

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado
somente a partir de 25/08/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

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

Ana Flávia Marques Pereira

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

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

Ana Flávia Marques Pereira

Orientador: Prof. Assoc. Ary Fernandes Júnior

Coorientador: Prof. Dra. Carla dos Santos Riccardi

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

Prof. Assoc. Ary Fernandes Júnior

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pereira, Ana Flávia Marques.

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

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

Orientador: Ary Fernandes Júnior

Coorientador: Carla dos Santos Riccardi

Capes: 21201005

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

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

Dedico esta tese

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

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

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

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

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

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

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

por sempre estarem presentes.

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Resumo

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

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

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

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

Abstract

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

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

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

Lista de Figuras

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

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

Lista de Tabelas

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

Lista de Abreviaturas

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

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

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

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

Lista de Símbolos

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

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

Sumário

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

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

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

1. Introdução

1.1. Aspectos gerais de resistência bacteriana

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

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

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

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

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

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

1.2. *Staphylococcus aureus*

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

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

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

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

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

1.2.1. Biofilme

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

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

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

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

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

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

1.3. Peptídeos antimicrobianos

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

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

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

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

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

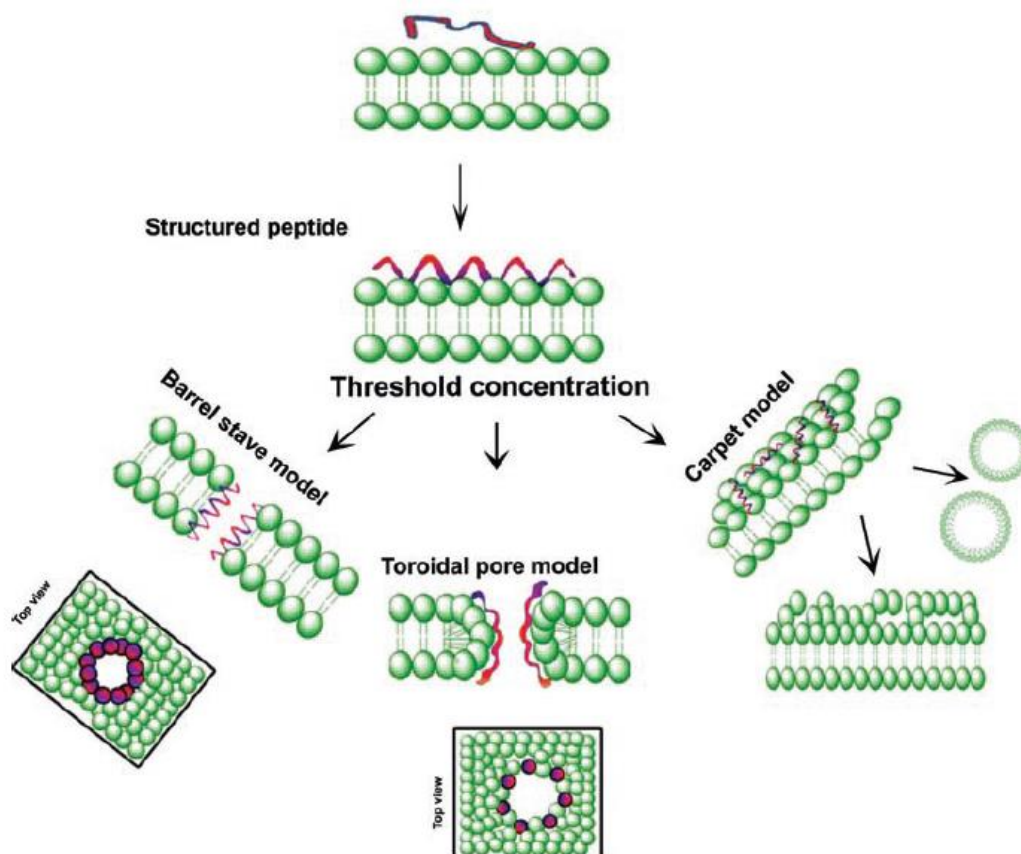


Figura 1. Modelos do modo de ação dos peptídeos antimicrobianos em membranas plasmáticas: modelo *barrel-stave*, modelo poro toroidal e modelo de tapete (Fonte: PASUPULETI et al., 2012).

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

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

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

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

1.3.1.Melitina

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4. Sinergismo com antibióticos

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

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

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

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

1.5. Nanoemulsões

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

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

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

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

Existem alguns métodos de preparação de nanoemulsões, sendo eles:

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

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

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

1.6. Nanopartículas de ouro

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

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

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

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

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

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

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

1.7. Análise Proteômica

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

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

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

5. Conclusões

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

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

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

6. Referências Bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1 dehydrogenase and promotes tumor growth and radiation resistance. *Nature Communications*,
2 v. 10, a. 991, 2019.

3 LIU, W.; CHEN, E.; YANG, L.; PENG, C.; WANG, Q.; XU, Z.; CHEN, D. Emerging
4 resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus*
5 *aureus*: A comprehensive review. *Microbial Pathogenesis*, v. 156, n. 104915, 2021.

6 LIU, Y.; SHI, J.; TONG, Z.; JIA, Y.; YANG, B.; WANG, Z. The revitalization of
7 antimicrobial peptides in the resistance era. *Pharmacological Research*, v. 163, n. 105276,
8 2021.

9 LV, F.; LIANG, H.; YUAN, Q.; LI, C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action
10 of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food*
11 *Research International*, v. 44, n. 9, p. 3057-3064, 2011.

12 MAHMOUDI, H.; ALIKHANI, M.Y.; FOOLADI, A.A.I. Synergistic antimicrobial activity
13 of melittin with clindamycin on the expression of encoding exfoliative toxin in
14 *Staphylococcus aureus*. *Toxicon*, v. 183, p. 11-19, 2020.

15 MAHON, C.R.; LEHMAN, D.C. Textbook of diagnostic microbiology. 6. ed. St. Louis,
16 Missouri, EUA: Elsevier Saunders, 2019.

17 MARTIN, A.; CAMACHO, M.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Resazurin microtiter
18 assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: Rapid,
19 simple and inexpensive method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 3616-
20 3619, 2003.

21 MARTINEZ, M.; GONÇALVES, S.; FELÍCIO, M.R.; MATURANA, P.; SANTOS, N.C.;
22 SEMORILE, L.; HOLLMANN, A.; MAFFÍA, P.C. Synergistic and antibiofilm activity of the
23 antimicrobial peptide P5 against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica*
24 *et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1861, n. 7, p. 1329-1337, 2019.

25 MEHMOOD, T.; AHMED, A. Tween 80 and Soya-Lecithin-Based Food-Grade
26 Nanoemulsions for the Effective Delivery of Vitamin D. *Langmuir*, v. 36, n. 11, p. 2886-2892,
27 2020.

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

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

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

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

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

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

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