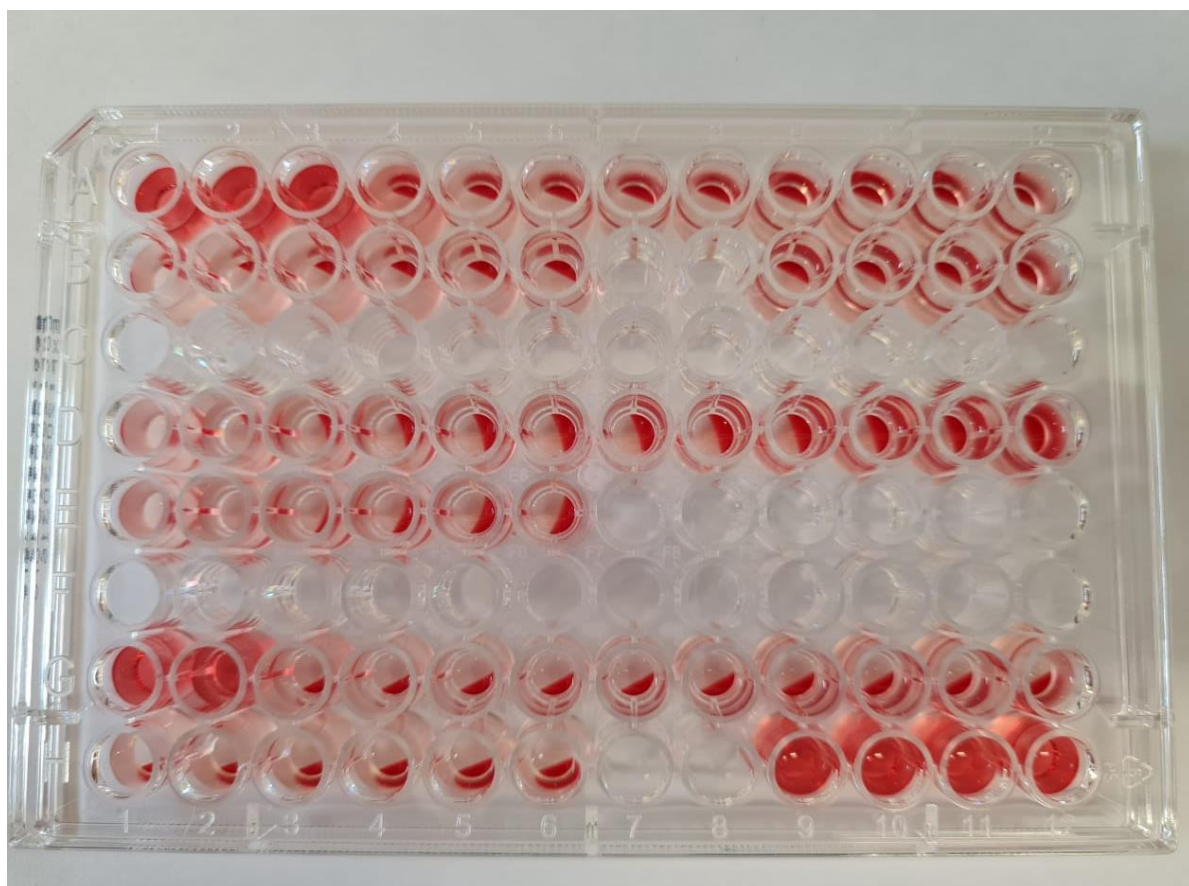
- 2 **Apêndice 1.** Ensaio de concentração inibitória mínima, após adição de resazurina, em placa
3 de elisa de 96 poços. Os poços rosas indicam crescimento bacteriano e os roxos indicam
4 inibição do crescimento bacteriano, podendo ser uma inibição bacteriostática ou bactericida
5 (PEREIRA, A.F.M., 2020).



- 1 **Apêndice 2.** Ensaio de inibição da formação do biofilme em placa de 96 poços. A foto foi
- 2 tirada após a placa ser corada com cristal violeta, lavada e ressuspensa com ácido acético
- 3 para ser lida no espectrofotômetro (PEREIRA, A.F.M., 2021).



- 1 **Apêndice 3.** Ensaio da atividade hemolítica, foto tirada do momento em que os produtos
- 2 testados estão em contato com as hemácias humanas (PEREIRA, A.F.M., 2022).



- 1 **Apêndice 4.** Placa de 96 poços do experimento de atividade hemolítica, foto tirada após o
- 2 contato dos produtos com as hemácias e depois de levada a centrifugação (PEREIRA, A.F.M.,
- 3 2022).



- 1 **Apêndice 5.** Ensaio de condutividade elétrica, foto tirada do momento em que os tubos estão
- 2 sendo verificados quanto as suas condutividades elétricas, os tubos contêm bactérias ou
- 3 glicose em contato com os produtos testados e estão sendo verificadas as suas condutividades
- 4 (PEREIRA, A.F.M., 2022).