



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



PG-BGA

SÍNTESE DE NANOEMULSÃO E NANOPARTÍCULA DE OURO
(AuNPs) CONTENDO NISINA E SEUS EFEITOS SOBRE OS
FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*

ALESSANDRA FURLANETTO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração: Biologia de
parasitas e micro-organismos

Professor Associado Ary Fernandes Junior

**BOTUCATU – SP
2020**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

SÍNTESE DE NANOEMULSÃO E NANOPARTÍCULA DE OURO
(AuNPs) CONTENDO NISINA E SEUS EFEITOS SOBRE OS
FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*

ALESSANDRA FURLANETTO

PROF. ASSOCIADO ARY FERNANDES JUNIOR

DRA. FERNANDA CRISTINA BÉRGAMO ALVES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração: Biologia de
parasitas e micro-organismos

Professor Associado Ary Fernandes Junior

**BOTUCATU – SP
2020**

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Furlanetto, Alessandra.

Síntese de nanoemulsão e nanopartícula de ouro (AuNPs) contendo nisina e seus efeitos sobre os fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* / Alessandra Furlanetto. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Ary Fernandes Júnior

Coorientador: Fernanda Cristina Bérnago Alves

Capes: 20100000

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Nanotecnologia. 3. Farmacorresistência bacteriana. 4. Antibióticos peptídios. 5. Fatores de virulência.

Palavras-chave: Fatores de virulência; Nanotecnologia; Peptídeos antimicrobianos; Resistência bacteriana; *Staphylococcus aureus*.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido que eu tivesse essa oportunidade, me ajudando a alcançar meus objetivos e que com certeza me ajudou nas minhas dificuldades.

Aos meus pais, Cyntia Maria Diehl e Antonio Furlanetto, que são a minha base e minha inspiração. Sem o apoio deles, com certeza não teria chegado onde cheguei e não teria me tornado a pessoa que me tornei. Nenhum agradecimento será o suficiente para expressar a gratidão que eu sinto por eles.

Ao meu namorado, Luís Felipe da Silva, que nunca deixou de estar do meu lado e me apoiar nesses 2 anos e 7 meses que estamos juntos. Por mais que tenhamos nossos altos e baixos, nunca deixou de me ajudar, de me apoiar, de me AMAR. Não sei o que seria de mim sem o seu companheirismo e amor. Eu te amo!

Aos meus amigos de laboratório: Ana Flávia, Alessandra Sani, Luciana Lyra e Pedro Bernardino. Com certeza sem vocês eu não teria realizado um terço do meu trabalho. Principalmente à Ana Flávia, obrigada por toda a ajuda desses anos, por todas as risadas (que não foram poucas), pela nossa viagem pro Chile, pelos docinhos do Giga e principalmente por toda a paciência, não deve ter sido fácil!

À Mariana Albano, que mesmo que eu não tenha tido muito tempo de convívio no laboratório como as outras meninas tiveram, me ensinou muito, tanto da área acadêmica quanto da vida. Desejo sempre muito sucesso pra você independentemente de onde estiver, seja nos Estados Unidos, no Brasil ou em qualquer outro lugar do mundo! Obrigada por tudo, Mari.

Aos meus amigos de Botucatu e da vida: Júlia Abbade, Bárbara Campos Jorge, Rafael Belleti, Carolina Campos e Isabela Ferraz. Ter vocês comigo aqui em Botucatu desde 2014 é um dos maiores presentes que a vida pôde ter me dado. Por mais que na Pós-Graduação cada um tenha seguido um caminho diferente e por isso seja difícil nos vermos sempre que nem antes, ter vocês aqui em Botucatu ainda já me traz um alívio e uma segurança por saber que vocês sempre estarão aqui por mim, e eu sempre estarei aqui por vocês. Em Botucatu ou em qualquer outro lugar do mundo! Eu amo vocês.

Aos meus colegas de trabalho do CDI do Hospital das Clínicas, tanto os biomédicos como a equipe de enfermagem, obrigada pela parceria e pela amizade que construímos. A gente trabalha pra caramba, mas sempre dá tempo de rirmos um pouco e de nos divertirmos. O trabalho é cansativo, mas ter a companhia de vocês deixa as coisas mais fáceis (mas tem dias que nem Deus ajuda!).

À minha co-orientadora Fernanda C. Bérghamo Alves, que desde antes do mestrado me ensinou tanto, e agora mesmo não estando mais no nosso laboratório, não mede esforços para me ajudar. Obrigada, Fer, por todo o ensinamento (que não foi pouco), por toda a ajuda, seja do mestrado ou mesmo da vida, e principalmente por toda a paciência. Sem você do meu lado nessa fase eu não teria realizado o meu trabalho, com certeza. Você é um anjo em forma de gente!

À Prof^a Carla dos Santos Riccardi, que entrou nesse desafio junto comigo para me ajudar e ensinar sobre nanoemulsões e nanopartículas, assunto que eu nunca nem tinha ouvido falar antes do mestrado. Obrigada por toda a ajuda, ensinamento, paciência e por ter escutado inúmeras vezes as minhas angústias pelos meus resultados não estarem saindo como eu desejava. Nunca vou esquecer de uma dessas vezes, em que me acalmou e disse que tudo daria certo, era só questão de tempo e paciência. E no fim, estava certa. Obrigada por tudo, Professora!

Ao meu orientador, Prof^o Ary Fernandes Júnior, por toda a amizade desses anos, desde o ano de 2015 quando nos conhecemos e quando resolvi que queria fazer Iniciação Científica no laboratório. Um orientador e um amigo que com certeza nunca esquecerei! Obrigada Professor, por toda a ajuda acadêmica e também da vida, obrigada por sempre me escutar (mais uma vez, minhas angústias) e me aconselhar. Não teria como eu ter sido orientada por outro professor. Muito obrigada por tudo, todos esses anos!

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IB e aos funcionários do Laboratório Central da FCA, muito obrigada por fazerem com que tenha sido possível eu realizar o meu trabalho! Vocês foram essenciais para essa conquista.

Resumo

O aumento no número de bactérias multirresistentes aos fármacos antibacterianos tradicionais é preocupação de saúde pública e tem motivado pesquisas na busca por antimicrobianos alternativos para minimizar este problema, e na obtenção de substâncias com capacidade de matar bactérias e/ou interferir com a sua patogenicidade. O *Staphylococcus aureus* é capaz de causar inúmeras doenças, incluindo intoxicações alimentares. Esta bactéria se tornou resistente aos diversos antimicrobianos ao longo dos anos com destaque para o *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA). O peptídeo antimicrobiano (AMP) nisina, bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* é um que vem sendo estudado na forma de nanoemulsões e nanopartículas. O objetivo desse estudo foi sintetizar, caracterizar e testar nanoemulsões e nanopartículas de ouro (AuNPs) de nisina, para a verificação da ação antibacteriana, através da Concentração Inibitória Mínima (CIM), atividade antibiofilme, antienterotoxina, atividade hemolítica, ação sobre a membrana bacteriana determinada pelo extravasamento de proteínas, sobre linhagens padrões ATCC de *S. aureus*, e teste de viabilidade celular em linhagem HCT-116 por citometria de fluxo. Os tratamentos utilizados foram nisina, cinco nanoemulsões com nisina (Nano-Nis), AuNPs com nisina (AuNPs-Nis), AuNPs com Nano-Nis (AuNPs + Nano-Nis) e AuNPs-Nis com nanoemulsão (AuNPs-Nis + Nano). De acordo com os resultados obtidos para CIM, observou-se que para a cepa ATCC 33591 de MRSA, a nanoemulsão denominada número 1, foi a mais eficiente entre as 5 testadas incluindo também a própria nisina. Por outro lado, sobre as linhagens também ATCC enterotoxigênicas, a nanoemulsão número 5 foi a mais eficiente sobre SEA e SEB com valores inferiores comparativos ao obtidos com a nisina e demais nanoemulsões. Considerando que a nanoemulsão número 1 foi a mais eficiente sobre a cepa MRSA, foi dada continuidade dos estudos utilizando combinações desta nanoemulsão juntamente com as AuNPs. Observou-se que as AuNPs-Nis, apresentaram mesma ação que a nisina isoladamente enquanto a do tratamento AuNPs + Nano-Nis apresentou menor valor. Os testes antienterotoxinas foram realizados utilizando kit SET-RPLA, entretanto, todas as cepas se mostraram fortes produtoras de enterotoxinas com uso de concentrações correspondentes a 70% do valor de CIM nos ensaios, com exceção das AuNPs-Nis que resultaram em moderada produção de SEA e SEB. O teste antibiofilme foi realizado com concentrações subinibitórias de 25% a 90% do valor de CIM dos tratamentos incubando-as por 48 horas. Todos os tratamentos apresentaram redução da produção de biofilme, em todas as concentrações testadas. A atividade hemolítica foi determinada para tratamentos com concentrações variando desde 1/4 até 4 vezes o CIM. No valor de CIM, dois tratamentos apresentaram-se hemolíticos enquanto no valor de 4xCIM, quatro tratamentos apresentaram-se hemolíticos. O teste de extravasamento protéico foi realizado, tendo as concentrações protéicas determinadas de acordo com protocolo de Bradford, e utilizando concentrações de 1 e 2 vezes a CIM para MRSA. O tratamento que resultou em maior concentração de proteínas extravasadas foi a Nano-Nis. Os tratamentos, com exceção da nanoemulsão, não apresentaram efeito citotóxico sobre a linhagem HCT-116. Assim, pode-se dizer que as nanoemulsões e AuNPs, quando conjugados à nisina, foram eficazes contra *S. aureus*, com potencial antibacteriano otimizados quando utilizando-a na forma pura.

Palavras-chave: fatores de virulência, nanotecnologia, peptídeos antimicrobianos, resistência bacteriana, *Staphylococcus aureus*

Abstract

The growth in the number of multiresistant bacteria resistant to traditional antimicrobial drugs is a public health concern which has been motivated researchs worldwide, seeking new antimicrobial drugs to minimize this problem besides getting new substances able to eradicate bacteria and/or interfere with their pathogenicity. *Staphylococcus aureus* is a highly virulent bacteria, able to cause countless diseases including food poisoning. This bacteria got resistant to many antimicrobials within the years, highlighting the *S. aureus* methicillin-resistant (MRSA). The antimicrobial peptide (AMP) nisin, bacteriocin synthesized by *Lactococcus lactis*, is one that has been studied in nanoemulsions and nanoparticles. The objective of this study was to synthesize, characterize and evaluate nanoemulsions and gold nanoparticles (AuNPs) with nisin, to verify their antibacterial action, using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), antibiofilm activity, antienterotoxin activity, hemolytic activity, action on bacterial membrane determined by protein leakage, on MRSA ATCC strains, and cell viability in HCT-116 strain by flow cytometry. The treatments used were nisin, five nanoemulsions with nisin (Nano-Nis), AuNPs with nisin (AuNPs-Nis), AuNPs with Nano-Nis (AuNPs + Nano-Nis) and AuNPs-Nis with nanoemulsion (AuNPs-Nis + Nano). According to the results obtained for MIC, it was observed that for the MRSA strain ATCC 33591, the number 1 formulation of nanoemulsions was the more efficient between the five others, including nisin itself. However, when tested on enterotoxigenic strains, the number 5 nanoemulsion was the more efficient on SEA and SEB with lower values when compared to nisin itself and with other nanoemulsions. Whereas nanoemulsion 1 was the more efficient on MRSA strain, the study continued with this nanoemulsion, with the AuNPs. It was observed that AuNPs-Nis showed the same action than nisin itself while the AuNPs + Nano-Nis treatment showed a lower MIC. The antienterotoxin test was evaluated by SET-RPLA kit, however, all of the enterotoxigenic strains showed high enterotoxin production after the experiment with 70% of the treatments' MICs, except for AuNPs-Nis, which resulted in moderate production of SEA and SEB. The antibiofilm test was evaluated with six subinhibitory concentrations, from 25% to 90%, incubating them for 48 hours. All treatments showed biofilm reduction in all six concentrations. The hemolytic activity was evaluated for the treatments from ¼ to 4 times the values of MICs. In the MIC value, two treatments showed hemolytic activity while in 4xMIC, four treatments showed hemolytic activity. The test for proteins leakage was evaluated following Bradford protocol, with concentrations of one and two times the MICs value for MRSA strain. The treatment that showed the higher concentration of leaked proteins was Nano-Nis. The treatments, except for the ones with nanoemulsion, didn't show cytotoxicity on HCT-116 strain. Then, it can be concluded that the nanoemulsions and the gold nanoparticles, when conjugated with nisin, were efficient against different strains of *S. aureus*, with antibacterial potential higher than the potential of nisin itself.

Key-words: virulence factors, nanotechnology, antimicrobial peptides, bacterial resistance, *Staphylococcus aureus*

Lista de abreviaturas:

Abu: ácido 2-aminobutírico

AHL: acylhomoserine lactones

AMPs: Peptídeos Antimicrobianos

ATCC: American Type Culture Collection

AgNPs: Nanopartículas de Prata

AgNPs-Nis: Nanopartículas de Prata acopladas à Nisina

AuNPs: Nanopartículas de Ouro

AuNPs-Nis: Nanopartículas de Ouro acopladas à Nisina

BHI: infusão de cérebro e coração

A/O: Emulsão água em óleo

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CBM: Concentração Bactericida Mínima

Dha: deidroalanina

Dhb: deidroaminobutírico

DLS: Dynamic Light Scattering

DO: Densidade Óptica

EHL: Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico

FAO: Food and Agriculture Organization

FDA: Food and Drug Administration

GRAS: Generally Recognized As Safe

HGT: Transferência Horizontal de Genes

MHC: Mueller Hinton Caldo

MRSA: *S. aureus* meticilina-resistente

Nano: Nanoemulsão

Nano-Nis: Nanoemulsão conjugada à nisina

O/A: Emulsão óleo em água

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Phosphate buffer saline

PDI: Índice de Polidispersividade

PMF: força motriz do próton

PZ: Potencial Zeta

REMA: Resazurin Microtiter Assay

SAg: Genes Produtores de Enterotoxinas

SEs: Enterotoxinas Estafilocócicas

SEA: Enterotoxinas Estafilocócica A

SEB: Enterotoxina Estafilocócica B

SEC: Enterotoxina Estafilocócica C

SED: Enterotoxina Estafilocócica D

SEL: Proteínas Semelhantes à Enterotoxina Estafilocócica

SCCs: Cassete Cromossômico Estafilocócico

SCVs: Pequenas Variantes de Colônia

UI: Unidades Internacionais

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

TSB: Caldo Trípico de Soja

TSST-1: Toxina da Síndrome do Choque Tóxico 1

VISA: *S. aureus* Intermediário à Vancomicina

Lista de figuras:

- Figura 1.** Esquema para disseminação de resistência aos fármacos antimicrobianos. Fonte: De Linton, 2019 19
- Figura 2.** Esquema de uma transferência horizontal de genes entre duas células. Fonte: Domingues et al., 2017 20
- Figura 3.** Esquemas dos modelos conformacionais adquiridos pelos AMPs quando em contato com as células-alvo. Modelo de cano-stave (esquerda), modelo poro toroidal (centro) e modelo de carpete (direita). Fonte: Pasupuleti et al., 2012 26
- Figura 4.** Estrutura primária da nisina, onde os aminoácidos azuis são os positivamente carregados em pH neutro. Aminoácidos roxos são os modificados pós-traducionais, e os anéis estão nomeados de A à E. Fonte: Morales et al., 2019 31
- Figura 5.** Representação da estrutura das gotículas de nanoemulsão O/A, composto pelos dois líquidos imiscíveis e surfactantes. Fonte: McClements, 2012 33
- Figura 6.** Representação das ações antibacterianas intracelulares das AuNPs. Fonte: Ramalingam, 2019 36
- Figura 7.** Especificações dos tensoativos Tween 20 e Span 80. 39
- Figura 8.** Interpretação dos resultados do teste da produção de enterotoxinas. Fonte: THERMO SCIENTIFIC 46
- Figura 9.** Nanoemulsões de 1 à 5, sem a adição de nisina 50

Figura 10. Mudança de coloração durante o preparo da solução de AuNPs. Solução de H ₂ AuCl ₄ sob agitação magnética (a); momento T ₀ , onde ocorreu a adição da solução de citrato de sódio (b); 5 minutos após a adição da solução (c); 30 minutos após (d); 1 hora após (e); 2 horas após (f).	58
Figura 11. Bandas de absorção obtidas nas formulações de AuNPs e AuNPs-Nis.	58
Figura 12. Ilustração de ambas as hipóteses sugeridas por N. Terjung (2011), onde a hipótese 1 (acima) ilustra o sequestro dos fitofenóis pela interface das gotículas, agindo como surfactante, e sendo diminuída sua concentração no meio aquoso. A hipótese 2 (abaixo) ilustra a diminuição do número de micelas no meio aquoso com os menores tamanhos de gotículas.	63
Figura 13. Representações gráficas da porcentagem de redução de biofilme dos seis tratamentos realizados com as seis concentrações subinibitórias testadas.	70
Figura 14. Representação gráfica da porcentagem (%) de hemólise causada pelos tratamentos a diferentes concentrações: ¼ de CIM, ½ CIM, CIM, 2xCIM e 4xCIM	72
Figura 15. Representações gráficas dos 3 tempos (0h, 2h e 4h) quanto às concentrações (µg/ml) de proteínas liberadas no sobrenadante, quando expostas a concentrações equivalentes ao CIM e a 2xCIM dos cinco diferentes tratamentos.	76
Figura 16. Gráficos representando a viabilidade celular das células HCT-116 ao controle (A) e tratadas, a concentrações 1 e 2 vezes valor de CIM para MRSA da nisina (B), Nano-Nis (C), AuNPs-Nis 1xCIM (D), AuNPs-Nis 2XCIM (E) e Nanoemulsão 1 (F).	78

As células vivas estão representadas no quadrante 4 (Q4) onde Anexina (-) e 7-AAD (-), apoptose inicial no quadrante 1 (Q1) onde Anexina (+) e 7-AAD (-) e apoptose tardia/necrose no quadrante 2 (Q2) onde Anexina (+) e 7-AAD (+). Os gráficos *gate* mostram o tamanho (FSC, eixo x) e granulosidade (SSC, eixo y) das células.

Figura 17. Porcentagem de morte celular de HCT-116 quando submetidas aos tratamentos nisina, Nano-Nis, nanoemulsão e AuNPS-Nis.

79

Lista de tabelas:

Tabela 1. Cinco formulações das nanoemulsões com seus respectivos valores de EHL.	39
Tabela 2. Valores de EHL dos tensoativos Tween 20 e Span 80	40
Tabela 3. Representados com asterisco (*) os diferentes tratamentos utilizando-se nisina, adicionada de nanoemulsões e/ou nanopartículas de ouro (AuNPs), realizadas sobre as diferentes cepas ATCC de <i>S. aureus</i> (MRSA e enterotoxigênicas A-D).	45
Tabela 4. Valores do tamanho das gotículas (nm), do Potencial Zeta (mV) e do Índice de Polidispersividade para as cinco nanoemulsões, puras e com nisina.	51
Tabela 5. Aspecto visual das cinco nanoemulsões nas diferentes temperaturas, desde o tempo zero do seu preparo até 1 mês após.	54
Tabela 6. Avaliação macroscópica das cinco nanoemulsões após 5 minutos em cada temperatura.	55
Tabela 7. Valores de pH antes e depois das amostras de nanoemulsões serem submetidas ao teste de estresse térmico.	56
Tabela 8. Valores de CIM e CBM ($\mu\text{g/ml}$) da nisina e suas nanoemulsões frente às cepas de <i>S. aureus</i> enterotoxigênicos (A-D) e MRSA	60
Tabela 9. Valores de CIM e CBM, em $\mu\text{g/ml}$, para as AuNPs e suas combinações com a nanoemulsão e nisina sobre as cepas enterotoxigênicas (A-D) e MRSA.	64
Tabela 10. Resultados obtidos para a produção de enterotoxinas A, B, C e D	67

por *S. aureus* quando submetidas a 70% MIC da nisina, nanomeulsão 5 com nisina e AuNPs-Nis.

Tabela 11. Valores da redução (em porcentagem) da formação de biofilme pela cepa MRSA ATCC 33591. Valor calculado em relação ao controle da bactéria. 69

Tabela 12. Valores, em porcentagem (%), da atividade hemolítica causada pelos tratamentos nas cinco diferentes concentrações testadas. 72

Tabela 13. Concentrações ($\mu\text{g/ml}$) de proteínas extravasadas de MRSA no tempo 0h, após 2h e 4h desde o início dos tratamentos em concentrações equivalentes ao CIM e duas vezes o seu valor. 76

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Revisão de literatura	17
2.1 Resistência bacteriana	17
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.3 Fatores de virulência	22
2.4 Peptídeos Antimicrobianos (AMPs)	25
2.4.1 Bacteriocinas	29
2.5 Nanotecnologia	32
2.5.1 Nanoemulsões	32
2.5.2 Nanopartículas de ouro (AuNPs)	35
3. Objetivo	37
3.1 Objetivo geral	37
4. Material e Métodos	38
4.1 Linhagens bacterianas e antimicrobianos	38
4.2 Preparo das nanoemulsões	38
4.2.1 Tensoativos utilizados	38
4.2.2 Incorporação da nisina às nanoemulsões	40
4.3 Caracterização das nanoemulsões	40
4.3.1 Avaliação macroscópica	41
4.3.2 Cor	41
4.3.3 Estresse térmico	41
4.3.4 Estabilidade em temperatura de armazenamento	41
4.3.5 Tamanho médio das partículas (DLS)/Potencial Zeta	41
4.3.6 Determinação pH	42
4.4 Preparo das Nanopartículas de Ouro (AuNPs)	42
4.4.1 Síntese das AuNPs estabilizadas por citrato	42
4.4.2 Incorporação da nisina às AuNPs	43
4.4.3 Incorporação das AuNPs-Nis à Nanoemulsão	43
4.4.4 Incorporação da Nano-Nis às AuNPs	43
4.5 Caracterização das AuNPs	43
4.5.1 Cor	43
4.5.2 Espectrometria UV-visível	44
4.6 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	

.....	44
4.7 Inibição da produção de enterotoxinas	45
4.8 Efeito dos tratamentos de nisina na formação de biofilme	46
4.9 Atividade hemolítica	47
4.10 Extração de proteínas	47
4.11 Viabilidade celular	48
4.11 Análise estatística	49
5. Resultados e discussão	49
5.1 Preparo das nanoemulsões	49
5.1.1 Avaliação macroscópica, tamanho médio das partículas e potencial zeta	49
5.1.2 Estabilidade em armazenamento a diferentes temperaturas	53
5.1.3 Estresse térmico	54
5.1.4 Valores de pH	56
5.2 Preparo das nanopartículas de ouro (AuNPs)	57
5.2.1 Síntese das AuNPs estabilizadas por citrato	57
5.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	
.....	59
5.3.1 Atividade antibacteriana da nisina e nanoemulsões-nisina contra <i>S. aureus</i>	
enterotoxigênicos e metilina-resistente (MRSA)	59
5.3.2 Atividade antibacteriana das nanopartículas de ouro acopladas à nisina (AuNPs-Nis),	
AuNPs acopladas à nanoemulsão-nisina (AuNPs + Nano-Nis) e das AuNPs-Nis acopladas à	
nanoemulsão (AuNPs-Nis + Nano) contra <i>S. aureus</i> metilina-resistente (MRSA)	63
5.4 Inibição da produção de enterotoxinas	66
5.5 Efeito dos tratamentos de nisina na formação do biofilme	69
5.6 Atividade hemolítica	71
5.7 Extração de proteínas	75
5.8 Viabilidade celular	77
6. Conclusão	82
7. Referências bibliográficas	83

1 **1. Introdução**

2 A resistência bacteriana aos antibióticos, medicamentos que são utilizados amplamente
3 pela população, têm se apresentado cada vez mais disseminada dentro de uma comunidade,
4 evoluindo para uma escala global. Os antibióticos são utilizados em muitos casos erroneamente,
5 tanto por sub-dosagem como em casos onde o paciente faz o uso da medicação sem ao certo
6 saber se realmente é uma infecção bacteriana que está ocorrendo. Dessa forma, para
7 controlarmos a disseminação de bactérias resistentes, duas medidas podem ser tomadas:
8 controlar e reduzir as prescrições de antibióticos e a prevenção da propagação desses micro-
9 organismos de pacientes infectados para a comunidade (Vassal et al., 2017).

10 O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva que coloniza naturalmente o
11 corpo humano, mas também possui a capacidade de expressar diversos fatores de virulência,
12 como a produção de biofilme e de enterotoxinas, e se apresenta potencialmente patogênica ao
13 homem. Uma das suas principais características é ser altamente oportunista, principalmente no
14 ambiente hospitalar, sendo capaz de causar desde infecções simples até mesmo sepses. Um *S.*
15 *aureus* de grande preocupação dos pesquisadores é a *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA),
16 que apresenta resistência contra o antibiótico meticilina, além dos demais β -lactâmicos, e já
17 foram reportados casos de resistência dessa cepa também à vancomicina (Mandal et al., 2015).

18 Uma vez que muitas bactérias patogênicas têm adquirido resistência aos medicamentos
19 comumente utilizados, os pesquisadores têm estudado diversas formas de como combater esses
20 micro-organismos. Diversos compostos já apresentaram efeitos antimicrobianos, dentre eles os
21 peptídeos antimicrobianos (AMPs). Os AMPs possuem atividade contra bactérias, vírus e
22 fungos e são componentes de origem biológica que podem ser derivados de plantas, mamíferos,
23 insetos e anfíbios. Suas principais características são a sua natureza catiônica e a sua capacidade
24 de permeabilizar membranas de micro-organismos. Um AMP bastante estudado é a nisina,
25 especialmente contra bactérias Gram-positivas inclusive com ação superior a alguns
26 antibióticos.

27 A nisina é uma bacteriocina, da classe Ia, também conhecida como um lantibiótico. É
28 uma bacteriocina considerada segura para consumo (GRAS – *Generally Recognized As Safe*) e
29 é utilizada na indústria alimentícia para preservação de alimentos há mais de 60 anos. Seu modo
30 de ação implica na sua capacidade de formar poros na membrana bacteriana, levando ao
31 extravasamento do seu conteúdo citoplasmático, acarretando na morte celular. A nisina possui
32 afinidade às moléculas de lipídio II localizadas na membrana plasmática, que são essenciais
33 para a síntese da estrutura da mesma (Scherer et al., 2015).

1 Com o objetivo de otimizar a ação antibacteriana da nisina e de outros AMPs, a
2 nanotecnologia vem sendo empregada em diversos estudos e, na área microbiológica, possui
3 como objetivo otimizar a entrega do composto de interesse ao seu micro-organismo alvo.
4 Diversos nanomateriais podem ser sintetizados, incluindo nanoemulsões e nanopartículas de
5 ouro (AuNPs). Os nanomateriais são aplicados nas mais diversas áreas, desde a indústria
6 agrícola até a indústria farmacêutica e hospitalar (Leite et al., 2018). Como vantagens, os
7 nanomateriais podem fornecer uma menor toxicidade ao hospedeiro, maior biodisponibilidade
8 do composto encapsulado e uma maior estabilidade (Dávila-Rodríguez et al., 2019).

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

2. Revisão de literatura

2.1 Resistência bacteriana

Os fármacos antibacterianos salvaram muitas vidas e ajudaram o desenvolvimento da medicina moderna na segunda metade do século passado. Porém, o surgimento de linhagens bacterianas resistentes a esta classe de fármacos compromete a eficácia desses tratamentos, mostrando claramente a urgência de medicamentos antibacterianos novos e aprimorados com novos alvos bem como agentes com estruturas moleculares distintos para evitar a resistência cruzada (Belete, 2019). Pesquisadores relatam que em breve haverá um grande problema no tratamento de doenças infecciosas provocadas por linhagens bacterianas resistentes aos fármacos tradicionais, devido ao grande uso desses medicamentos, resultando em um problema significativo à saúde pública em geral (Vassal et al., 2017).

De maneira geral, as doenças provocadas por micro-organismos multirresistentes estendem ao período de internação dos pacientes, levando a aumento dos custos para o sistema de saúde bem como são responsáveis também pelo aumento da taxa de morbidade e mortalidade nesses ambientes (Sancak, 2011).

Um estudo realizado na França por Bonnet et al. (2019), mostrou que pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) infectados por micro-organismos resistentes, foram associados com maiores índices de mortalidade, tendo fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como os principais agentes. Entretanto, ainda é incerto se a alta taxa de mortalidade está relacionada ao aumento de virulência dessas bactérias ou simplesmente pelo maior tempo necessário para se realizar a antibioticoterapia ideal devido à resistência bacteriana (Bonnet et al., 2019).

Em relação à epidemiologia, a evolução e disseminação de micro-organismos multirresistentes ampliaram drasticamente nos últimos 50 anos, período em que coincide com as descobertas e aumento do uso de agentes antimicrobianos (Friedman et al., 2015). Segundo ainda estes autores, cepas de *Staphylococcus aureus* começaram a demonstrar resistência pela produção de penicilinase com frequência, até que na década de 1940 aproximadamente 50% das cepas de *S. aureus* já havia se tornado resistentes à penicilina, sendo que como estratégia de tratar doenças provocadas por *S. aureus* resistentes à penicilina, a meticilina foi introduzida em 1959. Entretanto, apenas dois anos depois, já haviam sido reportadas cepas de *S. aureus* resistentes também à meticilina.

1 As consequências da utilização de antibióticos não é uma temática apenas das ciências
2 biológicas, mas também uma temática que está associada à ciência do meio ambiente (Yang et
3 al., 2018). Águas contaminadas com antibióticos e, conseqüentemente, cepas bacterianas
4 resistentes a antibióticos, são encontradas até em locais onde não ocorre a presença constante
5 de seres humanos, como por exemplo na Antártida, quando o estudo de Hernández (2019)
6 verificou que ao isolarem 115 cepas de *Escherichia coli* de água marinha da região Antártida,
7 houve resistência a 8 antibióticos de 18 testados no total, sendo 8% resistentes a mais de um
8 antibiótico, confirmando a disseminação da resistência bacteriana ao redor do mundo.

9 A utilização de antibióticos também influencia na cadeia alimentar, visto que ambientes
10 aquáticos são locais onde ocorre acúmulo de antibióticos e de genes de resistência (Yang et al.,
11 2018), assim como também em animais ruminantes (Rather et al, 2017). Conseqüentemente, o
12 consumo da carne animal e a utilização dessa água para irrigação, indústrias e ambientes
13 hospitalares, fazem com que esses antimicrobianos atinjam também a população humana de
14 forma direta (Yang et al., 2018). Este fenômeno da dispersão de resistência pode ser visualizado
15 de acordo com a Figura 1, segundo Linton (2019).

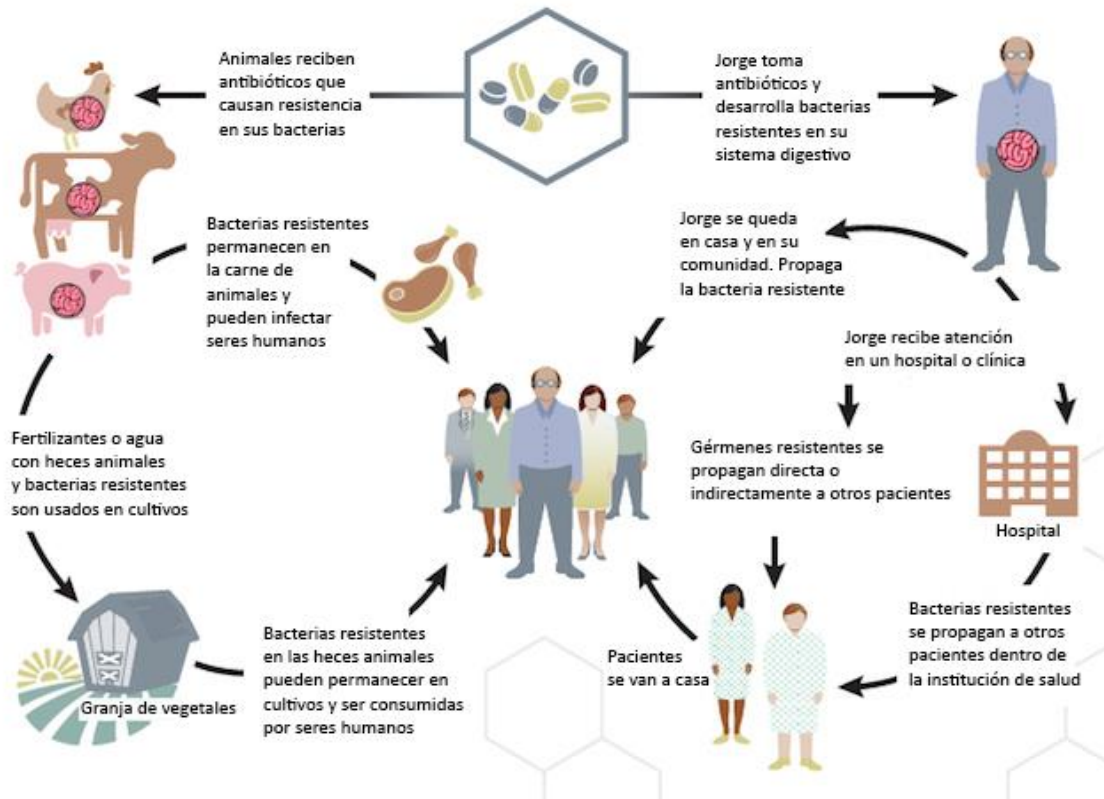
16 As bactérias são conhecidas por sua capacidade de se adaptarem em condições
17 ambientais diferentes de acordo com as suas necessidades fisiológicas que podem estar entre
18 limitações nutricionais, variações de valores de pH e temperatura e também mudanças
19 oxidativas e osmóticas (Provenzano et al., 2013). Assim, para sobreviverem, esses micro-
20 organismos precisam se adaptar rapidamente, fenômeno este mediado por proteínas regulatórias
21 que são responsáveis por controlar a transcrição, tradução ou outros eventos da sua expressão
22 gênica (Chattoraj et al., 2011).

