



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LARISSA QUEIROZ ROCHA

EFEITO ANTIMICROBIANO DE DINOPONERATOXINAS SOBRE CEPAS DE
***Staphylococcus aureus* FORMADORAS DE BIOFILMES**

FORTALEZA

2022

LARISSA QUEIROZ ROCHA

EFEITO ANTIMICROBIANO DE DINOPONERATOXINAS SOBRE CEPAS DE
Staphylococcus aureus FORMADORAS DE BIOFILMES.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a saúde.

Orientadora: Alice Maria Costa Martins

Coorientadora: Dânya Bandeira Lima

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R574e Rocha, Larissa Queiroz.

Efeito antimicrobiano de dinoponeratoxinas sobre cepas de staphylococcus aureus formadoras de biofilmes / Larissa Queiroz Rocha. – 2022.
67 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

Coorientação: Profa. Dra. Dânya Bandeira Lima.

1. Descritores em Ciências da Saúde. I. Título.

CDD 615

LARISSA QUEIROZ ROCHA

EFEITO ANTIMICROBIANO DE DINOPONERATOXINAS SOBRE CEPAS DE
Staphylococcus aureus FORMADORAS DE BIOFILMES.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a saúde.

Aprovada em 11/04/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Francisco Noé da Fonseca
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa B. de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus Pais, irmãos e a todos que
incentivaram a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo apoio financeiro e realização do projeto.

À Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientadora) e Dra. Dânya Bandeira Lima (Coorientadora), pela excelente orientação e paciência.

À Silvia Fernandes por acompanhar as etapas do trabalho e contribuir com a formatação textual e adequações as regras da ABNT.

Aos meus pais Leto Rocha e Rita Queiroz que sempre mostraram a importância dos estudos, bem como a continuidade e sempre motivando o crescimento pessoal e intelectual.

Ao Laboratório de Compostos Bioativos (LACOMB) da Universidade Federal do ABC Paulista - São Paulo e pelo Centro de Investigação Príncipe Felipe (Valência, Espanha), pela síntese de fase sólida das Dinoponeratoxinas e seus análogos.

Aos participantes da Banca Examinadora Andréa Bessa Teixeira, Nádia Accioly Pinto Nogueira, Francisco Noé da Fonseca, Tiago Lima Sampaio e Ramon Róseo Paula Pessoa B de Menezes pelo tempo, pelas as valiosas contribuições e sugestões.

À todos os colegas do Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

À Central Analítica da Universidade Federal do Ceará pela viabilidade do uso técnico de seus equipamentos, no aprimoramento, incremento e elevação do nível desta pesquisa.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Geral de Fortaleza do Exército e ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará por permitirem a realização das fases experimentais em suas instalações.

À coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e à secretaria desta, pela atenção e prontidão.

A todos aqueles não citados e que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.” (Marie Curie).

RESUMO

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno altamente virulento, capaz de formar biofilme e responsável por milhares de mortes a cada ano. A prevalência de cepas de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) tem aumentado nos últimos anos, tornando-se necessário o desenvolvimento de novos antibióticos. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são eficazes contra uma variedade de bactérias multirresistentes e baixos níveis de resistência são relatados para essas moléculas. O veneno de *Dinoponera quadriceps* (DqV) tem sido descrito por seu efeito contra *S. aureus*. Neste estudo, avaliamos o efeito antibacteriano de DqV-PAMs, as Dinoponeratoxinas (DNTxs; M-PONTXDq3a, -Dq3b, -Dq3c e -Dq4e), contra cepas de *S. aureus* sensível (MSSA) e resistente à meticilina (MRSA). As DNTxs foram testadas contra MSSA ATCC 6538P e MRSA ATCC 33591, ambos formadores de biofilme. A concentração inibitória mínima (CIM), concentração letal mínima (CLM) e tempo de morte foram realizadas por microdiluição em caldo e subcultivo na superfície de ágar. A Concentração Mínima de Inibição de Biofilme (CMIB) e a alteração na permeabilidade da membrana foram medidas pela técnica do cristal violeta. Alterações morfológicas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A MSSA ATCC 6538P mostrou melhores resultados em M-PONTXDq3a (MIC=0,78 µM; MLC=1,56 µM), então MIC, MLC, CMIB foram determinadas para ambas as cepas, mostrando resultados entre 0,78 e 3,12 µM. Tempo de morte, alterações na permeabilidade da membrana e SEM foram realizadas em MSSA ATCC 6538P tratado com M-PONTXDq3a, mostrando tempo de morte em 6 horas, ruptura de membrana na técnica do cristal violeta e SEM. M-PONTX-Dq3a demonstra ser um peptídeo antimicrobiano biologicamente ativo contra cepas de MSSA e MRSA, bem como abre novas perspectivas na prevenção da formação de biofilme através do desenvolvimento de revestimentos superficiais antiadesivos em dispositivos médicos, bem como tratar cepas resistentes em infecções de pele ou tecidos moles.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; MRSA; Peptídeos antimicrobianos; Dinoponeratoxinas; Biofilmes.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a highly virulent pathogen, capable of biofilm formation and responsible for thousands of deaths each year. The prevalence of Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) strains has increased in recent years and thus, the development of new antibiotics has become necessary. Antimicrobial Peptides (AMPs) are effective against a variety of multidrug-resistant bacteria and low levels of resistance have been reported regarding these molecules. *Dinoponera quadricaps* ant venom (DqV) has been described regarding its effect against *S. aureus*. In this study, we have evaluated the antibacterial effect of DqV-AMPs, the Dinoponeratoxins (DNTxs; M-PONTXDq3a, -Dq3b, -Dq3c and -Dq4e), against Methicillin-Sensitive (MSSA) and a Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) strains. DNTxs were tested against MSSA ATCC 6538P and MRSA ATCC 33591, both biofilm formers. The minimum inhibitory concentration (MIC), minimum lethal concentration (MLC) and rate of kill were performed by microdilution on broth and subculture on the surface of agar. Minimal Inhibitory Biofilm Concentration (MIBC) and alteration in membrane permeability was measured by crystal violet technique. Morphology alterations were observed by scanning electron microscopy (SEM). MSSA ATCC 6538P showed better results on M-PONTXDq3a (MIC=0.78 μ M; MLC=1.56 μ M), so MIC, MLC, MIBC were determined for both strains, showing results between 0.78 and 3.12 μ M. Rate of kill, alterations in membrane permeability and SEM were performed on MSSA ATCC 6538P treated with M-PONTXDq3a, showing time of kill at 6 hours, membrane disruption on Crystal Violet technique and SEM. M-PONTX-Dq3a demonstrates to be a biologically active antimicrobial peptide against strains of MSSA and MRSA, as well as opens up new perspectives for the prevention of biofilm formation through the development of anti-adhesive surface coatings on medical devices, as well as the treatment of resistant strains in skin or soft tissue infections.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; MRSA; Antimicrobial peptides; Dinoponeratoxins; Biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Possíveis mecanismos de resistência a antimicrobianos.....	20
Figura 2 - As cinco etapas do desenvolvimento e maturação do biofilme.....	22
Figura 3 - Prevalência mundial de MRSA. A porcentagem de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> que são resistentes a oxacilina (MRSA).....	25
Figura 4 - Compreensões sobre os Mecanismos de Ação dos PAMs.....	28
Figura 5 - Formiga <i>Dinoponera quadriceps</i>	30
Figura 6 - Número relativo de sequências isoladas do transcriptoma do veneno da <i>Dinoponera quadriceps</i>	31
Figura 7 - Concentração Inibitória Mínima de formação de biofilme M-PONTX-Dq3a sobre cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P.....	42
Figura 8 - Concentração Inibitória Mínima de formação de biofilme M-PONTX-Dq3a sobre cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591.	43
Figura 9 - Concentração Inibitória Mínima de formação de biofilme oxacilina sobre cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591.	43
Figura 10 - Concentração Inibitória Mínima de formação de biofilme oxacilina sobre cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P.....	44
Figura 11 - Concentração Inibitória Mínima de formação de biofilme vancomicina sobre cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P.....	44
Figura 12 - Concentração Inibitória Mínima de formação de biofilme vancomicina sobre cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591.	45
Figura 13 - Efeito de tempo de exposição de M-PONTX-Dq3a na viabilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P.	45
Figura 14 - Percentual de captação de Cristal Violeta em <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P tratado com M-PONTX-Dq3a.	46
Figura 15 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P.	47
Figura 16 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P tratados com M-PONTX-Dq3a.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura e propriedades físico-químicas de Dinoponeratoxinas de <i>D. quadriceps</i>	32
Tabela 2 - Efeito antimicrobiano de Dinoponeratoxinas sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	41
Tabela 3 - Efeito antimicrobiano de M-PONTX-Dq3a sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Aminoácidos
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN	Acetonitrila
Ágar PC	Ágar Plate Count
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CDC	Controle e Prevenção de Doenças
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMB	Concentração Inibitória Mínima de Formação do Biofilme
CLM	Concentração Letal Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Cm	Centímetros
CV	Cristal Violeta
DNTXs	Dinoponeratoxinas
DO ₅₇₀	Densidade Óptica a 570 nm
<i>D. quadriceps</i>	<i>Dinoponera quadriceps</i>
DMF	N,N'-dimetilformamida
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
<i>et al.</i>	Do latim “et alii”, em português: e outros.

EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Fmoc	Fluorenilmetiloxycarbonila
HBTU/NMM	Hexafluorofosfato/ N-metilmorfolina
KHz	Quilohertz
log	Logaritmo
MFA	Microscopia de Força Atômica
MH	Mueller-Hinton
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetros
NHSN	National Healthcare Safety Network
PAMs	Peptídeos Antimicrobianos
PBS	Phosphate buffered saline
PLP	Proteína de ligação da Penicilina
PoTx	Poneratoxinas
<i>sp.</i>	citação de gênero, do latim 'espécie'.
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

OXA	Oxacilina
TSB	Caldo Triptona Soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia
US	United States
UV	Ultravioleta
μL	Microlitro
μM	Micromolar
VAN	Vancomicina
v/v	Volume/Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

\$	Dólar
H	Hidrofobicidade
%	Porcentagem
μ H	Momento hidrofóbico
z	Carga líquida
h	Hora
~	Aproximadamente
μ	Micro
>	Maior
°C	Grau Célsius
\pm	Mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Histórico.....	18
1.2 Resistência à antimicrobianos.....	20
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	22
1.4 Peptídeos antimicrobianos	26
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo Geral.....	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4 MATERIAIS E METODOS	36
4.1 Obtenção das Dinoponeratoxinas	36
4.2 Fármacos Antimicrobianos	36
4.3 Cepas microbianas	36
4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Letal Mínima (CLM)	37
4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Formação do Biofilme (CIMB)	37
4.6 Determinação do efeito do tempo de exposição dos peptídeos sobre a viabilidade bacteriana.....	38
4.7 Detecção de alteração na permeabilidade de membrana pela captação de Cristal Violeta	39

4.8 Avaliação de alterações na morfologia da parede celular bacteriana de <i>S. aureus</i> expostos aos peptídeos	39
4.9 Análise estatística dos dados	40
5 RESULTADOS	41
6 DISCUSSÃO.....	48
7 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXO A - ARTIGO CIENTÍFICO: “Dinoponera quadriceps venom as a source of active agents against <i>Staphylococcus aureus</i>	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A resistência antimicrobiana é um problema multiforme, que impõe uma grave ameaça à saúde. A comercialização de antibióticos no século XX marcou uma nova era da medicina moderna. Hoje, o número de bactérias resistentes a antibióticos continua a crescer. Embora existam muitos fatores que determinem a resistência a antimicrobianos, a disseminação global de bactérias resistentes a antibióticos pode ser atribuída ao uso indevido de medicamentos e à ausência de fármacos eficazes lançadas no mercado. Esta crise mundial requer grande colaboração e um esforço abrangente com a finalidade de projetar e produzir agentes bactericidas eficazes limitando assim a propagação de patógenos resistentes (BROWNE *et al.*, 2020).