23 Segundo Khameneh (2016), a resistência bacteriana aos antibióticos pode ser dividida
24 em dois grupos: resistência intrínseca ou adquirida. A primeira, depende das propriedades
25 biológicas intrínsecas às bactérias, como por exemplo o sistema de efluxo AcrAB-TolC da *E.*
26 *coli*, visto que esse sistema é expresso em níveis baixos e há o favorecimento da resistência
27 intrínseca de *E. coli* a diversos fármacos, como quinolonas, macrolídeos e cloranfenicol
28 (Hernando-Amado et al., 2016). Já a resistência adquirida resulta da aquisição de genes de
29 resistência pelas bactérias, mutação de seu material genético ou uma combinação dos dois
30 fenômenos mencionados (Khameneh et al., 2016).

31 Os genes de resistência aos fármacos antibacterianos podem ser transferidos entre as
32 bactérias e aos humanos, de bactérias Gram-positivas para Gram-negativas e interespecies (De
33 Flaun et al. 1989; Breidenstein et al. 2011; Du and Liu, 2012; Bengtsson-Palme and Larsson,
34 2015; Li et al., 2015; Martinez et al., 2015; Van Boeckel et al., 2015). É importante ressaltar

1 que genes de resistência em patógenos multirresistentes usualmente possuem origem em locais
2 onde os micro-organismos estão submetidos a uma pressão seletiva quando estes mesmos
3 fármacos são utilizados (Stalder et al., 2014).

4



5

6 **Figura 1.** Esquema para disseminação de resistência aos fármacos antimicrobianos (Fonte:
7 De Linton, 2019).

8

9 A propagação dos genes de resistência pode ocorrer na forma de transferência horizontal
10 de genes (HGT), uma vez que estão localizados nos plasmídios, íntegrans ou transposons
11 (Breidenstein et al., 2011). Por definição, a HGT é o movimento do material genético entre
12 micro-organismos, que não sejam dados pela transferência parental, também conhecida como
13 transferência vertical de genes (Jain et al., 1999). Uma vez que a HGT confere diferentes
14 fenótipos para diferentes cepas bacterianas, esse fenômeno é considerado essencial para a
15 evolução microbiana (Fan et al., 2018). Como mostrado na Figura 2, a HGT pode ser mediada
16 por vesículas de membrana de uma célula doadora para uma receptora, carregando o material
17 genético de interesse. Bacteriófagos podem se ligar às vesículas ao serem transferidas para a
18 célula receptora (Domingues et al., 2017).

19

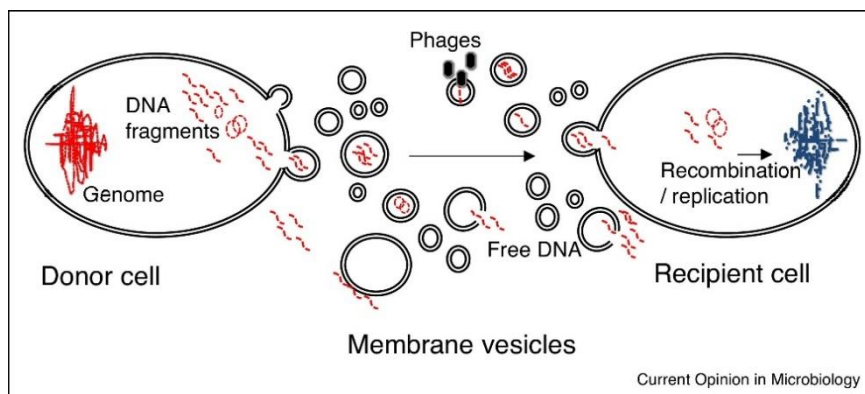


Figura 2. Esquema de uma transferência horizontal de genes entre duas células. Fonte: Domingues et al. (2017)

Além da transferência horizontal de genes, o papel das bombas de efluxo na resistência bacteriana é bastante relevante. Essas bombas são proteínas de transporte que expulsam drogas ou substâncias tóxicas para o meio extracelular (Khameneh et al., 2016). Um substrato específico ou uma classe de fármacos (antibióticos) podem ser transportados pelas bombas de efluxo. Assim, a presença desse transportador pode estar associada à resistência bacteriana a múltiplas drogas (Webber et al., 2003).

A resistência aos beta-lactâmicos se dá pela inativação enzimática dessas drogas, como pelas enzimas beta-lactamases e carbapenemases, ou pela alteração do ligante da bactéria ao antibiótico. As beta-lactamases causam a hidrólise do anel beta-lactâmico, levando à sua inativação. A resistência às cefalosporinas em *E. coli* e *K. pneumoniae* aumentou significativamente na Europa entre 2012 e 2015. Da mesma forma, as enzimas carbapenemases inativam os carbapenêmicos, e estão frequentemente associados com outros mecanismos de resistência, como as enzimas de modificação de aminoglicosídeos (MacGowan et al., 2017). Além das bombas de efluxo presentes nas membranas, as porinas também podem sofrer alterações, fazendo com que haja uma maior dificuldade para a entrada do antibiótico na célula bacteriana, como é o caso da família *Enterobacteriaceae*, que, além das beta-lactamases, apresenta resistência aos beta-lactâmicos por meio desse mecanismo (MacGowan et al., 2017).

Duas estratégias podem ser tomadas para o controle das bactérias resistentes e multirresistentes aos antibióticos. A primeira é levar em consideração o erro em sub-dosagem de medicação administrada e a segunda é evitar a propagação dessas bactérias, por pacientes infectados, para a população, seguindo alguns cuidados, ou seja, a necessidade de identificar quais pacientes estão em risco de possuir a bactéria resistente e coletar amostras para a identificação bacteriana e a quais antibióticos são resistentes. Medidas de precaução por contato

1 ou pelo ar são essenciais, como o isolamento do paciente em uma sala de internação, sempre
2 higienizar as mãos ao entrar em contato com o paciente e a limpeza e desinfecção do ambiente
3 onde o paciente se encontra (Vassal et al., 2017).

4 Segundo Belete (2019), a busca por novos antimicrobianos visando tratamento das
5 doenças infecciosas pode ter como princípio descobrir novos alvos antimicrobianos
6 promissores e maneiras alternativas de abordagens de agentes antimicrobianos. Assim,
7 menciona o autor possibilidades tais como mecanismos que reduzem a patogenicidade
8 (estratégias anti-virulência) como inibição de síntese ou neutralização de toxinas; uso de
9 imunocjugados; inibidores do *quorum sensing* como, por exemplo, pela inibição de síntese
10 da lactonas acil-homoserina (AHL) e consequente inibição na produção de fatores de virulência
11 e formação de biofilme; inibição da síntese de ácidos teicóicos, ácidos graxos e outros
12 precursores (isoprenóides, corismato, etc); ruptura de genes de resistência, além de propor uso
13 de métodos considerados alternativos como terapias com bacteriófagos e uso de peptídeos
14 antimicrobianos.

15 16 **2.2 *Staphylococcus aureus*** 17

18 *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva que coloniza naturalmente o corpo humano
19 (Mekonnen et al., 2019), sendo que 20% dos adultos são portadores constantes dessa bactéria e
20 60% são portadores intermitentes (Grumann et al., 2014). Entretanto, é considerado também
21 um patógeno altamente oportunista devido à sua habilidade de expressar resistência contra
22 agentes antimicrobianos (Mendem et al., 2016) por meio da obtenção de material genético de
23 outros microrganismos patogênicos. Estes são responsáveis por otimizar, além da resistência,
24 fatores de virulência e, conseqüentemente, a sua sobrevivência (Loftus et al., 2018).

25 Duas cepas de *S. aureus* responsáveis por duas grandes epidemias em um hospital
26 holandês já foram estudadas por conseguirem sobreviver em superfícies por cerca de 300 dias,
27 devido à temperatura e luz adequados para a sua sobrevivência (Wagenvoort et al., 2000). A
28 transmissão de *S. aureus*, principalmente no ambiente hospitalar, é dada na maioria das vezes
29 pela falta de higiene das mãos, tanto de funcionários como de pacientes. Dessa forma, há a
30 rápida contaminação do ambiente hospitalar, podendo também ser transmitida para o ambiente
31 extra-hospitalar, atingindo a população saudável de uma comunidade. A taxa de mortalidade de
32 uma população saudável de uma comunidade por *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA) pode
33 chegar a 18% (Loftus et al., 2018). Infecções por *S. aureus* variam desde furúnculos, evoluindo
34 para abscessos, sepses, bacteremia, endocardite e osteomielite (Mendem et al., 2016).

1 *S. aureus* já apresenta resistência contra diversos antibióticos, como penicilina,
2 meticilina, oxacilina, linezolida e daptomicina (Mekonnen et al., 2019). A resistência à
3 vancomicina devido à aquisição do gene *vanA* é raramente observada, entretanto, *S. aureus*
4 intermediário à vancomicina (VISA) é uma crescente preocupação considerando que o fracasso
5 do tratamento com esse antibiótico é prevalente em infecções com essa espécie (Haaber et al.,
6 2017). No estudo de Mandal et al. (2015), foram isoladas 76 cepas de VISA de efluentes
7 hospitalares na Índia, dessas, aproximadamente 90% apresentaram resistência à meticilina.

8 Os isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina são chamados de *Staphylococcus*
9 *aureus* meticilina-resistente (MRSA) que, devido a sua rápida disseminação global, o
10 tratamento de infecções por essa bactéria é um desafio a ser vencido (Szczepanik et al., 2007).
11 Cepas de MRSA que apresentaram resistência à vancomicina já foram detectadas, o que
12 aumenta mais ainda a preocupação ao redor do mundo, já que é o antibiótico mais utilizado no
13 combate a essa bactéria (Mandal et al., 2015).

14 A resistência de MRSA à meticilina se dá por meio da presença do gene *mecA*,
15 localizado no cassete cromossômico estafilocócico (SCCmec), inseridos no gene *rlmH* (Haaber
16 et al., 2017). Assim, o SCCmec confere resistência a antibióticos beta-lactâmicos em cepas de
17 MRSA (Haaber et al., 2017). Os genes *mecA* e *mecC* podem ainda ser responsáveis por alterar
18 as proteínas do ligante à penicilina, fazendo com que os beta-lactâmicos não consigam se ligar
19 corretamente às bactérias.

21 **2.3 Fatores de virulência**

22 Os fatores de virulência de *S. aureus* combinados ou isolados, o sítio de infecção e a
23 variabilidade da resposta imunológica do hospedeiro e determinam a capacidade dessa bactéria
24 em causar uma infecção sendo os fatores de virulência dessa bactéria subdivididos em proteínas
25 de superfície (adesinas), toxinas, enzimas (incluindo exoenzimas) e outras proteínas
26 (Deinhardt-Emmer et al., 2018; Zecconi et al., 2013).

27 Além disso, os fatores de virulência de *S. aureus* possuem um amplo repertório de
28 mecanismos que fazem a bactéria ser capaz de evadir-se do sistema imune do hospedeiro por
29 modificar componentes estruturais e secreção de proteínas imuno-modulatórias específicas, que
30 neutralizam componentes imunológicos e assim criando ambientes em que permitem sua
31 sobrevivência (Fedtke et al., 2004; Rooijackers et al., 2005).

32 *S. aureus* é capaz de produzir sub-populações naturais de crescimento lento,
33 denominadas pequenas variantes de colônia (SCVs), que são associadas com a exposição

1 crônica a antibióticos (Proctor et al., 2006) e apresentam uma elevada resistência a
2 antimicrobianos (Tuchscherr et al., 2010). Além disso, esse estilo de sobrevivência é
3 possivelmente a base para a sobrevivência e persistência de *S. aureus* no hospedeiro
4 (Tuchscherr et al., 2010).

5 As SCVs já foram observadas também em *E. coli*, *Salmonella sp.*, *P. aeruginosa* e *E.*
6 *faecalis* (Kahl, 2014). O que há em comum entre os achados de SCVs nessas bactérias, é que
7 elas foram isoladas em condições de estresse, como quando submetidas à antibioticoterapia,
8 estresse térmico aos desinfetantes ou em ambiente intracelular de células eucarióticas (Kahl,
9 2014). Os fatores ambientais que desencadeiam a formação de SCVs por *S. aureus* ainda
10 permanecem desconhecidos, entretanto, fatores que causam estresse à bactéria são potenciais
11 em induzir a sua formação (Bui et al., 2015).

12 Outro mecanismo de sobrevivência de *S. aureus*, bem como de diversas outras bactérias
13 patogênicas, é a produção de biofilme (Bui et al., 2015). Os biofilmes bacterianos são
14 comunidades sésseis com células ligadas a uma superfície ou a um substrato (Archer et al.,
15 2011) e estão imersas em uma matriz de substâncias poliméricas, contendo DNA extracelular,
16 proteínas e substâncias polissacarídicas que protegem a colônia bacteriana, fornecendo proteção
17 contra agentes externos (Mann et al., 2009; Sabirova et al., 2014). A formação do biofilme
18 depende da comunicação entre as células bacterianas, fenômeno conhecido como *quorum*
19 *sensing*. As bactérias sintetizam moléculas de sinalização, chamadas de auto-indutores, que
20 serão responsáveis pela comunicação intercelular, ajudando as bactérias a estimarem a sua
21 população naquele momento. Se há uma baixa quantidade de auto-indutores no meio, significa
22 que não há bactérias o suficiente para a formação do biofilme e assim, elas começam a se
23 dividir. Quando existe uma quantidade suficiente de auto-indutores no meio após sua
24 reprodução, a comunicação bacteriana indica que o meio e a quantidade bacteriana estão
25 favoráveis para o início da formação do biofilme (Belete, 2019).

26 A formação do biofilme é um processo dinâmico e frequentemente mais de uma espécie
27 bacteriana está englobada nessa matriz polimérica (Goldmann et al., 2018). Interações
28 interespecies em níveis moleculares moldam os biofilmes multiespecies em termos de
29 viabilidade celular, fatores de crescimento, fatores de virulência, resistência antimicrobiana e
30 imunidade do hospedeiro (Xu et al., 2019). A resistência das bactérias presentes nos biofilmes
31 pode ser controlada a partir do desenvolvimento de propriedades anti-aderentes de superfícies
32 susceptíveis à aderência bacteriana, inibidores do *quorum sensing* e desenvolvimento de novos
33 antimicrobianos como desinfetantes, nanopartículas, agentes desagregantes e peptídeos
34 antimicrobianos, assim como compostos sinérgicos entre materiais anti-aderentes e

1 antimicrobianos (Mohammed et al., 2018). Um peptídeo antimicrobiano, denominado 1018
2 (Belete, 2019), possui uma atividade de amplo espectro anti-biofilme por possuir a capacidade
3 de se ligar e degradar os nucleotídeos 5'-difosfato e 3'-difosfato, que funcionam como
4 sinalizadores na formação e permanência do biofilme.

5 Os biofilmes englobam 99% de toda a população bacteriana, são responsáveis por 65%
6 de todas as infecções em humanos e 80% das infecções bacterianas transmitidas por alimentos
7 (Antonio B. et al., 2017; Costerton et al., 1995). Nos alimentos, os biofilmes podem se formar
8 em carnes, leite, produtos lácteos, frutas e vegetais, sugerindo que *S. aureus* é capaz de criar
9 reservatórios em diversos tipos de alimentos (Pometto III Ato et al., 2015).

10 Nos alimentos, além de formar os biofilmes, o *S. aureus* é capaz de produzir e liberar
11 suas enterotoxinas no meio (Schelin et al., 2011), podendo se expressar em diversos tipos
12 alimentos, como em produtos lácteos, carnes, ovos e até mesmo em bolos e sorvetes (Adams et
13 al., 2008). A produção da enterotoxina por *S. aureus* em alimento foi identificada como causa
14 de intoxicação alimentar estafilocócica (Le Loir et al., 2003). A severidade da intoxicação irá
15 depender da quantidade do alimento ingerido e, conseqüentemente, da quantidade de toxinas
16 ali presentes (Smyth et al., 2004). A menor dose capaz de causar emese no hospedeiro foi
17 reportada por Evenson et al. (1988), onde a concentração de SEA foi de 0,5 ng/ml (Schubert et
18 al., 2016).

19 A família das enterotoxinas estafilocócicas é composta pelas enterotoxinas
20 estafilocócicas (SEs) e proteínas semelhantes à enterotoxina estafilocócica (SELs) (Zhang et
21 al., 2017). As proteínas SELs são homólogas e estruturalmente similares às SEs (Zhang et al.,
22 2017), mas, diferentemente das SEs, não são capazes de induzir emese no hospedeiro e nem de
23 ativar as células T (Xu et al., 2012).

24 Até o presente momento, 23 enterotoxinas estafilocócicas foram reconhecidas
25 (Grumann et al., 2014), entretanto, apenas a presença de SEA, SEB, SEC, SED e SEE é
26 investigada durante a rotina de análise de alimentos (Regulação Européia 1441/2007) (Schubert
27 et al., 2016). A análise genética de isolados clínicos de *S. aureus* mostrou que aproximadamente
28 80% dos isolados possuem entre cinco e seis genes produtores de enterotoxinas (SAg)
29 (Grumann et al., 2014). As enterotoxinas representam a causa de intoxicação alimentar, devido
30 principalmente à sua estabilidade em altas temperaturas de cocção e de seu potente fator
31 antigênico (Schelin et al., 2011 e Yan et al., 2012).

32 Infecções por *Staphylococcus aureus*, de origem comunitária ou nosocomial, têm
33 reforçado também a necessidade do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos contra
34 essa bactéria (Fridkin et al., 1999). Por mais que algumas abordagens convencionais contra

1 infecções bacterianas ainda funcionem, o direcionamento de drogas antimicrobianas contra os
2 fatores de virulência de *S. aureus* vem sendo estudada como uma nova estratégia no combate à
3 essa bactéria (Gatadi, et al., 2019).

4 Na busca por novos agentes antimicrobianos que sejam capazes de tratar infecções e
5 intoxicações por *S. aureus*, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) têm sido amplamente
6 estudados e demonstram propriedades antibacterianas importantes (Chung et al., 2017).

8 **2.4 Peptídeos Antimicrobianos (AMPs)**

9 Na década de 80, na época quando os números de novos agentes antibacterianos
10 começaram a decair, a pesquisa pelos peptídeos antimicrobianos (AMPs) ganhou força, quando
11 diversos AMPs diferentes foram descobertos (Koehbach et al., 2019) em diferentes espécies,
12 como insetos (Steiner et al., 1981), anfíbios (Zasloff, 1987) e mamíferos (Lehrer, et al., 1991).
13 Além disso, pela problemática mundial da multirresistência bacteriana, enfatiza-se a
14 necessidade e a importância do desenvolvimento de novos tratamentos, sendo que os AMPs
15 possuem papel importante na área verificado pelos muitos trabalhos dedicados a este assunto
16 recentemente (Carmona-Ribeiro et al., 2014).

17 Peptídeos antimicrobianos são um grupo diverso de moléculas que exibem atividade
18 antimicrobiana (Andreu et al., 1998; Bulet et al., 1999; Zasloff, 2002) e são componentes-chave
19 do sistema imune inato, fazendo parte da primeira oposição contra patógenos (Häffner et al.,
20 2018) como bactérias, fungos, vírus e parasitas (Andreu et al., 1998; Teixeira et al., 2012),
21 podendo também influenciar no sistema imune adaptativo (Travkova et al., 2017).

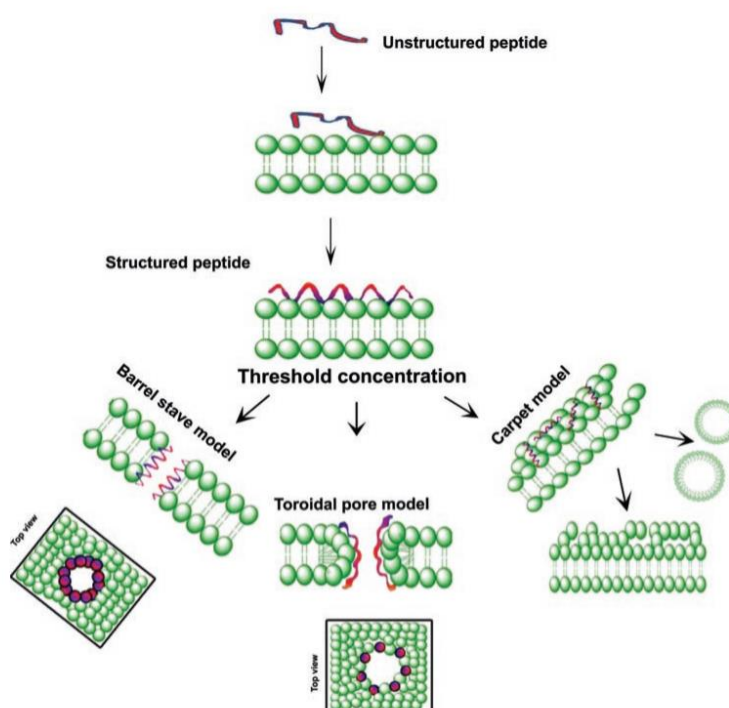
22 Além do fato dos AMPs serem uma alternativa ao combate de micro-organismos
23 patogênicos, podemos ressaltar como vantagens do seu uso o fato de apresentarem poucos
24 relatos na literatura de micro-organismos resistentes a esses peptídeos. O modo de ação que os
25 AMPs possuem de desintegrar a parede celular bacteriana não é energeticamente favorável às
26 bactérias para que desenvolvam facilmente a resistência contra os AMPs (Andersson et al.,
27 2016; Guilhelmelli et al., 2013).

28 São divididos em subgrupos, de acordo com sua composição bioquímica e estrutural
29 (Hancock, 1997; Gennaro et al., 2000; Vizioli et al., 2002;) em peptídeos catiônicos, aniônicos,
30 dipeptídeos aromáticos e peptídeos derivados de proteínas de ligação ao oxigênio (Vizioli et
31 al., 2002). Além dessa subdivisão, os AMPs podem ainda ser classificados quanto à sua origem
32 e à sua atividade biológica (Chung et al., 2017).

33 Algumas características são responsáveis por afetar a atividade e a especificidade dos
34 AMPs, como o seu tamanho, sua carga, sua conformação e estrutura, sua hidrofobicidade, sua

1 anfipaticidade e sua sequência de aminoácidos (Brogden, 2005) que, por sua vez, pode ser
2 designada a conter informações biológicas que podem ser incorporadas em sua estrutura por
3 meio de seus epítomos (Cui et al., 2014).

4 Acredita-se que alguns AMPs existam em conformações não-estruturadas antes que
5 interajam com as células-alvo e, ao fazer essa interação, elas adquirem tal conformação que seja
6 mais eficaz na erradicação do patógeno (Travkova et al., 2017). As conformações estruturais
7 adquiridas pelos AMPs após a ligação inicial à célula-alvo são três: cano-stave, modelo de poro
8 toroidal e modelo carpete (Figura 3) (Ciumac et al., 2019).



10 **Figura 3.** Esquemas dos modelos conformacionais adquiridos pelos AMPs quando em contato
11 com as células-alvo. Modelo de cano-stave (esquerda), modelo poro toroidal (centro) e modelo
12 de tapete (direita). Fonte: Pasupuleti et al., 2012.

13
14 Na conformação cano-stave, um número variável de peptídeos é arranjado de tal forma
15 que formem um poro semelhante a um barril, ou um canal (Pasupuleti et al., 2012). A superfície
16 hidrofóbica do peptídeo interage com as cadeias dos lipídeos de membrana, gerando um poro
17 aquoso consistindo de pelo menos quatro peptídeos (Ehrenstein and Lecar, 1977; Reddy et al.,
18 2004) e a morte celular ocorrerá a partir do extravasamento dos componentes intracelulares
19 (Pasupuleti et al., 2012).

1 No modelo de poro toroidal, os peptídeos acoplados à membrana começam a fazer com
2 que a camada lipídica realize uma curvatura positiva na membrana, resultando em uma abertura
3 chamada de poro toroidal (Epanand et al., 1999; Bocchini et al., 2009; Pasupuleti et al., 2012;
4 AlMatar et al., 2018).

5 No modelo carpete, os AMPs se ligam à superfície externa da membrana, cobrindo-a
6 quase em sua totalidade e, a partir de uma concentração crítica, os AMPs formam poros na
7 membrana, causando a formação de micelas com a posterior lise celular (Shai, 1999; Ciunac
8 et al., 2019).

9 Os dois maiores grupos conformacionais são os grupos da α -hélice, que se apresentam
10 em maior quantidade em anfíbios e insetos, e o do folha- β , que são mais ordenados em soluções
11 aquosas (Travkova et al., 2017). Por mais que apresentem variações quanto às suas estruturas,
12 os AMPs compartilham o fato de possuírem carga positiva, devido aos seus resíduos de
13 aminoácidos de arginina e lisina (De La Fuente-Núñez et al., 2017).

14 Quanto à sua afinidade à água, uma grande quantidade dos AMPs possui uma fração
15 hidrofóbica com a finalidade de formar a α -helix após a sua ligação com bactérias ou
16 membranas similares às bacterianas (Häffner et al., 2018). Embora a hidrofobicidade seja
17 necessária para a permeabilização pela membrana celular, acima do nível ótimo levará a uma
18 perda da atividade antimicrobiana e acarretará no aumento da toxicidade nas células do
19 hospedeiro, uma vez que com uma elevada hidrofobicidade, os AMPs passarão a se ligar e
20 romperão membranas celulares eucarióticas, além das procarióticas (Pasupuleti et al., 2012;
21 Dennison et al., 2005). Essa característica hidrofóbica se deve ao modo de ação desses
22 peptídeos (Häffner et al., 2018).

23 Por mais que os AMPs pertençam ao sistema imune inato, seu modo de ação é diferente
24 de outras moléculas e células, como citocinas e fagócitos (Pasupuleti et al., 2012). Sua carga
25 positiva e sua anfipaticidade explicam a sua alta afinidade por membranas, mais precisamente
26 as membranas carregadas negativamente das paredes celulares bacterianas (Koehbach et al.,
27 2019). Assim sendo, interações eletrostáticas devem estar envolvidas no mecanismo de
28 rompimento de membrana celular (Travkova et al., 2017), além de outros processos que
29 também podem estar envolvidos, como na inativação de ácidos nucleicos e de proteínas
30 citoplasmáticas (Brogden, 2005).

31 O colesterol, presente nas membranas celulares de mamíferos, é um componente que
32 dificulta e repele a ligação dos AMPs a essas células (Pasupuleti et al., 2012) uma vez que é
33 capaz de afetar a fluidez e o potencial dipolo dos fosfolipídeos de membrana, além de estabilizar

1 a bicamada lipídica. Assim, acaba por atrasar a ligação dos AMPs às membranas (Tytler et al.,
2 1995; Matsuzaki, 1999).

3 Quanto à sua atividade antibacteriana, os AMPs já apresentaram atividade sinérgica com
4 antibióticos, como vancomicina, penicilina, ampicilina, beta-lactâmicos, polimixina E,
5 daptomicina, linezolid, teicoplanina, ciprofloxacina e claritromicina (Zhou et al., 2013). Como
6 exemplo a atividade da lactoferrina quando administrada junto com a rifampicina e minociclina,
7 que apresentou um efeito anti-biofilme em *S. aureus* e *P. aeruginosa* em equipamentos
8 hospitalares (Yoshinari et al., 2010). O sinergismo entre compostos é de extrema importância,
9 uma vez que a concentração dos agentes antimicrobianos responsáveis por causa resistências é
10 reduzida, além de diminuir a citotoxicidade nas células do hospedeiro (AlMatar et al., 2018).

11 Além destes, estudos já foram realizados por nosso grupo, tendo como objetivos
12 verificar sinergismo da nisina com compostos fenólicos majoritários em óleos essenciais de
13 plantas (Alves et al., 2016) tais como o carvacrol, timol, eugenol, cinamaldeído, sobre linhagens
14 de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 em leite de
15 vaca, sendo que a nisina apresentou sinergismo com todos os compostos testados. Mais
16 recentemente, foi publicado estudo utilizando a proteômica como ferramenta de estudo para
17 esclarecer sinergismo entre nisina e oxacilina sobre cepa ATCC de MRSA (Alves et al., 2019),
18 tendo sido verificado que o perfil proteico da cepa de MRSA estudada foi amplamente afetado
19 quando foram comparados os ensaios controles com tratamentos, sendo estes, a nisina, a
20 oxacilina e combinação de nisina com oxacilina.

21 Bactérias presentes na epiderme humana como o *S. epidermidis* produzem AMPs
22 (PSM γ e PSM δ) que apresentam atividade bactericida contra bactérias patogênicas encontradas
23 na epiderme, como *S. aureus*, *Streptococcus* grupo A e *Escherichia coli*, mas não possuem
24 atividade contra *S. epidermidis* (Zhang et al., 2016).

25 Alguns AMPs foram capazes ainda de apresentar ação inibidora sobre *Mycobacterium*
26 *tuberculosis*, uma das micobactérias responsáveis por causar a tuberculose (AlMatar et al.,
27 2018). O atual tratamento dessa doença, assim como os programas de vacinação, tem falhado
28 ao erradicar a tuberculose do hospedeiro tanto na transmissão da bactéria como na obtenção da
29 doença (Tanland et al., 2018). O estudo de Sharma et al. (2001) mostrou que a defensina
30 humana Hnp-1 foi capaz de se ligar à membrana plasmática de *M. tuberculosis* e, como alvo
31 secundário, se ligou ao DNA bacteriano.

32 Os AMPs, por serem potentes ligantes de bactérias patogênicas, são estudados também
33 pela sua capacidade de reconhecer a presença de patógenos, em diferentes tipos de meios,
34 mesmo quando estão em concentrações baixas. Nesse fim, ainda possuem vantagens em serem

1 utilizados ao invés da utilização de anticorpos, pela maior resistência dos peptídeos no processo
2 (Pardoux et al., 2019).

3 4 **2.4.1 Bacteriocinas**

5 Pequenos AMPs, chamados de bacteriocinas, são produzidos e secretados por algumas
6 espécies bacterianas, com o objetivo de sobreviverem e competirem por nutrientes e habitat
7 com outros micro-organismos no meio em que estão inseridas (Gosh et al., 2019). Elas foram
8 identificadas inicialmente por Gratia (1925), como uma proteína antimicrobiana produzida por
9 *Escherichia coli*, com o nome de colicina (Balciunas et al., 2013).

10 As bacteriocinas são sintetizadas ribossomicamente (Hols et al., 2019) e possuem ação
11 contra bactérias patogênicas multirresistentes (Cotter et al., 2013) além de outros tipos de
12 bactérias. Os genes responsáveis por sua síntese estão geralmente arranjados em óperons,
13 localizados em cromossomos associados a transposons ou em plasmídios (Sidhu et al., 2017).
14 Recentemente, bacteriocinas contendo também atividade anti-parasitária foram relatadas, como
15 a AS-48, produzida por *Enterococcus* spp., que apresentou ação contra *Trypanosoma* spp. e
16 *Leishmania* spp. (Martín-Escolano et al., 2019).

17 São geralmente sintetizadas como pré-peptídeos inativos que possuem uma sequência
18 precursora N-terminal (Macwana & Muriana, 2012). Esses precursores são transportados para
19 a superfície celular durante a fase de crescimento exponencial e são enzimaticamente
20 convertidas em suas formas ativas (Balciunas et al., 2013). Como mecanismo de ação, além de
21 formarem poros na membrana bacteriana, inibe a síntese de peptidoglicanos ao se ligarem ao
22 lipídio II da membrana (Gosh et al., 2019).

23 Devido a algumas características, como função, sequência ou microrganismo produtor,
24 as bacteriocinas são classificadas em quatro classes (Cotter et al., 2013). A classe I das
25 bacteriocinas compreendem um grupo de pequenos peptídeos (< 5 Kda) que atuam ativamente
26 na membrana celular e são chamados de lantibióticos (Zou et al., 2018) e ainda podem ser
27 subdivididos em Ia e Ib (Ahmad et al., 2017), onde o Ia são bacteriocinas responsáveis por
28 formar poros na membrana do seu alvo, e o Ib inibem as enzimas catalíticas bacterianas (Ahmad
29 et al., 2017). A classe II é considerada de pequenos peptídeos (< 10 Kda), termoestáveis e
30 podem ser subdivididos em IIa, IIb e IIc (J. Zou et al., 2018). A classe III é representada por
31 bacteriocinas termolábeis e de elevado peso molecular (> 30 Kda), enquanto as de classe IV
32 são peptídeos grandes e complexos contendo carboidratos ou lipídios (Balciunas et al., 2013).

1 As bacteriocinas podem apresentar seletividade contra bactérias (Gosh et al., 2019),
2 como por exemplo a bacteriocina thuricin, que apresentou efeito contra *Clostridium difficile*
3 mas não causou danos às bactérias comensais do hospedeiro (Rea et al., 2011).

4 A nisina é uma bacteriocina da classe Ia, também denominada como um lantibiótico, e
5 é produzida por cepas de *Lactococcus lactis* e *Streptococcus uberis* (Zaschke-Kriesche et al.,
6 2019). Esse peptídeo contém uma ação de amplo espectro contra diversas bactérias Gram-
7 positivas, como *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus spp.*,
8 *Listeria spp.*, *Mycobacterium spp.* e contra bactérias esporuladas, possuindo ação em sua forma
9 vegetativa e no crescimento de seus esporos na fase germinativa, ao impedir o estabelecimento
10 de um potencial de membrana e do metabolismo oxidativo (Delves-Broughton et al., 1996;
11 McAuliffe et al., 2001; , Gut et al., 2008; Modugno et al., 2018). Quanto à sua estabilidade e
12 sua solubilidade, quanto menor o pH do meio, mais estável e mais solúvel a nisina se
13 apresentará. Em pHs elevados, a nisina começa a ser inativada, que pode ser consequência de
14 uma desnaturação, modificação química ou ambos.

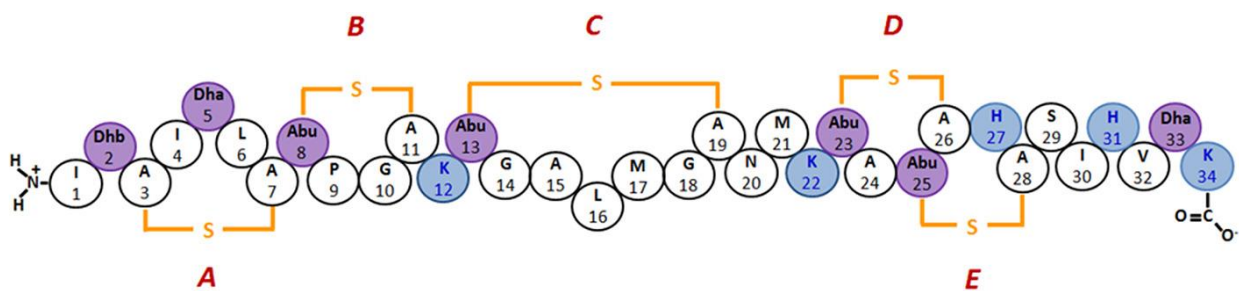
15 A nisina é um peptídeo considerado seguro para consumo (GRAS – *Generally*
16 *Recognized As Safe*), é aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) e tem sido utilizada
17 na preservação de alimentos há mais de 60 anos (Zaschke-Kriesche et al., 2019; Delves-
18 Broughton et al., 1996). Sua utilização em alimentos se dá desde no processamento de queijos,
19 produtos lácteos e enlatados (Galvez et al., 2007), e em alimentos com baixo pH, como saladas
20 e bebidas alcólicas (Delves-Broughton et al., 1996). Entretanto, quando aplicada em meios
21 com pH neutro a nisina apresenta certa instabilidade (Sidhu et al., 2017).

22 Uma aplicação na área de alimentos em que a nisina também está inserida é na sua
23 incorporação em embalagens com função antimicrobiana, visto que quando aplicado
24 diretamente no alimento, os peptídeos antimicrobianos podem perder sua atividade
25 antibacteriana, dependendo da matriz do alimento no qual foi inserido, pela sua interação com
26 proteínas, gorduras e sódio (Santos et al., 2018; Miltz et al., 2006).

27 Contra bactérias Gram-negativas, a nisina já foi reportada apresentando ruptura na
28 membrana externa bacteriana, entretanto, as bacteriocinas produzidas por Gram-positivas não
29 possuem ação bactericida contra Gram-negativas (Stevens et al., 1991; McAuliffe et al., 2001).

30 Os lantibióticos caracterizados até então possuem uma boa atividade contra bactérias
31 patogênicas e, por possuírem baixa toxicidade, são considerados uma classe com grande
32 potencial para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas no uso para humanos e em
33 tratamentos veterinários (Cotter, 2012; Knerr et al., 2012; Zaschke-Kriesche et al., 2019).

1 A nisina possui carga positiva e contém 34 aminoácidos, nos quais 13 são considerados
 2 não usuais devido a modificações pós-traducionais mediadas por enzimas (Hasper et al., 2004;
 3 P. D. Cotter et al., 2005), como a deidroalanina (Dha), o ácido deidroaminobutírico (Dhb) e o
 4 ácido 2-aminobutírico (Abu) (Morales et al., 2019). Como consequência, cinco anéis de
 5 lantionina são formados (anel A, Figura 4) e anéis de metil-lantionina (anéis B, C, D e E, Figura
 6 3), fornecendo à nisina uma estrutura única (Figura 4) (Hasper et al., 2004; Morales et al., 2019).
 7



8 **Figura 4.** Estrutura primária da nisina, onde os aminoácidos azuis são os positivamente
 9 carregados em pH neutro. Aminoácidos roxos são os modificados pós-traducionais, e os anéis
 10 estão nomeados de A à E (Morales et al., 2019).

11

12 O modo pelo qual a nisina é tão eficiente contra bactérias Gram-positivas é porque ela
 13 atua permeabilizando a membrana bacteriana ao interagir com o lipídio II (Breukink et al.,
 14 2003), molécula precursora de ligação ao bactoprenol (Morales et al., 2019), substância
 15 essencial à constituição da membrana plasmática bacteriana bem como para fornecer as
 16 unidades monoméricas do peptidoglicano da parede bacteriana (Scherer et al., 2013). O estudo
 17 de Breukink et al. (1999) mostrou que, ao aumentar a concentração de moléculas de lipídio II
 18 em modelos isolados de membranas, há um aumento também na sensibilidade da membrana à
 19 nisina. O efeito do lipídio II se mostrou específico para a nisina, sugerindo uma interação
 20 específica de alta-afinidade entre a bacteriocina e o lipídio II da membrana, resultando na
 21 formação de poros (Breukink et al., 1999; McAuliffe et al., 2001). No estudo de Wiedemann et
 22 al. (2001) foram identificados peptídeos mutantes da nisina, que se apresentaram incapazes de
 23 formar poros na membrana, mas ainda possuíam ação antimicrobiana ao bloquearem o lipídio
 24 II da sua incorporação em peptidoglicano.

25

Ao se ligar ao lipídio II, a nisina perturba a transglicosilação, levando assim à formação
 26 de poros na membrana que podem chegar a 2.5nm de diâmetro (Wiedemann et al., 2004), e
 27 consequentemente, inibe a biossíntese da parede celular bacteriana (Modugno et al., 2018) ao
 28 remover o lipídio II do ciclo de biossíntese (Scherer et al., 2013). O complexo nisina-lipídio II

1 tende a crescer em tamanho pelo recrutamento de centenas de moléculas de nisina e de lipídio
2 II, levando assim ao rápido dano à membrana bacteriana (Scherer et al., 2013; Scherer et al.,
3 2015). A formação de poros resulta no efluxo de componentes citoplasmáticos bacterianos,
4 como aminoácidos, potássio, fosfato inorgânico, glutamato e ATP, além de resultar no colapso
5 de íons essenciais à célula e na dissipação de componentes da força motriz do próton (PMF),
6 como a interferência no potencial transmembrana e no gradiente de pH, levando a interrupção
7 de todos os processos biossintéticos necessários para a sobrevivência (Bauer et al., 2005).

8 O estudo de Scherer et al. (2015) mostrou que o dano à membrana bacteriana e a sua
9 morte, ocorreram após uma certa quantidade de nisina ter se agregado à célula, atingindo um
10 certo tamanho, o que demonstrou a importância da agregação em larga-escala da nisina à
11 bactéria para ocorrer o mecanismo de morte celular.

12 13 **2.5 Nanotecnologia**

14 A nanotecnologia é uma ciência que possui como objetivo a manipulação de moléculas,
15 de uma escala nanométrica (1-100 nm), para a sua aplicação em sistemas maiores e mais
16 complexos (Adams et al., 2013). Essa ciência tem sido aplicada e estudada por diversos
17 pesquisadores nas diversas áreas, desde a sua aplicação na indústria agrícola e alimentícia na
18 incorporação de embalagens até a sua utilização em diversos ramos da medicina, como no
19 tratamento de câncer, em neurocirurgias complexas, na realização de exames de ressonância
20 magnética, em tratamentos odontológicos, entre outros (Leite et al., 2018; Viswanathan et al.,
21 2019; Leso et al., 2019).

22 Quando se trata da área microbiológica, a nanotecnologia possui diversas aplicações
23 como a síntese de nanoemulsões, nanopartículas, nanoesferas, nanocápsulas e nanolipossomos,
24 que servirão como carreadores do composto ativo antibacteriano de interesse, aumentando sua
25 biodisponibilidade, eficiência e estabilidade no meio inserido (Dávila-Rodríguez et al., 2019).

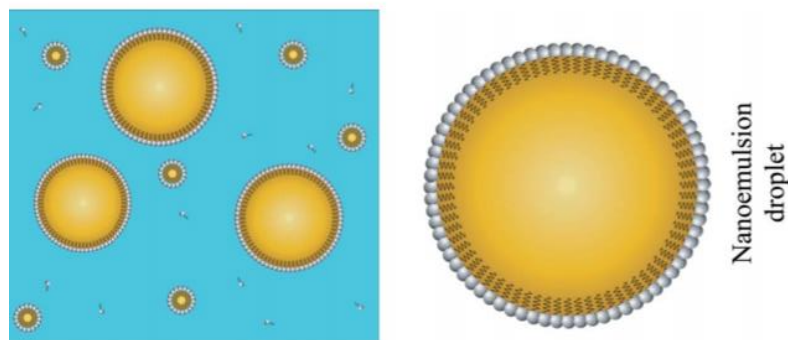
26 27 **2.5.1 Nanoemulsões**

28 Por definição, nanoemulsões são soluções de dois líquidos imiscíveis, podendo ser óleo
29 em água (O/A) ou água em óleo (A/O), que são estabilizados entre si por meio da adição de
30 emulsificantes, que reduzem a tensão interfacial entre os dois líquidos, devido à sua absorção
31 na interface óleo-água (Riquelme et al., 2019). Assim, há a formação de uma emulsão mais
32 estável, e irá demorar mais para ocorrer uma separação de fases entre os dois líquidos (Lin et
33 al., 2008).

1 Entretanto, alguns fenômenos de instabilidade podem ser observados nas nanoemulsões
2 desde o início de seu preparo. De acordo com o volume de emulsificantes utilizados, a
3 nanoemulsão possuirá um valor de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL), que irá representar a
4 afinidade do emulsificante com a água ou com o óleo, em casos de emulsificantes hidrofílicos
5 e lipofílicos, respectivamente. Quanto maior o valor de EHL, maior será a afinidade da fase
6 oleosa com a aquosa, em casos de nanoemulsões O/A (Lian et al., 2019). O sistema numérico
7 de EHL foi estabelecido pelo pesquisador e químico William Griffin, sendo apresentado pela
8 primeira vez no ano de 1949. Segundo Griffin, o método EHL seria usado com base de que
9 todos os surfactantes (ao combinarem grupos lipofílicos e hidrofílicos em uma só molécula) e
10 que a diferente proporção de porcentagem entre ambos os grupos, fosse um indicativo do
11 comportamento esperado de uma emulsão (Pasquali et al., 2008). Griffin ainda atribuiu um
12 intervalo de valores de EHL de aproximadamente 1, até 18, sendo o menor valor atribuído como
13 padrão o ácido oleico puro e para o maior, o oleato de sódio (Pasquali et al., 2008).

14 A estrutura das partículas de nanoemulsões O/A está representada na Figura 5, onde as
15 caudas não-polares dos surfactantes estão inseridas na molécula de óleo, que apresenta caráter
16 hidrofóbico. Enquanto isso, as cabeças polares dos surfactantes estarão expostas para o meio
17 aquoso (McClements, 2012).

18
19
20
21
22
23
24
25
26



27 **Figura 5.** Representação da estrutura das gotículas de nanoemulsão O/A, composto pelos dois
28 líquidos imiscíveis e surfactantes. Fonte: McClements, 2012.

29
30
31
32
33
34

O tamanho das gotículas formadas das nanoemulsões são geralmente menores que 500 nm e, por esse motivo, podem ser confundidas com as microemulsões. Entretanto, as nanoemulsões diferem das microemulsões em diversos aspectos, podendo destacar a questão termodinâmica, onde as nanoemulsões apresentam instabilidade e as microemulsões, estabilidade. Além disso, as nanoemulsões apresentam algumas características particulares

1 como a sua turbidez, taxa reduzida de separação gravitacional, formação de floculação (Donsì
2 et al., 2016), estrutura das partículas e a sua forma de preparo (McClements et al., 2012).

3 Há diversos métodos para a síntese das nanoemulsões e a maioria delas consiste em uma
4 potente agitação mecânica, como emulsificação espontânea, inversão de fases e de emulsões,
5 homogeneização de alta pressão, alta velocidade e ultrassonicação (Dávila-Rodríguez et al.,
6 2019). A sonicação é um método de alta energia para a formação de nanoemulsões. Por essa
7 técnica, o aparelho sonicador aplica ondas de alta frequência no recipiente contendo a solução
8 para causar vibrações mecânicas, seguidas pela formação de cavitações acústicas, que ao se
9 romperem, são geradas ondas de choque capazes de irrompendo as gotículas maiores em
10 tamanhos menores, formando as nanoemulsões (Ghosh et al., 2013). Entretanto,
11 independentemente do método utilizado, os agentes emulsificantes é que terão a maior
12 influência na estabilidade da nanoemulsão formada. Os tensoativos possuem a capacidade de
13 modificar as gotículas de óleo da amostra devido a alterações na tensão interfacial das
14 moléculas ou até mesmo de estabilizar a interface por prevenir a instabilidade das emulsões
15 (Villalobos-Castillejos et al., 2018; Páez-Hernández et al., 2019).

16 As nanoemulsões vêm sendo empregadas em diversas áreas, como na indústria
17 alimentícia, agrícola e farmacêutica, com o objetivo de realizar a entrega do composto lipofílico
18 (McClements, 2012). Algumas substâncias encapsuladas em nanoemulsões estão sendo
19 testadas em ensaios clínicos, como derivados de testosterona, propofol, ciclosporina, entre
20 outros (Singh et al., 2017). Uma vez a droga encapsulada, o composto precisará se fragmentar
21 para ser transferido da fase oleosa para a camada onde estará o surfactante e desta, para a fase
22 aquosa. Com isso, a droga sofrerá nanoprecipitação, o que levará a um aumento importante da
23 sua área de superfície, acelerando sua dissolução no meio (Singh et al., 2017).

24 Quando se trata da sua aplicação na área microbiológica, as nanoemulsões são
25 sintetizadas para encapsular diversos compostos, dentre eles os óleos essenciais de extratos de
26 plantas, que possuem propriedades importantes e um amplo espectro de ação contra bactérias
27 patogênicas (Qiu et al., 2012), como no estudo de Prakash (2019), onde nanoemulsões do óleo
28 essencial linalol apresentaram melhor atividade contra *Salmonella Typhimurium* do que o
29 linalol em sua forma não encapsulada.

30 Em estudo realizado também por nossa equipe, foi possível verificar o uso potencial de
31 nanoemulsões contendo óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e de seu composto
32 majoritário geraniol sobre linhagens de *Cutibacterium acnes* (antigo *Propionibacterium acnes*)
33 (Lyra, 2019). Segundo os resultados, a eficácia da nanoemulsão contendo estes antibacterianos

1 foi potencializada quando associada a nanopartícula contendo prata, bem como não apresentou
2 citotoxicidade sobre queratinócitos.

3 4 **2.5.2 Nanopartículas de ouro (AuNPs)**

5 O ouro foi introduzido na medicina em 1890 pelo bacteriologista Robert Koch que
6 observou baixas concentrações do composto cianeto de potássio e ouro foram capazes de
7 apresentar atividade antibacteriana contra bacilos causadores de tuberculose. Assim, no ano de
8 1920, terapias contra tuberculose que envolviam a aplicação de ouro foram introduzidas, bem
9 como no tratamento de artrite reumatoide, em 1935 (Arvizo et al., 2011).

10 Recentemente, os nanomateriais metálicos vêm chamando a atenção de muitos
11 pesquisadores por apresentarem características bastante interessantes quando se trata de
12 aplicações na área médica. Algumas de suas propriedades chamam a atenção como seu tamanho
13 (podem variar de 2 a 500 nm), seu formato, sua elevada relação superfície para volume, sua
14 biocompatibilidade, sua baixa taxa de toxicidade, suas propriedades ópticas colorimétricas e
15 seu núcleo, que se tornam interessantes devido a suas propriedades físicas (Arvizo et al., 2011;
16 Elahi et al., 2018). Com tantas propriedades inerentes a esses nanomateriais, é possível
17 manipulá-los de forma a obter estes materiais com as características desejadas, para a sua
18 aplicação em diferentes áreas (Sidhu et al., 2017). Para otimizar sua função como carreador de
19 drogas e suas aplicações multifuncionais, as AuNPs podem ainda ser revestidas com polímeros
20 ou proteínas (Ramalingam, 2019).

21 As nanopartículas de ouro (AuNPs) vêm sendo aplicadas em diversos ramos da
22 medicina moderna, como na composição de lentes de contato (Kharaghani et al., 2019), em
23 terapias fotodinâmicas, terapias fototermiais, em contrastes de exames de imagem, em
24 atividades antioxidantes, anticâncer, antifúngicas, antibacterianas, em detectores de diversas
25 moléculas e em carreadores, sendo capazes de carrear diversos compostos como antibióticos,
26 peptídeos, proteínas e plasmídios (Elahi et al., 2018).

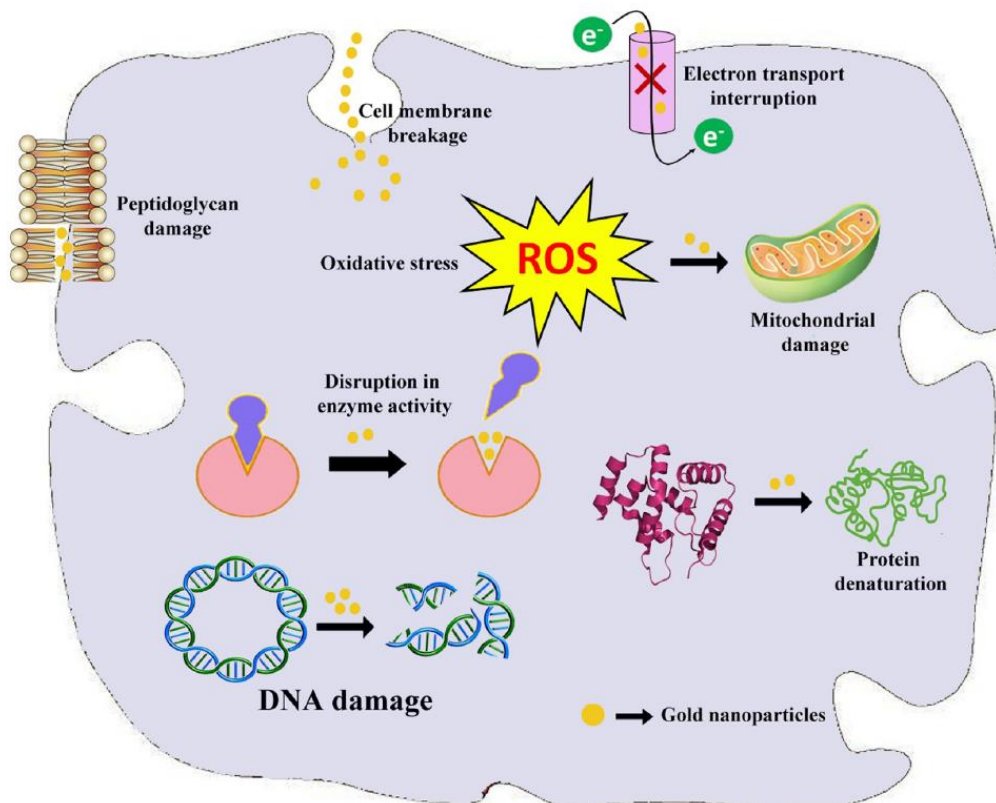
27 Quanto à sua aplicação como carreadores de drogas, as AuNPs, além de possuírem todas
28 as vantagens em relação às suas propriedades físicas e químicas e por terem seu núcleo
29 considerado não tóxico, se apresentam ainda como uma solução quanto ao problema da
30 resistência bacteriana aos antibióticos, à toxicidade de algumas dessas drogas e da sua
31 biodisponibilidade no organismo (Pradeepa et al., 2017).

32 Sua ação contra bactérias patogênicas se dá pela sua grande área de superfície de contato
33 com os micro-organismos e também pela presença de cadeias de aquil, onde possuem um
34 fragmento hidrofóbico que irá interagir com a bicamada lipídica da membrana citoplasmática

1 bacteriana, causando a sua ruptura e o extravasamento citoplasmático. Como representado na
2 Figura 6, além do rompimento da membrana, as AuNPs também causam estresse oxidativo na
3 bactéria ao estimular a produção de ROS pelas mitocôndrias, interrompendo a atividade
4 enzimática, desnaturando o material genético e interrompendo o seu crescimento e acarretando
5 na morte celular (Ramalingam, 2019). As AuNPs possuem ainda a vantagem de serem seletivas
6 para esses micro-organismos, sem causar a ruptura das células eucarióticas do hospedeiro (Mei
7 et al., 2014) devido a maior presença de carga negativa nas membranas bacterianas do que nas
8 células de mamíferos (Pradeepa et al., 2017).

9 As nanopartículas de ouro, dentre outras nanopartículas, são consideradas as mais
10 seguras contra as células de mamíferos devido a mecanismos independentes de ROS. Além
11 disso, as AuNPs conseguem ser funcionalizadas facilmente com drogas antimicrobianas
12 (Khezerlou et al., 2018).

13



14

15 **Figura 6.** Representação das ações antibacterianas intracelulares das AuNPs.

16 Fonte: Ramalingam, 2019.

17

18

19

1 **3 Objetivo**

2 **3.1 Objetivo geral**

3 O objetivo do estudo foi sintetizar e caracterizar formulações de nanoemulsões e
4 nanopartícula de ouro (AuNPs) conjugadas à nisina visando potencializar a atividade inibidora
5 deste polipeptídeo antimicrobiano para linhagens padrões ATCC de *Staphylococcus aureus* e
6 sobre seus fatores de virulência

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

4 Material e Métodos

4.1 Linhagens bacterianas e antimicrobianos

Foram utilizadas cinco cepas padrão American Type Culture Collection (ATCC) de *Staphylococcus aureus*, sendo *S. aureus* ATCC 13565 (produtora de enterotoxina A), ATCC 14558 (produtora de enterotoxina B), ATCC 19095 (produtora de enterotoxina C), ATCC 23235 (produtora de enterotoxina D) e MRSA ATCC 33591 (produtora de biofilme). Segundo informações do distribuidor da nisina (Nisin from Sigma Aldrich® do Brasil, produto código N5764-5G) esta tem peso molecular de 3.354,07 g/mol, sendo a potência do produto correspondente a 1.000,000 UI (Unidades Internacionais)/grama. Considerando a grau de pureza de 2,5%, calculou-se em 40 UI/μg de nisina pura contida no produto adquirido. A oxacilina foi obtida em forma de sais da empresa farmacêutica Teuto/Pfizer.

4.2 Preparo das nanoemulsões

O preparo de uma nanoemulsão pode ser realizado utilizando métodos de baixa energia, como difusão de solventes, emulsificações espontâneas ou por temperaturas de fase invertida, ou a partir de métodos de alta energia, que incluem equipamentos mecânicos mais complexos, como homogeneizadores de alta pressão, microfluidificadores e equipamentos ultrassônicos, sendo este último utilizado no preparo das nanoemulsões neste estudo.

4.2.1 Tensoativos utilizados

Os preparos das formulações de nanoemulsões foram realizados pela cavitação ultrassônica de emulsão óleo em água O/A. A fase oleosa, contendo o tensoativo lipofílico Span 80 e um óleo inerte de girassol da Empresa WNF Óleos Essenciais, foi adicionada lentamente à fase aquosa contendo água ultrapura Milli-Q® e o tensoativo hidrofílico Tween 20, sob agitação contínua ultrassônica (potência 900 W) por aproximadamente 1 hora em equipamento de homogeneização de alta energia (sonicador ultrassônico/desruptor de célula ultrassônico, Modelo DES500, Marca Unique) à 25 °C. As características e a estrutura química de ambos os tensoativos estão representados na Figura 7.

Cinco nanoemulsões com diferentes proporções dos tensoativos foram obtidas em duplicata com a concentração de óleo fixa em 1,5% m/m. A quantidade de tensoativos será mantida constante a 5,0%, o que influencia para a baixa toxicidade das amostras (Goyal et al., 2017). A avaliação da estabilidade física e propriedades físico-química dependerá da variação da composição das nanoemulsões em termos dos valores do equilíbrio hidrofílico-lipofílico

(EHL), de 6,78 até 11,74, conforme a Tabela 1. O valor de EHL para os tensoativos utilizados são conhecidos, conforme mostra a Tabela 2. Para o cálculo das quantidades de tensoativo hidrofílico (Tween 20) e do tensoativo lipofílico (Span 80) em função dos valores de EHL, foi utilizada a equação:

$$A + B = 100 \quad (1)$$

$$EHL_{\text{Resultante}} = EHL_A \times 0,01A + EHL_B \times 0,01B \quad (2)$$

A = porcentagem do tensoativo hidrofílico; B= porcentagem do tensoativo lipofílico;

EHL_A = Equilíbrio Lipofílico de A;

EHL_B = Equilíbrio Hidrofílico de B;

$EHL_{\text{Resultante}}$ = Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico resultante.

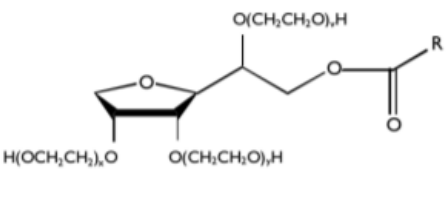
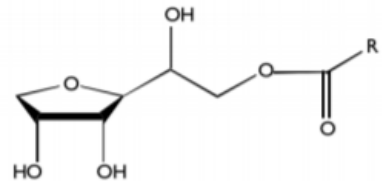
	
<p>Monolaurato de sorbitano etoxilado 20 OE INCI: <i>polysorbate 20</i> Nome comercial: Tween® 20 Valor de EHL = 16,7 Fornecedor: Inlab Confiança</p>	<p>Monooleato de sorbitano INCI: <i>sorbitan monooleate</i> Nome comercial: Span® 80 Valor de EHL: 4,3 Fornecedor: Inlab Confiança</p>

Figura 7. Especificações dos tensoativos Tween 20 e Span 80.

Tabela 1. Cinco formulações das nanoemulsões com seus respectivos valores de EHL.

Nanoemulsões AMOSTRAS	óleo % m/m	Tween 20 % m/m	Span80 % m/m	EHL	água % m/m
1	1,5	1,0	4,0	6,78	93,5
2	1,5	1,5	3,5	8,02	93,5
3	1,5	2,0	3,0	9,26	93,5
4	1,5	2,5	2,5	10,5	93,5
5	1,5	3,0	2,0	11,74	93,5

1 **Tabela 2.** Valores de EHL dos tensoativos Tween 20 e Span 80

Tween 20	Span 80
16,7	4,3

2
3 Visto que o Tween 20 apresenta um caráter mais hidrofílico do que lipofílico visto que
4 o seu valor de EHL previamente conhecido é alto (EHL = 16,7), próximo ao limite estabelecido
5 por Griffin, as nanoemulsões que possuem uma maior porcentagem deste surfactante,
6 apresentarão também um maior valor de EHL e conseqüentemente uma maior afinidade à fase
7 aquosa. Conforme observado na Tabela 1, na nanoemulsão de formulação 5, as gotículas da
8 fase oleosa apresentaram maior afinidade à fase aquosa do que as demais. O Span 80 apresenta
9 um caráter mais lipofílico do que hidrofílico, com o seu valor de EHL em 4,3. Assim, as
10 nanoemulsões que possuem uma maior porcentagem deste surfactante, apresentarão um
11 menor valor de EHL, e conseqüentemente não terão uma grande afinidade com a fase aquosa.
12 Considerado esse fator, podemos concluir que a nanoemulsão de formulação 1 será a amostra
13 que suas gotículas da fase oleosa apresentarão menor afinidade à fase aquosa.

14 Como ambos os valores de EHL dos tensoativos possuem valores extremos, há a
15 importância e a necessidade de formular diferentes amostras de nanoemulsões com diferentes
16 porcentagens de ambos, para apresentarem estabilidade entre as fases e para serem estudados
17 quanto às suas propriedades físico-químicas e serem estipulados como mais ou menos
18 adequados para a sua utilização como antimicrobiano.

20 **4.2. 2. Incorporação da nisina às nanoemulsões**

21 A nisina foi incorporada às cinco diferentes formulações de nanoemulsões estabilizadas,
22 de forma que fosse obtida uma solução com concentração de 100 µg/ml de nisina. A
23 incorporação foi realizada por meio de agitação magnética, por aproximadamente 1 hora, em
24 Agitador-Aquecedor Modelo 258 da marca FANEM. A nisina foi previamente pesada em
25 balança analítica para laboratório em um recipiente béquer, e o volume adequado de
26 nanoemulsão foi delicadamente despejado em cima da amostra de nisina. Protegida da luz, o
27 béquer permaneceu sob agitação.

29 **4.3 Caracterizações das nanoemulsões**

30 A caracterização das nanoemulsões foi realizada a partir do tamanho das gotículas, índice
31 de polidispersividade, potencial zeta, valor do pH, densidade, cor, centrifugação, estabilidade

1 em diferentes temperaturas de armazenamento (4°C, 25°C e 37°C) e estresse térmico (40 a
2 80°C).

3 4 **4.3.1 Avaliação macroscópica**

5 Esta avaliação teve como objetivo buscar sinais de instabilidade após 24 horas de
6 realização do preparo das formulações. Foram analisados sinais de cremeação ou de separação
7 de fases, além do aspecto de turbidez.

8 9 **4.3.2 Cor**

10 Observação da variação de cores entre as formulações quanto a serem opacas ou
11 translúcidas.

12 13 **4.3.3 Estresse térmico**

14 Foram colocadas em diferentes frascos, 10 ml de cada amostra, em triplicata. Os frascos
15 foram então submetidos a aquecimento na faixa de 40°C a 80°C, aumentando a temperatura de
16 5 em 5 °C até atingir a temperatura final de 80°C em equipamento de banho-maria. As amostras
17 foram analisadas quanto a ocorrência ou não de separação de fases ou modificações. Para
18 aquecimento foi utilizado aparelho ultratermostático (QUIMIS Modelo Q215m2). A
19 observação das alterações resultantes foi classificada em SA (sem alteração aparente), LM
20 (levemente modificado, mas sem separação de fases) e SF (separação de fases).

21 22 **4.3.4 Estabilidade em temperaturas de armazenamento**

23 Amostras das cinco nanoemulsões foram divididas em tubos de ensaio, em duplicata, e
24 submetidas a diferentes condições de temperatura, permanecendo desde o tempo de 0h
25 (momento do preparo) até depois de 3 meses. As amostras ficaram em condições de temperatura
26 de geladeira (4-8 °C), temperatura ambiente (25 °C) e temperatura de estufa (37 °C).

27 28 **4.3.5 Tamanho médio das partículas (DLS)/Potencial Zeta**

29 Foram empregados testes para identificar o diâmetro das partículas (técnica de
30 Espalhamento Dinâmico da Luz - DLS, *Dynamic Light Scattering*), índice de polidispersividade
31 (IPD) e potencial zeta. Os experimentos foram realizados utilizando o analisador de tamanho
32 de partículas modelo 90 Plus da marca Brookhaven, na Universidade Anhanguera, câmpus
33 Pirituba, São Paulo.

1 As amostras foram previamente diluídas em solução de 1mM de NaCl antes de serem
2 aplicadas no aparelho. A diluição dos compostos em NaCl 1mM foi de 1:100.

3 4 **4.3.6 Determinação do valor do pH**

5 Os valores de pH foram aferidos em triplicata, após diluição das amostras na proporção de
6 1:10, utilizando um medidor de pH de bancada GEHAKA, modelo PG 2000. A avaliação foi
7 feita antes e depois das formulações serem submetidas ao estresse térmico.

8 9 **4.4 Preparo das Nanopartículas de Ouro (AuNPs)**

10 As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram sintetizadas pelo método de redução de ouro
11 por citrato e a interação da nisina com as AuNPs (AuNPs-Nis) foi realizada posteriormente, ao
12 incorporar certa quantidade de nisina de forma que a solução resultante possuísse uma
13 concentração do peptídeo de 100 µg/mL, por meio de agitação magnética em Agitador-
14 Aquecedor Modelo 258 da marca FANEM pelo período de 2 horas.