Antes da comercialização de antibióticos, as três principais causas de morte eram a pneumonia, a gripe, a tuberculose e as infecções gastrointestinais (“Control of infectious diseases, 1900-1999”, 1999). Durante a Primeira Guerra Mundial, doenças infecciosas causaram mais mortes do que as feridas em batalhas (COSSART, 2014). A descoberta eventual da Penicilina em 1928 marcou uma nova era da medicina moderna, não só apenas desencadeou o desenvolvimento de novos antibióticos, como também modificou todo o canal para a descoberta de outros medicamentos. Hoje, temos uma infinidade de antibióticos que são eficazes contra uma ampla gama de bactérias (“Sir Alexander Fleming - Nobel Lecture: Penicillin - NobelPrize.org”, [S.d.]).

No entanto, o uso indiscriminado de antibióticos veio com um custo, um relatório abrangente, com o objetivo de avaliar aumento da resistência antimicrobiana, previu que, até 2050, mais de 10 milhões de mortes ocorrerão anualmente como resultado de patógenos resistentes a antimicrobianos, culminando em um ônus econômico de US \$ 100 trilhões (O’NEILL, 2019).

Uma variedade de fatores tem contribuído para o aumento gradual de bactérias resistentes a antibióticos. O uso de antibióticos na agricultura e no meio ambiente, embora regulamentado, não é controlado. Somente quando a resistência é generalizada, certos antibióticos são proibidos (GHARAIBEH; SHATNAWI, 2019). De forma alarmante, 80% de todos os antibióticos são utilizados em animais, e apenas 20% destinados para uso em humano (MARTIN *et al.*, 2015).

Esses antibióticos são usados na agricultura como promotores de crescimento e na prevenção de infecções em animais mantidos em condições ambientais anti-higiênicas. Por exemplo, a Colistina é um antibiótico de último recurso para o tratamento de infecções multidroga resistentes não responsivas. No entanto, a utilização generalizada na agricultura impulsionou o surgimento do gene de resistência à Colistina (*mcr*), com grandes implicações no tratamento das infecções em humanos (GHARAIBEH; SHATNAWI, 2019).

Outro fator crítico no desenvolvimento da resistência é a prescrição excessiva de antibióticos. Em alguns países, os antimicrobianos estão disponíveis como medicamentos de venda livre (AUTA *et al.*, 2019). Em contraste, em países onde os antibióticos são de uso apenas com prescrição, a maioria delas são inadequadas (IERANO *et al.*, 2019; MILANI *et al.*, 2019), sendo prescritas preventivamente com base nos sintomas da doença, sem a confirmação da infecção bacteriana ou em casos prescritos para pacientes com infecções virais, com a finalidade de limitar a ocorrência de infecção bacteriana secundária (LANDSTEDT *et al.*, 2017).

Além da resistência, observamos vários obstáculos regulatórios e econômicos que também limitam o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos pela indústria farmacêutica. À medida que surgiram micro-organismos resistentes, certas classes de antibióticos se tornaram ineficazes, então medicamentos similares foram desenvolvidos. Pequenas modificações foram feitas nos antibióticos existente, porém muitos tinham mecanismo de ação idêntico àqueles da molécula original (BROWNE *et al.*, 2020). Assim, rapidamente verificou-se uma rápida resistência para esses compostos.

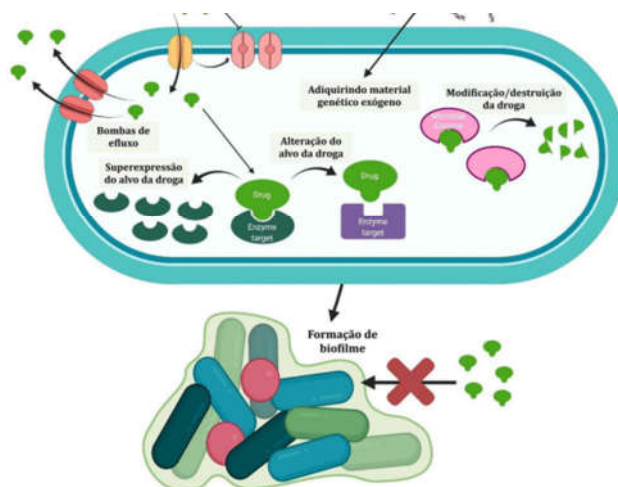
Atualmente, o fluxo para o desenvolvimento de novos antimicrobianos chega a níveis críticos, com o número de moléculas desenvolvidas em declínio constante nas últimas três décadas (BROWNE *et al.*, 2020). A produção e síntese de novos medicamentos é demorado e custa caro, portanto, muitas empresas farmacêuticas têm direcionado sua atenção para opções mais lucrativas. Enquanto a pesquisa com antibióticos diminui, os patógenos resistentes estão em constante aumento globalmente (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES; CDC., 2019). De doze antimicrobianos lançados desde os anos 2000, oito têm isolados clínicos resistentes generalizados. Uma combinação mais recente de

antibióticos, Ceftazidima/Avibactam, desenvolveu isolados resistentes dentro de apenas um ano após o lançamento no mercado (SHIELDS *et al.*, 2017).

1.2 Resistência à antimicrobianos

As bactérias utilizam múltiplos mecanismos na evolução da resistência aos antibióticos (Figura 1). Pequenas mutações genéticas dentro de uma população permitem que a porção resistente recolonize o local da infecção (MUNITA JM; ARIAS CA, 2016). As mutações ocorrem de forma aleatória e relativamente lenta. A forma mais rápida de resistência aos antibióticos surge via transferência horizontal de genes. As bactérias podem adquirir material genético de espécies vizinhas resistentes através da incorporação de genes mutantes ao seu próprio genoma (THOMAS; NIELSEN, 2005).

Figura 1 - Possíveis mecanismos de resistência a antimicrobianos.



Fonte: LIMA, 2021.

Aproximadamente 20% do genoma de *Escherichia coli* foi modificado ao longo do tempo por meio de transferência de genes (LAWRENCE; OCHMAN, 1997). Modificações em genomas bacterianos via transferência horizontal de genes são comumente vistas em comunidades formadoras de biofilme, onde a comunicação bacteriana é essencial para sua sobrevivência (MADSEN *et al.*, 2012).

Mais frequentemente, as mutações resultam na modificação estrutural do alvo do antibiótico, e subsequente supressão da atividade antimicrobiana. Por

exemplo, mudanças na estrutura do rRNA 23S em *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* conferem resistência ao antibiótico Linezolida (LONG; VESTER, 2012). Resistência à Penicilina e outros antibióticos da classe β -lactâmicos (Cefalosporinas, Monobactâmicos e Carbapenêmicos) também surgiram devido à evolução de uma gama de enzimas β -lactamases. Essas enzimas hidrolisam diretamente os antibióticos e tornando-os ineficazes (EGOROV *et al.*, 2018). Além disso, um novo padrão de resistência microbiana vem chamando atenção da comunidade científica que é a formação de biofilme (SAGINUR *et al.*, 2006). A formação de biofilme é um dos principais fatores de virulência atribuídos aos micro-organismos, o que tornam as infecções relacionadas à formação destas estruturas, mais complicadas e persistentes. Este fato está relacionado à maior capacidade dos micro-organismos em biofilme tolerar níveis elevados de antibióticos do que em culturas planctônicas, o que está bem estabelecido através de ensaios de suscetibilidade (VUONG; OTTO, 2002).

Biofilme (Figura 2) é uma comunidade tridimensional de bactérias com arquitetura estruturada que vive nas superfícies, é encapsulada em uma rede de polissacarídeos hidratados, proteínas e DNA. A infecção bacteriana persistente e o aumento da resistência aos antibióticos podem frequentemente ser atribuídos à formação de biofilme nos tecidos e implantes do hospedeiro. A prevalência de infecção mediada por biofilme é muito rápida e é observada em periodontite, endocardite, osteomielite e infecções do trato urinário. As bactérias do biofilme são altamente resistentes à antibioticoterapia devido à matriz de exopolissacarídeo (EPS) que fornece ancoragem e suporte, tornando-as menos suscetíveis a esses agentes terapêuticos. Os medicamentos atuais atuam efetivamente em bactérias flutuantes que são destacadas do biofilme, mas não naquelas que estão incorporadas na matriz, levando à recorrência e persistência da infecção até que a superfície colonizada ou o implante seja excisado cirurgicamente. A falha da terapia antimicrobiana, em geral, é atribuída aos altos níveis de bactérias resistentes a medicamentos incorporadas ao biofilme. Mesmo uma bactéria séssil altamente sensível sem qualquer composição genética inerente para resistência a antibióticos desenvolve resistência em mil vezes quando incorporada a um biofilme. O motivo da resistência pode ser atribuído a vários fatores, como encapsulamento de matriz EPS, má expressão de proteínas, diminuição dos fatores de crescimento, diferenças fenotípicas, ativação da bomba de efluxo e comunicação intercelular. Esses fatores podem ser amplamente agrupados em

fatores bioquímicos, mecanismos moleculares e fatores ambientais alterados do hospedeiro (VENKATESAN; PERUMAL; DOBLE, 2015).

Figura 2 - As cinco etapas do desenvolvimento e maturação do biofilme.



Fonte: Adaptado de Monroe D (2007). A figura mostra o Processo de formação do biofilme: (1) adesão reversível; (2) adesão irreversível; (3) desenvolvimento da arquitetura do biofilme; (4) maturação; (5) dispersão.

Um dos principais colonizadores e formadores de biofilme maduro em implantes médicos e tecidos do hospedeiro é o *S. aureus*. Estes cocos Gram-positivos são uma das principais causas de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade e o estabelecimento de seu biofilme maduro, desempenha um papel importante na persistência de infecções crônicas (LISTER; HORSWILL, 2014).

1.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é um patógeno pertencente à família Staphylococcaceae, móveis, não formadores de esporos e são Coagulase-positivos. São cocos Gram-positivos e possuem crescimento irregular agrupados em cachos semelhantes aos de uva. É uma bactéria esférica de aproximadamente 1 μm de diâmetro, que em placa de crescimento apresentam colônias lisas, elevadas e brilhantes, que podem causar hemólise quando cultivadas em meio contendo sangue.

São extremamente resistentes quando comparado àquelas que formam esporos e podem sobreviver a diversas variações ambientais não fisiológicas (TOLZIS, 2018).