15 16 **4.4.1 Síntese das Nanopartículas de Ouro (AuNPs) estabilizadas por citrato**

17 As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram sintetizadas pelo método de redução de ouro
18 por citrato. O cloreto de ouro (III) e o citrato de sódio foram obtidos da Empresa Sigma
19 Aldrich® do Brasil. Uma solução de ácido tetracloroáurico triidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol}$
20 L^{-1} ; $V_f = 95 \text{ mL}$) foi mantida sob condição de controle de temperatura de 80 °C.
21 Sequencialmente, uma solução de citrato de sódio (1,0 % m/v; $V_f = 5,0 \text{ mL}$) foi adicionada e a
22 mistura reacional permaneceu entre 95 - 100°C por 45 minutos. A mudança de coloração de
23 incolor para vermelho foi um indicativo macroscópico da formação de nanopartículas esféricas
24 de ouro. A solução de AuNPs foi armazenada em temperatura de geladeira (4-8°C) e protegida
25 da luz, em frasco âmbar e envolta por papel alumínio.

26 Neste método, o ouro proveniente do agente precursor, cloreto de ouro (III), é reduzido
27 a ouro metálico por ação do citrato de sódio à temperatura constante a 95 °C. O citrato de sódio
28 é um agente redutor fraco que funciona simultaneamente como agente de recobrimento das
29 AuNPs. Os íons citrato devem estar em excesso no meio reacional, assim à medida que ocorre
30 a redução do ouro, íons citratos excedentes são adsorvidos à superfície das AuNPs, que se torna
31 carregada negativamente. Esse mecanismo estabiliza as nanopartículas formadas por repulsão
32 eletrostática, prevenindo o fenômeno de agregação e um crescimento descontrolado das AuNPs.

1 **4.4.2 Incorporação da nisina às Nanopartículas de Ouro (AuNPs)**

2 Para incorporar a nisina às AuNPs, foi preparada previamente uma solução de nisina a
3 200 µg/mL em água ultrapura Milli-Q® e posteriormente a solução foi filtrada em filtro de 0,2
4 µm. A solução foi adicionada à solução de AuNPs preparada anteriormente, e mantida em
5 agitação magnética por duas horas em temperatura ambiente (25°C) e protegida da luz por meio
6 de papel alumínio, por ser uma solução fotossensível. A solução de nisina acoplada às AuNPs
7 (AuNPs-Nis) foi armazenada posteriormente em temperatura de geladeira (4°C) e protegida da
8 luz, em frasco âmbar e envolta por papel alumínio.

10 **4.4.3 Incorporação da AuNPs-Nis à Nanoemulsão**

11 Além das formulações de AuNPs-Nis e das Nanoemulsões com nisina, foi incorporado
12 também a AuNPs-Nis na formulação de nanoemulsão que apresentou o menor valor de
13 Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente à cepa de MRSA ATCC 33591, com o objetivo
14 de verificar a ação antimicrobiana dessa solução. A incorporação foi realizada por meio da
15 agitação magnética, por um período de 2 horas em temperatura ambiente (25°C). A solução
16 resultante (AuNPs-Nis + Nanoemulsão) foi armazenada em temperatura de geladeira (4-8°C) e
17 protegida da luz, em frasco âmbar e envolta por papel alumínio. A concentração final de nisina
18 na solução foi de 50 µg/ml.

20 **4.4.4 Incorporação da Nanoemulsão com Nisina à AuNPs**

21 Com o mesmo objetivo do preparo da solução de AuNPs-Nis + Nanoemulsão, foi
22 incorporada também à formulação de nanoemulsão que mostrou o menor valor de Concentração
23 Inibitória Mínima (CIM) frente à cepa de MRSA ATCC 33591, a solução de AuNPs pelo
24 mesmo método da agitação magnética por um período de 2 horas em temperatura ambiente
25 (25°C). Uma solução de Nanoemulsão-Nisina foi previamente preparada, com uma
26 concentração de Nisina de 200 µg/ml. A solução resultante (Nanoemulsão-Nisina + AuNPs) foi
27 armazenada em temperatura de geladeira (4°C) e protegida da luz, em frasco âmbar e envolta
28 por papel alumínio. A concentração final de nisina na solução foi de 100 µg/ml.

30 **4.5 Caracterização das Nanopartículas de Ouro (AuNPs)**

31 **4.5.1 Cor**

32 A mudança da coloração da solução foi observada, desde o primeiro momento da adição
33 da solução de citrato à solução de H₂AuCl₄, até o tempo final de 2 horas. A coloração foi

1 registrada de 30 em 30 minutos, sob agitação magnética. A mudança de coloração da solução
2 de AuNPs ao adicionar o peptídeo nisina também foi registrado.

3 4 **4.5.2 Espectrofotometria na região de UV-visível**

5 Para obter o comprimento de onda das AuNPs, as amostras finais foram lidas em um
6 equipamento UV-M51 da BEL Engineering, junto com uma amostra branca, composta por água
7 destilada. A leitura no espectrofotômetro é importante para obtermos uma ideia da superfície e
8 morfologia das nanopartículas, que irão controlar as propriedades ópticas e eletrônicas das
9 AuNPs (Ramalingam, 2019). A leitura foi obtida em um intervalo de comprimento de onda de
10 300 nm até 1000 nm, em temperatura ambiente (25 °C).

11 12 **4.6 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

13 Os ensaios de sensibilidade foram realizados de acordo com a metodologia Resazurin
14 Microtiter Assay (REMA) adaptada de Martin et al. (2003) em microplacas de Elisa de 96 poços
15 com as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 (produtora de enterotoxina A - SEA),
16 ATCC 14558 (produtora de enterotoxina B - SEB), ATCC 19095 (produtora de enterotoxina C
17 - SEC), ATCC 23235 (produtora de enterotoxina D - SED) e ATCC 33591 (MRSA produtora
18 de biofilme), sendo as concentrações dos tratamentos obtidas em meio Mueller Hinton Caldo
19 (MHC) em um volume final de 200 µL e variando de 0,1 a 50 µg/ml. Todos os tratamentos com
20 as respectivas linhagens testadas estão indicados na Tabela 3. Foram preparadas suspensões
21 bacterianas de acordo com a escala 0,5 de McFarland que corresponde a $1,5 \times 10^8$ unidades
22 formadoras de colônias por mL (UFC/mL), seguido de inoculação das bactérias nos respectivos
23 poços das microplacas com uma concentração bacteriana corrigida para o equivalente a 10^5
24 UFC/mL. As placas foram incubadas à 37 °C por 24 horas. Foram utilizados controles negativos
25 em todos os ensaios (MHC sem bactérias), controles positivos (MHC com bactérias) e os
26 controles de esterilidade da nisina (MHC com nisina).

27 Foram realizadas leituras dos respectivos valores de CIM, definida como a menor
28 concentração de cada tratamento capaz de inibir o crescimento bacteriano utilizando-se leitor
29 de microplacas (Epoch 2 – BioTek) e também pela observação visual com a adição do composto
30 revelador de oxirredução resazurina (0,05%). Esses ensaios foram realizados em triplicatas.

31 Para a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram preparadas subculturas a partir das
32 concentrações testadas nos ensaios de microdiluição utilizando placas de ágar infusão de
33 cérebro e coração (BHI). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24

1 horas, sendo a CBM a menor concentração em que não foi visualizada a formação de colônias
2 (NCCLS, 1999). Esse ensaio também foi realizado em triplicata.

3
4 **Tabela 3.** Representados com asterisco (*) os diferentes tratamentos utilizando-se nisina,
5 adicionada de nanoemulsões e/ou nanopartículas de ouro (AuNPs), realizadas sobre as
6 diferentes cepas ATCC de *S. aureus* (MRSA e enterotoxigênicas A-D).

	MRSA			13565	14558	19095	23235
	B	P	H				
Nisina	*	*	*	*	*	*	*
Nanoemulsões	NR	NR	*	*	*	*	*
Nanoemulsões + Nis.	*	*	*	*	*	*	*
AuNPs	NR	NR	*	*	*	*	*
AuNPs + Nis.	*	*	*	*	*	*	*
(AuNPs + Nis.) + Nano	*	*	*	NR	NR	NR	NR
(Nano + Nis.) + AuNPs	*	*	*	NR	NR	NR	NR

7 B = ensaio de produção de biofilme; P = ensaio de extravasamento proteico; H = ensaio de
8 atividade hemolítica; NR = não realizado.

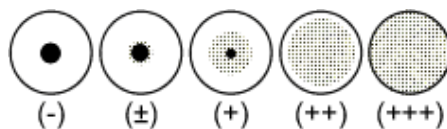
10 4.7 Inibição da produção de enterotoxinas

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

18 Após incubação (37 °C por 24 horas), cada tratamento foi centrifugado a 9000 g, 4°C por
19 30 minutos e o procedimento foi realizado utilizando o kit SET-RPLA de acordo com as
20 instruções do fabricante (Oxoid). Esse experimento foi realizado em triplicata.

21 O kit SET-RPLA baseia-se na ligação entre anticorpos específicos e antígeno
22 (enterotoxina). Os anticorpos vêm ligados a partículas de látex, que na presença de antígeno se
23 aglutinam e quando não há antígenos presentes ocorre uma precipitação dessas partículas no
24 fundo do poço da placa (microtitulação com fundo em “V”), podendo ser observada como um

1 ponto rosa. Assim, a produção de enterotoxina foi quantificada visualmente e caracterizada
2 pelos símbolos de + ou -, ou seja, se a produção de enterotoxina é considerada forte a
3 aglutinação é caracterizada como (+++), uma produção moderada é caracterizada como (++)
4 uma produção fraca (+) e ausência de produção quando não há aglutinação visível (-), como
5 representado na Figura 8.



6
7 **Figura 8.** Interpretação dos resultados do teste da produção de enterotoxinas. Fonte: THERMO
8 SCIENTIFIC

9
10 Os tratamentos utilizados para esse teste foram a nisina, nanopartículas de ouro acopladas
11 à nisina (AuNPs-Nis) e a nanoemulsão de formulação número 5 com e sem a nisina, que se
12 apresentou como a nanoemulsão com melhor atividade quanto aos valores de CIM contra as
13 cepas ATCC enterotoxigênicas.

14 **4.8 Efeito dos tratamentos de nisina na formação de biofilme**

15 O efeito de diferentes concentrações subinibitórias da nisina e de seus tratamentos (Tabela
16 3) foram testados na formação de biofilme em MRSA ATCC 33591 de acordo com a
17 metodologia adaptada de Stepanovic´ et al. (2000). As cepas foram cultivadas overnight em 4
18 mL de TSB contendo 1% de glicose, padronizadas pela escala 0,5 de McFarland e diluídas em
19 TSB até 10^6 UFC/mL. 100 μ L foram dispensados em cada poço de uma placa de 96 poços de
20 fundo chato contendo 100 μ L de diferentes concentrações subinibitórias de nisina e seus
21 tratamentos (25%, 50%, 60%, 70%, 80% e 90% da CIM) ou 100 μ L de TSB (para controle).
22 Após incubação estática (37°C/48h), cada poço foi lavado três vezes com tampão PBS estéril
23 (pH 7,4) e a placa permaneceu secando à temperatura ambiente por 4h. O biofilme formado no
24 fundo do poço foi fixado com 150 μ L de metanol por 15 min, corado com 150 μ L de cristal
25 violeta 1% por 15 min e as placas foram lavadas em água corrente para retirada do excesso de
26 corante. Após secagem a 25°C, os biofilmes corados foram ressuspensos em 150 μ L de ácido
27 acético 33% e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 570 nm. A formação de biofilme
28 foi determinada através da fórmula: (média do valor do tratamento/média do valor do controle)
29 x 100 (Nostro et al., 2007). Cada ensaio foi realizado em triplicata.
30

1 Para a realização deste experimento foi utilizada apenas a nanoemulsão de formulação
2 número 1, que se apresentou como a nanoemulsão com melhor atividade quanto aos valores de
3 CIM contra a cepa de MRSA ATCC 33591.

4.9 Atividade hemolítica

6 O protocolo para realizar os testes de atividade hemolítica foi de acordo com o realizado
7 por Zarrinnahad et al. (2018). Uma alíquota de 10 ml de sangue humano recém coletado foi
8 heparinizada e centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos e, posteriormente, o sobrenadante foi
9 descartado e a amostra lavada com PBS (Phosphate buffer saline). Tal procedimento foi
10 realizado três vezes. A seguir, o sobrenadante foi descartado e uma alíquota de 2% da suspensão
11 de hemácias foi preparado com PBS. Os tratamentos utilizados (Tabela 3) foram testados em 5
12 concentrações diferentes, variando desde ¼ do valor do CIM para MRSA ATCC 33591, até 4
13 vezes o valor do CIM. Foi utilizado o PBS como controle negativo, e o Triton X-100 a 1%
14 como controle positivo. O experimento foi realizado em microplacas de poliestireno de 96
15 poços, sendo 100 µl da suspensão de hemácias a 2% inseridas em cada poço contendo os
16 tratamentos. As placas foram então incubadas a 37 °C por duas horas, e posteriormente
17 centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos em centrífuga para microplacas Eppendorf 5810 R.
18 Assim, houve a formação de sobrenadante nos poços, sendo cuidadosamente transferidos para
19 uma nova microplaca de 96 poços. A nova microplaca foi então lida a uma densidade óptica
20 (DO) de 540 nm em espectrofotômetro Epoch-Biotek 2 Microplate Reader. O ensaio foi
21 realizado em triplicata.

22 A porcentagem de hemólise resultante foi calculada segundo a fórmula:

$$23 \quad [(DO \text{ amostra} - DO \text{ controle negativo}) \div (DO \text{ controle positivo} - DO \text{ controle negativo})] \times 100$$

4.10 Extração proteínas

26 Para verificar a integridade da membrana bacteriana de MRSA ATCC 33591, foi
27 calculada a concentração (µg/ml) de proteínas liberadas no sobrenadante pela bactéria quando
28 exposta a diferentes concentrações dos tratamentos (Tabela 3), por meio da metodologia de
29 Bradford (1976).

30 Inicialmente, a bactéria foi inoculada em meio MHC e incubada a 37 °C por 14 horas.
31 Posteriormente, o meio contendo o crescimento bacteriano foi separado em tubos de ensaio com
32 os respectivos tratamentos, em concentrações de 1 e 2 vezes o valor de CIM obtido previamente
33 para a bactéria em estudo. O experimento foi realizado em duplicata. Os tempos analisados no
34 experimento foram de T0 (logo após a adição dos tratamentos), T1 (2 horas após a adição dos

1 tratamentos) e T2 (4 horas após a adição dos tratamentos). Nesses tempos, as amostras foram
2 transferidas para tubos Eppendorfs e centrifugadas a 10.000 g por 7 minutos a 4 °C. Os
3 sobrenadantes foram coletados, transferidos para uma microplaca de poliestireno de 48 poços
4 e a DO lida a 595 nm.

6 **4.11 Viabilidade celular**

7 O teste de viabilidade celular foi realizado sobre a linhagem tumoral de cólon HCT 116
8 visando a análise de apoptose e necrose utilizando citometria de fluxo. A Anexina V 51-
9 65875X e o 7-AAD 51-68981E utilizados foram do kit PE Annexin V apoptosis detection kit
10 I, da Empresa BD Biosciences. Para o ensaio, foram testados os tratamentos nisina,
11 nanoemulsão contendo nisina, nanopartículas de ouro acopladas à nisina (AuNPs-Nis) e a
12 nanoemulsão sem a adição de nisina. Para todos os tratamentos foram realizadas duas
13 concentrações, ou seja, em uma e duas vezes os valores de CIM obtidos previamente para a
14 linhagem MRSA ATCC.

15 A marcação de células apoptóticas pela proteína Anexina V é possível pela sua alta
16 afinidade à fosfatidilserina (PS), uma molécula presente na superfície interna da bicamada
17 lipídica celular. Uma vez que a apoptose é iniciada, as moléculas PS são translocadas para a
18 superfície exterior da bicamada lipídica, devido à desorganização da membrana nessas
19 condições. Antes mesmo da perda total da integridade da membrana, ou seja, no início da
20 apoptose, a Anexina V já se adere à membrana celular e alterações morfológicas podem ser
21 detectadas. A conjugação da Anexina V ao FITC (Isotiocianato de fluoresceína) torna possível
22 a identificação e a quantificação das células apoptóticas utilizando a metodologia de citometria
23 de fluxo.

24 O 7-AAD (7-Aminoactinomicina D) é um componente químico que emite fluorescência
25 e possui uma forte afinidade ao DNA. Esse composto intercala a dupla fita do DNA, possuindo
26 afinidade por regiões ricas em ligações guanina-citosina. O 7-AAD é utilizado em análises de
27 citometria de fluxo para identificar e quantificar as células em apoptose tardia ou necróticas.
28 Uma vez as células nessas duas situações, a sua membrana estará desestabilizada, o que
29 permitirá a entrada do 7-AAD nas células, sendo possível dessa forma a sua ligação ao DNA.

30 As células foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal
31 bovino, 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sódio, 0.1 mM de aminoácidos não-
32 essenciais e 1% de antibióticos/antifúngicos (Life Technologies). Os ensaios foram realizados
33 em microplaca de 24 poços e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas sob 5% de tensão de
34 CO₂. Após esse período, as células receberam os tratamentos nas duas diferentes concentrações

1 dos produtos e foram incubadas novamente por 24 horas. Após adição de tripsina e após a
2 lavagem das células com PBS, as mesmas foram ressuspensas com 100uL de tampão de
3 Anexina V, e o protocolo de marcação foi iniciado a partir da pipetagem de 2,5uL de Anexina
4 V e a posterior incubação da placa à temperatura ambiente (25°C) e protegida da luz por 15
5 minutos. 200uL de tampão de Anexina V foi adicionado para atingir um volume final de 300uL
6 e 3uL de 7-AAD foi adicionado por fim, para a posterior análise no citômetro.

7 As amostras foram injetadas no citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences)
8 com software FACSDiva (BD Biosciences) sendo os resultados analisados com uso do software
9 FlowJo versão vX10.7 (Tree Stars Inc.).

11 **4.12 Análise estatística**

12 A análise estatística utilizada para os testes de extravasamento proteico e de redução de
13 biofilme foram os testes de Tukey's e ANOVA, sendo $p < 0,05$. Foi utilizado o software
14 GraphPad Prism versão 8 para Windows.

17 **5 Resultados e Discussão**

18 **5.1 Preparo das nanoemulsões**

19 **5.1.1 Avaliação macroscópica, tamanho médio das partículas, Potencial Zeta e Índice de** 20 **Polidispersividade**

21 Considerando as 5 formulações das nanoemulsões, as de número 3 e 4 apresentaram um
22 aspecto levemente translúcido, enquanto as formulações 1, 2 e 5 apresentaram um caráter mais
23 leitoso (Figura 9). Tais características macroscópicas foram visualizadas no momento da
24 síntese, após 24 horas e permaneceram estáveis por mais de 1 ano desde a sua formulação.
25 Nenhuma das amostras apresentou separação de fases. Entretanto, as formulações 1, 2 e 5
26 apresentaram cremeação em sua superfície após alguns meses desde o seu preparo. O fenômeno
27 de cremeação ocorre quando as partículas dispersas em uma nanoemulsão se assentam ou
28 flutuam na solução e assim, a emulsão se torna mais opaca ou com aspecto mais leitoso. Em
29 alguns trabalhos, uma taxa de cremeação é calculada para avaliar a extensão de agregação de
30 gotículas que estão ocorrendo na emulsão (Gadkari et al., 2015). É importante ressaltar que a
31 formação de cremeação não significa que a emulsão foi desfeita (Nejatian et al., 2018), apenas
32 ocorre quando as partículas dispersas flutuam ou se assentam em relação à fase contínua, e
33 assim a solução se torna mais opaca ou com aspecto cremoso (Gadkari et al., 2015). A

1 incorporação da nisina às nanoemulsões não causou nenhuma alteração na avaliação
2 macroscópica das amostras.

3



4

5 **Figura 9.** Nanoemulsões de 1 à 5, sem a adição de nisina

6

7 As nanoemulsões são caracterizadas macroscopicamente pelo seu aspecto transparente,
8 translúcido ou leitoso. A aparência transparente ou translúcida de uma emulsão ocorrerá quando
9 o diâmetro das gotículas da amostra for menor que 30 nm. Quanto maior o aspecto leitoso da
10 nanoemulsão, maior será o tamanho de suas gotículas. Entretanto, possuindo aspecto quase
11 transparente ou leitoso, as nanoemulsões são conhecidas por serem estáveis a tempo
12 determinado, podendo se desestabilizar com facilidade. As taxas de degradação de uma
13 nanoemulsão vão depender de diversos fatores como o tipo de óleo usado, surfactantes e suas
14 concentrações, pH e tipo de solvente. Quando uma nanoemulsão é preparada cujas gotículas
15 apresentam diâmetro menor que 90 nm, o fenômeno de cremação pode ser evitado
16 (McClements, 2012).

17 Quanto ao tamanho médio das gotículas de uma nanoemulsão, Chaari (2018) sugere que
18 o tamanho pode variar entre 50 e 500 nm, sem que a solução deixe de ser considerada uma
19 nanoemulsão quando seu valor é próximo de 500 nm. Foi reportado por McClements (2012)
20 que não ocorrem alterações nas propriedades físico-químicas e termodinâmicas de uma emulsão
21 O/A que diminuiu o tamanho de suas partículas da escala micrométrica para nanométrica.

22 O tamanho médio das gotículas das cinco nanoemulsões formuladas, puras e com a
23 nisina, estão apresentadas na Tabela 4, assim como seus valores de Potencial Zeta (PZ) e Índice

de Polidispersividade (PDI). O PZ é uma propriedade eletroquímica que irá indicar a carga elétrica das superfícies das gotículas, e que poderá ser influenciado de acordo com a sua interação com o meio dispersante. É um potencial elétrico dos nanomateriais que se apresenta exatamente entre o meio dispersante e os íons fortemente associados com a superfície do nanomaterial (Varenne et al., 2019). Assim, se o PZ de uma amostra permanecer constante ao longo do tempo, a fluidez do meio também permanecerá constante (Karemore et al., 2018). Já o índice de polidispersividade (PDI) avalia a homogeneidade do tamanho das gotículas dispersas no meio.

Tabela 4. Valores do tamanho das gotículas (nm), do Potencial Zeta (mV) e do Índice de Polidispersividade para as cinco nanoemulsões, puras e com nisina.

Amostra	Tamanho	PZ	PDI
Nanoemulsão 1	249,16	0,30	0,282
Nanoemulsão 1 + Nis.	208,00	-0,34	0,229
Nanoemulsão 2	226,85	0,03	0,283
Nanoemulsão 2 + Nis.	200,43	-1,17	0,259
Nanoemulsão 3	102,82	1,12	0,300
Nanoemulsão 3 + Nis.	97,19	0,82	0,273
Nanoemulsão 4	98,37	-0,62	0,309
Nanoemulsão 4 + Nis.	95,88	-1,54	0,301
Nanoemulsão 5	241,25	0,29	0,279
Nanoemulsão 5 + Nis.	241,86	-0,03	0,291

PZ = Potencial Zeta; PDI = Índice de Polidispersividade

O tamanho das gotículas analisadas pelo DLS corrobora com a caracterização macroscópica das amostras. Como visto anteriormente, as amostras que apresentaram um caráter mais leitoso foram as nanoemulsões 1, 2 e 5 e as nanoemulsões 3 e 4 as mais translúcidas. E, ao analisar o tamanho de suas gotículas, é possível observar que elas apresentam os maiores valores, tendo a nanoemulsão 1 um tamanho de 249,16 nm e, com a nisina, esse valor foi de 208,0 nm. A nanoemulsão 5 também apresentou um elevado tamanho de gotícula, sendo de 241,25 nm e 241,86 com a nisina. As nanoemulsões 3 e 4 apresentaram os menores valores, sendo de 102,82 nm e 98,37, respectivamente. Segundo Chaari (2018), quando uma nanoemulsão possui suas gotículas entre 50 e 200 nm, elas apresentarão um caráter transparente

1 ou translúcido e, quando possuírem um tamanho de 500 nm ou mais, elas terão um caráter
2 considerado leitoso.

3 No estudo, a adição da nisina fez com que o tamanho das gotículas diminuísse
4 sutilmente. Entretanto, no estudo de Zhang (2014), foram preparadas nanoemulsões de d-
5 limoneno com adição de nisina havendo um aumento no tamanho das gotículas, possivelmente
6 pelo alto peso molecular do peptídeo.

7 Todas apresentaram as mesmas condições de preparo, como à potência requerida pelo
8 sonicador, a temperatura em que foram realizadas (25°C), o tempo de gotejamento da fase
9 oleosa na aquosa e o tempo que a solução ficou sob o efeito ultrassônico. A diferença do
10 tamanho das gotículas de uma amostra para a outra se deve à diferente proporção dos
11 tensoativos utilizados.

12 O tipo de óleo utilizado para realizar uma nanoemulsão pode modificar as propriedades
13 físico-químicas finais da amostra, como a tensão superficial, a sua solubilidade, viscosidade e
14 o tamanho de suas partículas e sua distribuição no meio (Gharibzalhedi et al., 2018). Entretanto,
15 quando utilizado um único tipo de óleo, e alterando-se apenas sua concentração na emulsão,
16 não há mudança significativa no tamanho das gotículas, como observado no trabalho de
17 Nejatian (2018), onde a formulação de diversas nanoemulsões contendo óleo de girassol em
18 diferentes concentrações (10 – 60%), não resultou em alterações significativas de tamanho de
19 partícula. Entretanto, quanto maior a permanência da amostra no equipamento ultrassônico, as
20 gotículas foram apresentando menores diâmetros.

21 Segundo Páez-Hernández (2019), que sintetizou nanoemulsões de óleo de cúrcuma
22 variando-se o tempo de sonicação (de 10 a 30 minutos), a potência aplicada e a amplitude,
23 obteve resultados mostrando que as emulsões submetidas ao tempo máximo de 30 minutos
24 foram as que apresentaram menores tamanhos de gotículas quando comparadas às submetidas
25 por 10 minutos. Tal resultado é devido a uma maior energia aplicada no meio e a uma cavitação
26 acústica mais intensa.

27 Quanto aos valores de PDI obtidos, a nanoemulsão 4 pura e com a nisina foi a
28 formulação que apresentou os maiores valores, de 0,309 e 0,301, respectivamente. Este valor
29 representa a homogeneidade do tamanho das partículas dispersas. Quanto maior este valor,
30 maior será a quantidade de partículas com tamanhos diferentes encontradas na solução.
31 Segundo Bhattacharjee (2016), quando o PDI obtido é maior ou igual à 0.1, as partículas se
32 apresentam altamente monodispersas, ou seja, não apresentam tamanhos variados. Quando se
33 apresentam entre 0.1 e 0.4, são considerados moderadamente polidispersos e, maior que 0.4,
34 altamente polidispersos.

5.1.2 Estabilidade em armazenamento a diferentes temperaturas

As nanoemulsões foram avaliadas macroscopicamente quanto à sua estabilidade, ao longo de 1 mês desde o preparo, quando armazenadas em diferentes condições de temperatura, sendo 4°C (armazenadas em geladeira), 25°C (temperatura ambiente) e 37°C (armazenadas em estufa). Esse teste foi importante para analisar o comportamento das amostras quando armazenadas a longo prazo em diferentes condições de temperatura. As nanoemulsões 3 e 4, que apresentaram caráter mais translúcido que as demais, foram as amostras que menos sofreram alterações ao longo dos 30 dias, nas três diferentes temperaturas. A nanoemulsão 4 apresentou apenas cremeação no dia 30, quando em geladeira e estufa. Já a nanoemulsão 3 apresentou separação de fases no dia 30 quando em estufa. A nanoemulsão que apresentou maior instabilidade foi a de número 5 com maior quantidade de cremeações ao longo do tempo e em 3 semanas, em estufa, já apresentou separação total de fases, o mesmo ocorrendo para a nanoemulsão 2. O armazenamento em 37°C acarreta no enfraquecimento das interações hidrofóbicas e hidrofílicas, levando à desestabilização (Gadkari et al., 2015). A formação de cremeação e separação de fases significam uma desestabilização da amostra quanto à interação da fase oleosa com seus surfactantes e, esta instabilidade, acarreta na alteração do tamanho das gotículas. Os aspectos visuais das nanoemulsões submetidas a este teste de estabilidade estão representados na Tabela 5.

No estudo de Gadkari (2015), nanoemulsões foram preparadas a partir de óleo de girassol e de óleo de palma e foram armazenadas a 4°C, 25°C e 37°C por 14 dias. Foi observado um aumento das gotículas ao longo dos 14 dias, assim como em alguns casos, ocorreu o aumento das gotículas quando maior a temperatura de armazenamento. O aumento no diâmetro das gotículas pode estar associado com a interação dos surfactantes com as gotículas de óleo, que pode ter prejudicado a carga elétrica da sua superfície, que não possuiu mais a capacidade de dificultar a instabilidade da amostra, acarretando no aumento de suas gotículas (Gadkari et al., 2015).

Quando comparada a estabilidade das nanoemulsões entre as temperaturas, foi possível concluir que as amostras em temperatura ambiente apresentaram maior estabilidade do que as armazenadas em geladeira e estufa, sendo essa a temperatura que causou maior instabilidade nas amostras. No estudo de Zhang (2019), as nanoemulsões preparadas com DHA e EPA, dois importantes ácidos graxos, apresentaram relativa estabilidade nas três condições de temperatura. Entretanto, comparando-se as temperaturas entre si, as amostras foram mais estáveis aos 4°C do que aos 37°C. Tal instabilidade em temperaturas elevadas se deve ao fato da possível oxidação lipídica da fase oleosa, e assim, acarreta na instabilidade da emulsão.

- 1 **Tabela 5.** Aspecto visual das cinco nanoemulsões nas diferentes temperaturas, desde o tempo
2 zero do seu preparo até 1 mês após.

Tempo	Nano 1			Nano 2			Nano 3			Nano 4			Nano 5		
	4°C	25°C	37°C	4°C	25°C	37°C	4°C	25°C	37°C	4°C	25°C	37°C	4°C	25°C	37°C
0	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
24h	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
1 sem.	H	H	C	H	H	H	H	H	H	H	H	H	C	H	C
2 sem.	H	C	C	H	H	H	H	H	H	H	H	H	C	H	C
3 sem.	C	C	C	H	H	SF	H	H	C	H	H	H	C	C	SF
1 mês	C	C	SF	C	H	SF	C	C	SF	C	H	C	C	C	SF

3 H = homogêneo; C = presença de cremeação e SF = separação de fases.

4

5

6 5.1.3 Estresse térmico

7 O teste de estresse térmico foi realizado com as cinco nanoemulsões em uma faixa de
8 temperatura de 40°C a 80°C, em duplicata e analisadas depois de 5 minutos em cada
9 temperatura. Este teste foi realizado para a análise da instabilidade das soluções após
10 permanecerem em cada uma das temperaturas. As avaliações macroscópicas de cada amostra
11 nas diferentes temperaturas estão descritas na Tabela 6.

12 Todas as amostras apresentaram boa estabilidade durante os 5 minutos nas temperaturas
13 testadas, sendo que nenhuma amostra apresentou separação de fases. A nanoemulsão 5 foi a
14 única que, até os 80 °C, não apresentou nenhuma alteração macroscópica. A nanoemulsão 1 e
15 2, a partir dos 75°C, apresentaram cremeação em sua superfície. As nanoemulsões 3 e 4, aos
16 80°C, apresentaram uma coloração mais opaca e um aspecto mais leitoso do que quando estão
17 à temperatura ambiente.

18 Como discutido anteriormente no teste de estabilidade nas temperaturas de 4 °C, 25 °C
19 e 37 °C, ao aumentarmos a temperatura onde as nanoemulsões estão inseridas, há uma possível
20 oxidação das moléculas lipídicas, acarretando na sua instabilidade. Conseqüentemente ocorrerá
21 um aumento do tamanho das gotículas, e isso fará com que a nanoemulsão apresente um caráter
22 mais opaco/leitoso.

23 No estudo de Chen (2018), as nanoemulsões sintetizadas com óleo de soja e Tween 20
24 como tensoativo, quando submetidos ao teste de estresse térmico, apresentaram estabilidade até
25 a temperatura de 60 °C apenas, sem que fosse notado um aumento no tamanho de suas gotículas.

Entretanto, quando atingidos os 90 °C, houve um notável aumento no tamanho das gotículas, sendo possível observar separação de fases com uma fina camada de óleo na superfície quando atingida a temperatura de 120 °C. Teo (2016) reportou em seu estudo, com nanoemulsões à base de óleo de milho e Tween 20 como tensoativo, que à temperatura de 90°C houve instabilidade nas amostras, ocorrendo um aumento do tamanho de suas gotículas.

Tabela 6. Avaliação macroscópica das cinco nanoemulsões após 5 minutos em cada temperatura.

Temperatura	Nano 1	Nano 2	Nano 3	Nano 4	Nano 5
40 °C	H	H	H	H	H
45 °C	H	H	H	H	H
50 °C	H	H	H	H	H
55 °C	H	H	H	H	H
60 °C	H	H	H	H	H
65 °C	H	H	H	H	H
70 °C	H	H	H	H	H
75 °C	C	C	H	H	H
80 °C	C	C	O	O	H

H = homogêneo; C = cremeação; SF = separação de fases; O = opaca.

Todos os surfactantes possuem um “ponto de nuvem”, que é definido por uma determinada temperatura onde o surfactante passa a ser insolúvel, e acarreta na separação de fases da solução devido a uma desidratação de suas moléculas. O ponto de nuvem do Tween 20, já determinado por seu fabricante, é em torno de 76 °C. Ou seja, quando soluções que possuem esse surfactante passam por temperaturas além dos 76 °C, o fenômeno de coalescência pode ocorrer devido ao aumento das gotículas da solução (Teo et al., 2016).

No estudo de Borba (2019), foram sintetizadas nanoemulsões a base de óleo de milho com os surfactantes Tween 20 e Span 80. No seu teste de estresse térmico, as amostras apresentaram um comportamento semelhante ao do presente estudo. Também foram observados certos pontos de cremeação, entretanto, nenhuma amostra apresentou separação de fases. O autor traz esse resultado com o fato de as amostras terem sido sintetizadas com ambos os tensoativos, Tween 20 e Span 80, e não apenas o Tween 20, que apresentou ser o responsável pela desestabilização a elevadas temperaturas. O uso de dois tensoativos, um lipofílico e um

1 hidrofílico, fornece à emulsão uma maior estabilidade quando comparados ao uso de apenas
2 um (Borba et al., 2019).

3 4 **5.1.4 Valores de pH**

5 A análise do valor de pH é importante para estudarmos as diferenças nas composições
6 de ácidos presentes quando as amostras são submetidas a determinadas situações de estresse.
7 Os valores de pH das amostras de nanoemulsões foram medidas antes e após o teste de estresse
8 térmico e seus valores estão representados na Tabela 7. As amostras analisadas foram apenas
9 após o estresse térmico de 80°C.

10
11 **Tabela 7.** Valores de pH antes e depois das amostras de nanoemulsões serem submetidas ao
12 teste de estresse térmico.

pH	Nano 1	Nano 2	Nano 3	Nano 4	Nano 5
Antes	7,07	6,73	5,75	5,30	5,82
Depois	7,10	6,93	5,50	5,27	5,94

13
14 Os menores valores obtidos foram das nanoemulsões 3 e 4, enquanto a nanoemulsão 1
15 apresentou o maior valor de pH, sendo um pH neutro. Os valores obtidos de pH, antes e após o
16 estresse térmico, não apresentaram diferença significativa entre si. Os valores de pH obtidos
17 em nanoemulsões com o surfactante Tween 80, no estudo de Ghosh (2013), o autor obteve
18 valores parecidos com o do atual estudo, variando de 4,0 a 6,0. Prakash (2019), também
19 utilizando Tween 80 em suas nanoemulsões, obteve valores próximos ao pH neutro, mesmo
20 quando aumentava-se a concentração do surfactante no meio.

21 No estudo de Gadkari (2015) também foram preparadas nanoemulsões a base de óleo
22 de girassol sendo os valores de pH analisados durante o armazenamento a diferentes
23 temperaturas (4°C, 25°C e 37°C) durante 14 dias. Durante todo o período do armazenamento,
24 as amostras não apresentaram diferenças significativas no valor do pH, sendo que todas as
25 amostras permaneceram com um pH próximo de 5,0. Tal fato confirmou que não houve
26 degradação química por conta das condições de temperatura capaz de ter produzido produtos
27 ácidos nas nanoemulsões. O pH da fase aquosa de uma nanoemulsão pode afetar a estabilidade
28 da interação óleo-água devido aos seus possíveis efeitos na reatividade e solubilidade da
29 amostra (McClements et al., 2000).

30 Segundo Zhang (2019), as nanoemulsões se apresentaram mais estáveis quando seu pH
31 estava próximo a 7,0. Por outro lado, segundo Qian (2012), quando em elevadas temperaturas

1 e em condições ácidas de pH, a coloração das nanoemulsões de β -caroteno foi prejudicada,
2 apresentando degradação. Estes estudos corroboram com o nosso estudo, pois as nanoemulsões
3 3 e 4, que apresentaram as condições mais ácidas de pH, foram as únicas amostras que no teste
4 do estresse térmico apresentaram mudança de coloração/turbidez na condição de temperatura
5 de 80°C

7 **5.2 Preparo das Nanopartículas de Ouro (AuNPs)**

8 **5.2.1 Síntese das Nanopartículas de Ouro (AuNPs) estabilizadas por citrato**

9 A síntese das AuNPs foi iniciada com a preparação de duas soluções distintas, sendo
10 uma a solução de ácido tetracloroáurico triidratado, a uma concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e
11 uma solução de citrato de sódio a 1%. Ao atingir a temperatura de 80°C pela solução de ácido
12 tetracloroáurico, a solução de citrato de sódio foi sutilmente incorporada à primeira. O citrato
13 de sódio é responsável por reduzir o ácido tetracloroáurico e estabilizar a solução. Assim, a
14 solução irá resultar em nanopartículas esféricas de ouro (Elahi et al., 2018). A mudança de
15 coloração da solução foi sendo analisada a cada 30 minutos, pelo período total de 2 horas sob
16 agitação magnética e estão representadas na Figura 10.

17 O início da solução possui caráter amarelado devido à presença do cloreto de ouro
18 diluído na amostra (Fig. 10a). Logo no início da adição da solução de citrato de sódio, a solução
19 começa a perder o seu tom amarelado, passando para um amarelo mais sutil, quase transparente,
20 o que indica a formação do ácido cítrico (Gomashe et al., 2014) (Fig. 10b). Apenas 5 minutos
21 após a adição dessa solução, a amostra passa a apresentar uma coloração acinzentada (Fig. 10c),
22 passando para um azul escuro após 30 minutos (Fig. 10d). Totalizando 1 hora desde a adição
23 do citrato, a solução permanece estabelecida em uma coloração vermelho intenso (Fig. 10e),
24 permanecendo com essa coloração até o final da agitação magnética (Fig. 10f).

25 A quantidade de cloreto de ouro presente na amostra influencia na coloração da solução
26 de AuNPs, visto que no estudo de Pradeepa (2017), na concentração de $9 \times 10^{-3} \text{ M}$ de AuNPs,
27 a coloração final obtida foi em tons de rosa. No estudo de Mythili (2018), onde foram
28 preparadas soluções de AuNPs com a mesma concentração do atual estudo, a solução também
29 apresentou um vermelho intenso como sua coloração final, que é um indicador essencial que
30 comprova a formação das nanopartículas esféricas de ouro. As AuNPs esféricas exibem uma
31 ampla gama de coloração (marrom, laranja, roxo, vermelho) em soluções aquosas ao longo que
32 o tamanho das partículas aumentam de 1 para 100 nm (Yeh et al., 2012).

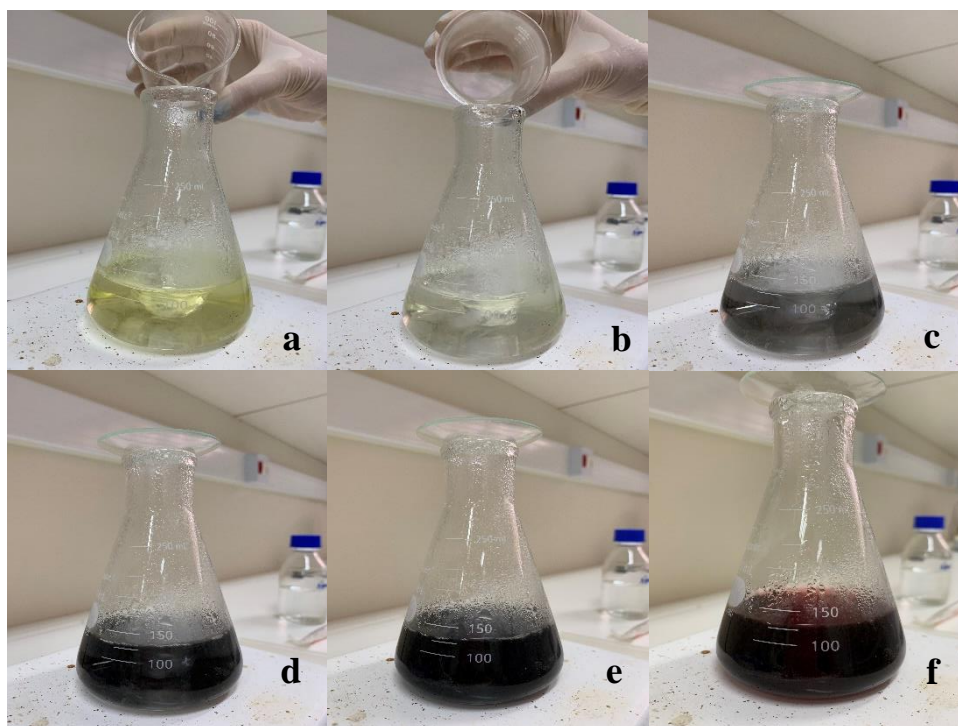


Figura 10. Mudança de coloração durante o preparo da solução de AuNPs. Solução de HAuCl₄ sob agitação magnética (a); momento T₀, onde ocorreu a adição da solução de citrato de sódio (b); 5 minutos após a adição da solução (c); 30 minutos após (d); 1 hora após (e); 2 horas após (f).

Outra caracterização importante das AuNPs é a leitura das amostras no espectrofotômetro em UV-Vis, que a partir do pico de absorbância obtido, irá confirmar a formação das nanopartículas. A relação do intervalo de comprimento de onda (300 – 1000 nm) com a banda de absorção obtida das AuNPs e das AuNPs-Nis estão representadas na Figura 11.

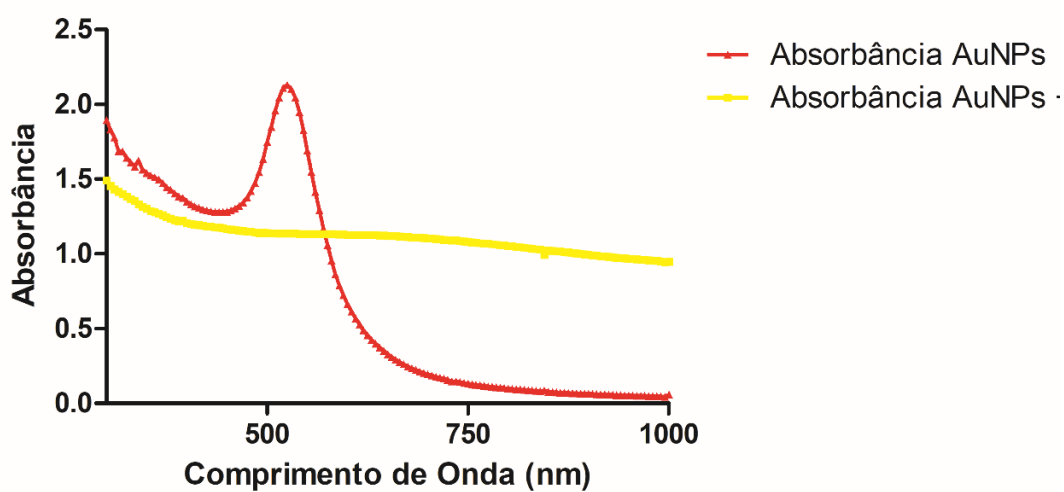


Figura 11. Bandas de absorção obtidas nas formulações de AuNPs e AuNPs-Nis.

1 O pico de absorvância das AuNPs se apresentou evidente no comprimento de onda 525
2 nm. Este valor representa a ressonância plasmônica de superfície das AuNPs. A excitação dessa
3 superfície pode ser responsável pela mudança da coloração da solução ao longo de sua síntese
4 (Mythili et al., 2018).

5 As AuNPs apresentam um pico de absorvância entre 500 e 550 nm. Essa banda de
6 absorção se deve à oscilação da condutividade dos elétrons, devido à excitação ressonante dos
7 fótons incidentes. Essa banda não é observada em nanopartículas que possuem um diâmetro
8 menor que 2 nm. Tal fenômeno é influenciado não apenas pelo tamanho das nanopartículas,
9 mas também por seu formato, solvente, ligante de superfície, temperatura e pela proximidade
10 entre as partículas (Yeh et al., 2012).

11 Quanto à absorvância das AuNPs acopladas à nisina, não houve um pico de absorvância
12 evidente, permanecendo os valores constantes e abaixo da faixa de absorvância das AuNPs. No
13 estudo de Kumar (2018), o autor sintetizou AuNPs com peptídeos de penetração celular e
14 obteve uma faixa de absorvância com alterações sutis, o que confirmou a estabilização dos
15 peptídeos com as nanopartículas. Da mesma forma, Kumar (2012) sintetizou AuNPs com dois
16 tipos de peptídeos, p12 e CRGDK, e quando analisados no UV-Vis, também não apresentaram
17 pico de absorvância, devido ao pequeno tamanho das partículas formadas.

18 19 **5.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

20 **5.3.1 Atividade antibacteriana da nisina e nanoemulsões-nisina contra *S. aureus*** 21 **enterotoxigênicos e metilina-resistente (MRSA)**

22 A nisina e as cinco formulações de nanoemulsões foram testadas sobre as quatro cepas
23 de *S. aureus* enterotoxigênicos ATCC 13565 (produtora de enterotoxina A), ATCC 14558
24 (enterotoxina B), ATCC 19095 (enterotoxina C), ATCC 23235 (enterotoxina D) além do
25 MRSA ATCC 33591. As nanoemulsões sem adição de nisina também foram testadas, e
26 nenhuma apresentou atividade inibidora contra as cinco cepas testadas. A concentração inicial
27 de todos os tratamentos foi de 100 µg/ml e o experimento foi realizado por diluição seriada. Os
28 resultados obtidos para CIM e CBM estão representados na Tabela 8.

29 Os valores de CIM da nisina frente às quatro cepas foram bastante inferiores quando
30 comparamos a ação da nisina sobre *S. aureus* em outros estudos. No estudo de Sadiq (2016), o
31 valor inibitório da nisina contra *S. aureus* foi de 10 µg/mL, enquanto no de Shi (2017), foi de
32 32 µg/mL e no de Zhao (2014) os valores variaram de 8 até 64 µg/mL em cepa ATCC de *S.*

1 *aureus* e isolados de alimentos. Alves (2016) também obteve valores mais elevados com a
 2 nisina, sendo a CIM para *S. aureus* de 110 µg/mL e de 125 µg/mL para *L. monocytogenes*.

3

4 **Tabela 8.** Valores de CIM e CBM (µg/ml) da nisina e suas nanoemulsões frente às cepas de *S.*
 5 *aureus* enterotoxigênicos (A-D) e MRSA

	SEA (13565)		SEB (14558)		SEC (19095)		SED (23235)		MRSA (33591)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Nisina	3,1±0,1 ^a	6,2 ^a	3,1±0,1 ^a	250 ^a	6,2±0,1 ^a	6,2 ^a	6,2±0,1 ^a	6,2 ^a	1,5±0,1 ^a	1,5 ^a
Oxacilina	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	125±2,0 ^b	125 ^c
Nano 1 + Nis.	12,5±0,2 ^b	12,5 ^c	25±2,5 ^b	25 ^d	50±2,5 ^b	50 ^d	25±1,5 ^b	25 ^c	0,8±0,1 ^a	3,1 ^b
Nano 2 + Nis.	3,1±0,1 ^a	12,5 ^c	1,5±0,1 ^c	3,1 ^c	12,5±1,2 ^c	12,5 ^b	6,2±0,1 ^a	12,5 ^b	25±2,0 ^c	25 ^c
Nano 3 + Nis.	1,5±0,1 ^c	6,2 ^a	3,1±0,3 ^a	6,2 ^b	6,2±0,1 ^a	6,2 ^a	6,2±0,1 ^a	12,5 ^b	50±2,0 ^d	50 ^d
Nano 4 + Nis.	3,1±0 ^a	6,2 ^a	3,1±0 ^a	6,2 ^b	25±1,5 ^d	25 ^c	25±1,5 ^b	25 ^c	50±2,0 ^d	50 ^d
Nano 5 + Nis.	0,2±0 ^d	3,1 ^b	0,4±0,1 ^d	12,5 ^c	1,5±0,2 ^e	6,2 ^a	1,5±0,2 ^c	12,5 ^b	50±2,0 ^d	50 ^d

6 NR = Não realizado. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas
 7 de atividade antimicrobiana entre produtos para a mesma cepa quando p≤0,05.

8

9 Importante salientar que as cinco formulações sem a inclusão de nisina foram testadas
 10 e todas apresentaram resultados negativos, ou seja, não possuem ação inibidora das bactérias
 11 testadas. Quanto as nanoemulsões contendo nisina, a de formulação 1 foi a menos eficiente
 12 tendo apresentado o menor CIM de 12,5 µg/ml para a produtora de enterotoxina A e o maior de
 13 50 µg/ml para a produtora de enterotoxina C. A nanoemulsão que apresentou os melhores
 14 resultados, ou seja, os menores valores de CIM frente às cepas enterotoxigênicas, foi a
 15 nanoemulsão 5, que com uma concentração de 0,2 µg/ml foi capaz de inibir o crescimento da
 16 produtora de enterotoxina A. Frente às outras cepas também apresentou valores baixos, com
 17 0,4 µg/ml para produtora de enterotoxina B e 1,5 µg/ml para produtora de enterotoxina C e D.
 18 Quando comparamos a susceptibilidade das quatro cepas aos antimicrobianos, é possível
 19 observar que a produtora de enterotoxina D foi a cepa que apresentou maior resistência,
 20 enquanto a produtora de enterotoxina A foi a mais susceptível. Portanto, pode-se dizer que
 21 houve otimização da ação da nisina quando comparada à sua ação em sua forma não
 22 encapsulada.

1 Quando comparamos o tamanho das gotículas das nanoemulsões e sua atividade
2 antibacteriana, nota-se quanto menor for, melhor é a sua atividade antibacteriana. Isto pode ser
3 explicado pelo fato de possuírem uma elevada proporção área/volume e assim, sua capacidade
4 de penetrar pela membrana bacteriana se torna maior (Chuesiang et al., 2019). Entretanto, no
5 atual estudo, a nanoemulsão 5, que apresentou um dos maiores tamanhos de gotículas, de
6 241,86 nm, foi a que apresentou melhor atividade, e não as nanoemulsões 3 e 4, que
7 apresentaram os menores tamanhos, ou seja, 97,19 nm e 95,88 nm respectivamente. Similar ao
8 presente estudo, Moghimi (2016) formulou nanoemulsões de óleo de sálvia, com Span 80 e
9 Tween 80 como tensoativos, obtendo sua formulação um tamanho de gotícula de 222 nm, e a
10 ação antibacteriana, sua nanoemulsão foi capaz de reduzir em até 75% os MICs quando
11 comparados ao óleo em sua forma pura contra *E. coli*, *Shigella dysenteriae* e *Salmonella Typhi*.
12 Já no estudo de Khan (2019), nanoemulsões de óleo de Mahua foram sintetizadas com
13 diferentes tipos e concentrações de tensoativos, sendo testadas contra diversas bactérias
14 patogênicas. A nanoemulsão que apresentou um DLS de 142 nm, o maior tamanho dentre as
15 demais, foi a que apresentou um menor valor de CIM quando testadas contra duas cepas
16 distintas de *S. aureus*.

17 Por mais que o tamanho das gotículas de uma nanoemulsão seja considerada a
18 propriedade inicial pelo qual a associamos com a atividade antibacteriana, suas propriedades
19 de superfície também são importantes para a sua ação antimicrobiana. No caso do
20 encapsulamento da nisina em lipossomos, Pinilla (2016) verificou existir forte interação da
21 nisina com fosfatidilcolina e isto fez com que a taxa de liberação da nisina do lipossomo para
22 o meio externo fosse prejudicada interferindo significativamente com a sua ação sobre *L.*
23 *monocytogenes*. O potencial zeta das nanoemulsões também pode influenciar a interação da
24 nisina com a bactéria, pois uma vez que a parede externa bacteriana possui carga negativa, a
25 repulsão eletrostática entre as nanoemulsões e a parede bacteriana pode ocorrer, prejudicando
26 a interação entre a nisina encapsulada e a bactéria pode ser prejudicada (Pinilla et al., 2016).

27 Como a nanoemulsão 5 mostrou o melhor valor de CIM sobre as cepas
28 enterotoxigênicas, esta foi a nanoemulsão escolhida para seguir com o ensaio para verificar a
29 inibição da produção de enterotoxinas.

30 Similar aos testes sobre os *S. aureus* enterotoxigênicos, a nisina e as cinco nanoemulsões
31 também foram estudadas quanto aos seus valores de CIM e CBM contra *S. aureus* metilina-
32 resistente (MRSA), cepa ATCC 33591. A resistência de *S. aureus* à metilina se deve à
33 capacidade da bactéria de possuir o cassete cromossômico estafilocócico (*SCCmec*), que
34 carrega consigo genes, como por exemplo o gene *mecA*, que confere a esta bactéria resistência

1 a antimicrobianos (Zehra et al., 2019), o que a torna uma bactéria mais resistente a diversos
2 antimicrobianos naturais e antibióticos.

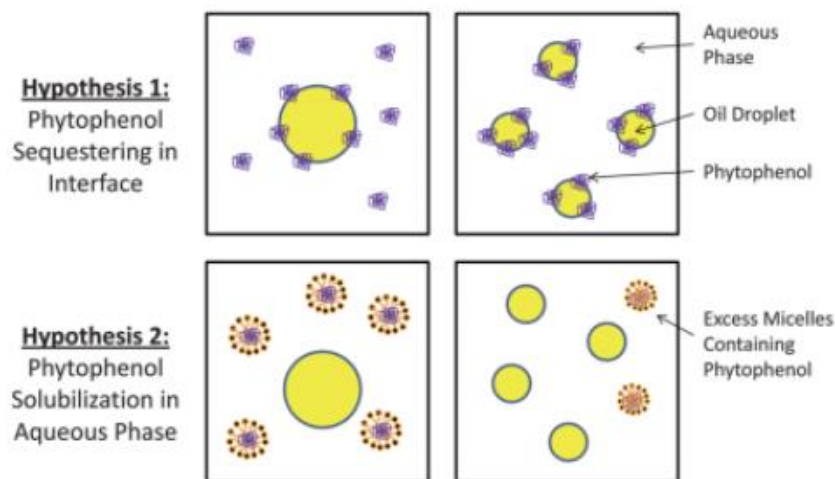
3 Quando comparamos o MRSA com as cepas enterotoxigênicas discutidas
4 anteriormente, esta apresentou maior susceptibilidade à nisina, apresentando um CIM no valor
5 de 1,5 µg/ml. As nanoemulsões apresentaram um valor mais elevado de CIM, com exceção da
6 nanoemulsão 1, que apresentou um valor de CIM menor que a nisina, sendo de 0,8 µg/ml. Nos
7 valores de CBM, a concentração da nisina se manteve à mesma do que a CIM, mostrando que
8 a concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano foi a mesma concentração capaz de
9 causar a morte bacteriana. Quanto à nanoemulsão 1, que apresentou o melhor resultado dentre
10 as outras, seu valor de CBM se apresentou maior do que a concentração de CIM, sendo de 3,1
11 µg/ml. Ou seja, o seu valor de CIM foi bacteriostático e não bactericida. Quanto ao tratamento
12 com o antibiótico oxacilina, é possível observar que é necessária uma concentração muito maior
13 do fármaco para inibir o crescimento de MRSA quando comparada às concentrações da nisina
14 e de suas nanoemulsões.

15 Os valores da CIM e CBM da nisina para MRSA foram mais baixos quando
16 comparamos com o estudo de Castelani (2019), onde o valor da concentração bactericida contra
17 duas cepas MRSA ATCC foram de 100 µg/ml e 50 µg/ml, apresentando uma maior resistência
18 ao peptídeo. *S. aureus* multirresistente, entretanto, pode apresentar uma maior susceptibilidade
19 à nisina conforme reportado por Niaz (2018), sendo que uma cepa de *S. aureus* resistente a
20 diversos antibióticos apresentou um valor de CIM da nisina de apenas 5 µg/ml. Resultado
21 semelhante foi obtido por Koopmans (2015), onde a nisina apresentou um valor de CIM de 10
22 µg/ml e peptídeos sintéticos obtidos a partir da nisina, possuindo o mesmo mecanismo de ação
23 da nisina, também apresentaram baixos valores de CIM.

24 Similar às cepas enterotoxigênicas, as nanoemulsões com os maiores tamanhos de
25 gotículas (DLS = 208 nm, quando acopladas à nisina), novamente apresentaram um efeito
26 antimicrobiano mais eficaz do que as outras nanoemulsões, com tamanhos de gotículas
27 menores. Quando comparado com a nisina, a nanoemulsão 1 mostrou melhor resultado sobre a
28 cepa testada. Reforçando Weiss (2014), Pinilla (2016) propõe que quando os antimicrobianos
29 estão fortemente aderidos às interfaces das gotículas nanoemulsionadas, e as gotículas não
30 interagem diretamente com a membrana bacteriana, os antimicrobianos são prejudicados ao
31 serem liberados das micelas da emulsão, e assim podem falhar em erradicar o patógeno.

32 Terjung (2011) teve como objetivo do seu trabalho verificar a influência do tamanho
33 das gotículas de nanoemulsões de carvacrol e eugenol em cepas de *E. coli* e *L. innocua*, onde
34 os compostos foram encapsulados em nanoemulsões com diferentes tamanhos de gotículas.

1 Como resultado, o autor observou que, a uma mesma concentração do composto ativo, a adição
2 da nanoemulsão com gotículas maiores teve uma ação antibacteriana mais eficaz contra *L.*
3 *innocua* do que as de menores gotículas. Da mesma forma que foi proposto por Terjung (2011),
4 Weiss (2014) também trouxe como hipótese o fato dos seus compostos terem sido mantidos na
5 interface, agindo como surfactantes/co-surfactantes, ao longo que os tamanhos de suas
6 partículas diminuíssem. Outra hipótese levantada pelo autor é a pequena quantidade, ou até
7 mesmo a ausência de micelas, na fase aquosa das nanoemulsões com pequenos tamanhos de
8 gotículas, uma vez que as micelas são ótimas solubilizantes para os fitofenóis usados no
9 experimento. Assim, com ausência de micelas, menos eugenol e carvacrol estariam disponíveis
10 na fase aquosa da nanoemulsão. Ambas as hipóteses estão ilustradas na Figura 12.
11



12
13 **Figura 12.** Ilustração de ambas as hipóteses sugeridas por Terjung (2011), onde a hipótese 1
14 (acima) ilustra o sequestro dos fitofenóis pela interface das gotículas, agindo como surfactante,
15 e sendo diminuída sua concentração no meio aquoso. A hipótese 2 (abaixo) ilustra a diminuição
16 do número de micelas no meio aquoso com os menores tamanhos de gotículas.
17

18 Como a nanoemulsão 1 mostrou o melhor valor de CIM frente a cepa MRSA ATCC,
19 esta foi a nanoemulsão escolhida para seguir com os demais testes de atividade antibacteriana
20 e para a posterior incorporação com as nanopartículas de ouro (AuNPs).
21

22 **5.3.2 Atividade antibacteriana das nanopartículas de ouro acopladas à nisina (AuNPs-
23 Nis), AuNPs acopladas à nanoemulsão-nisina (AuNPs + Nano-Nis) e das AuNPs-Nis
24 acopladas à nanoemulsão (AuNPs-Nis + Nano) contra *S. aureus* meticilina-resistente
25 (MRSA)**

1 As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram sintetizadas a partir da redução do cloreto de
 2 ouro (III) a ouro metálico por meio do citrato de sódio. Além da vantagem de serem
 3 considerados não tóxicos, a síntese e modificação das AuNPs é considerada simples, sendo
 4 necessário apenas um ou mais reagentes químicos para tal (Jelinkova et al., 2019), assim como
 5 sua incorporação com a nisina, onde foi realizada apenas por meio de agitação magnética pelo
 6 período de duas horas.

7 Os valores de CIM e CBM para as nanopartículas de ouro (AuNPs), para as AuNPs
 8 acopladas à nisina (AuNP-Nis), para as AuNPs acopladas à nanoemulsão-nisina (AuNPs +
 9 Nano-Nis) e para as AuNPs-Nis acopladas à nanoemulsão (AuNPs-Nis + Nano) estão
 10 apresentados na Tabela 9. A formulação de nanoemulsão utilizada para esses ensaios foi a de
 11 número 1, que apresentou o melhor valor de CIM anteriormente para MRSA.

12
 13 **Tabela 9.** Valores de CIM e CBM, em µg/ml, para as AuNPs e suas combinações com a
 14 nanoemulsão e nisina sobre as cepas enterotoxigênicas (A-D) e MRSA.

	13565		14558		19095		23235		MRSA	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Nisina	3,1±0,1 ^a	6,2 ^a	3,1±0,1 ^a	250 ^a	6,2±0,1 ^a	6,2 ^a	6,2±0,1 ^a	6,2 ^a	1,5±0,1 ^a	1,5 ^a
AuNPs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nano + AuNPs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AuNPs + Nano-Nis	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,8±0,1 ^a	6,2 ^b
AuNPs-Nis	0,4±0,1 ^b	0,4 ^b	0,1±0 ^b	0,8 ^b	0,8±0 ^b	0,8 ^b	0,4±0,1 ^b	0,8 ^b	1,5±0,1 ^a	1,5 ^a
AuNPs-Nis + Nano	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	3,1±0,1 ^b	6,2 ^b

15 NR = Não realizado. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas
 16 de atividade antimicrobiana entre produtos para a mesma cepa quando $p \leq 0,05$. Indicado com
 17 (-) os tratamentos que não apresentaram valores de CIM.

18
 19 Para comprovar que as AuNPs não possuem ação antibacteriana sem a presença da
 20 nisina, estas foram testadas, assim como a sua combinação com a nanoemulsão. Ambos os
 21 tratamentos apresentaram resultados negativos contra as cinco cepas, o que foi comprovado
 22 anteriormente por Willams (2016), que afirmou que as AuNPs por si não apresentam atividade
 23 antibacteriana, apenas quando administradas junto com o composto ativo de interesse.

1 Ao comparar os valores de CIM e CBM das AuNPs-Nis com a nisina em sua forma pura
2 sobre as cepas enterotoxigênicas, podemos observar que ocorreu uma otimização significativa
3 da ação da nisina quando conjugadas às AuNPs. Sobre a cepa produtora de enterotoxina B, as
4 AuNPs foram capazes de diminuir a CIM em 96,8% quando comparadas à nisina e a CBM em
5 99,7%. Da mesma forma, com as outras cepas enterotoxigênicas, ocorreu uma diminuição
6 significativa dos valores de CIM e CBM, mostrando a grande otimização e o grande potencial
7 das nanopartículas de ouro para sua aplicação sobre *S. aureus*.

8 Quanto aos tratamentos com as AuNPs e nanoemulsões acopladas à nisina sobre MRSA,
9 o tratamento que obteve um menor valor de CIM foi o da AuNPs + Nano-Nis., apresentando-
10 se na concentração de 0,8 µg/ml, uma concentração 50% menor do que o tratamento com a
11 nisina, que se apresentou em 1,5 µg/ml. As AuNPs-Nis apresentaram um valor de CIM
12 equivalente ao da nisina, na concentração de 1,5 µg/ml. Quando observado os valores de CBM,
13 em comparação aos obtidos na CIM, é possível concluir que o resultado da CIM das AuNPs-
14 Nis se assemelhou ao resultado de CBM, ou seja, o valor inibitório mínimo obtido foi um valor
15 bactericida. Entretanto, para as AuNPs + Nano-Nis, o resultado de CBM se apresentou 8 vezes
16 maior do que o resultado da CIM, podendo concluir que a concentração de 0,8 µg/ml foi um
17 valor bacteriostático sobre MRSA, e não bactericida.

18 Quando comparamos os resultados de CIM e CBM da nisina com os das AuNPs-Nis,
19 podemos concluir que ambas apresentaram o mesmo efeito contra MRSA. Podem-se observar
20 resultados similares no trabalho de Thirumurugan (2013), quando foram administradas AuNPs-
21 Nis e nisina em sua forma pura contra *E. coli*, *M. luteus*, *B. cereus* e *S. aureus*. O autor pôde
22 observar que não houve grandes diferenças entre os dois tratamentos contra as quatro bactérias,
23 sendo que contra *S. aureus*, a nisina ainda foi capaz de obter uma atividade um pouco maior do
24 que as AuNPs-Nis. Já Goshe (2014), comparou o efeito de AuNPs-Nis, AuNPs e AuNPs
25 acopladas a uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus lactis* e *Lactobacillus plantarum*.
26 Quando a bacteriocina foi acoplada às AuNPs, uma discreta otimização pôde ser observada em
27 sua ação quando comparada com a bacteriocina pura, corroborando com novos resultados
28 obtidos com a nisina onde houve uma otimização quando combinadas com as AuNPs.