S. aureus é uma bactéria comensal que costuma estar presente de forma assintomática em diversas partes do corpo humano, como pele, glândulas cutâneas e membranas mucosas, incluindo narizes e intestinos de indivíduos saudáveis. Estudos têm demonstrado que cerca de 20% dos indivíduos são portadores nasais persistentes de *S. aureus* e cerca de 30% são portadores intermitentes, enquanto cerca de 50% são não portadores. Esta colonização, portanto, aumenta significativamente as chances de infecções, fornecendo um reservatório do patógeno. Os indivíduos afetados, na maioria dos casos, estão infectados pela cepa *S. aureus* que geralmente carregam como um micro-organismo comensal (LAKHUNDI; ZHANG, 2018).

O *S. aureus* é um dos primeiros patógenos descritos e continua como uma das causas mais comuns de infecções em humanos. É de importância significativa devido à sua capacidade de causar uma infinidade de infecções, bem como a sua capacidade de adaptação às diversas condições ambientais. *S. aureus* são uma das principais causas de infecções hospitalares persistentes e adquiridas na comunidade, o que resulta em sérias consequências. Pode afetar a corrente sanguínea, pele, tecidos moles e trato respiratório inferior, podendo causar infecções relacionadas à instrumentação médica, infecção da corrente sanguínea associada ao uso de cateter, bem infecções profundas graves como a endocardite e a osteomielite (SCHITO, 2006).

S. aureus possui uma variedade de fatores de virulência, muitas vezes sendo responsável por toxinas mediadoras de doenças, incluindo a síndrome do choque tóxico, doenças estafilocócicas transmitidas por alimentos e síndrome da pele escaldada, sendo a última uma dermatose rara, causada por uma exotoxina que produz lesões bolhosas e difusas por todo o corpo do indivíduo acometido (MIRANDA *et al.*, 2017). Esses fatores de virulência e toxinas também permitem ao *S. aureus* enfrentar os desafios apresentados pelo sistema imunológico do hospedeiro. Clinicamente, um grave problema associado ao *S. aureus* é o notável nível de desenvolvimento da resistência a múltiplas classes de antibióticos, causando assim complicações ao tratamento. Historicamente, a resistência a *S. aureus* surgiu apenas dois anos após a descoberta da Penicilina (KIRBY, 1944).

As primeiras cepas de *S. aureus* resistentes à Penicilina surgiram na década de 40 (RAMMELKAMP; MAXON, 2016), acelerando o processo de

desenvolvimento de novos antibióticos, como a meticilina, que foi desenvolvida no final dos anos 1950, porém cepas resistentes à meticilina (MRSA) foram clinicamente identificadas em 1960 (JEVONS; P., 1961).

A partir da década de 1980, novas linhagens de MRSA surgiram, levando o mundo a uma calamidade que ainda verificamos nos dias atuais. As infecções causadas por cepas de MRSA estão associadas a maiores taxas de mortalidade do que aquelas causadas por cepas sensíveis à meticilina. Além disso, elas resultam no aumento do tempo de internação hospitalar, bem como nos custos de cuidados associados à saúde (WHITBY; MCLAWS; BERRY, 2001; WOLK *et al.*, 2009).

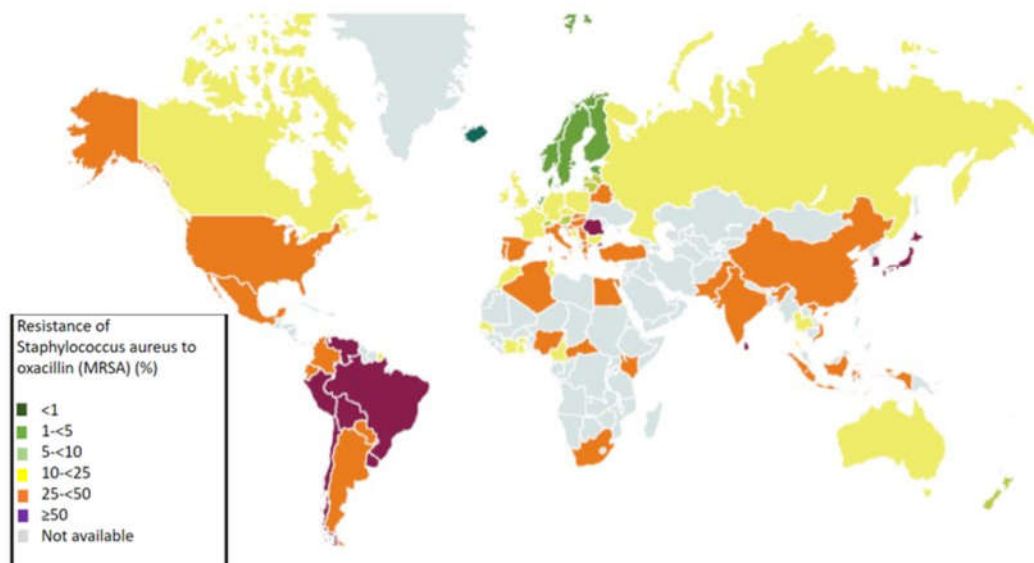
As cepas de MRSA produzem uma Proteína de Ligação da Penicilina (PLP) alterada associada à diminuição da afinidade para a maioria das Penicilinas semissintéticas. A proteína é codificada por um gene adquirido, *mecA* (MATSUHASHI *et al.*, 1986; UTSUI; YOKOTA, 1985). Este material genético que confere resistência à meticilina é transportado em um elemento genético móvel denominado *cassette chromosome mec* estafilocócico (SCCmec) (KATAYAMA *et al.*, 2000).

Consequentemente, o surgimento de cepas MRSA ocorre devido à aquisição e inserção destes elementos genéticos nos cromossomos das cepas suscetíveis à meticilina. Esta aquisição de resistência antimicrobiana tem apresentado um grande desafio para o mundo da medicina moderna em termos de tratamento e controle de infecções estafilocócicas. MRSA na maioria dos casos é responsável por pelo menos 25 a 50% das infecções causadas por *S. aureus* em ambientes hospitalares. Apresentam colossal preocupação devido elevada morbimortalidade, bem como sua resistência a todas as Penicilinas e a maioria de outros antimicrobianos β -lactâmicos. MRSA já foi associado apenas a ambientes de cuidados de saúde, incluindo hospitais e outros ambientes a eles relacionados, bem como pessoas ligadas a esses ambientes. No entanto, também surgiram cepas resistentes como uma das principais causas de infecções associadas à comunidade e rotineiramente verificam-se reservatórios em ambas as esferas (LAKHUNDI; ZHANG, 2018).

Em muitos países, a expressiva prevalência do MRSA é verificada e distribuída nas diversas regiões geográficas do mundo (Figura 3). A propagação de MRSA parece ocorrer por pelo menos dois mecanismos: via propagação de clones resistentes existentes e aquisição de SCCmec por uma cepa de *S. aureus* sensível à meticilina. Detalhes do mecanismo de transferência horizontal de SCCmec não são

bem compreendidos, mas as evidências epidemiológicas mostram que este mecanismo de resistência se espalhou para a maioria clones de cepas patogênicas de *S. aureus*, em humanos e animais (LEE *et al.*, 2018).

Figura 3 - Prevalência mundial de MRSA. A porcentagem de isolados de *Staphylococcus aureus* que são resistentes a oxacilina (MRSA).



Fonte: *Staphylococcus aureus* metilina resistente (LEE *et al.*, 2018).

A vancomicina é historicamente o medicamento de escolha e às vezes o último recurso terapêutico de infecções graves causadas por MRSA, fornecendo cobertura empírica e terapia definitiva. É um antimicrobiano que pertence ao grupo dos Glicopeptídeos, que de maneira geral, o mecanismo de ação está relacionado com a inibição da parede celular bacteriana durante a multiplicação, resultando em morte por lise osmótica, principalmente devido ao seu poder inibitório agindo como antagonista competitivo do polímero da cadeia peptidoglicana que constitui a parede celular microbiana (RANG & DALE, 2016). No entanto, seu uso aumentado já levou ao surgimento de cepas de *S. aureus* com resistência intermediária a vancomicina (VISA), bem como *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) em algumas partes do mundo o que nos traz grande preocupação (HIRAMATSU, K *et al.*, 1997; HIRAMATSU, KEIICHI, 2001; LEE *et al.*, 2018).

Além da resistência a metilina e à vancomicina, as infecções por *S. aureus* podem se tornar crônicas quando associadas a formação de biofilme, onde *S. aureus*

pode se fixar e persistir nos tecidos do hospedeiro, como ossos e válvulas cardíacas, causando osteomielite e endocardite, respectivamente, ou ainda aderindo em materiais implantados, como cateteres, articulações protéticas e marca-passos. Os materiais implantados ficam revestidos com proteínas hospedeiras após a inserção, e as proteínas de ligação à matriz em superfície de *S. aureus* facilitam a ligação a essas proteínas com o desenvolvimento de biofilme. Em casos de dispositivos médicos infectados, a remoção é muitas vezes necessária para tratar a infecção (LISTER; HORSWILL, 2014). Assim, surge a necessidade inegável em pesquisar novos compostos biologicamente ativos eficazes e por meio de estratégias de combate as infecções bacterianas de *S. aureus* e na formação de seus biofilmes.

1.4 Peptídeos antimicrobianos

Diante do cenário da ameaça universal dos micro-organismo resistentes aos antibióticos convencionais surge a necessidade imediata de alternativas estratégicas guiadas pela busca por novas substâncias com potencial antimicrobiano. Pequenas proteínas ou peptídeos antimicrobianos (PAMs) vem sendo sugeridos como agentes terapêuticos alternativos, podendo substituir ou complementar os tratamentos clássicos, uma vez que os PAMs possuem atividades contra uma infinidade de patógenos, atuando principalmente nas membranas celulares, sendo o local de ação inversamente ao que é descrito pelos medicamentos tradicionais que atuam por vias biossintéticas específicas (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Uma das primeiras evidências do papel importante desempenhado pelos PAMs na defesa imune foi descrito em 1996, quando demonstrado que a após a remoção do mecanismo genético da síntese de peptídeos antimicrobianos, moscas das frutas tornaram-se suscetíveis a infecções fúngicas (LEMAITRE *et al.*, 1996).

Desde então, os peptídeos antimicrobianos têm sido descobertos e caracterizados em quase todos os organismos multicelulares. Uma coleção de peptídeos antimicrobianos foi criada para a acelerar e expandir estudos baseados nas famílias dos peptídeos, que possuem composição de sequência específica da família e que pode ser utilizada para a descoberta e desenho de novos PAMs. A coletânea contém informações sobre as sequências obtidas como padrões através do “Modelo de Hidden Markov”, que descreve um modelo estatístico que utiliza o princípio de Markov que contém parâmetros escondidos e desconhecidos, o modelo serve para

identificar parâmetros ocultos, a partir de então são utilizados para análises posteriores. O modelo foi descrito em 1386 PAMs, representados por 45 famílias. As informações estão relacionadas com a sequência, definição das proteínas, números de acessos, atividade, organismo fonte, organismo alvo e descrição da família das proteínas. Até o momento foram identificadas 8164 sequências, 757 estruturas e 2083 patentes (WAGHU *et al.*, 2015; WAGHU *et al.*, 2019). Existe uma grande expectativa do aumento desses números nos próximos anos (PUSHPANATHAN *et al.*, 2013).

Os PAMs atuam nos componentes lipídicos da membrana celular bacteriana e demonstram atividade antimicrobiana de amplo espectro (HANCOCK, ROBERT EW, 2001). PAMs isolados da natureza são eficazes contra bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas), vírus (com envelope e sem envelope), leveduras, fungos, bolores e parasitas (MARXER *et al.*, 2016; RADEK; GALLO, 2007; ZASLOFF, 2002).