29 Entretanto, segundo estudo de Pradeepa (2017), as AuNPs-Nis apresentaram um valor
30 de CIM 93% menor do que o tratamento apenas com a nisina quando testadas em *S. aureus*,
31 bem como o seu valor de CBM. Além das bactérias Gram positivas, as AuNPs também possuem
32 efeitos positivos quando testados com as Gram-negativas, como no estudo de Tiwari (2011),
33 que sintetizou AuNPs com 5-fluorouracil, e a conjugação foi estudada contra *M. luteus*, *P.*

1 *aeruginosa* e *E. coli* e foram obtidos resultados antibacterianos bastante eficientes devido à sua
2 internalização ser mais fácil pelas bactérias Gram-negativas.

3 Além das nanopartículas de ouro, nanopartículas de prata (AgNPs) também são uma
4 opção de síntese para a sua utilização com a nisina e outros peptídeos. Segundo Arakha (2016),
5 AgNPs foram conjugadas com a nisina e testadas quanto à sua ação antibacteriana contra *S.*
6 *aureus*, *E. coli* e *B. subtilis*. Mesmo em concentração baixas, de 0.3 a 1.2 µg/mL de nisina, a
7 conjugação AgNPs-Nis apresentou uma otimização do efeito antibacteriano contra as bactérias
8 testadas.

9 Os tratamentos utilizando nanopartículas de ouro misturadas à nanoemulsão-nisina
10 (AuNPs + Nano-Nis) e da nanoemulsão acoplada às AuNPs-Nis (AuNPs-Nis + Nano) foram
11 sintetizadas com o objetivo de verificar se a nanoemulsão junto com as AuNPs possuem um
12 efeito ainda mais otimizado contra *S. aureus*. Pode-se observar que o valor de CIM para AuNPs
13 + Nano-Nis foi de 0,8 µg/mL, uma concentração 50% menor do que o CIM da nisina
14 administrada sozinha e o mesmo valor de CIM obtido para Nano-Nis anteriormente. Neste caso,
15 podemos concluir que a adição das AuNPs no tratamento não mostrou uma ação otimizante na
16 Nano-Nis. Já para o tratamento AuNPs-Nis + Nano, o valor de CIM se apresentou em 3,1
17 µg/mL, que se mostra uma concentração maior do que o tratamento com a nisina sozinha, assim
18 como para o tratamento de AuNPs-Nis. Para este tratamento, a adição da nanoemulsão na
19 solução de AuNPs-Nis obteve um efeito negativo, visto que o valor de CIM aumentou após
20 essa incorporação, prejudicando a ação antibacteriana das AuNPs-Nis.

21 Com o objetivo similar ao do presente estudo, Guler (2014) testou algumas formulações
22 de nanoemulsões do óleo de *Nigella sativa*, uma planta nativa asiática, enriquecidas com
23 extratos de *Calendula officinalis*, popularmente conhecida como margarida, usando diversas
24 concentrações do extrato, de água destilada e de AuNPs acopladas ao ácido α -lipóico (AuNP-
25 LA). Foram realizados testes de citotoxicidade, de cicatrização de feridas, atividades
26 antioxidantes e de proliferação celular. Quanto à citotoxicidade em células Vero e potencial
27 para cicatrizar feridas, a amostra de nanoemulsão O/A que obteve os melhores resultados foi a
28 que não possuía nenhuma concentração de AuNP-LA, sendo somente a ação do óleo de *N.*
29 *sativa* enriquecido com o extrato de *C. officinalis* capazes de apresentar os melhores resultados.

30 Incorporando nanopartículas de prata (AgNPs) e Doxorrubicina, um fármaco
31 quimioterápico, a formulações de nanoemulsões de óleo de soja, Goyal (2017) estudou seus
32 efeitos citotóxicos e antibacterianos contra *E. coli*, *Methylobacterium spp.* e *Sphingomonas spp*
33 e ficou comprovada a internalização dos íons de prata (Ag⁺) nas gotículas da fase oleosa da
34 nanoemulsão. Entretanto, no teste antibacteriano pela metodologia do disco de difusão, não

1 houve formação de halos de inibição quando testadas as nanoemulsões contendo prata, tendo
 2 os autores considerado como explicação que os íons Ag⁺ não foram capazes de se difundir da
 3 fase oleosa da emulsão. Por outro lado, as AgNPs, sem as nanoemulsões, apresentaram-se
 4 eficazes quanto ao seu efeito antibacteriano. Tal hipótese corrobora com o resultado obtido no
 5 presente estudo, onde o tratamento de AuNPs-Nis apresentou um valor de CIM mais eficaz do
 6 que AuNPs-Nis + Nano, onde as AuNPs-Nis, considerando que tenham sido incorporadas nas
 7 gotículas da fase oleosa da nanoemulsão, apresentou dificuldade em se difundir das gotículas
 8 para a fase aquosa, onde iria agir nas membranas bacterianas.

10 **5.4 Inibição da produção de enterotoxinas**

11 Os ensaios com a produção das enterotoxinas foram realizados com três tratamentos:
 12 nisina, AuNPs-Nis e nanoemulsão de formulação 5. Esta nanoemulsão foi escolhida para este
 13 teste devido ao seu melhor desempenho na atividade antimicrobiana (menor CIM) do que as
 14 demais. A concentração subinibitória de ambos os tratamentos para esse experimento foi de
 15 70% do MIC para as cepas. Os resultados da produção de enterotoxinas estão apresentados na
 16 Tabela 10.

18 **Tabela 10.** Resultados obtidos para a produção de enterotoxinas A, B, C e D por *S. aureus*
 19 quando submetidas a 70% MIC da nisina, nanomeulsão 5 com nisina e AuNPs-Nis.

	Nisina				Nano-Nis				AuNPs-Nis			
	1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000	1:1	1:10	1:100	1:1000
SEA	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
SEB	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
SEC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SED	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

20 (-): não produção de enterotoxina; (++) : moderada produção de enterotoxina; (+++): forte
 21 produção de enterotoxina.

23 A produção das enterotoxinas A, B, C e D pelas diferentes cepas não foram prejudicadas
 24 com uso dos tratamentos com nisina e nanoemulsão 5, em nenhuma das diluições testadas, com
 25 exceção da diluição 1:1000 da nanoemulsão, que apresentou efeito sobre a produção de SEB,
 26 apresentando-se como moderada produtora (++) . Quanto à ação de AuNPs-Nis, SEA e SEB
 27 apresentaram moderada produção das enterotoxinas (++) em todas as diluições. No grupo

1 controle, todas as cepas apresentaram-se forte produtoras (+++) de enterotoxinas, com exceção
2 da SEC, que não apresentou nenhuma produção (-). Pode-se observar que as cepas, no geral,
3 apresentaram certa resistência aos tratamentos em 70% MIC em suas variadas diluições quanto
4 à produção das enterotoxinas.

5 Quando comparamos com a nisina e à sua forma nanoemulsificada, quando conjugadas
6 às AuNPs, o peptídeo antimicrobiano apresentou um efeito otimizado contra a produção das
7 enterotoxinas A e B de *S. aureus*. Segundo Rai (2010), que realizou um estudo com o antibiótico
8 Cefaclor e sua ação quando acopladas a nanopartículas de ouro, as nanopartículas foram
9 capazes de interagir com o DNA bacteriano e assim afetar seu processo de transcrição. O
10 complexo Cefaclor-AuNPs aumentou a permeabilidade da membrana plasmática bacteriana,
11 resultando na formação de poros e conseqüentemente ocorreu a sua entrada para o citoplasma
12 bacteriano. Além da ação das AuNPs, elas ainda podem ter sido responsáveis por uma maior
13 entrega da nisina para o citoplasma bacteriano (Rizvi et al., 2018). Levando em consideração
14 essa hipótese levantada pelo autor, pode-se sugerir que as AuNPs tenham interagido com o
15 material genético bacteriano, afetando a produção de enterotoxinas, uma vez que são produzidas
16 pelos genes produtores de enterotoxinas (S_{Ag}).

17 Em diversos estudos foi reportado que a nisina apresenta uma baixa atividade contra a
18 produção de enterotoxinas quando em alimentos. No estudo de Hamama (2002), *S. aureus*
19 produtor de enterotoxina C (SEC), presente no leite, foi incubado junto com uma cepa de
20 *Lactotoccus lactis* produtora de nisina-Z. A produção de enterotoxina se deu
21 independentemente da presença de grandes quantidades de *L. lactis* por haver uma grande
22 quantidade de *S. aureus* (10^5 UFCmL⁻¹) no leite. O autor também levanta a hipótese de que se
23 *L. lactis* fosse inserido na fase da fermentação do leite, a quantidade de *S. aureus* presente seria
24 provavelmente menor. No estudo de Lin (2018), resultados similares foram apresentados, onde
25 a nisina, mesmo em elevadas concentrações, não foi capaz de impedir a produção da
26 enterotoxina A por *S. aureus*.

27 Entretanto, alguns estudos também mostram que alguns peptídeos e óleos essenciais são
28 capazes de inibir a produção de enterotoxinas estafilocócicas. No estudo de Wang (2008), o
29 peptídeo sintetizado P72 apresentou atividade inibitória contra a liberação das enterotoxinas A,
30 B, C e D. No estudo de Albano (2016), os compostos eugenol, terpineol, cinamaldeído,
31 citronelol e geraniol apresentaram efeitos inibitórios relevantes contra a produção de SEA, SEB,
32 SEC e SED, em concentrações subinibitórias de 60% e 80%. As cepas utilizadas por Albano
33 (2016) foram as mesmas cepas padrão ATCC utilizadas no atual estudo.

34

5.5 Efeito dos tratamentos de nisina na formação de biofilme

O biofilme bacteriano é um dos maiores responsáveis pela resistência intrínseca aos antimicrobianos por *S. aureus*, sendo composto por uma rica matriz extracelular, que protege a bactéria contra a ação de agentes externos. Assim, há a constante busca pelos pesquisadores por antimicrobianos capazes de controlar a formação de biofilme. Atualmente, ainda não há um fármaco antimicrobiano que possua como alvo específico a inibição da formação de biofilme (Mohammed et al., 2018).

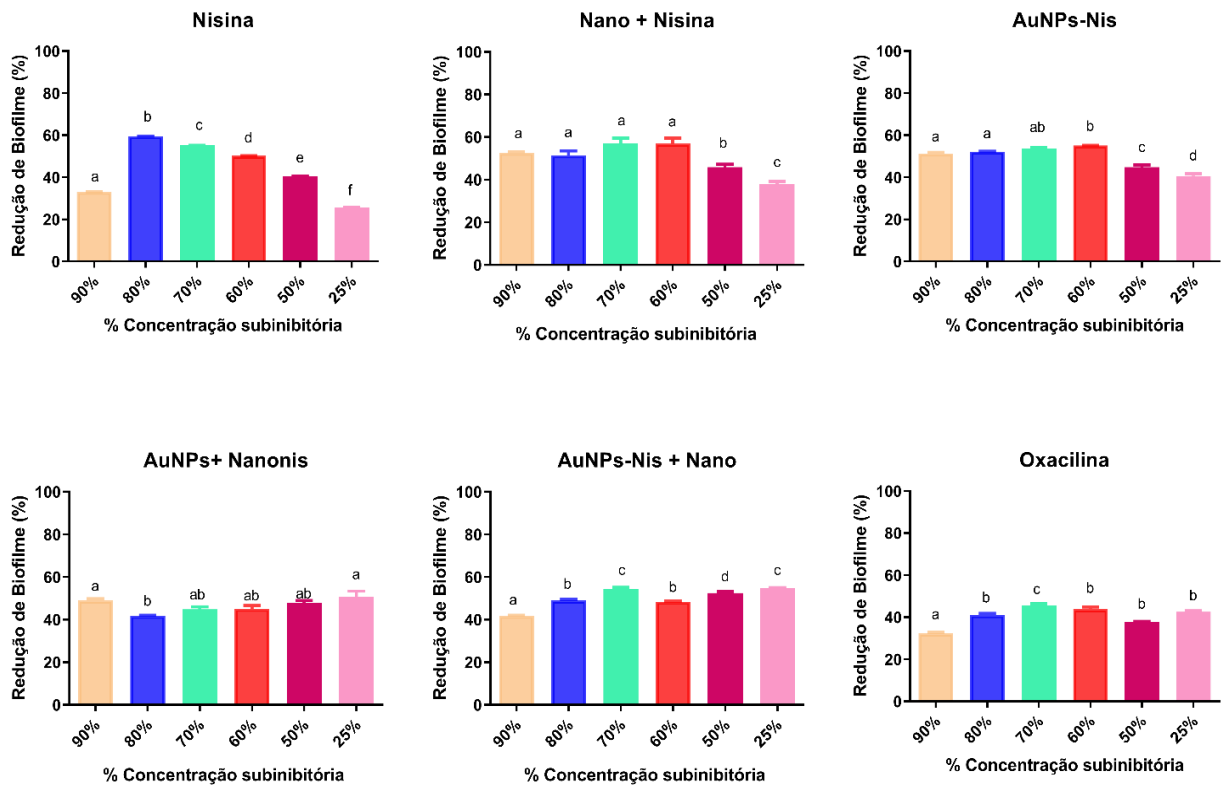
O teste da redução da formação do biofilme de MRSA foi realizado com 6 tratamentos diferentes, e cada um foi realizado em triplicata. As concentrações subinibitórias utilizadas foram de 90%, 80%, 70%, 60%, 50% e 25% do valor das CIM obtidos respectivamente para cada amostra. A redução da formação do biofilme foi dada em porcentagem e está representada na Tabela 11 e na Figura 13.

Tabela 11. Valores da redução (em porcentagem) da formação de biofilme pela cepa MRSA ATCC 33591. Valor calculado em relação ao controle da bactéria.

	90%	80%	70%	60%	50%	25%
Nisina	33,1	59,5	55,2	50,3	40,5	25,8
Nano + Nis	52,4	52,9	58,7	58,7	46,8	38,8
AuNPs-Nis	51,7	52,3	53,5	55,2	45,6	41,4
AuNPs + Nano-Nis	49,6	41,7	45,7	46,2	48,6	52,6
AuNPs-Nis + Nano	41,8	49,4	54,9	48,3	53	54,8
Oxacilina	32,9	41,8	46,4	44,9	37,3	43

As porcentagens de redução do biofilme, para todos os seis tratamentos realizados, apresentaram valores significativos quanto aos seus potenciais anti-biofilme de *S. aureus*. Quando comparamos o antibiótico oxacilina com a nisina, pode-se observar que, com exceção da concentração de 25%, a nisina foi capaz de inibir uma maior quantidade de produção de biofilme do que o antibiótico. Isso se deve ao fato de MRSA, uma bactéria que possuiu a habilidade de se tornar resistente a antibióticos, mais especificamente a meticilina, também apresentar a resistência contra antibióticos em suas concentrações subinibitórias para a erradicação do biofilme. Como discutido anteriormente a respeito da resistência a antimicrobianos, tal mecanismo pode ter sido adquirido tanto pela transferência horizontal de

1 genes quanto pela mutação bacteriana em sua composição de membrana, nas suas bombas de
 2 efluxo ou nos seus ligantes a antibióticos, impedindo que ocorra tal ligação. Assim, uma das
 3 opções de vencer a resistência é a partir da nisina, como sendo um lantibiótico, agirá ao alterar
 4 a permeabilização da membrana, e assim impedirá a síntese de macromoléculas e sua posterior
 5 adesão (Mohammed et al., 2018).



6 **Figura 13.** Representações gráficas da porcentagem de redução de biofilme dos seis
 7 tratamentos realizados com as seis concentrações subinibitórias testadas.

8

9 Tanto os tratamentos com as AuNPs e com a nanoemulsão apresentaram porcentagens
 10 também relevantes para inibição da formação do biofilme, permanecendo entre 40% e 60% de
 11 inibição. A maioria dos percentuais inibitórios desses tratamentos se apresentou com valores
 12 superiores que os percentuais da nisina pura. Isso indica que a nanotecnologia utilizada para
 13 otimizar a ação antibacteriana da nisina apresentou resultados positivos quanto ao teste de
 14 formação de biofilme pela bactéria em questão.

15 Em estudo realizado por Niaz (2019), quando se testou a ação da nisina pura e
 16 encapsulada em rhamnossomos, que são rhamnolipídeos (moléculas produzidas por *P.*
 17 *aeruginosa* que possuem atividade antimicrobiana e características físico-químicas que
 18 permitem com que sejam moléculas com capacidade de erradicação de biofilmes) encapsulados
 19 em lipossomos, reportaram que que a nisina incorporada aos rhamnossomos apresentou uma

1 redução de mais de 80% do crescimento do biofilme, tanto para as bactérias Gram-positivas (*S.*
2 *aureus* e *L. monocytogenes*) quanto Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) testadas, sendo
3 que a nisina pura não mostrou qualquer redução do biofilme das Gram-negativas. Já quando
4 testados nos biofilmes pré-formados, a nisina não apresentou qualquer redução significativa no
5 biofilme, devido a uma barreira mais rica e complexa que a matriz fornece às bactérias. Já
6 quando encapsulada, a nisina foi capaz de reduzir mais de 50% em massa o biofilme pré-
7 formado, devido à uma maior área de superfície que os lipossomos apresentam e permitem que
8 a nisina penetre com maior eficiência na matriz.

9 Nanoemulsões do óleo essencial de *Thymus daenensis*, assim como o óleo em sua forma
10 pura, foram estudados quanto à sua ação anti-biofilme de *A. baumannii* por Moghimi (2018) e
11 como resultado, obteve-se uma redução de 56,43% do biofilme quando tratado com 50% do
12 CIM da nanoemulsão do óleo, em comparação com uma redução de 20,65% quando tratado
13 com o óleo puro a uma mesma concentração. Quanto às AuNPs, Ahmed (2016) sintetizou
14 AuNPs com clorexidina e realizou testes anti-biofilme de isolados de *K. pneumoniae*. Como
15 resultado, as AuNPs funcionalizadas foram capazes de reduzir entre 80 e 90% do biofilme e de
16 células viáveis dos isolados bacterianos. Sintetizados com compostos majoritários de óleos
17 essenciais, como o cinamaldeído, as AuNPs também foram capazes de reduzir
18 significativamente o biofilme de *S. aureus* a uma porcentagem de 90% (Ramasamy et al., 2017).

19 A interação das nanopartículas (NPs) com o biofilme bacteriano irá depender de suas
20 características, como tamanho, formato, carga, hidrofobicidade e de seus grupos
21 funcionalizantes. No primeiro contato das NPs com a superfície externa do biofilme, elas irão
22 inevitavelmente interagir com uma ampla rede de macromoléculas que irão alterar suas
23 propriedades de superfície, e essa diferente superfície ficará conhecida como “corona
24 biomolecular”. Essa corona, uma vez na matriz extracelular do biofilme, irá modular a interação
25 das NPs com o biofilme. Uma vez em contato com a superfície bacteriana, as NPs irão causar
26 danos à membrana, posteriormente prejudicando o funcionamento do material genético,
27 proteínas e oxidação de componentes celulares, levando à morte celular (Fulaz et al., 2019).

29 **5.6 Atividade hemolítica**

30 Os peptídeos antimicrobianos são conhecidos por possuírem ação seletiva contra
31 membranas bacterianas e não contra células de mamíferos, fazendo com que sejam
32 considerados seguros para o uso terapêutico. Tal ação seletiva se deve ao arranjo das cadeias
33 hidrofóbicas e hidrofílicas dos peptídeos, que os tornam capazes de distinguir entre a superfície

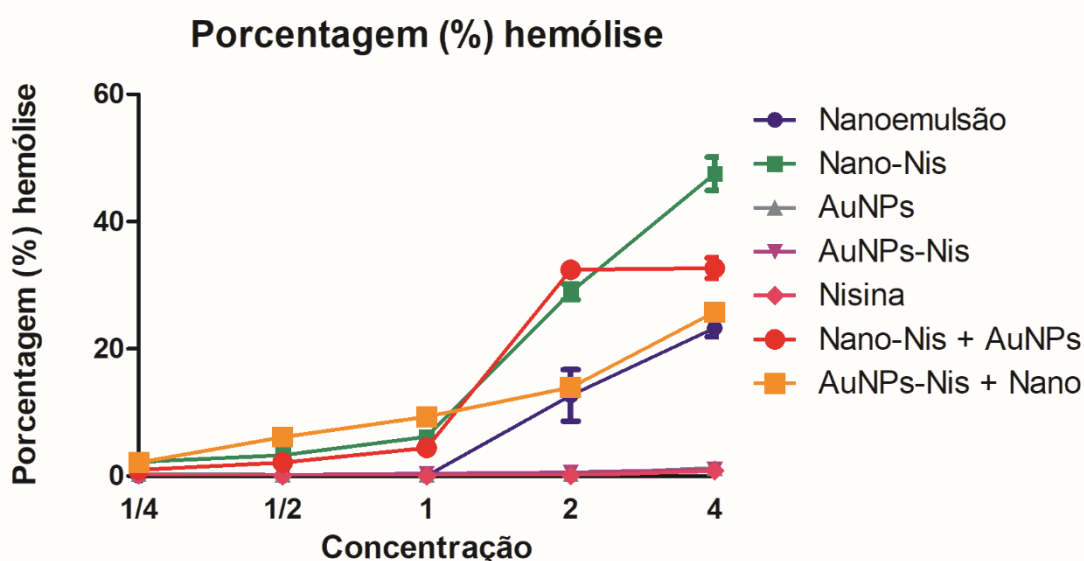
1 celular carregada mais negativamente (membranas bacterianas) e a membrana celular de
2 organismos multicelulares.

3 As hemácias são um dos modelos de estudo mais utilizados para avaliar a toxicidade de
4 determinado produto em mamíferos (Ilker et al., 2004). Variando as concentrações dos
5 produtos, desde $\frac{1}{4}$ do valor de CIM dos tratamentos para MRSA, até 4 vezes o valor de CIM,
6 os produtos foram testados em hemácias humanas para verificar a porcentagem de hemólise
7 que a nisina e seus encapsulamentos são capazes de causar. O experimento foi realizado em
8 triplicata, e a média dos valores da porcentagem de atividade hemolítica, estão indicados na
9 Tabela 12 e representados na Figura 14.

10

11 **Tabela 12.** Valores, em porcentagem (%), da atividade hemolítica causada pelos tratamentos
12 nas cinco diferentes concentrações testadas

	4xCIM	2xCIM	CIM	$\frac{1}{2}$ CIM	$\frac{1}{4}$ CIM
Nanoemulsão	23,0	16,5	0,0	0,0	0,0
Nano + Nis	47,5	28,9	6,2	3,5	2,2
AuNPs	1,2	0,3	0,0	0,0	0,0
AuNPs-Nis	1,6	0,6	0,0	0,0	0,0
Nisina	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0
Nano-Nis + AuNPs	32,7	32,4	4,4	2,1	1,0
AuNPs-Nis + Nano	25,4	13,9	9,5	6,2	3,0



13

14

Figura 14. Representação gráfica da porcentagem (%) de hemólise causada pelos tratamentos a diferentes concentrações: $\frac{1}{4}$ de CIM, $\frac{1}{2}$ CIM, CIM, 2xCIM e 4xCIM

15

1 Os tratamentos que apresentaram as menores porcentagens de hemólise foram as
2 AuNPs, AuNPs-Nis e a nisina onde, mesmo quando a concentração utilizada foi de quatro vezes
3 o valor de CIM para MRSA, elas não foram capazes de causar hemólise. Tal resultado corrobora
4 com uma das maiores vantagens da utilização das AuNPs na terapêutica, em que elas não
5 apresentam toxicidade ao hospedeiro. A nisina é um peptídeo reconhecida como GRAS e
6 aprovada pela FDA para o consumo por humanos. Mesmo na concentração de quatro vezes o
7 valor de CIM, que se apresentou em 6,25 µg/mL, é um valor bem abaixo do máximo
8 recomendado para o uso em alimentos. De acordo com a WHO (*World Health Organization*) e
9 com a FAO (*Food and Agriculture Organization*), os valores máximos de nisina pura que são
10 permitidos de serem aplicados em produtos derivados de carne, são de 5 a 25 mg/kg de
11 alimento.

12 No estudo de Pradeepa (2017), os autores também não obtiveram porcentagens
13 significativas de hemólise para AuNPs-Nis. Mesmo em elevadas concentrações (2500U/mL),
14 a viabilidade celular se manteve em mais de 89%, sugerindo que as nanopartículas são não-
15 tóxicas. Em estudos com outras bacteriocinas, como no trabalho de Teixeira (2008), os autores
16 estudaram a ação hemolítica de uma bacteriocina produzida por *Bacillus licheniformis*, na sua
17 forma pura e quando encapsulada em nanovesículas. Similar à nisina, a bacteriocina não
18 apresentou porcentagens significativas de hemólise. Entretanto, alguns peptídeos
19 antimicrobianos também podem se apresentar tóxicos por causarem altas taxas de hemólise,
20 como é o caso do peptídeo produzido por *Brevibacterium linens*, chamado de linenscin OC2.
21 No trabalho de Boucabeille (1997), esse peptídeo foi estudado com o objetivo de prevenir a
22 proliferação de *L. monocytogenes* em queijos. Quando testados em hemácias de ovelhas, a taxa
23 de hemólise se apresentou elevada, variando de acordo com o tempo de incubação e com a
24 concentração utilizada. Ocorreu 40% de hemólise em 30 minutos de incubação a uma
25 concentração de 7000 AU/mL, e 100% de hemólise em 1 hora a 3000 AU/mL. A melitina, outro
26 peptídeo antimicrobiano que possui um mecanismo de ação similar ao da nisina, apresentou
27 uma atividade hemolítica significativa no trabalho de Maher (2010), onde concentrações
28 variando de 4 a 11 µM foram capazes de atingir uma porcentagem de hemólise de 80 a 90%,
29 apresentando-se altamente tóxica.

30 Quando observados os tratamentos contendo a nanoemulsão, todas apresentaram uma
31 porcentagem maior de hemólise quando comparadas às amostras que não a possuem. De acordo
32 com a ASTM (Prática padrão para avaliação das propriedades hemolíticas dos materiais,
33 Sociedade Americana de Testes e Designação de Materiais: ASTM: F756-00), quando a

1 porcentagem de hemólise obtida é inferior a 2%, a amostra é considerada não-hemolítica, entre
2 2% e 5% é fracamente hemolítica e quando maior que 5%, hemolítica.

3 O tratamento de Nano-Nis apresentou-se hemolítica a partir da concentração de CIM,
4 onde foi capaz de causar 6,2%, evoluindo para 28,9% em 2 vezes o valor de CIM e chegando
5 em até 47,5% de hemólise em 4 vezes o valor de CIM. Da mesma forma, os outros tratamentos
6 contendo a nanoemulsão apresentaram valores elevados de hemólise. A nanoemulsão em
7 branco e a Nano-Nis + AuNPs apresentaram-se hemolíticas a partir de 2 vezes o CIM. Já a
8 AuNPs-Nis + Nano apresentou-se hemolítica desde a concentração de $\frac{1}{2}$ CIM até 4 vezes o
9 valor de CIM.

10 Uma das maiores problemáticas no uso de fármacos quimioterápicos é a toxicidade que
11 as altas doses desses medicamentos causam no organismo. Uma das alternativas para a
12 diminuição dessa toxicidade, tanto nas hemácias quanto nos tecidos, é o encapsulamento da
13 droga em nanoemulsões, visto que a interação da droga responsável pela hemólise com as
14 biomembranas será reduzida. Quando administradas via endovenosa, uma nova formulação de
15 polietileno-glicol encapsulada em nanoemulsão apresentou uma menor taxa de hemólise
16 quando comparada com a sua forma pura (Jeswani et al., 2015). Similarmente no trabalho de
17 Rajitha et al. (2019), nanoemulsão de metotrexato, um medicamento utilizado no tratamento da
18 psoríase, reduziu significativamente a porcentagem de hemólise após seu encapsulamento. Por
19 outro lado, as nanoemulsões também podem se apresentar tóxicas e causar hemólise, como nos
20 resultados obtidos por Krishnamoorthy et al. (2018), onde nanoemulsões de óleo de *Cleome*
21 *viscosa* se apresentaram cada vez mais tóxicas ao aumentar a sua concentração.

22 Um dos fatores que podem estar associados à uma maior porcentagem de hemólise dos
23 tratamentos com nanoemulsões neste estudo é a presença dos tensoativos Span 80 e Tween 20.
24 Quanto maior as concentrações dos surfactantes, maior suas temperaturas de incubação e maior
25 a duração do contato com as hemácias, devido à produção de micelas na camada lipídica da
26 membrana, maior serão seus efeitos tóxicos (Kaur et al., 2017). O aumento da temperatura, de
27 25°C a 42°C, acarretará em uma maior fluidez de membrana e conseqüentemente uma maior
28 permeabilidade. A presença de tensoativos mais hidrofóbicos levam a uma redução na
29 permeabilidade, resultando em menores efeitos hemolíticos (Noudeh et al., 2008).

30 Quanto à influência da concentração dos surfactantes nas amostras na lise celular, dois
31 processos são conhecidos, o de solubilização e o de lise osmótica. Quando os surfactantes se
32 encontram em elevadas concentrações, o principal mecanismo de lise celular é o da
33 solubilização, que ocorre quando o surfactante causa uma solubilização parcial ou completa dos
34 lipídios da membrana citoplasmática a partir da formação de micelas (Shalel et al., 2002).

1 Quando em concentrações mais baixas, há uma intercalação do surfactante na membrana celular
2 que induzirá alterações na sua permeabilidade (Aparicio et al., 2005).

3 No trabalho de Roggia (2019) foram sintetizados lipossomos contendo Tween 80 como
4 surfactante, e guaraná como composto ativo. No teste de hemólise, os lipossomos contendo
5 apenas o Tween 80, foram capazes de causar 100% de hemólise após 24 horas de incubação.
6 Além da toxicidade em hemácias já reportada, no estudo de Tatsuishi (2005), foi possível
7 observar que o Tween 80 aumentou a citotoxicidade *in vitro* em timócitos de ratos por causar
8 estresse oxidativo nas células, que já foi reportado como sendo um dos principais mecanismos
9 de toxicidade causados por nanomateriais (Brandelli, 2019).

11 **5.7 Extravasamento de proteínas**

12 O estudo do extravasamento proteico celular é um método para avaliar os danos que os
13 antimicrobianos são capazes de causar na membrana plasmática bacteriana, levando ao
14 extravasamento do conteúdo celular bacteriano para o meio. As concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de
15 proteínas liberadas dos tratamentos de nisina no tempo 0, tempo 1 e tempo 2 estão representadas
16 na Tabela 13, assim como na Figura 15.

17 Em todos os tratamentos realizados foi possível observar um aumento da concentração
18 de proteínas extravasadas em função do tempo. Quando comparamos as duas diferentes
19 concentrações dentro de um mesmo tratamento, pode-se observar que a Nano-Nis foi o
20 tratamento que apresentou melhor efeito no extravasamento proteico, apresentando uma
21 concentração de 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Ou seja, foi capaz de causar o maior dano à membrana de MRSA.
22 Da mesma forma, a nisina em sua forma pura e AuNPs-Nis + Nano também foram capazes de
23 causar um dano significativo às células bacterianas, como observado nos gráficos da Figura 15
24 e na Tabela 21, sendo que após 4 horas do início do tratamento, a nisina foi capaz de causar um
25 extravasamento proteico de 0,04 $\mu\text{g/ml}$ na concentração de CIM e 0,03 $\mu\text{g/ml}$ na de 2xCIM. Já
26 o tratamento AuNPs + Nano-Nis, também mostrou um valor considerável para extravasamento
27 proteico após 4 horas de experimentação, sendo também de 0,04 $\mu\text{g/ml}$. A nisina, uma vez
28 possuindo o seu modo de ação na membrana bacteriana, ao se ligar ao lipídio II, era esperado
29 que ocorresse um extravasamento proteico elevado em relação ao controle, o que significa que
30 a nisina foi capaz de realizar a sua ação sobre a membrana de MRSA.

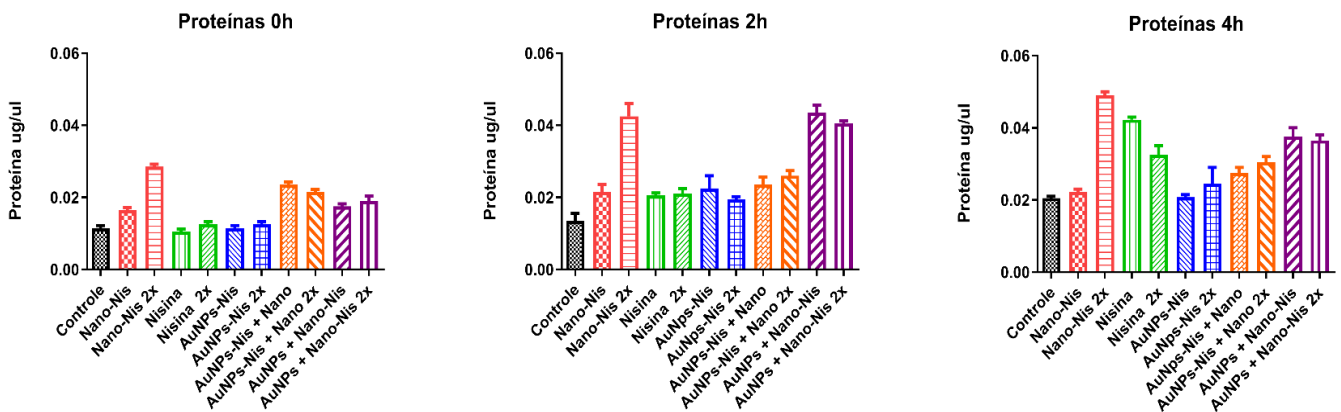
31 No trabalho de Zhang (2014), *S. aureus* tratado com nanoemulsão de limoneno causou
32 danos às membranas bacterianas podendo ser comprovado a partir da microscopia eletrônica de
33 varredura (MEV). Com a adição da nisina nessa nanoemulsão, os danos à membrana se
34 apresentaram mais intensificados, comprovados novamente a partir do MEV e pela medida da

1 absorvância do sobrenadante das culturas tratadas, sendo o maior extravasamento para *S. aureus*
 2 observado o tratamento de duas vezes o valor de CIM para a nanoemulsão com nisina. A
 3 bactéria que sofreu maiores danos com essa nanoemulsão foi *Bacillus subtilis*.