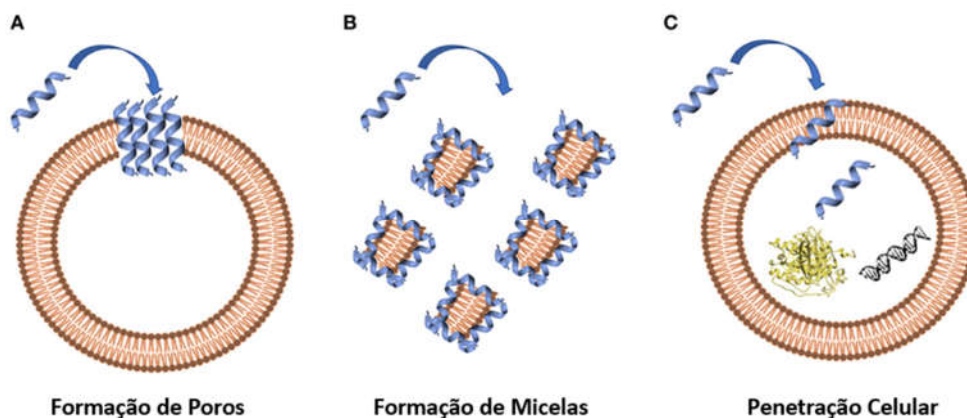
Diante deste panorama, os PAMs ganharam atenção como uma nova possível classe de moléculas antimicrobianas, demonstrando elevado potencial clínico. Estudos mostram a extraordinária diversidade química em sua natureza, que geralmente contém uma cadeia inferior de 100 aminoácidos, muitas vezes incluindo resíduos carregados positivamente (com lisina, arginina e histidina) e uma grande porção de resíduos hidrofóbicos (> 50%) (BAHAR *et al.*, 2013).

Vários mecanismos têm sido sugeridos para a atividade de PAMs através das membranas bacterianas e foram extensivamente revisados (KUMAR *et al.*, 2018; SEYFI *et al.*, 2020). Em resumo, a ligação do peptídeo antimicrobiano leva a uma ruptura do potencial de membrana, uma alteração na permeabilidade e extravasamento de metabólitos, por fim, causa a morte celular bacteriana. A natureza anfipática dos peptídeos antimicrobianos contribui para a sua capacidade de interagir com as membranas das células bacterianas. A maioria dos PAMs tem uma carga líquida positiva e são, portanto, chamados de PAMs catiônicos. Interações eletrostáticas entre PAMs catiônicos e membranas aniônicas das bactérias estabilizam a ligação desses PAMs às membranas. Posteriormente, a membrana bacteriana é rompida, através da inserção de peptídeos, que ligados às membranas levam a formação de poros. Além de sua atividade direta como antimicrobianos, os PAMs regulam mecanismos imunomoduladores no sistema imunológico inato. Em eucariotos superiores, uma classe de PAMs, chamados de peptídeos de defesa do hospedeiro, modulam as respostas imunológicas agindo como quimioatraentes para

leucócitos, aumentando a atividade de leucócitos, monócitos e levando a expressão de citocinas pró-inflamatórias (ZHANG; GALLO, 2016).

De maneira simplificada, os PAMs podem atuar através de mecanismo de lise da membrana bacteriana e outro não membranolítico (Figura 4). No mecanismo de lise, os PAMs podem levar à formação de (4A) poros na membrana celular ou pela formação de (4B) micelas na membrana. No mecanismo não membranolítico, (4C) os PAMs podem penetrar nas membranas celulares e interagir com alvos intracelulares, tais como proteínas e moléculas de DNA (MORETTA *et al.*, 2021).

Figura 4 - Compreensões sobre os Mecanismos de Ação dos PAMs.



Fonte: MORETTA *et al.*, 2021.

Uma vantagem dos peptídeos antimicrobianos é sua ação em alvos biológicos distintos aos tradicionais antibióticos (ZASLOFF, 2002). Além disso, uma qualidade única de muitos PAMs são seus múltiplos mecanismos de ação, que juntos contribuem para sua atividade antimicrobiana geral. Por exemplo, o LL-37 (catelicidina humana) demonstra morte microbiana direta, modulação imunológica e atividade antibiofilme (BUCKI *et al.*, 2010). Embora mais comumente conhecido por sua ação na membrana celular bacteriana, LL-37 também é capaz de modular as respostas imunes pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (AGIER; EFENBERGER; BRZEZIŃSKA-BLASZCZYK, 2015). Adicionalmente, LL-37 exerce atividade antibiofilme em concentrações fisiologicamente relevantes, muito abaixo de sua concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* (DEAN; BISHOP; VAN HOEK, 2011; OVERHAGE *et al.*, 2008).

Muitos PAMs têm atividade semelhante contra organismos resistentes e sensíveis a antibióticos. Por exemplo, mutações em proteínas de ligação da Penicilina de *S. aureus* conferem resistência à meticilina. No entanto, como os PAMs têm como alvo a membrana celular, não há sobreposição no mecanismo de ação, e nenhuma resistência cruzada é observada. Considerando que PAMs têm atividade potente contra organismos multirresistentes, eles podem ser usados para tratar o aumento do número de infecções resistentes a antibióticos (GIULIANI *et al.*, 2007).

Além disso, a capacidade de um único PAM atuar por meio de vários mecanismos e através de vias distintas, não só aumenta sua eficácia antimicrobiana, mas também pode diminuir a chance do desenvolvimento da resistência (HANCOCK *et al.*, 1999). Um composto que atua por meio de várias vias reduz a probabilidade das bactérias adquirirem múltiplas mutações simultaneamente (MARR *et al.*, 2006).

Atualmente, existem dez antimicrobianos à base de peptídeos disponíveis comercialmente, bacitracina, dalbavancina, oritavancina, daptomicina, colistina, gramicidina D, polimixina B, teicoplanina, vancomicina e telavancina. Semelhantes a muitos dos antibióticos tradicionais, sete desses compostos ativos foram isolados de espécies bacterianas. Os três restantes são derivados semissintéticos de compostos existentes. Todos são baseados nos mecanismos dos peptídeos, os antibióticos atuam na membrana da célula bacteriana, seja diretamente pela lise da membrana ou indiretamente pela inibição da síntese da parede celular. Embora muitos PAMs tenham mecanismos em alvos semelhantes (membrana celular bacteriana), sua composição química pode ser bastante ampla, como é visto nos antibióticos obtidos a partir de peptídeos atualmente no mercado (EBENHAN *et al.*, 2014).

Os venenos de animais são ricas fontes de PAMs, e por várias décadas, têm sido estudados com o objetivo de encontrar moléculas farmacologicamente ativas. Nestas pesquisas utilizando biotoxinas, a indústria farmacêutica conseguiu alguns sucessos notáveis, que originaram medicamentos amplamente comercializados (HARVEY, 2014).

Recentemente, demonstrou-se que o veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* (Figura 5), encontrada na serra do município de Maranguape no estado do Ceará, possui ação antimicrobiana e tripanocida (LIMA, *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2016).

Figura 5 - Formiga *Dinoponera quadriceps*.



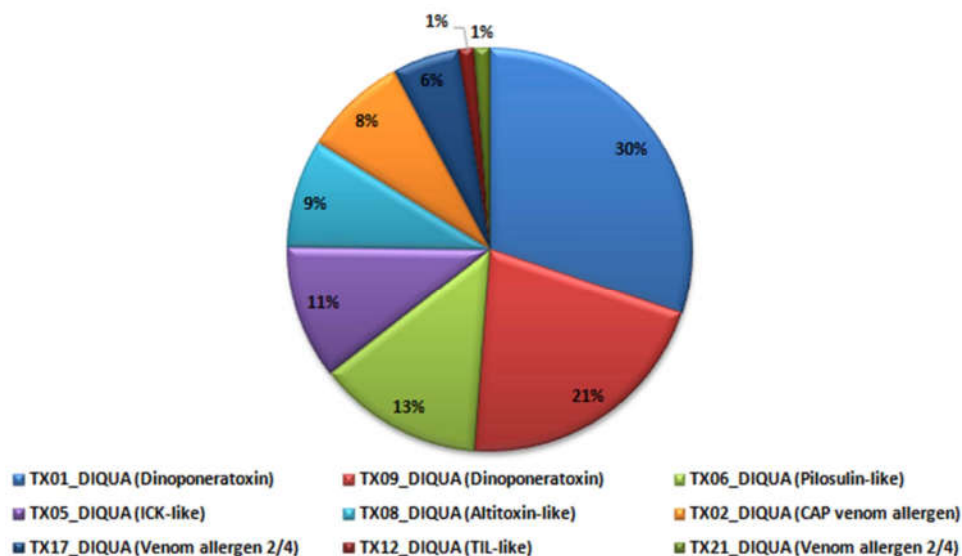
Legenda: *D. quadriceps* em três diferentes perspectivas. 1 – Visão Frontal; 2 – Visão Lateral; 3 – Visão Dorsal.

Fonte: AntWeb. Versão 8.75.3. Academia de Ciências da Califórnia, online <https://www.antweb.org>. Acesso em 01/05/2022.

A *D. quadriceps* possui ampla distribuição no nordeste brasileiro podendo ser observada nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. É encontrada nas Caatingas, Cerrados e nas florestas úmidas das serras e na Mata Atlântica (GBIF, 2021).

Ainda em estudos recentes, foi possível identificar no transcriptoma da glândula de veneno da *D. quadriceps*, os PAMs chamados Dinoponeratoxinas (DNTXs) sendo estes descritos como componentes majoritários (Figura 6) (TORRES *et al.*, 2014).

Figura 6 - Número relativo de sequências isoladas do transcriptoma do veneno da *Dinoponera quadricaps*.



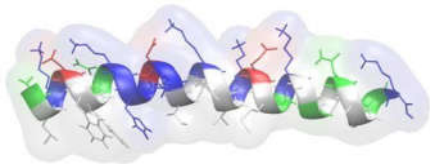
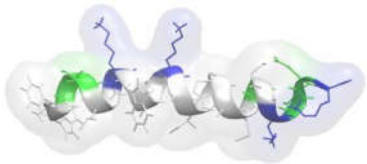
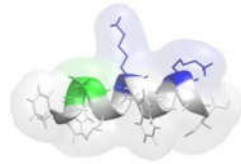
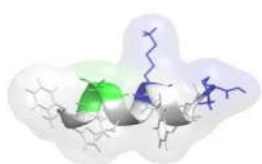
Legenda: Componentes do transcriptoma da glândula de veneno da *D. quadricaps*. Os componentes majoritários correspondem a 51% dos isolados e são representados por TX01_DIQUA (Dinoponeratoxin) – 30% e TX09_DIQUA (Dinoponeratoxin) – 21%.

Fonte: Torres *et al.*, 2014.

Tais achados abriram caminho para novas investigações funcionais e farmacológicas desses (poli) peptídeos preditos do veneno desta formiga gigante. Os precursores transcricionais que codificam duas DNTXs de comprimento total, foram proporcionalmente os transcritos mais expressos. Estes códigos de transcrições de DNTXs para pré-propeptídeos longos são propensos a modificações pós-tradução na glândula de veneno, então vários fragmentos peptídicos podem ser liberados, conforme detectado na peptidômica do veneno de *D. quadricaps* (LIMA *et al.*, 2018).

As DNTX foram denominados levando em consideração uma nomenclatura normalizada: M-PONTXDq3a (23 resíduos de aminoácidos), M-PONTX-Dq3b (13 resíduos de aminoácidos), M-PONTX-Dq3c (11 resíduos de aminoácidos) e MPONTX-Dq4e (30 resíduos de aminoácidos) (Tabela 1) (BANDEIRA LIMA *et al.*, 2018).

Tabela 1 - Estruturas e propriedades físico-químicas de Dinoponeratoxinas de *D. quadriceps*.

Dinoponeratoxina (nomenclatura normalizada)	Peptídeos			
	M-PONTX-Dq4e	M-PONTX-Dq3a	M-PONTX-Dq3b	M-PONTX-Dq3c
Estrutura primária ^a	GLKDWWNKHKDKIVKVVKEMGKAGINAAGK	FWGTLAKWALKAI PAAMGMKQNK	FWGTLAKWALKAI	FWGTLAKWALK
Peso molecular ^b	3348,97 (3350,02)	2561,13 (2562,16)	1503,83 (1504,85)	1319,59 (1320,61)
Predição de modelo ^c				
Carga líquida (z) ^d	6,1	5,0	3,0	3,0
pI ^d	10,9	14,0	14,0	14,0
Hidrofobicidade, H	0,148	0,509	0,823	0,781
μH ^e	0,458	0,248	0,531	0,523

Legenda: Estrutura primária^a corresponde a sequência de aminoácidos dos peptídeos; ^bMassa molecular experimental e teórica entre parênteses respectivamente; Predição de modelo^c arquivado com o servidor PEP-FOLD 2 (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>); ^dCarga líquida em pH e pI^d neutro, calculado por <http://pepcalc.com>; μH^e = momento hidrofóbico.

Fonte: Adaptado de Lima *et al.*, 2018.

As DNTXs maduras compartilham semelhanças de variáveis na sequência primária com peptídeos antimicrobianos (PAMs) de outros venenos animais como Ponericina W3, G2 e G3 de formiga, Dermaseptina-H65 de sapo e Gaegurin-5 e Brevinin-1PTa de rã (LIMA *et al.*, 2018; COLOGNA *et al.*, 2013; JOHNSON *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2014). Assim, o efeito antimicrobiano do veneno, juntamente com a homologia à PAMs, sugerem as DNTXs como PAMs (LIMA *et al.*, 2014), sendo potenciais candidatos para o desenvolvimento de novas moléculas com atividade antimicrobiana (SUN; SUN; HUANG, 2016; TORRENT *et al.*, 2012; YAVARI *et al.*, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

A resistência antimicrobiana é uma ameaça global bem reconhecida, assim, o desenvolvimento de políticas de controle de infecção, juntamente com estratégias de manejo antimicrobiano, novas terapias são necessárias para controlar o desenvolvimento desse processo (THABIT; CRANDON; NICOLAU, 2015).

Venenos animais e seus componentes são de grande interesse biotecnológico, podendo ser usados para identificar novos alvos terapêuticos e estabelecer modelos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos (HARVEY, 2014). O efeito antimicrobiano do veneno de *D. quadriceps* foi demonstrado sobre cepas sensíveis e resistentes de *S. aureus* (LIMA *et al.*, 2014), bem como o efeito antiparasitário contra *L. amazonensis* e *T. cruzi* com alto índice de seletividade para o último (LIMA *et al.*, 2016).

Em 2013, a biblioteca de cDNA da glândula de veneno da *D. quadriceps* foi construída, e através da análise transcriptômica foram identificadas novas moléculas, dentre elas as Dinoponeratoxinas, como componentes majoritários (TORRES *et al.*, 2014). Em seguida, continuando o estudo dos efeitos biológicos deste veneno, demonstramos o efeito das Dinoponeratoxinas em cepa Y de *T. cruzi*, onde os resultados mostraram dois peptídeos promissores (LIMA, *et al.*, 2018). Entretanto, o efeito antimicrobiano das Dinoponeratoxinas ainda não havia sido explorado, o que poderia gerar modelos moleculares contra a resistência aos antimicrobianos.

A abordagem proposta neste trabalho foi dar continuidade ao estudo, buscando novas moléculas antimicrobianas, visto que as DNTXs apresentam homologia na sequência primária com peptídeos antimicrobianos (PAMs) de outros venenos animais. Assim, esse trabalho estudou o potencial antimicrobiano de Dinoponeratoxinas, bem como mecanismo de ação e efeito contra biofilmes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antimicrobiano das dinoponeratoxinas sintéticas M-PONTX-Dq4e, M-PONTX-Dq3a, M-PONTX-Dq3b e M-PONTX-Dq3c sobre cepas de *Staphylococcus aureus* formadoras de biofilmes.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial antimicrobiano das dinoponeratoxinas M-PONTX-Dq4e, M-PONTX-Dq3a, M-PONTX-Dq3b e M-PONTX-Dq3c sobre a cepa de *S. aureus* produtora de biofilme ATCC 6538P metilicina sensível;
- Avaliar o efeito antimicrobiano da dinoponeratoxina de melhor resultado sobre a cepa de *S. aureus* produtora de biofilme ATCC 33591 metilicina resistente;
- Avaliar o efeito antimicrobiano da dinoponeratoxina de melhor resultado sobre a formação de biofilme nas cepas de *S. aureus* ATCC 6538P e ATCC 33591;
- Avaliar o efeito antimicrobiano da dinoponeratoxina de melhor resultado no tempo de exposição sobre viabilidade microbiana na cepa de *S. aureus* ATCC 6538P;
- Avaliar o mecanismo de ação antimicrobiano da dinoponeratoxina de melhor resultado na cepa de *S. aureus* ATCC 6538P;
- Avaliar as alterações ocorridas na morfologia da parede celular bacteriana na cepa de *S. aureus* ATCC 6538P exposta dinoponeratoxina de melhor resultado.

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 Obtenção das dinoponeratoxinas

As dinoponeratoxinas (DNTXs) foram obtidas via síntese de fase sólida (LibertyBlue, Kamp-Lintfort, Germany) no Centro de Investigação Príncipe Felipe (Valência, Espanha) e estas, por fim, foram gentilmente cedidas para a realização dos experimentos.

As DNTXs apresentaram as seguintes estruturas:

M-PONTX-Dq4e: GLKDWWNKHKDKIVKVVKEMGKAGINAAGK

M-PONTX-Dq3a: FWGTLAKWALKAI PAAMGMKQNK

M-PONTX-Dq3b: FWGTLAKWALKAI

M-PONTX-Dq3c: FWGTLAKWALK

4.2 Fármacos Antimicrobianos

Os antimicrobianos utilizados como controles experimentais foram a oxacilina e vancomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Estes foram pesados e reconstituídos em cada ensaio.

4.3 Cepas microbianas

As cepas microbianas de referência utilizadas foram doadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As culturas bacterianas foram mantidas em Ágar Nutriente (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e estocadas a 4° C e realizados subcultivos a cada oito semanas. Uma cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (MSSA) produtora de biofilme e uma cepa meticilina resistente *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (MRSA) também produtora de biofilme.

4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Letal Mínima (CLM)

A CIM e a CLM dos quatro peptídeos para as cepas de *S. aureus* foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo de cultura (CLSI, 2015).

Para isso, alíquotas das suspensões microbianas em Mueller-Hinton (caldo MH) (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) contendo inóculos com aproximadamente 10^6 UFC/mL foram adicionadas aos poços da microplaca contendo diferentes concentrações de peptídeos (0,19 - 25,0 μ M). Como controle dos experimentos foram utilizados oxacilina ou vancomicina (no intervalo de concentrações de 0,095 a 200,0 μ M) como controle positivos e como controle negativo, solução de PBS. As microplacas foram incubadas a 37° C e inspecionadas visualmente após 24h. A CIM foi considerada a menor concentração de peptídeos capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, constatado pela ausência de turvação visível. As placas de cultura também foram submetidas à leitura de absorbância, em leitora de Elisa Bio-Tek a 620 nm, para confirmação dos valores de CIM e para excluir a interferência da turvação determinada pela presença de peptídeos.

A CLM foi determinada por contagem de células viáveis. De forma asséptica, inóculos de 5 μ L foram obtidos dos poços das microplacas usadas para a determinação da CIM, onde havia ausência total de turvação visível, e semeados na superfície do ágar Plate-Count (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil).

As placas foram incubadas a 37° C / 24h e as colônias crescidas na superfície do ágar foram contadas. A CLM foi considerada a menor concentração de peptídeos capaz de determinar a morte de 99,9% das células de *S. aureus* do inóculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicata (SHANHOLTZER *et al.*, 1984).

4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Formação do Biofilme (CIMB)

O efeito dos peptídeos sobre a formação de biofilme foi avaliado pela determinação da CIMB (BATISTA *et al.*, 2017, onde o biofilme foi obtido e sua massa quantificada pela técnica do Cristal Violeta (CV, Cromato Produtos Químicos, São Paulo, Brasil) (STEPANOVIC *et al.*, 2000). As cepas de *S. aureus* foram cultivadas

em *Tryptic Soy Broth* (TSB; Merck Millipore Corporation), suplementado com 1% (p/v) de glicose, por 24h a 37° C. Alíquotas de 100 µL de cultura (10^6 UFC/mL) e 100 µL de peptídeos foram adicionadas aos poços de microplacas de 96 poços, incubadas por 24h a 37°C. Os poços foram lavados três vezes com 250 µL de solução salina 0,85% estéril e para a fixação das células aderidas, 200 µL de metanol 99% foram adicionados por 15 minutos. Após a retirada do metanol e secagem das microplacas a temperatura ambiente, alíquotas de 200 µL de solução de CV 2% (v/v) foram adicionadas aos poços por 15 minutos. O excesso de CV foi removido por lavagem das microplacas por três vezes com água ultrapura. O CV captado pelas células bacterianas foi liberado pela adição de 160 µL de ácido acético 33%, por 15 minutos, e a leitura da densidade óptica a 570 nm (DO570) foi realizada em leitora de microplaca (Biotek ELX-800, Winooski, VT, USA). Como controles do experimento foram utilizados TSB estéril e cultura microbiana sem exposição aos peptídeos. A CIMB foi considerada a menor concentração de peptídeos capaz de inibir a formação de biofilme bacteriano.

4.6 Determinação do efeito do tempo de exposição dos peptídeos sobre a viabilidade bacteriana

Alíquotas do peptídeo M-PONTX-Dq3a nas concentrações inibitória mínima (CIM) e letal mínima (CLM) foram adicionadas a poços das microplacas contendo 100 µL de caldo BHI e 80 µL da suspensão de *S. aureus* ATCC 6538P na concentração de 10^6 UFC/mL na fase de crescimento exponencial cultivada em caldo MH, distribuídas em microplaca de 96 poços. As placas foram incubadas a 37° C e pequenas alíquotas foram removidas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24h (DEVI *et al.*, 2010). Estas foram diluídas em solução salina estéril na concentração de 0,85% e semeadas em ágar “Plate Count”, a contagem de colônias foi realizada após 24h de incubação a 37° C. As culturas de *S. aureus* em PBS foram utilizadas como controle experimental. Os ensaios foram realizados em triplicata e todos os resultados obtidos foram expressos em \log_{10} UFC/mL.