4

5 **Tabela 13.** Concentrações ($\mu\text{g/ml}$) de proteínas extravasadas de MRSA no tempo 0h, após 2h
 6 e 4h desde o início dos tratamentos em concentrações equivalentes ao CIM e duas vezes o seu
 7 valor

		Nisina		Nano-Nis		AuNPs-Nis		AuNPs-Nis + Nano		AuNPs + Nano-Nis	
		CIM	2 CIM	CIM	2 CIM	CIM	2 CIM	CIM	2 CIM	CIM	2 CIM
0h	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02
2h	0,01	0,02	0,02	0,02	0,04	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04	0,04
4h	0,02	0,04	0,03	0,02	0,05	0,02	0,02	0,03	0,03	0,04	0,04



8 **Figura 15.** Representações gráficas dos 3 tempos (0h, 2h e 4h) quanto às concentrações ($\mu\text{g/ml}$)
 9 de proteínas liberadas no sobrenadante, quando expostas a concentrações equivalentes ao CIM
 10 e a 2xCIM dos cinco diferentes tratamentos.

11

12 Assim como neste estudo, onde a nanoemulsão foi capaz de causar maiores danos às
 13 membranas de *S. aureus* quando comparamos à nisina em sua forma pura, segundo Prakash
 14 (2019) houve melhor atividade no extravasamento proteico de *Salmonella Typhimurium* pelas
 15 nanoemulsões de linalol quando comparado ao linalol em sua forma pura, chegando a causar
 16 um aumento de quatro vezes na absorvância lida. Com exceção da Nano-Nis, em que houve
 17 aumento significativo do extravasamento proteico quando comparadas ambas concentrações
 18 testadas, os outros tratamentos não apresentaram grandes diferenças entre uma e duas vezes o

1 valor de CIM. De forma semelhante ocorreu no estudo de Prakash (2019), onde tanto a
2 nanoemulsão quanto o linalol em sua forma pura não causaram um aumento significativo do
3 extravasamento proteico na concentração de duas vezes o valor de CIM.

4 Nanopartículas de ouro (AuNPs) também foram reportadas provocando o
5 extravasamento de conteúdo citoplasmático bacteriano, como no estudo de Vinosha (2019),
6 quando AuNPs sintetizadas com extrato de *Halymenia dilatata*, uma espécie de alga vermelha,
7 foram responsáveis por alterar a permeabilidade de membrana de *Aeromonas hydrophila*.
8 Como resultado, ocorreu o extravasamento do conteúdo citoplasmático em concentrações de
9 25 a 100 µg/ml, com desnaturação da membrana bacteriana. Consequentemente, ocorreu o
10 bloqueio da função respiratória, desestabilização da parede celular e a diminuição da atividade
11 de ATP que resultou em morte bacteriana.

12 De forma similar, no estudo de Manikandakrishnan (2019), AuNPs foram sintetizadas
13 com *Caulerpa racemosa*, uma espécie de alga verde comestível, e a sua ação sobre o
14 extravasamento proteico de *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas veronii* foi estudada, sendo
15 que em ambas as bactérias observou-se extravasamento do conteúdo citoplasmático conforme
16 as concentrações de AuNPs eram aumentadas nos ensaios. Os íons Au⁺, além de causarem
17 danos ao material genético, reagem com o grupo tiol na cadeia enzimática respiratória
18 bacteriana e assim, há inibição do processo respiratório (Manikandakrishnan et al., 2019).

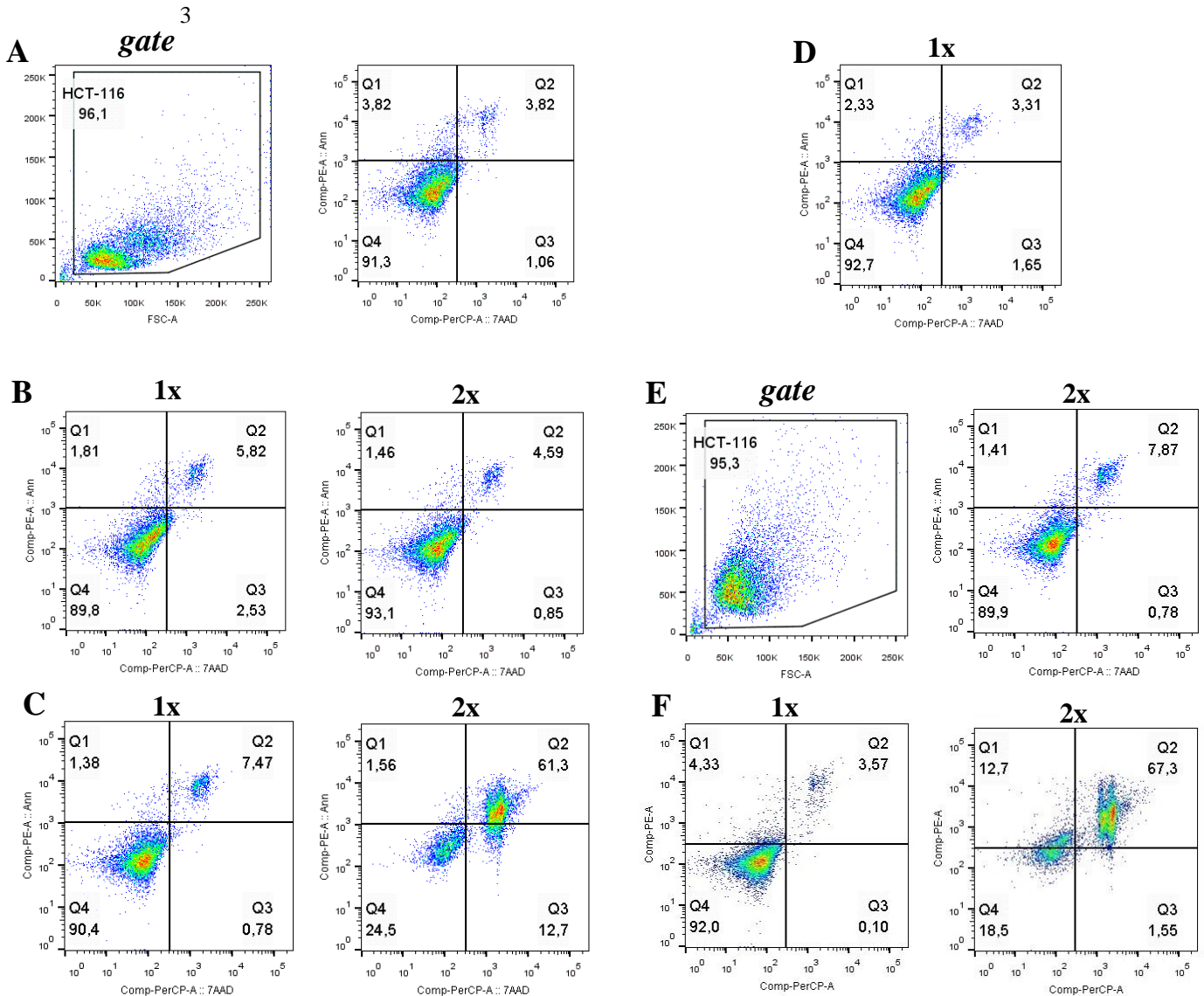
19 20 **5.8 Viabilidade celular**

21 O ensaio de viabilidade celular sobre a linhagem HCT-116 de células de câncer de cólon
22 retal foi realizado com o objetivo de elucidar a ação da nisina, AuNPs-Nis, Nano-Nis, bem
23 como a nanoemulsão sem a adição da nisina, sobre membranas celulares metastáticas de cólon
24 retal. Os gráficos *pseudocolor* resultantes da citometria de fluxo estão representados na Figura
25 16 e o gráfico da porcentagem de morte celular está representado na Figura 17.

26 Os tratamentos com nisina e AuNPs-Nis, tanto em concentrações de uma e duas vezes
27 o valor de CIM, não apresentaram toxicidade para a linhagem celular testada bem como
28 apresentado porcentagens baixas de necrose, não sendo significativamente necróticas quando
29 comparamos ao controle. A nisina em seu valor de 2 vezes o valor de CIM, apresentou 4,59%
30 de necrose, enquanto as AuNPs-Nis apresentaram 7,87% de necrose na mesma concentração.
31 Quanto aos valores de apoptose inicial, nenhum dos tratamentos apresentou porcentagem
32 significativa.

33 Os tratamentos de nanoemulsão e Nano-Nis apresentaram, na concentração de duas
34 vezes o valor de CIM, elevadas taxas de necrose, sendo a Nano-Nis sendo capaz de causar

- 1 61,3% de necrose, e 67,3% a nanoemulsão sem a nisina. Na concentração de uma vez o valor
- 2 de CIM, ambos os tratamentos não causaram taxas de necrose significativas.



4

5

6 **Figura 16.** Gráficos representando a viabilidade celular das células HCT-116 ao controle (A)

7 e tratadas, a concentrações 1 e 2 vezes valor de CIM para MRSA da nisina (B), Nano-Nis (C),

8 AuNPs-Nis 1xCIM (D), AuNPs-Nis 2XCIM (E) e Nanoemulsão 1 (F). As células vivas estão

9 representadas no quadrante 4 (Q4) onde Anexina (-) e 7-AAD (-), apoptose inicial no quadrante

10 1 (Q1) onde Anexina (+) e 7-AAD (-) e apoptose tardia/necrose no quadrante 2 (Q2) onde

11 Anexina (+) e 7-AAD (+). Os gráficos *gate* mostram o tamanho (FSC, eixo x) e granulosidade

12 (SSC, eixo y) das células.

13

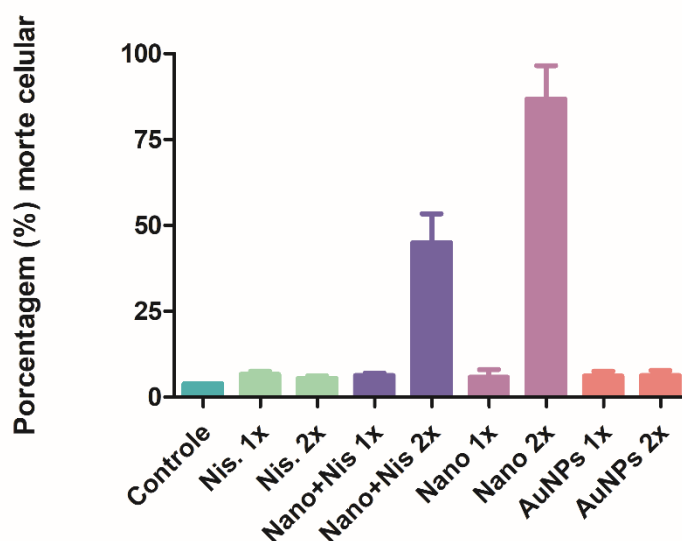


Figura 17. Porcentagem de morte celular de HCT-116 quando submetidas aos tratamentos nisina, Nano-Nis, nanoemulsão e AuNPS-Nis.

Segundo o gráfico de *gate* das AuNPs-Nis, quando na concentração de duas vezes o valor de CIM, por mais que não tenha ocorrido uma taxa significativa de apoptose inicial ou necrose, houve uma mudança na morfologia celular, como observado na Figura 16 (E). Quando comparamos ao *gate* do controle, na Figura 16 (A), o padrão de fluorescência foi alterado, apresentando células com morfologia mais complexa, com uma maior taxa de granulação. O eixo X dos gráficos de *gate* representam o tamanho celular, enquanto o eixo Y representa a complexidade celular quanto à granulação.

A nisina já foi testada em diversos estudos tanto quanto à sua citotoxicidade contra células tumorais de cólon retal, como em outras linhagens celulares tumorais. No estudo de Maher (2006), a nisina e outros peptídeos antimicrobianos foram estudados quanto aos seus efeitos contra as linhagens HT-29 e Caco-2, ambas tumorais de cólon retal. Dentre os sete peptídeos estudados, a nisina foi o segundo menos citotóxico para ambas as linhagens, sendo a galidermina o mais seguro e a melitina a mais tóxica. Ainda no estudo de Maher (2006), quanto à integridade do epitélio intestinal de Caco-2, a nisina não apresentou prejudicar a morfologia celular, podendo ser considerada como um peptídeo apropriado para o tratamento de infecções gastrointestinais (Maher et al., 2006). No estudo de Ahmadi (2017), a nisina também foi estudada quanto à sua citotoxicidade, dessa vez contra a linhagem celular de câncer de cólon retal SW480. Da concentração de 1000 a 4000 µg/mL, a nisina apresentou reduzir a viabilidade

1 celular em até 80%. De 1 a 750 µg/mL, a nisina não apresentou redução significativa da
2 viabilidade de SW480.

3 Dentre os metais nobres utilizados para a síntese de nanopartículas, entre eles o ouro,
4 prata e platina, as nanopartículas de ouro são consideradas as menos tóxicas, principalmente
5 pela sua natureza inerte. Quando observamos toxicidade das AuNPs em estudos com linhagens
6 celulares, o efeito tóxico pode ocorrer devido à linhagem celular utilizada, à composição
7 química da superfície celular e pelo tamanho das AuNPs (Kamal et al., 2018).

8 Da mesma forma que no presente estudo, onde as AuNPs com nisina não causaram
9 apoptose ou necrose, no estudo de Preet (2019), a adição da nisina a uma solução de AuNPs
10 também não foi capaz de causar uma redução significativa na massa de melanoma induzido em
11 ratos quando comparados à ação das AuNPs administradas sozinhas. Kim (2017) estudou a
12 citotoxicidade de AuNPs conjugadas com ácido gálico em linhagem embrionária de
13 fibroblastos de ratos (MEF), de concentrações de 1 a 400 ppm. Após 24 horas de tratamento,
14 foi constatada uma viabilidade celular de mais de 75% nas concentrações inferiores a 50 ppm.
15 Por fim, similar ao presente estudo, Shukla (2005) comprovou em seu trabalho que AuNPs não
16 apresentaram citotoxicidade em concentrações de até 100 µM, em 72 horas de incubação, em
17 linhagem RAW264.7 de macrófagos, se apresentando como uma alternativa segura para a
18 aplicação em nanoimunologia e nanobiotecnologia.

19 O encapsulamento de moléculas lipídicas em nanotecnologia é conhecido por otimizar
20 a dispersão do lipídio no meio e, quando estudados quanto à sua ação antitumoral, há uma
21 otimização na entrega do componente encapsulado às células tumorais (Guan et al., 2019). No
22 estudo de Guan (2019), o autor estudou o encapsulamento do éster fenético do ácido cafeico
23 (CAPE), um composto fenólico natural, em micelas de escala nanométrica, com um éster de
24 sacarose (SFAE) agindo como um surfactante não-iônico. O encapsulado CAPE-SFAE foi
25 estudado quanto à sua citotoxicidade contra a linhagem HCT-116 e, como resultados, o autor
26 obteve porcentagens elevadas de inibição das células, chegando a mais de 80% quando em
27 concentração de 20 µg/mL. A essa mesma concentração, quando o SFAE administrado com
28 apenas 0,3% de timol, também houve uma inibição celular de aproximadamente 50%.

29 No estudo de Staka (2019), foram sintetizadas nanoemulsões do quimioterápico
30 Gemcitabina (GEM), contendo quatro surfactantes distintos, dentre eles o Tween 80 e CTAB.
31 Como resultado, similar ao presente estudo, quando testados em linhagem HCT-116 e em
32 linhagem de células tumorais pancreáticas resistentes à GEM, as nanoemulsões sem a adição
33 de GEM apresentaram efeito citotóxico semelhante à nanoemulsão com o encapsulamento de
34 GEM sobre a linhagem resistente, tendo como principal sugestão que a formulação da

1 nanoemulsão apresentava algum de seus compostos como responsável pela toxicidade, sendo
2 este efeito relacionado ao surfactante CTAB utilizado. Da mesma forma, no estudo de Alkhatib
3 (2014), microemulsões contendo ou não o fármaco sinvastatina, apresentaram semelhante
4 citotoxicidade sobre a linhagem HCT-116. Ou seja, ambas as formulações das microemulsões
5 foram capazes de diminuir para até 17% a viabilidade celular.

6 Na concentração de duas vezes o valor de CIM para as nanoemulsões, a porcentagem
7 de necrose celular foi bastante elevada, tanto para a nanoemulsão contendo a nisina quanto para
8 a nanoemulsão branco, ou seja, sem inclusão da nisina. A participação dos surfactantes nas
9 emulsões possui como objetivo melhorar a solubilidade e a absorção de compostos lipídicos.
10 Esse mecanismo de absorção possui relação direta com os danos causados nas membranas
11 lipídicas celulares e proteínas de membrana. Estudos bioquímicos relataram que o aumento da
12 permeabilidade das membranas celulares causadas por surfactantes possui relação com a
13 natureza do surfactante, sua carga elétrica, polaridade e o tipo de membrana na qual estará
14 agindo (Kaur et al., 2017).

15 A toxicidade do Tween já foi reportada na literatura, onde dentre Tween 20, 40, 60 e
16 80, o que apresentou uma menor taxa de hemólise no estudo de Noudeh (2008) foi o Tween 80
17 devido ao seu maior valor de EHL. O Tween 20, por outro lado, foi o surfactante que causou
18 uma das maiores taxas de hemólise, chegando a quase 100%. Ou seja, quanto mais hidrofóbico
19 um surfactante, menor a sua afinidade com a membrana celular, acarretando em uma
20 permeabilidade reduzida e em uma menor taxa de hemólise.

21 No estudo de Omokawa (2010), vesículas de Span 80 contendo *Eucheuma serra*
22 aglutinina, uma espécie de alga marinha, foram sintetizadas e testadas quanto à sua atividade
23 apoptótica sobre a linhagem Colo201 de câncer de cólon. No teste de viabilidade celular, foram
24 estudadas as ações anti-câncer de vesículas de Span 80 contendo *Eucheuma serra* e apenas
25 Span 80. Por mais que as vesículas contendo o composto ativo *E. serra* tenha causado uma
26 diminuição na viabilidade celular para 17%, o tratamento apenas com Span 80 também foi
27 capaz de reduzir a viabilidade celular para 55%.

6. Conclusão

A nanotecnologia é amplamente utilizada em diversas áreas, sendo dentre estas também na microbiologia médica. Isto se confirmou, pois a incorporação da nisina em nanoemulsões e nanopartículas de ouro (AuNPs) possibilitou que sua ação antibacteriana fosse otimizada com redução na concentração necessária para a inibição bacteriana quando comparado aos testes na sua forma pura.

A utilização da nisina mostrou ser uma alternativa potencial na antibioticoterapia em especial para doenças provocadas por *S. aureus*. Além de possuir significativa atividade antibacteriana, os tratamentos estudados contendo AuNPs e nanoemulsões se mostraram, em sua maioria, seguras quanto à toxicidade sobre hemácias e células tumorais de cólon. Por outro lado, os ensaios com as nanoemulsões apresentaram-se tóxicas quando testadas em concentrações superiores a CIM obtidas, ou seja, em concentrações acima daquelas necessárias para obtenção da morte dos *S. aureus* testados.

A síntese de nanoemulsões e AuNPs, e suas aplicações, se mostraram eficazes além de serem alternativas potenciais para o seu uso futuro sobre outras bactérias Gram-positivas, e possivelmente em Gram-negativas, com o objetivo de otimizar a ação destes compostos ativos, capazes de contribuir para minimizar o problema da resistência aos fármacos antimicrobianos e reduzir a quantidade dos compostos ativos necessários para tal finalidade.

7 Referências bibliográficas

- ADAMS F. C., BARBANTE C. Nanoscience, nanotechnology and spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 86, pp. 3-13, 2013.
- ADAMS M. R., MOSS M. O. Bacterial agents of foodborne illness—*Staphylococcus aureus*. **Food Microbiology**, 2008.
- AHMAD V., KHAN M. S., JAMAL Q. M. S., ALZOHAIY M. A., KARAAWI M. A., SIDDIQUI M. U. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, pp. 1-11, 2017.
- AHMADI S., GHOLLASI M., HOSSEINI H. M. The apoptotic impact of nisin as a potent bacteriocin on the colon cancer cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, pp. 193-197, 2017.
- AHMED A., KHAN A. K., ANWAR A., ALI S. A., SHAH M. R. Biofilm inhibitory effect of chlorhexidine conjugated gold nanoparticles against *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 98, pp. 50-56, 2016.
- ALBANO M., ALVES F. C. B., ANDRADE B. F. M. T., BARBOSA L. N., PEREIRA A. F. M., CUNHA M. L. R. S., RALL V. L. M., FERNANDES JÚNIOR A. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, pp. 83-90, 2016.
- ALKHATIB M. H., AL-MERABI S. S. In vitro assessment of the anticancer activity of simvastatin-loaded microemulsion in liver and colon cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 24, pp. 373-379, 2014.
- ALMATAR M., MAKKY E. A., YAKICICIŞIL G., KAYAR V. B., KOKSAL F. Antimicrobial peptides as an alternative to anti-tuberculosis drugs. **Pharmacological Research**, v. 128, pp. 288-305, 2018.
- ALVES F. C. B., BARBOSA L. N., ANDRADE B. F. M. T., ALBANO M., FURTADO F. B., PEREIRA A. F. M., RALL V. L. M., FERNANDES JÚNIOR A. Short communication: Inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cow milk. **Journal of Dairy Science**, v. 99, pp. 1831-1836, 2016.
- ANDERSSON D. I. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Drug Resistance Updates**, v. 26, pp. 43-57, 2016.
- ANDREU D., RIVAS L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47, pp. 415-433, 1998.

1
2 ANTONIO B., MARIA R. C., MILENA S. The Microbiological Quality of Food. Woodhead
3 Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; 2017.
4
5 APARICIO R. M., GARCÍA-CELMA M. J., VINARDELL M. P., MITJANS M. In vitro
6 studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of**
7 **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, pp. 1063-1067, 2005.
8
9 ARAKHA M., BORAH S. M., SALEEM M., JHA A. N., JHA S. Interfacial assembly at silver
10 nanoparticle enhances the antibacterial efficacy of nisin. **Free Radical Biology and Medicine**,
11 v. 101, pp. 434-445, 2016.
12
13 ARCHER N. K., MAZAITIS M. J., COSTERTON J. W., LEID J. G., POWERS M. E.,
14 SHIRTLIFF M. E. *Staphylococcus aureus* biofilms properties, regulation and roles in human
15 disease. **Virulence**, v. 2, pp. 445-459, 2011.
16
17 ARVIZO R. R., BHATTACHARYYA S., KUDGUS R. A., GIRI K., BHATTACHARYAA
18 R., MUKHERJEE P. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past,
19 present and future. **The Royal Society of Chemistry**, 2012.
20
21 BALCIUNAS E. M., MARTINEZ F. A. C., TODOROV S. D., FRANCO B. D. G. M.,
22 CONVERTI A., OLIVEIRA R. P. S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A
23 review. **Food Control**, v. 32, pp. 134-142, 2013.
24
25 BENGTTSSON-PALME J., LARSSON D. G. J. Antibiotic resistance genes in the environment:
26 prioritizing risks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 396, 2015.
27
28 BOCCHINFUSO G., PALLESCHI A., ORIONI B. Different mechanisms of action of
29 antimicrobial peptides: insights from fluorescence spectroscopy experiments and molecular
30 dynamics simulations. **Journal of Peptide Science**, v. 15, pp. 550-558, 2009.
31
32 BORBA C. M., TAVARES M. N., MACEDO L. P., ARAÚJO G. S., FURLONG E. B., DORA
33 C. L., BURKET J. F. M. Physical and chemical stability of β -carotene nanoemulsions during
34 storage and thermal process. **Food Research International**, v. 121, pp. 229-237, 2019.
35
36 BOUCABEILLE C., MENGIN-LECREULX D., HENCKES G., SIMONET J. M., VAN
37 HEIJENOORT J. Antibacterial and hemolytic activities of linenscin OC2, a hydrophobic
38 substance produced by *Brevibacterium linens* OC2. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, pp.
39 295-301, 1997.
40
41 BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
42 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**,
43 v. 72, pp. 248-254, 1976.
44

- 1 BREIDENSTEIN E. B., DE LA FUENTE-NÚÑES C., HANCOCK R. E. *Pseudomonas*
2 *aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v. 19, pp. 419-426, 2011.
3
- 4 BREUKINK E., VAN HEUSDEN H. E., VOLLMERHAUS P. J., SWIEZEWSKA E.,
5 BRUNNER L., WALKER S., HECK A. J. R., KRUIJFF B. Lipid II Is an Intrinsic Component
6 of the Pore Induced by Nisin in Bacterial Membranes. **The Journal of Biological Chemistry**,
7 v. 278, pp. 19898-19903, 2003.
8
- 9 BROGDEN K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?
10 **Nature Reviews Microbiology**, 2005.
11
- 12 BUI L. M. G., TURNIDGE J. D., KIDD S. P. The induction of *Staphylococcus aureus* biofilm
13 formation or Small Colony Variants is a strain-specific response to host-generated chemical
14 stresses. **Microbes and Infection**, v. 17, pp. 77-82, 2015.
15
- 16 CARMONA-RIBEIRO A. M., CARRASCO L. D. M. Novel Formulations for **Antimicrobial**
17 **Peptides**, v. 15, pp. 18040-18083, 2014.
18
- 19 CASTELANI L., ARCARO J. R. P., BRAGA J. E. P., BOSSO A. S., MOURA Q., ESPOSITO
20 F., SAUTER I. P., CORTEZ M., LINCOPAN N. Short communication: Activity of nisin, lipid
21 bilayer fragments and cationic nisin-lipid nanoparticles against multidrug-resistant
22 *Staphylococcus spp.* isolated from bovine mastites. **Journal of Dairy Science**, v. 102, pp. 678-
23 683, 2019.
24
- 25 CHAARI M., THEOCHARI I., PAPADIMITRIOU V., XENAKIS A., AMMARA E.
26 Encapsulation of carotenoids extracted from halophilic Archaea in oil-in-water (O/W) micro-
27 and nano-emulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 161, pp. 219-227, 2018.
28
- 29 CHATTORAJ P., MOHAPATRA S. S., RAO J. L. Regulation of transcription by SMU.1349,
30 a TetR family regulator, in *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, pp. 6605-
31 6613, 2011.
32
- 33 CHEN Z., SHU G., TAARJI N., BARROW C. J., NAKAJIMA M., KHALID N., NEVES M.
34 A. Gypenosides as natural emulsifiers for oil-in-water nanoemulsions loaded with astaxanthin:
35 Insights of formulation, stability and release properties. **Food Chemistry**, v. 261, pp. 322-328,
36 2018.
37
- 38 CHUESIANG P., SIRIPATRAWAN U., SANGUANDEEKUL R., YANG J. S.,
39 MCCLEMENTS D. J., MCLANDSBOROUGH L. Antimicrobial activity and chemical
40 stability of cinnamon oil in oil-in-water nanoemulsions fabricated using the phase inversion
41 temperature method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 110, pp. 190-196, 2019.
42

1 CHUNG P. Y., KHANUM R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against
2 multidrugresistant bacteria. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, pp.
3 405-410, 2017.
4
5 CIMOLAI N. MRSA and the environment: implications for comprehensive control measures.
6 **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, pp. 481-493, 2008.
7
8 CIUMAC D., GONG H., HU X., LU J. R. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides.
9 **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 537, pp. 163-185, 2019.
10
11 COSTERTON J. W., LEWANDOWSKI Z., CALDWELL D. E., KORBER D. R., LAPPIN-
12 SCOTT H. M. Microbial biofilms. **Annual Review Microbiology**, v. 49, pp. 711-745, 1995.
13
14 COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food.
15 **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, pp. 777-788, 2005.
16
17 COTTER P. D. Bioengineering: a bacteriocin perspective. **Bioengineered**, v. 3, pp. 313-319,
18 2012.
19
20 COTTER P. D. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews**
21 **Microbiology**, v. 11, pp. 95-105, 2013.
22
23 CUI H., WEBBER M. J., STUPP S. I. Self-assembly of peptide amphiphiles: from molecules
24 to nanostructures to biomaterials. **Peptide Science**, v. 94, pp. 1-18, 2014.
25
26 DÁVILA-RODRÍGUEZ M., LÓPEZ-MALO A., RAMÍREZ-CORON E. P. N., JIMÉNEZ-
27 MUNGUÍ M. T. Antimicrobial activity of nanoemulsions of cinnamon, rosemary, and oregano
28 essential oils on fresh celery. **LWT - Food Science and Technology**, v. 112, 2019.
29
30 DEFLAUN M. F., LEVY S. B. Genes and their varied hosts. **Gene Transfer in the**
31 **Environment**, p. 1-32, 1989.
32
33 DEINHARDT-EMMER S., SACHSE S., GERACI J., FISCHER C., KWETKAT A.,
34 DAWCZYNSKI K., TUCHSCHERR L., LOFFLER B. Virulence patterns of Staphylococcus
35 aureus strains from nasopharyngeal colonization *S. aureus*. **Journal of Hospital Infection**, v.
36 100, pp. 309-315, 2018.
37
38 DE LA FUENTE-NÚÑEZ C., SILVA O. N., LU T. K., FRANCO O. L. Antimicrobial peptides:
39 Role in human disease and potential as immunotherapies. **Pharmacology & Therapeutics**, v.
40 178, pp. 132-140, 2017.
41
42 DE LINTON M. A. R., Resistencia a Antibióticos y sus Mecanismos – Parte I. Disponível em:
43 <http://afqfelsalvador.com/resistencia-a-antibioticos-y-sus-mecanismos-parte-i/>. Acessado em:
44 10 de setembro de 2019.

1
2 DELVES-BROUGHTON J., BLACKBURN P., EVANS R. J., HUGENHOLTZ J.
3 Applications of the bacteriocin, nisin. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 69, pp. 193-202, 1996.
4
5 DENNISON S. R., WALLACE J., HARRIS F., PHOENIX D. A. Amphiphilic alpha-helical
6 antimicrobial peptides and their structure/function relationships. **Protein Peptide Letter**, v. 12,
7 pp. 31-39, 2005.
8
9 DOMINGUES S., NIELSEN K. M. Membrane vesicles and horizontal gene transfer in
10 prokaryotes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 38, pp. 16-21, 2017.
11
12 DU L. F., LIU W. K. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A
13 review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, pp. 309-327, 2012.
14
15 EHRENSTEIN G., LECAR H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. **Quarterly**
16 **Reviews of Biophysics**, v. 10, pp. 1-34, 1977.
17
18 ELAHI N., KAMALI M., BAGHERSAD M. H. Recent biomedical applications of gold
19 nanoparticles: A review. **Talanta**, v. 184, pp. 537-556, 2018
20
21 EPAND R. M., VOGEL H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of
22 action. **BBA – Biomembrane**, v. 1462, pp. 11-28, 1999
23
24 FEDTKE I., GOTZ F., PESCHEL A. Bacterial evasion of innate host defenses – the
25 *Staphylococcus aureus* lesson. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, pp.
26 189-194, 2004.
27
28 FRIDKIN S. K., STEWARD C. D., EDWARDS J. R. Surveillance of antimicrobial use and
29 antimicrobial resistance in United States hospitals: project ICARE phase 2. **Clinical Infectious**
30 **Diseases**, v. 29, pp. 245-252, 1999.
31
32 FRIEDMAN N. D., TEMKIN E., CARMELI Y. The negative impact of antibiotic resistance.
33 **Clinical Microbiology Infection**, v. 22, pp. 416-422, 2015.
34
35 FULAZ S., VITALE S., QUINN L., CASEY E. Nanoparticle–Biofilm Interactions: The Role
36 of the EPS Matrix. **Trends in Microbiology**, v. xx, pp. 1-12, 2019.
37
38 GADKARI P. V., BALARAMAN M. Extraction of catechins from decaffeinated green tea for
39 development of nanoemulsion using palm oil and sunflower oil based lipid carrier systems.
40 **Journal of Food Engineering**, v. 147, pp. 14-23, 2015.
41
42 GALVEZ A., ABRIOUEL H., LOPEZ R. L., BEN OMAR N. Bacteriocin-based strategies for
43 food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, pp. 51-70, 2007.
44

- 1 GATADI S., GOUR J., NANDURI S. Natural product derived promising anti-MRSA drug
2 leads: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, pp. 3760-3774, 2019.
- 3
- 4 GHOSH C., SARKAR P., ISSA R., HALDAR J. Alternatives to Conventional Antibiotics in
5 the Era of Antimicrobial Resistance. **Trends in Microbiology**, v. 27, pp. 323-338, 2019.
- 6
- 7 GHOSH V., MUKHERJEE A., CHANDRASEKARAN N. Ultrasonic emulsification of food-
8 grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics**
9 **Sonochemistry**, v. 20, pp. 338-344, 2013.
- 10
- 11 GOLDMANN O., MEDINA E. Staphylococcus aureus strategies to evade the host acquired
12 immune response. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, pp. 625-630,
13 2018.
- 14
- 15 GOMASHE A. V., DHARMIK P. G. Synergistic Effect of Gold Nanoparticles and Bacteriocin
16 Against Food Blemishing Microbes: A Novel Approach for Food Packaging Material
17 Preparation. **Global Journal For Research Analysis**, v. 3, pp. 1-3, 2014.
- 18
- 19 GOYAL G., HWANG J., AVIRAL J., SEO Y., JO Y., SON J., CHOI J. Green synthesis of
20 silver nanoparticles using β -glucan, and their incorporation into doxorubicin-loaded water-in-
21 oil nanoemulsions for antitumor and antibacterial applications. **Journal of Industrial and**
22 **Engineering Chemistry**, v. 47, pp. 179-186, 2017.
- 23
- 24 GRUMANN D., NUBEL U., BROKER B. M. *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions
25 and genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, pp. 583-592, 2014.
- 26
- 27 GUAN Y., CHEN H., ZHONG Q. Nanoencapsulation of caffeic acid phenethyl ester in sucrose
28 fatty acid esters to improve activities against cancer cells. **Journal of Food Engineering**, v.
29 246, pp. 125–133, 2019
- 30
- 31 HAABER J., PENADÉS J. R., INGMER H. Transfer of Antibiotic Resistance in
32 *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 25, pp. 893-905, 2017.
- 33
- 34 HAFFNER S. M., MALMSTEN M. Influence of self-assembly on the performance of
35 antimicrobial peptides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 38, pp. 56-79,
36 2018.
- 37
- 38 HASPER H. E., DE KRUIFF B., BREUKINK E. Assembly and Stability of Nisin-Lipid II
39 Pores. **Biochemistry**, v. 43, pp. 11567-11575, 2004.
- 40
- 41 HERNANDO-AMADO S., BLANCO P., ALCALDE-RICO M., CORONA F., REALES-
42 CALDERÓN J. A., SÁNCHEZ M. B., MARTÍNEZ J. L. Multidrug efflux pumps as main
43 players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. **Drug Resistance Updates**, v. 28,
44 pp. 13-27, 2016.