4.7 Detecção de alteração na permeabilidade de membrana pela captação de cristal violeta

A detecção das alterações na permeabilidade da membrana induzida pelo peptídeo M-PONTX-Dq3a foi avaliada através do ensaio do CV (DEVI *et al.*, 2010). Culturas de *S. aureus* 6538P foram sub cultivadas em caldo BHI e incubadas a 37°C “overnight” em caldo BHI. A suspensão foi coletada centrifugada a 4500 g por 5 minutos a 4° C, lavadas duas vezes e suspensas em PBS na concentração de 10⁸ UFC/mL.

As suspensões bacterianas foram tratadas com o peptídeo M-PONTX-Dq3a (CIM, CLM e 2x CLM) e incubadas a 37° C / 30 minutos. As células foram coletadas (9300 x g / 5 minutos), ressuspensas em PBS contendo 10 µg/mL de CV (Cromato Produtos Químicos, São Paulo, Brasil) e incubadas por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação (13400 × g/15 minutos), as células foram descartadas e o sobrenadante foi coletado para leitura de DO570 nm em leitor de microplaca (Biotek ELX-800, Winooski, VT, USA). Culturas tratadas com oxacilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, 0,25 M, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e PBS estéril (sem tratamento) foram utilizadas como controles. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A captação de CV cristal pelas células bacterianas foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{DO570 da amostra} / \text{DO570 do CV} \times 100.$$

Considerando DO570 da solução de CV como 100%.

4.8 Avaliação de alterações na morfologia da parede celular bacteriana de *S. aureus* expostos aos peptídeos

As alterações na morfologia da parede celular bacteriana causadas pelos peptídeos foram analisadas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Suspensões de *S. aureus* (10⁶ UFC/mL) foram incubadas “overnight” a 37° C e centrifugadas (4500 × g/5 minutos). O pellet obtido foi lavado duas vezes com água ultrapura e a densidade celular foi ajustada a fim de obter 10¹⁰ UFC/mL.

Alíquotas de peptídeos nas CIM e CLM foram incubadas com 180 µL de suspensão de *S. aureus* (10^{10} UFC/mL) por 6 h, a 37° C. Após a incubação, as bactérias foram fixadas por 2 horas com 2,5% de glutaraldeído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania), lavadas duas vezes com PBS e duas vezes com água destilada centrifugando-se a 800g por 10 min. Em seguida, as amostras foram desidratadas e series crescentes de etanol (30-100%), colocadas em lamínulas de vidro, fixadas a 37° C com 5% de CO₂, cobertas com ouro e observadas em um microscópio eletrônico de varredura FEG Quanta 450 (FEI, Oregon, USA) (MELLO *et al.*, 2017). As imagens digitais foram adquiridas e armazenadas em computador na Central Analítica – UFC utilizando o Software Nis 4.0.

4.9 Análise estatística dos dados

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média e significância $p < 0,05$. Comparações estatísticas foram analisadas utilizando ANOVA com *Dunett's post-test* no programa GraphPad Prism 5.

5 RESULTADOS

Quatro peptídeos antimicrobianos do veneno de *D. quadriceps* (M-PONTX-Dq3a, -Dq3b, -Dq3c e -Dq4e) foram testados contra *S. aureus* ATCC 6538P sensível à metilicina em diferentes concentrações para avaliar CIM e CLM. Entre todos, M-PONTX-Dq3a foi o mais potente, enquanto M-PONTX-Dq3c teve valor indeterminado. M-PONTX-Dq4e e M-PONTX-Dq3b mostraram o mesmo CLM, mas M-PONTX-Dq3b mostrou uma CIM inferior.

Os antibióticos, oxacilina e vancomicina, foram usados como controles positivos de indução de morte bacteriana. Estes antibióticos mostraram valores de CIM e CLM aproximados aos observados para M-PONTX-Dq3a (0,39 - 0,78 μM vs 0,78 - 1,56 μM). (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito antimicrobiano de Dinoponeratoxinas sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.

	M-PONTX-Dq4e	M-PONTX-Dq3c	M-PONTX-Dq3b	M-PONTX-Dq3a	Oxacilina	Vancomicina
CIM	12,5	In	6,25	0,78	0,39	0,39
CLM	25	In	25	1,56	0,39	0,78

Legenda: Valores descritos em μM ; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CLM: Concentração letal mínima; ATCC: *American Type Culture Collection*; In: Indeterminado.

Fonte: Dados da pesquisa.

Assim, a atividade do peptídeo mais potente, M-PONTX-Dq3a, foi estudada na cepa MRSA ATCC 33591 e na formação de biofilme.

M-PONTX-Dq3a mostrou CIM e CLM de 0,78 e 1,56 μM , respectivamente. Isto é de particular relevância dado que é uma cepa metilicina resistente e o tratamento de escolha (vancomicina), CIM e CLM de 0,39 e 0,78, mostrou valores próximos de CIM e CLM obtidos para M-PONTX-Dq3a (Tabela 3).

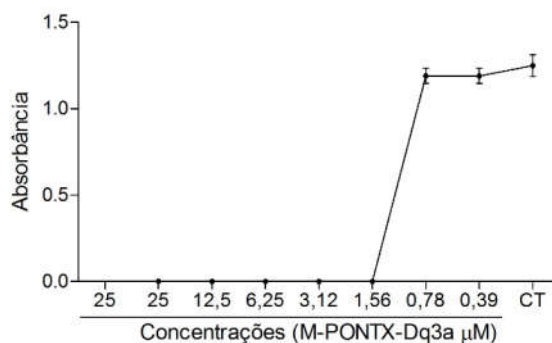
Tabela 3 - Efeito antimicrobiano de M-PONTX-Dq3a sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

	M-PONTX-Dq3a	Oxacilina	Vancomicina
CIM	0,78	200	0,39
CLM	1,56	>200	0,78

Legenda: Valores descritos em μM ; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CLM: Concentração letal mínima; ATCC: *American Type Culture Collection*.
Fonte: Dados da pesquisa.

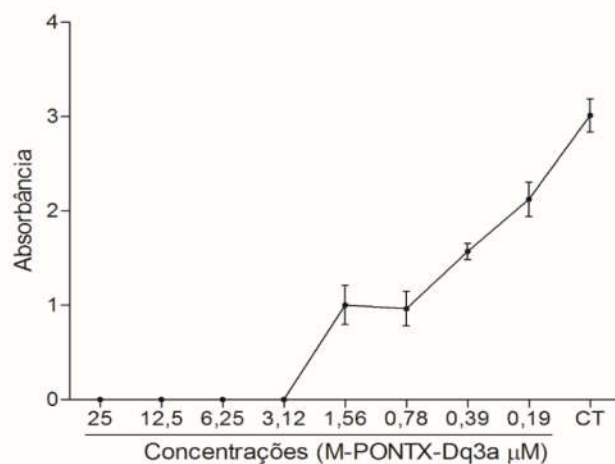
Nos estudos de formação de biofilme, M-PONTX-Dq3a mostrou CIMB de 1,56 e 3,12 μM em *S. aureus* sensível (Figura 7) e *S. aureus* resistente a meticilina (Figura 8), respectivamente.

Figura 7 - Concentração Inibitória Mínima de formação de biofilme M-PONTX-Dq3a sobre cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.



Legenda: Dados expressos em média \pm erro padrão da média de 3 experimentos em triplicata. CT= controle negativo (PBS).
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 8 - Concentração Inibitória Mínima de formação de biofilme M-PONTX-Dq3a sobre cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

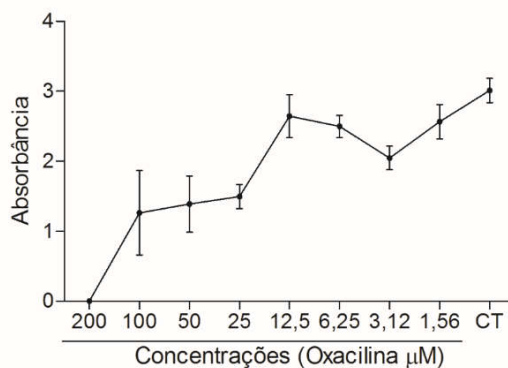


Legenda: Dados expressos em média \pm erro padrão da média de 3 experimentos em triplicata. CT= controle negativo.

Fonte: Dados da pesquisa.

M-PONTX-Dq3a foi eficaz em situações que oxacilina não foi (Figura 9), mostrando uma faixa de atividade semelhante à produzida pela vancomicina (Figura 10). As concentrações inibitórias mínimas de formação de biofilmes de oxacilina e vancomicina nas cepas sensível e resistente à meticilina estão mostradas nas figuras de 9 a 12.

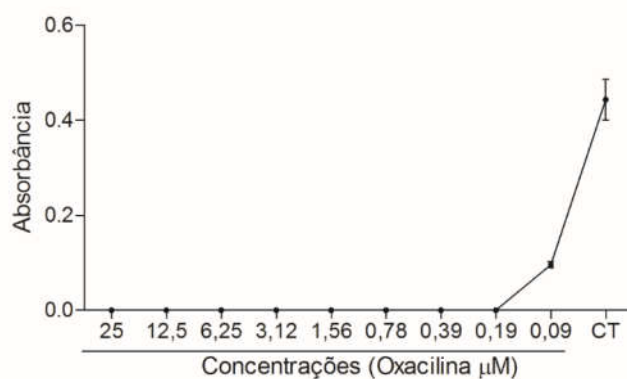
Figura 9 - Concentração Inibitória Mínima de formação de biofilme oxacilina sobre cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.



Legenda: Dados expressos em média \pm erro padrão da média de 3 experimentos em triplicata. CT= controle negativo.

Fonte: Dados da pesquisa.

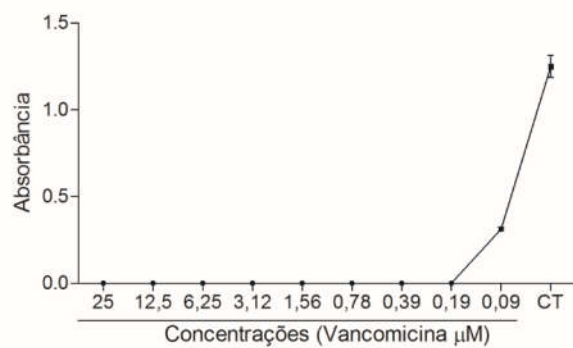
Figura 10 - Concentração Inibitória Mínima de formação de biofilme oxacilina sobre cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.



Legenda: Dados expressos em média \pm erro padrão da média de 3 experimentos em triplicata. CT= controle negativo.

Fonte: Dados da pesquisa.

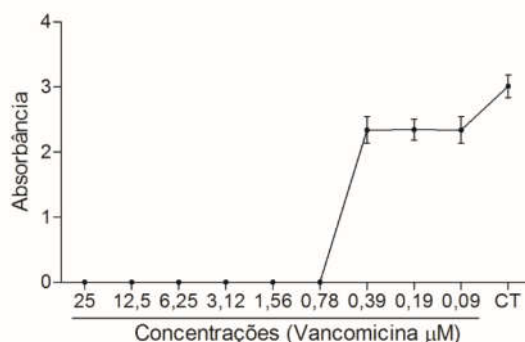
Figura 11 - Concentração Inibitória Mínima de formação de biofilme vancomicina sobre cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.



Legenda: Dados expressos em média \pm erro padrão da média de 3 experimentos em triplicata. CT= controle negativo.

Fonte: Dados da pesquisa.

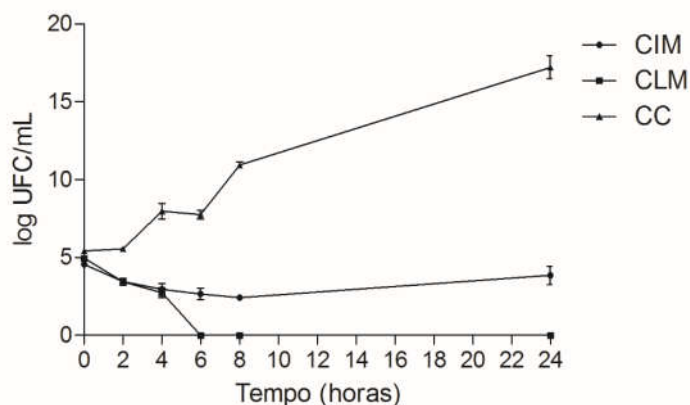
Figura 12 - Concentração Inibitória Mínima de formação de biofilme vancomicina sobre cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.



Legenda: Dados expressos em média \pm erro padrão da média de 3 experimentos em triplicata. CT= controle negativo. Fonte: Dados da pesquisa.

Para entender melhor o mecanismo de ação do M-PONTX-Dq3, primeiro avaliamos a taxa de morte no MSSA ATCC 6538P (figura 13). O tratamento com M-PONTX-Dq3a foi capaz de matar todas as bactérias a 1,56 μM (CLM) após 6 h de incubação.

Figura 13 - Efeito de tempo de exposição de M-PONTX-Dq3a na viabilidade de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.

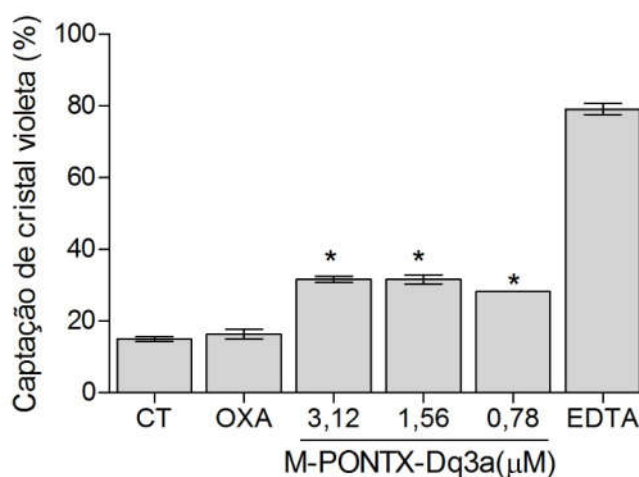


Legenda: Dados expressos em média \pm erro padrão da média de 3 experimentos em triplicata. CIM= concentração inibitória mínima (0,78 μM) CC= controle de crescimento, CLM= concentração letal mínima (1,56 μM).
Fonte: Dados da pesquisa.

Para estudar a capacidade de M-PONTX-Dq3a de induzir a permeação de membrana na cepa bacteriana, analisamos a captação de Cristal Violeta (CV) por bactérias tratadas em concentrações de CIM, CLM e 2 x CLM. Em contraste com a

oxacilina, o tratamento com M-PONTX-Dq3a foi capaz de aumentar a captação de CV por *S. aureus* para 28-33%. O agente quelante (EDTA dissódico, 0,25 M) foi incluído como controle positivo, que também foi capaz de aumentar a captação CV (Figura 14).

Figura 14 - Percentual de captação de cristal violeta em *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P tratado com M-PONTX-Dq3a.

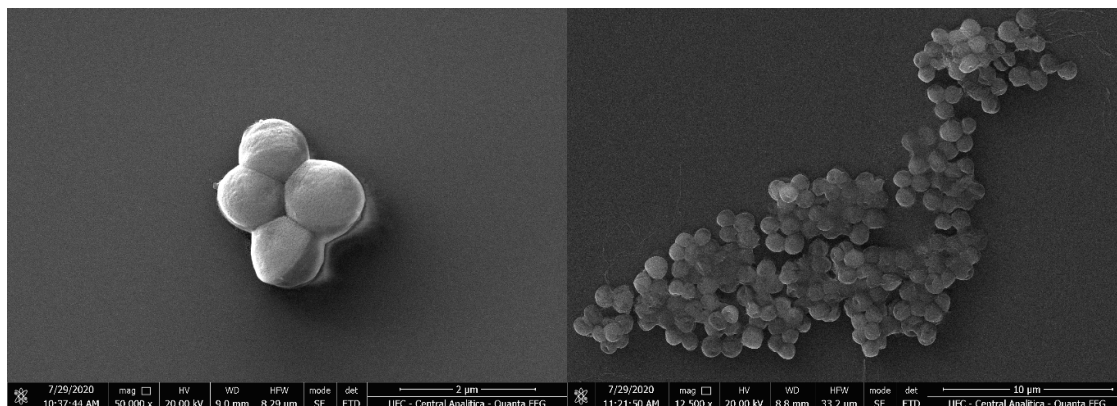


Legenda: Dados expressos em média \pm erro padrão da média de 3 experimentos em triplicata. CT: Controle, células tratadas com tampão de fosfato em solução salina; OXA: células tratadas com oxacilina 0,39 μ M; EDTA: células tratadas com EDTA dissódico 0,25 M. * $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa.

Para confirmar a ruptura da membrana, realizamos estudos SEM em culturas bacterianas tratadas com M-PONTX-Dq3a. As células tratadas com PBS mostraram integridade na superfície da membrana e aderência célula a célula preservada (Figura 15). Curiosamente, a concentração mais baixa de M-PONTX-Dq3a (0,78 μ M) produziu o rompimento das membranas (Figura 16) e a mais alta (1,56 μ M) mostrou bolhas ou vesículas projetando-se da superfície bacteriana como resultado da interação do peptídeo com a membrana (Figura 16), confirmando assim que M-PONTX-Dq3a produz ruptura da parede bacteriana.

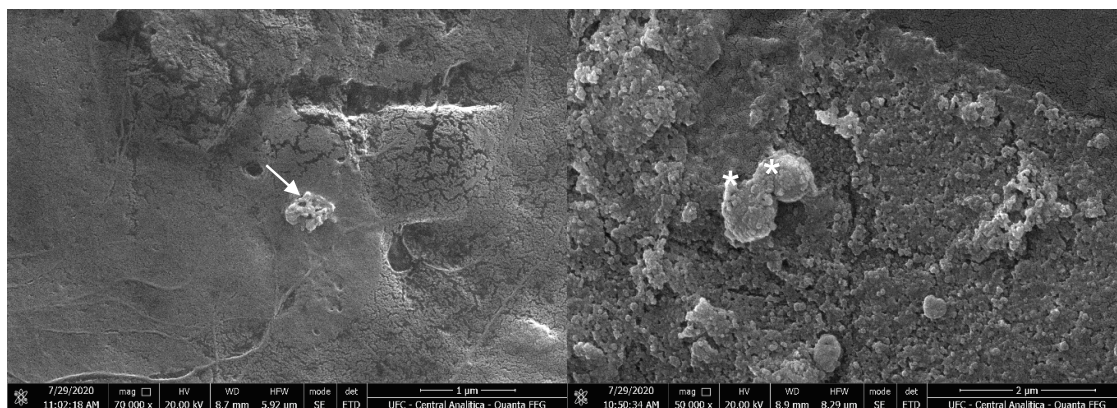
Figura 15 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.



Legenda: Células sem exposição a M-PONTX-Dq3a mostrando tamanho normal, forma e aderência célula a célula.

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 16 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P tratados com M-PONTX-Dq3a.



Legenda: Células expostas a M-PONTX-Dq3a na concentração 0,78 µM mostrando ruptura nas membranas (ver seta branca). Células expostas a M-PONTX-Dq3a na concentração 1,56 µM mostrando bolhas ou vesículas projetando-se na superfície bacteriana como resultado da interação peptídeo-membrana (ver asteriscos brancos).

Fonte: Dados da pesquisa.

6 DISCUSSÃO

O efeito antimicrobiano de DNTxs contra bactérias Gram-Negativas (DODOU LIMA; SIDRIM DE PAULA CAVALCANTE; RÁDIS-BAPTISTA, 2020) e fungos (LIMA; CAVALCANTE; RÁDIS-BAPTISTA, 2020) foi recentemente descrito. No entanto, seu potencial contra *S. aureus*, sugerido pela atividade do efeito do veneno bruto (LIMA *et al.*, 2014), ainda não havia sido explorado.

Neste trabalho, avaliamos o efeito de M-PONTX-Dq3a, M-PONTX-Dq3b, M-PONTX-Dq3c, M-PONTX-Dq4e sobre duas cepas padrão ATCC de *S. aureus*, MSSA 6538P e MRSA 33591, as mesmas cepas utilizadas no trabalho com o veneno bruto (LIMA, D. B. *et al.*, 2014). Ambas são cepas formadoras de biofilme (BATISTA *et al.*, 2017). Os DNTxs foram avaliados quanto ao seu efeito antimicrobiano de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015) e sua inibição da formação de biofilme pela técnica CV (DE CARVALHO *et al.*, 2019; STEPANOVIC *et al.*, 2000), que são métodos clássicos usados por décadas. O mecanismo de ação também foi avaliado por ensaio de CV e MEV, que são ensaios capazes de evidenciar a ruptura da membrana por métodos bioquímicos (LIMA *et al.*, 2014) e morfológicos (HOLLMANN *et al.*, 2018).

Anteriormente, M-PONTX-Dq3a, de 23 resíduos, relacionado à Ponericina W e uma sequência derivada de M-PONTX-Dq4e (peptídeo de 28 resíduos amidado) relacionado à Ponericina G, foram avaliados contra bactérias Gram-negativas resistentes, nas quais o peptídeo derivado de M-PONTX-Dq4e foi eficaz, mas M-PONTX-Dq3a não mostrou efeito (DODOU LIMA; SIDRIM DE PAULA CAVALCANTE; RÁDIS-BAPTISTA, 2020). No entanto, neste trabalho, M-PONTX-Dq3a foi o peptídeo mais potente, inclusive em uma cepa de MRSA, mas M-PONTX-Dq4e apresentou baixa potência contra *S. aureus*.

M-PONTX-Dq3b e M-PONTX-Dq3c são dois fragmentos de M-PONTX-Dq3a encontrados naturalmente no veneno, que têm 13 e 11 resíduos, respectivamente. Eles mostraram menor potência do que o peptídeo original em algumas atividades biológicas (DODOU LIMA *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2018). Neste trabalho, perfil semelhante foi observado. M-PONTX-Dq3b mostrou baixa potência e M-PONTX-Dq3c mostrou efeito indeterminado nas concentrações testadas.