1
2 HOLS P., LEDESMA-GARCÍA L., GABANT P., MIGNOLET J. Mobilization of Microbiota
3 Commensals and Their Bacteriocins for Therapeutics. **Trends in Microbiology**, v. 27, pp. 690-
4 702, 2019.

5
6 ILKER M. F., NUSSLEIN K., TEW G. N., COUGHLIN E. B. Tuning the Hemolytic and
7 Antibacterial Activities of Amphiphilic Polynorbornene Derivatives. **Journal of American**
8 **Chemical Society**, v. 126, pp. 15870-15875, 2004.

9
10 JAIN R., RIVERA M. C., LAKE J. A. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity
11 hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, pp. 3801-3806, 1999.

12
13 JESWANI G., ALEXANDER A., SARAF S., SARAF S., AJAZUDDIN A. Q. Recent
14 approaches for reducing hemolytic activity of chemotherapeutic agents. **Journal of Controlled**
15 **Release**, v. 211, pp. 10-21, 2015.

16
17 KAHL B. C. Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus* – A bacterial survival
18 strategy. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, pp. 515-522, 2014.

19
20 KAMAL R., CHADHA V. D., DHAWAN D. K. Physiological uptake and retention of
21 radiolabeled resveratrol loaded gold nanoparticles (^{99m}Tc-Res-AuNP) in colon cancer tissue.
22 **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, pp. 1059-1071, 2018.

23
24 KAREMORE M. N., AVARI J. G. Zeta potential as a novel diagnostic tool for preeclampsia.
25 **Pregnancy Hypertension**, v. 13, pp. 187-197, 2018.

26
27 KAUR G., MEHTA S. K. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions:
28 Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. **International Journal of**
29 **Pharmaceutics**, v. 529, pp. 134-160, 2017.

30
31 KHAN M. H., RAMALINGAM K. Synthesis of antimicrobial nanoemulsions and its
32 effectuality for the treatment of multi-drug resistant ESKAPE pathogens. **Biocatalysis and**
33 **Agricultural Biotechnology**, v. 18, 2019.

34
35 KHAMENEH B., ROUDAYNA D., GHAZVINI K., BAZZAZ B. S. F. Breakthroughs in
36 bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. **Microbial**
37 **Pathogenesis**, v. 95, pp. 32-42, 2016.

38
39 KHEZERLOU A., ALIZADEH-SANI M., AZIZI-LALABADI M., EHSANI A. Nanoparticles
40 and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and
41 viroses. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, pp. 505-526, 2018.

42

1 KIM Y., KIM M., SHINDE S., SUNG J., GHODAKE G. Cytotoxicity and antibacterial
2 assessment of gallic acid capped goldnanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**,
3 v. 149, pp. 162–167, 2017.
4
5 KNERR P. J., VAN DER DONK W. A. Discovery, biosynthesis, and engineering of
6 lantipeptides. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, pp. 479-505, 2012.
7
8 KOEHBACH J., CRAIK D. J. The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. **Trends**
9 **in Pharmacological Sciences**, v. 40, pp. 517-528, 2019.
10
11 KOOPMANS T., WOOD T. M., HART P., KLEIJN L. H. J., HENDRICK A. P. A., WILLEMS
12 R. J. L., BREUKINK E., MARTIN N. I. Semisynthetic Lipopeptides Derived from Nisin
13 Display Antibacterial Activity and Lipid II Binding on Par with That of the Parent Compound.
14 **Journal of American Chemistry Society**, v. 137, pp. 9382-9389, 2015.
15
16 KRISHNAMOORTHY R., ATHINARAYANAN J., PERIASAMY V. S., ADISA A. R., AL-
17 SHUBIABER M. A., GASSEM M. A., ALSHATWI A. A. Antimicrobial activity of
18 nanoemulsion on drug-resistant bacterial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 120, pp. 85-
19 96, 2018.
20
21 KUMAR A., MA H., ZHANG X., HUANG K., JIN S., LIU J., WEI T., CAO W., ZOU G.,
22 LIANG X. J. Gold nanoparticles functionalized with therapeutic and targeted peptides for
23 cancer treatment. **Biomaterials**, v. 33, pp. 1180-1189, 2012.
24
25 LE LOIR Y., BARON F., GAUTIER M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics**
26 **and Molecular Research**, v. 2, pp. 63-76, 2003.
27
28 LI B., YANG Y., MA L., JU F., GUO F., TIEDJE J. M., ZHANG T. Metagenomic and network
29 analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance
30 genes. **The ISME Journal**, v. 9, pp. 2490-2502, 2015.
31
32 LIAN H., PENG Y., SHI J., WANG Q. Effect of emulsifier hydrophilic-lipophilic balance
33 (HLB) on the release of thyme essential oil from chitosan films. **Food Hydrocolloids**, v. 97,
34 2019.
35
36 LIN C. Y., CHEN L. W. Comparison of fuel properties and emission characteristics of two-
37 and three-phase emulsions prepared by ultrasonically vibrating and mechanically
38 homogenizing emulsification methods. **Fuel**, v. 87, pp. 2154-2161, 2008.
39
40 LIN L., HU J. Y., WU Y., CHEN M., OU J., YAN W. L. Assessment of the inhibitory effects
41 of sodium nitrite, nisin, potassium sorbate, and sodium lactate on *Staphylococcus aureus*
42 growth and staphylococcal enterotoxin A production in cooked pork sausage using a predictive
43 growth model. **Food Science and Human Wellness**, v. 7, pp. 83-90, 2018.
44

- 1 LOFTUS R. W., DEXTER F., ROBINSON A. D. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus*
2 *aureus* has greater risk of transmission in the operating room than methicillin-sensitive *S aureus*.
3 **American Journal of Infection Control**, v. 46, pp. 520-525, 2018.
4
- 5 LYRA, L.P.S. “Desenvolvimento de nanoemulsão de geraniol e óleo essencial de palmarosa
6 (*Cymbopogon martinii*) e sua ação inibitória sobre linhagens de *Cutibacterium acnes*. 2019.
7 128 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Instituto de Biociências,
8 Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.
9
- 10 MACGOWAN A., MACNAUGHTON E. Antibiotic resistance. **Medicine**, pp. 622-628, 2017.
11
- 12 MAHER S., DEVOCELLE M., RYAN S., MCCLEAN S., BRAYDEN D. J. Impact of amino
13 acid replacements on in vitro permeation enhancement and cytotoxicity of the intestinal
14 absorption promoter, melittin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 387, pp. 154-160,
15 2010.
16
- 17 MAHER S., MCCLEAN S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic
18 antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 71,
19 pp. 289–1298, 2006.
20
- 21 MANDAL S. M., GHOSH A. K., PATI B. R. Dissemination of antibiotic resistance in
22 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S aureus* strains isolated
23 from hospital effluents. **American Journal of Infection Control**, v. 43, pp. 87-88, 2015.
24
- 25 MANIKANDAKRISHNAN M., PALANISAMY S., VINOSHA M., KALANJIARAJA B.,
26 MOHANDOSS S., MANIKANDAN R., TABARSA M., YOU S. G., PRABHU N. M. Facile
27 green route synthesis of gold nanoparticles using *Caulerpa racemosa* for biomedical
28 applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, pp. 1-11, 2019.
29
- 30 MANN E. E., RICE K. C., BOLES B. R., ENDRES J. L., RANJIT D., CHANDRAMOHAN
31 L. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm
32 maturation. **PLoS One**, v. 4, 2009.
33
- 34 MARTÍN-ESCOLANO R., CEBRIÁN R., MARTÍN-ESCOLANO J., ROSALES M. J.,
35 MAQUEDA M., SÁNCHEZ-MORENO M., MARÍN C. Insights into Chagas treatment based
36 on the potential of bacteriocin AS-48. **International Journal for Parasitology: Drugs and**
37 **Drug Resistance**, v. 10, pp. 1-8, 2019.
38
- 39 MARTINEZ J. L., COQUE T. M., BAQUERO F. What is a resistance gene? Ranking risk in
40 resistomes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, pp. 116-123, 2015.
41
- 42 MCAULIJE O., ROSS R. P., HILL C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action.
43 **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, pp. 285-308, 2001.
44

- 1 MCCLEMENTS D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and
2 similarities. **Soft Matter**, v. 8, pp. 1719-1729, 2012.
- 3
- 4 MCCLEMENTS D. J., DECKER E. A. Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of
5 Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. **Journal of**
6 **Food Science**, v. 65, 2000
- 7
- 8 MEI L., ZHANG X., WANG Y., ZHANG W., LU Z., LUO Y., ZHAO Y., LI C. Multivalent
9 polymer–Au nanocomposites with cationic surfaces displaying enhanced antimicrobial activity.
10 **Polymer Chemistry**, v. 5, 2014
- 11
- 12 MEKONNEN S. A., MEDINA L. M. P., MICHALIK S., LORETI M. G., SALAZAR M. G.,
13 VAN DIJL J. M., VOLKER U. Metabolic niche adaptation of community- and hospital-
14 associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Proteomics**, v. 193, pp.
15 154-161, 2019.
- 16
- 17 MENDEM S. K., GANGADHARA T. A., SHIVANNAVAR C. T., GADDAD S. M. Antibiotic
18 resistance patterns of *Staphylococcus aureus*: A multi center study from India. **Microbial**
19 **Pathogenesis**, v. 98, pp. 167-170, 2016.
- 20
- 21 MILTZ J., RYDLO T., MOR A., POLYAKOV V. Potency Evaluation of a Dermaseptin S4
22 Derivative for Antimicrobial Food Packaging Applications. **Packaging Technology and**
23 **Science**, v. 19, pp. 345-354, 2006.
- 24
- 25 MOGHIMI R., ALIAHMADI A., MCCLEMENTS D. J., RAFATI H. Investigations of the
26 effectiveness of nanoemulsions from sage oil asantibacterial agents on some food borne
27 pathogens. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, pp. 69-76, 2016.
- 28
- 29 MOGHIMI R., ALIAHMADI A., RAFATI H., ABATAHI H. R., AMINI S., FEIZABADI M.
30 M. Antibacterial and anti-biofilm activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* oil against
31 multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Molecular Liquids**, v. 265, pp. 765-
32 770, 2018.
- 33
- 34 MOHAMMED Y. H. E., MANUKUMAR H. M., RAKESH K. P., KARTHIK C. S., MALLU
35 P., QIN H. L. Vision for medicine: *Staphylococcus aureus* biofilm war and unlocking key's for
36 anti-biofilm drug development. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, pp. 339-347, 2018.
- 37
- 38 MORALES M. C. S., JUÁREZ A. C., MONTICH G. G., ÁLVAREZ R. M. S. Interaction of
39 the antibiotic peptide nisin with anionic membranes in different phase-states: a vibrational
40 study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 215, pp.
41 389-397, 2019.
- 42
- 43 MYTHILI R., SELVANKUMAR T., SRINIVASAN P., SENGOTTAIYAN A.,
44 SABASTINRAJ J., AMEEN F., AL-SABRI A., KAMALA-KANNAN S., GOVARTHANAN

1 M., KIM H. Biogenic synthesis, characterization and antibacterial activity of gold nanoparticles
2 synthesised from vegetable waste. **Journal of Molecular Liquids**, v. 262, pp. 318-321, 2018.
3

4 NEJATIAN M., ABBASI S., KADKHODAE R. Ultrasonic-Assisted Fabrication of
5 Concentrated Triglyceride Nanoemulsions and Nanogels. **Langmuir**, v. 34, pp. 11433-11441,
6 2018.
7

8 NIAZ T., SHABBIR S., NOOR T., RAHMAN A., BOKHARI H., IMRAN M. Potential of
9 polymer stabilized nano-liposomes to enhance antimicrobial activity of nisin Z against
10 foodborne pathogens. **LWT – Food Science and Technology**, v. 96, pp. 98-110, 2018
11

12 NIAZ T., SHABBIR S., NOOR T., IMRAN M. Antimicrobial and antibiofilm potential of
13 bacteriocin loaded nano-vesicles functionalized with rhamnolipids against foodborne
14 pathogens. **LWT – Food Science and Technology**, v. 116, 2019.
15

16 NOUDEH G. D., KHAZAELI P., RAHMANI P. Study of the Effects of Polyethylene Glycol
17 Sorbitan Esters Surfactants Group on Biological Membranes. **International Journal of**
18 **Pharmacology**, v. 4, pp. 27-33, 2008.
19

20 OMOKAWA Y., MIYAZAKI T., WALDE P., AKIYAMA K., SUGAHARA T., MASUDA
21 S., INADA A., OHNISHI Y., SAEKI T., KATO K. In vitro and in vivo anti-tumor effects of
22 novel Span 80 vesicles containing immobilized Eucheuma serra agglutinin. **International**
23 **Journal of Pharmaceutics**, v. 389, pp. 157-167, 2010.
24

25 PARDOUX E., ROUX A., MATHEY R., BOTURYN D., ROUPIOZ Y. Antimicrobial peptide
26 arrays for wide spectrum sensing of pathogenic bacteria. **Talanta**, v. 203, pp. 322-327, 2019.
27

28 PASUPULETI M., SCHIDTCHEN A., MALMSTEN M. Antimicrobial peptides: key
29 components of the innate immune system. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, pp. 143-
30 171, 2012.
31

32 PINILLA C. M. B., BRANDELLI A. Antimicrobial activity of nanoliposomes co-
33 encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in
34 milk. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, pp. 287-293, 2016.
35

36 POMETTO III ATO, DEMIRCI I. Biofilms in the Food Environment, ed. 2, **John Wiley &**
37 **Sons, Ltd**; 2015.
38

39 PRADEEPA, BHAT K. U., VIDYA S. M. Nisin gold nanoparticles assemble as potent
40 antimicrobial agente against *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* clinical isolates.
41 **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 37, pp. 20-27, 2017.
42

1 PRAKASH A., VADIVEL V., RUBINI D., NITHYANAND P. Antibacterial and antibiofilm
2 activities of linalool nanoemulsions against Salmonella Typhimurium. **Food Bioscience**, v. 28,
3 pp. 57-65, 2019.
4
5 PREET S., PANDEY S. K., KAUR K., CHAUHAN S., SAINI A. Gold nanoparticles assisted
6 co-delivery of nisin and doxorubicin against murine skin cancer. **Journal of Drug Delivery
7 Science and Technology**, v. 53, 101147, 2019.
8
9 PROVENZANO J. C., SIQUEIRA JR. J. F. ROCAS I. N. Metaproteome analysis of endodontic
10 infections in association with different clinical conditions. **PLoS One**, v. 8, 2013.
11
12 QIU J., LI H., SU H., DONG J., LUO M., WANG J., LENG B., DENG Y., LIU J., DENG X.
13 Chemical composition of fennel essential oil and its impact on Staphylococcus aureus exotoxin
14 production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, pp. 1399-1405, 2012.
15
16 RAJITHA P., SHAMMIKA P., AISWARYA S., GOPIKRISHNAN A., JAYAKUMAR R.,
17 SABITHA M. Chaulmoogra oil based methotrexate loaded topical nanoemulsion for the
18 treatment of psoriasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 49, pp. 463-
19 476, 2019.
20
21 RAMALINGAM V. Multifunctionality of gold nanoparticles: Plausible and convincing
22 properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 271, 2019.
23
24 RAMASAMY M., LEE J. H., LEE J. Direct one-pot synthesis of cinnamaldehyde immobilized
25 on gold nanoparticles and their antibiofilm properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**,
26 v. 160, pp. 639-648, 2017.
27
28 REA M. C., DOBSON A., O'SULLIVAN O., CRSPIE F., FOUHY F., COTTER P. D.,
29 SHANAHAN F., KIELY B., HILL C., ROSS R. P. Effect of broad-and narrow-spectrum
30 antimicrobials on Clostridium difficile and microbial diversity in a model of the distal colon.
31 **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, pp. 4639-4644, 2011.
32
33 REDDY K. V., YEDERY R. D., ARANHA C. Antimicrobial peptides: premises and promises.
34 **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, pp. 536-547, 2004.
35
36 RICE L. B., BONOMO R., MURRAY P., BARON E., JORGENSEN J., LANDRY M.
37 Mechanisms of Resistance to antibacterial agents. **Manual of Clinical Microbiology**, v. 1, pp.
38 1114-1145, 2006.
39
40 RIQUELME N., ZÚNIGA R. N., ARANCIBIA C. Physical stability of nanoemulsions with
41 emulsifier mixtures: Replacement of tween 80 with quillaja saponin. **LWT**, v. 111, pp. 760-
42 766, 2019.
43

1 RIZVI S. M. D., HUSSAIN T., AHMED A. B. F., ALSHAMMARI T. M., MOIN A., AHMED
2 M. Q., BARRETO G. E., KAMAL M. A., ASHRAF G. M. Gold nanoparticles: A plausible
3 tool to combat neurological bacterial infections in humans. **Biomedicine & Pharmacotherapy**,
4 v. 107, pp. 7–18, 2018.

5

6 ROGGIA I., DALCIN A. J. F., OURIQUE A. F., DA CRUZ B. M., RIBEIRO E. E., MITJANS
7 M., VINARDELL M. P., GOMES P. Protective effect of guarana-loaded liposomes on
8 hemolytic activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2019.

9

10 ROOIJAKKERS S. H. M., VAN KESSEL K. P. M., VAN STRIJP J. A. G. Staphylococcal
11 innate immune evasion. **Trends in Microbiology**, v. 13, pp. 596-601, 2005.

12

13 SABIROVA J. S., XAVIER B. B., HERNALSTEENS J. P., DE GREVE H., IEVEN M.,
14 GOOSSENS H. Complete genome sequences of two prolific biofilmforming *Staphylococcus*
15 *aureus* isolates belonging to USA300 and EMRSA-15 clonal lineages. **Genome**
16 **Announcements**, v. 2, pp. 610-614, 2014.

17

18 SANCAK B. *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance. **Mikrobiyoloji Bülteni**, v. 45,
19 pp. 565-576, 2011.

20

21 SCHELIN J., WALLIN-CARLQUIST N., COHN M. T., LINDQVIST R., BARKER G. C.,
22 RADSTROM P. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments
23 and advances in risk assessment. **Virulence**, v. 6, pp. 580-592, 2011.

24

25 SCHERER K. M., SPILLE J. H., SAHL H. G., GREIN F., KUBITSCHECK U. The lantibiotic
26 nisin induces lipid II aggregation, causing membrane instability and vesicle budding.
27 **Biophysical Journal**, v. 108, pp. 1114-1124, 2015.

28

29 SCHUBERT J., PODKOWIK M., BYSTRON J., BANIA J. Production of staphylococcal
30 enterotoxins in microbial broth and milk by *Staphylococcus aureus* strains harboring *seh* gene.
31 **International Journal of Food Microbiology**, v. 235, pp. 36-45, 2016.

32

33 SHALEL S., STREICHMAN S., MARMUR A. The Mechanism of Hemolysis by Surfactants:
34 Effect of Solution Composition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 252, pp. 66-76,
35 2002.

36

37 SHARMA S., KHULLER G. DNA as the intracellular secondary target for antibacterial action
38 of human neutrophil peptide-I against mycobacterium tuberculosis H37Ra. **Current**
39 **Microbiology**, v. 43, pp. 74-76, 2001.

40

41 SHI C., ZHANG X., ZHAO X., MENG R., LIU Z., CHEN X., GUO N. Synergistic interactions
42 of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized
43 milk. **Food Control**, v. 71, pp. 10-16, 2017.

44

- 1 SHUKLA R., BANSAL V., CHAUDHARY M., BASU A., BHONDE R. R., SASTRY M.
2 Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular
3 Compartment: A Microscopic Overview. **Langmuir**, v. 21, pp. 10644-10654, 2005.
4
- 5 SIDHU P. K., NEHRA K. Bacteriocin-nanoconjugates as emerging compounds for enhancing
6 antimicrobial activity of bacteriocins. **Journal of King Saud University**, 2017.
7
- 8 SINGH Y., MEHER J. G., RAVAL K., KHAN F. A., CHAURASIA M., JAIN N. K.,
9 CHOURASIA M. K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery.
10 **Journal of Controlled Release**, v. 252, pp. 28-49, 2017.
11
- 12 SMYTH C. J., SMYTH D. S., KENNEDY J., TWOHIG J., BOLTON D. J. *Staphylococcus*
13 *aureus*: from man or animal— an enterotoxin iceberg? **Teagasc – The National Food Centre**,
14 Italy, 2004.
15
- 16 STAKA I., CADETE A., TEJA B. A novel low molecular weight nanocomposite hydrogel
17 formulation for intra-tumoural delivery of anti-cancer drugs. **International Journal of**
18 **Pharmaceutics**, v. 565, pp. 151–161, 2019.
19
- 20 STALDER T., BARRAUD O., JOVÉ T., CASELLAS M., GASCHET M., DAGOT C.
21 Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool.
22 **The ISME Journal**, v. 8, pp. 768-777, 2014.
23
- 24 STEVENS K. A., SHELDON B. W., KLAPES N. A., KLAENHAMMER T. R. Nisin treatment
25 for the inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. **Applied and**
26 **Environmental Microbiology**, v. 57, pp. 3613-3615, 1991.
27
- 28 SZCZEPANIK A., KOZIOL-MONTEWKA M., AL-DOORI Z., MORRISON D., KACZOR
29 D. Spread of a single multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone carrying
30 a variant of staphylococcal cassette chromosome mec type III isolated in a university hospital.
31 **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 26, pp. 29-35, 2007.
32
- 33 TATSUISHI T., OYAMA Y., IWASE K., YAMAGUCHI J., KOBAYASHI M., NISHIMURA
34 Y., KANADA A., HIRAMA S. Polysorbate 80 increases the susceptibility to oxidative stress
35 in rat thymocytes. **Toxicology**, v. 207, pp. 7-14, 2005.
36
- 37 TEIXEIRA M. L., DOS SANTOS J., SILVEIRA N. P., BRANDELLI A. Phospholipid
38 nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*.
39 **Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, pp. 49-52, 2008.
40
- 41 TEIXEIRA V., FEIO M. J., BASTOS M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial
42 peptides with membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 51, pp. 149-177, 2012.
43

1 TEO A., GOH K. K. T., WEN J., OEY I., KO S., KWAK H. S., LEE S. J. Physicochemical
2 properties of whey protein, lactoferrin and Tween 20 stabilised nanoemulsions: Effect of
3 temperature, pH and salt. **Food Chemistry**, v. 197, pp. 297-306, 2016.
4
5 TERJUNG N., LOFFLER M., GIBIS M., HINRICHS J., WEISS J. Influence of droplet size on
6 the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. **Food & Function**,
7 v. 3, pp. 290-301, 2012.
8
9 THERMO SCIENTIFIC. Toxin Detection Kits. **Oxoid Limited**, ©2001 – 2019
10
11 THIRUMURUGAN A., RAMACHANDRAN S., GOWRI A. S. Combined effect of
12 bacteriocin with gold nanoparticles against food spoiling bacteria - an approach for food
13 packaging material preparation. **International Food Research Journal**, v. 20, pp. 1909-1912,
14 2013.
15
16 TIWARI P. M., VIG K., DENNIS V. A., SINGH S. R. Functionalized gold nanoparticles and
17 their biomedical applications. **Nanomaterials**, v. 1, pp. 31-63, 2011.
18
19 TRAVKOVA O. G., MOEHWALD H., BREZESINSKI G. The interaction of antimicrobial
20 peptides with membranes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 247, pp. 521-532,
21 2017.
22
23 TUCHSCHERR L., HEITMANN V., HUSSAIN M., VIEMANN D., ROTH J., VON EIFF C.
24 *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular
25 persistence. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, pp. 1031-1040, 2010.
26
27 VAN BOECKEL T. P., BROWER C., GILBERT M., GRENFELL B. T., LEVIN S. A.,
28 ROBINSON T. P., TEILLANT A., LAXMINARAYAN R. Global trends in antimicrobial use
29 in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, pp. 5649-5654,
30 2015.
31
32 VARENNE F., COTY J. B., BOTTON J., LEGRAND F. X., HILLAIREAU H., BARRATT
33 G., VAUTHIER C. Evaluation of zeta potential of nanomaterials by electrophoretic light
34 scattering: Fast field reversal versus Slow field reversal modes. **Talanta**, v. 205, 2019.
35
36 VASSAL P., BERTHELOT P., CHAUSSINAND J. P., JAY S., DE FILIPPIS J. P., AUBOYER
37 C., RENOUX F., BEDOIN D. Extensively drug-resistant bacteria: Which ethical issues?
38 **Médecine et maladies infectieuses**, v. 47, pp. 319-323, 2017.
39
40 VINOSHA M., PALANISAMY S., MUTHUKRISHNAN R., SELVAM S., KANNAPIRAN
41 E., YOU S. G., PRABHU N. M. Biogenic synthesis of gold nanoparticles from *Halymenia*
42 *dilatata* for pharmaceutical applications: Antioxidant, anti-cancer and antibacterial activities.
43 **Process Biochemistry**, v. 85, pp. 219-229, 2019.

1
2 VIZIOLI J., SALZET M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. **Trends**
3 **in Pharmacological Sciences**, v. 23, pp. 494-496, 2002.
4
5 WAGENVOORT J. H. T., SLUIJSMANS W., PENDERS R. J. R. Better environmental
6 survival of outbreak vs. sporadic MRSA isolates. **Journal of Hospital Infection**, v. 45, pp. 231-
7 234, 2000.
8
9 WANG S., LI Y., XIONG H., CAO J. A broad-spectrum inhibitory peptide against
10 staphylococcal enterotoxin superantigen SEA, SEB and SEC. **Immunology Letters**, v. 121,
11 pp. 167-172, 2008.
12
13 WEBBER M., PIDDOCK L. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance.
14 **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, pp. 9-11, 2003.
15
16 WEISS J., MCCLEMENTS D. J., DAVIDSON P. M. Nanoscalar dispersion of antimicrobials:
17 effect on food safety world food Science. **World Food Microbiology**, v. 16, pp. 8-19, 2014.
18
19 WIEDEMANN I., BENZ R., SAHL H. G. Lipid II-mediated pore formation by the peptide
20 antibiotic nisin: a black lipid membrane study. **Journal of Bacteriology**, v. 186, pp. 3259-3261,
21 2004.
22
23 WILLIAMS D. N., EHRMAN S. H., HOLOMAN T. R. P. Evaluation of the microbial growth
24 response to inorganic nanoparticles. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 4, pp. 1-3, 2006.
25
26 World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United States. NEW
27 PROPOSALS FOR THE USE OF NISIN (INS 234) IN FOOD CATEGORY 08.0 “MEAT
28 AND MEAT PRODUCTS, INCLUDING POULTRY AND GAME”. **Beijing, China**, 2013.
29
30 XU S. X., MCCORMICK J. K. Staphylococcal superantigens in colonization and disease.
31 **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 52, 2012.
32
33 XU Z., XIE J., SOTEYOME T., PETERS B. M., SHIRTLIFF M. E., LIU J., HARRO J. M.
34 Polymicrobial interaction and biofilms between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas*
35 *aeruginosa*: an underestimated concern in food safety. **Current Opinion in Food Science**, v.
36 26, pp. 57-64, 2019.
37
38 YAN X., WANG B., TAO X., HU Q., CUI Z., ZHANG J. Characterization of *Staphylococcus*
39 *aureus* strains associated with food poisoning in Shenzhen, China. **Applied and**
40 **Environmental Microbiology**, v. 78, pp. 6637-6642, 2012.
41
42 YANGA Y., SONG W., LIND H., WANG W., DUE L., XIN W. Antibiotics and antibiotic
43 resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis. **Environment International**, v.
44 116, pp. 60-73, 2018.

1
2 YE H Y. C., CRERAN B., ROTELLO V. M. Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and
3 Applications in Bionanotechnology. **Nanoscale**, v. 4, pp. 1871-1880, 2012.
4
5 YOSHINARI M., KATO T., MATSUZAKA K., HAYAKAWA T., SHIBA K. Prevention of
6 biofilm formation on titanium surfaces modified with conjugated molecules comprised of
7 antimicrobial and titanium-binding peptides. **Biofouling**, v. 26, pp. 103-110, 2010.
8
9 ZARRINNAHAD H., MAHMOODZADEH A., HAMIDI M. P., MAHDAVI M., MORADI
10 A., BAGHERI K. P., SHAHBAZZADEH D. Apoptotic Effect of Melittin Purified from Iranian
11 Honey Bee Venom on Human Cervical Cancer HeLa Cell Line. **International Journal of**
12 **Peptide Research and Therapeutics**, v. 24, pp. 563-570, 2018.
13
14 ZASCHKE-KRIESCHE J., BEHRMANN L. V., REINERS J., LAGEDROSTE M., GRONER
15 Y., KALSCHUEUR R., SMITS S. H. J. Bypassing lantibiotic resistance by an effective nisin
16 derivative. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, pp. 3454-3462, 2019.
17
18 ZASLOFF M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, pp. 389-395, 2002.
19
20 ZECCONI A., SCALI S. Staphylococcus aureus virulence factors in evasion from innate
21 immune defenses in human and animal diseases. **Immunology Letters**, v. 150, pp. 12-22, 2013.
22
23 ZEHRA A., GULZAR M., SINGH R., KAUR S., GILL J. P. S. Prevalence, multidrug resistance
24 and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in retail meat
25 from Punjab, India. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 16, pp. 152-158, 2019.
26
27 ZHANG L., ZHANG F., FAN Z., LIU B., LIU C., MENG X. DHA and EPA nanoemulsions
28 prepared by the low-energy emulsification method: Process factors influencing droplet size and
29 physicochemical stability. **Food Research International**, v. 121, pp. 359-366, 2019.
30
31 ZHANG X., HU X., RAO X. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* toxins.
32 **Microbiological Research**, v. 205, pp. 19-24, 2017.
33
34 ZHANG Z., VRIESEKOOOP F., YUAN Q., LIANG H. Effects of nisin on the antimicrobial
35 activity of d-limonene and its nanoemulsion. **Food Chemistry**, v. 150, pp. 307-312, 2014.
36
37 ZHAO X., LIU Z., LI W., LI X., SHI C., MENG R., CHENG W., JINA K., YANG Z., SHI X.,
38 GUO N., YU L. In Vitro synergy of nisin and coenzyme Q0 against *Staphylococcus aureus*.
39 **Food Control**, v. 46, pp. 368-373, 2014.
40
41 ZHOU Y., PENG Y. Synergistic effect of clinically used antibiotics and peptide antibiotics
42 against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Experimental and Therapeutic**
43 **Medicine**, v. 6, pp. 1000-1004, 2013.
44

1 ZOU J., JIANG H., CHENG H., FANG J., HUANG G. Strategies for screening, purification
2 and characterization of bacteriocins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.
3 117, pp. 781-789, 2018.
4