A carga líquida de PAMs catiônicos foi sugerida como necessária para interagir com componentes carregados negativamente de membranas de micro-organismos (DODOU LIMA *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2018). No entanto, algumas características físico-químicas, como momento hidrofóbico e hidrofobicidade, também foram correlacionadas com a interação da membrana (DRIN; ANTONNY, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2012). Peptídeos ativos em membranas biológicas frequentemente mostram hidrofobicidade entre 0,1 e 0,6 e momento hidrofóbico maior que 0,2 (DODOU LIMA *et al.*, 2020). M-PONTX-Dq3b e M-PONTX-Dq3c exibem carga líquida inferior do que M-PONTX-Dq3a e hidrofobicidade superior a 0,6 (LIMA *et al.*, 2018), o que, em conjunto, poderia explicar a menor potência desses dois peptídeos neste trabalho. Assim, continuamos os ensaios em MRSA, mecanismo de ação e formação de biofilme apenas com M-PONTX-Dq3a.

As infecções por *S. aureus* são geralmente tratadas com oxacilina em cepas sensíveis, mas nas resistentes à metilicina são tratadas com vancomicina (THABIT *et al.*, 2015). A vancomicina tem sido a base da terapia de MRSA, apesar de deficiências importantes, como pobre penetração em tecidos e intracelular, efeitos bactericidas lentos (> 12h) e o recente surgimento de susceptibilidade diminuída à vancomicina em alguns isolados de *S. aureus* (HAGIHARA *et al.*, 2012). Neste trabalho, o M-PONTX-Dq3a apresentou efeito bactericida rápido (6 h), apresentando grande vantagem para o tratamento efetivo do MRSA. Além disso, os valores de CIM de M-PONTX-Dq3a encontrados neste trabalho são semelhantes aos valores de CIM de vancomicina em ambas as cepas.

O surgimento de patógenos com uma variedade de mecanismos de resistência intensificou os desafios associados ao controle de infecções e estratégias de tratamento, sendo necessários novos mecanismos de ação (THABIT; CRANDON; NICOLAU, 2015). O mecanismo dos PAMs é geralmente drástico se a concentração limite for atingida (HOLLMANN *et al.*, 2018), como ruptura do invólucro. Neste trabalho, M-PONTX-Dq3a apresentou alteração na permeabilidade da membrana (ensaio CV), enquanto a oxacilina não. A oxacilina inibe a biossíntese da parede celular bacteriana, sem afetar a membrana diretamente, enquanto o M-PONTX-Dq3a parece atuar diretamente na parede celular.

A ruptura da membrana foi descrita como o mecanismo de ação de DqV sobre *S. aureus* (LIMA *et al.*, 2014) e MEV foi usado para confirmar o efeito de membrana de M-PONTX-Dq3a sugerido pelo ensaio CV. Imagens de MEV mostraram danos drásticos à membrana na concentração de CIM, com a presença de várias bolhas projetando-se da superfície da célula na concentração de CLM, confirmando o efeito de membrana.

A presença de múltiplas bolhas projetando-se da superfície celular é resultado da interação peptídeo-membrana, que pode levar à desestabilização da membrana externa e, posteriormente, à ruptura do invólucro celular. Esse fenômeno poderia ser explicado por este tipo de PAM, primeiro causar uma desestabilização da parede celular e depois da membrana (HOLLMANN *et al.*, 2018). Nossas imagens de MEV mostraram esse perfil na concentração de CLM, mesma concentração capaz de inibir a formação de biofilme.

Os PAMs têm grande potencial como agentes antibiofilme, como a Polimixina E (Colistina), um PAM clinicamente disponível, sendo frequentemente utilizado como medicamento de último recurso em infecções associadas ao biofilme, quando surge resistência a todos os outros medicamentos. O uso de PAMs para o desenvolvimento de revestimentos superficiais antiadesivos tem sido pesquisado como estratégias para combater ou prevenir infecções associadas ao biofilme de implantes médicos (SÁNCHEZ-GÓMEZ; MARTÍNEZ-DE-TEJADA, 2017). Neste trabalho, descrevemos um PAM com efeito na inibição da formação de biofilme em MSSA e MRSA em baixas concentrações (1,56-3,12 μ M).

No entanto M-PONTX-Dq3a mostra toxicidade em células de mamíferos em concentrações de cerca de 25 μ M (LIMA *et al.*, 2018), neste trabalho mostramos valores de CIM e CLM em MRSA e MSSA 32 e 16 vezes, respectivamente, menores do que as concentrações tóxicas. Além disso, mostramos inibição da formação de biofilme também em ambas as cepas, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de revestimentos superficiais antiadesivos.

Além disso, a estratégia de design molecular guiado por ferramentas físico-químicas pode ser usada para melhorar os PAMs. Ajustando parâmetros físico-químicos, como fração helicoidal, hidrofobicidade e momento hidrofóbico, é possível

projetar peptídeos sintéticos não tóxicos com potência antimicrobiana aumentada *in vitro* e atividade anti-infecciosa *in vivo* (TORRES *et al.*, 2018).

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, este trabalho descreve um peptídeo antimicrobiano biologicamente ativo contra cepas de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina com rápido mecanismo de ação por danos em membrana, bem como na inibição na formação de seus biofilmes. M-PONTX-Dq3a abre novas perspectivas para prevenir a formação de biofilme de *S. aureus* em dispositivos médicos, bem como tratamento tópico para cepas resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIER, Justyna; EFENBERGER, Magdalena; BRZEZIŃSKA-BLASZCZYK, Ewa. **Cathelicidin impact on inflammatory cells**. *Central-European journal of immunology*, v. 40, n. 2, p. 225–235, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26557038/>. Acesso em: 30 nov. 2021.

AUTA, Asa *et al.* **Global access to antibiotics without prescription in community pharmacies: A systematic review and meta-analysis**. *Journal of Infection*, v. 78, n. 1, p. 8–18, 1 jan. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29981773/>. Acesso em: 28 ago. 2021.

BAHAR, Ali *et al.* **Antimicrobial Peptides**. *Pharmaceuticals*, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 28 nov. 2013. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1424-8247/6/12/1543>. Acesso em: 22 abr. 2019.

BATISTA, Andressa H M *et al.* **Antimicrobial Effects of Violacein against Planktonic Cells and Biofilms of *Staphylococcus aureus***. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 22, n. 10, p. 1534, 25 set. 2017. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/10/1534>. Acesso em: 14 set. 2018.

BROWNE, Katrina *et al.* **A new era of antibiotics: The clinical potential of antimicrobial peptides**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 19, p. 1–23, 2020.

BUCKI, Robert *et al.* **Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide**. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, v. 58, n. 1, p. 15–25, fev. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20049649/>. Acesso em: 30 nov. 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). M07-A10 **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Tenth Edition. *Clinical Infectious Diseases*, v. 35, n. 2, 2015. Disponível em: www.clsi.org. Acesso em: 13 maio 2020.

COLOGNA, Camila Takeno *et al.* **Peptidomic comparison and characterization of the major components of the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four different areas of Brazil**. *Journal of Proteomics*, v. 94, p. 413–422, 6 dez. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.017>. Acesso em: 5 set. 2017.

Control of infectious diseases, 1900-1999. *Journal of the American Medical Association*. [S.l.: s.n.], 15 set. 1999

COSSART, Yvonne E. **The rise and fall of infectious diseases: Australian perspectives, 1914-2014**. *The Medical journal of Australia*, v. 201, n. 1 Suppl, p. S11–S14, 1 jul. 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.5694/mja14.00112>. Acesso em: 28 ago. 2021.

DE CARVALHO, Danielle Bruno *et al.* **Fire ant venom alkaloids inhibit biofilm formation.** *Toxins*, v. 11, n. 7, 2019.

DEAN, Scott N.; BISHOP, Barney M.; VAN HOEK, Monique L. **Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm to Alpha-Helical Peptides: D-enantiomer of LL-37.** *Frontiers in microbiology*, v. 2, n. JULY, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21772832/>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

DEVI, K Pandima *et al.* **Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane.** *Journal of ethnopharmacology*, v. 130, n. 1, p. 107–15, 6 jul. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874110002564>>. Acesso em: 14 set. 2018.

DODOU LIMA, Hilania V.; SIDRIM DE PAULA CAVALCANTE, Carolina; RÁDIS-BAPTISTA, Gandhi. **Antimicrobial activity of synthetic Dq-3162, a 28-residue ponicin G-like dinoponeratoxin from the giant ant *Dinoponera quadriceps* venom, against carbapenem-resistant bacteria.** *Toxicon*, v. 187, n. May, p. 19–28, 1 nov. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.015>>. Acesso em: 14 set. 2020.

DRIN, Guillaume; ANTONNY, Bruno. **Amphipathic helices and membrane curvature.** *FEBS letters*, v. 584, n. 9, p. 1840–7, 3 maio 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2009.10.022>>. Acesso em: 23 jan. 2018.

EBENHAN, Thomas *et al.* **Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging.** *BioMed research international*, v. 2014, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25243191/>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

EGOROV, AM; ULYASHOVA, MM; RUBTSOVA, MY. **Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance.** *Acta naturae*, v. 10, n. 4, p. 33–48, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30713760/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

GHARAIBEH, Mohammad H.; SHATNAWI, Shoroq Q. **An overview of colistin resistance, mobilized colistin resistance genes dissemination, global responses, and the alternatives to colistin: A review.** *Veterinary World*. [S.l.]: Vet World. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32009752/>>. Acesso em: 28 ago. 2021. , 2019

GIULIANI, Andrea; PIRRI, Giovanna; NICOLETTO, Silvia Fabiole. **Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics.** *Central European Journal of Biology*, v. 2, n. 1, p. 1–33, 2007. Disponível em: <<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

HAGIHARA, Mao *et al.* **In vitro pharmacodynamics of vancomycin and cefazolin alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 1, p. 202–207, 1 jan. 2012. Disponível em: <<http://aac.asm.org/>>. Acesso em: 16 set. 2020.

HANCOCK, Robert E.W.; CHAPPLE, Daniel S. **Peptide antibiotics. Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1317–1323, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10348745/>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

HANCOCK, Robert Ew. **Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials**. *The Lancet. Infectious diseases*, v. 1, n. 3, p. 156–164, 1 out. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11871492/>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

HARVEY, Alan L. **Toxins and drug discovery**. *Toxicon*, v. 92, p. 193–200, 15 dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25448391>>. Acesso em: 14 set. 2018.

HIRAMATSU, K *et al.* **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 40, n. 1, p. 135–136, 1 jul. 1997. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article/40/1/135/816631>>. Acesso em: 2 set. 2021.

HIRAMATSU, Keiichi. **Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: A new model of antibiotic resistance**. *Lancet Infectious Diseases*. [S.l.]: Lancet Infect Dis. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11871491/>>. Acesso em: 2 set. 2021. , 1 out. 2001.

HOLLMANN, Axel *et al.* **Antimicrobial peptides: Interaction with model and biological membranes and synergism with chemical antibiotics**. *Frontiers in Chemistry*, v. 6, n. JUN, p. 1–13, 2018.

IERANO, Courtney *et al.* **Appropriateness of Surgical Antimicrobial Prophylaxis Practices in Australia**. *JAMA Network Open*, v. 2, n. 11, p. e1915003–e1915003, 1 nov. 2019. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2754258>>. Acesso em: 28 ago. 2021.

JEVONS; P., M. **Celbenin-resistance *Staphylococci***. *Br Med J*, p. 124–125, 1961. Disponível em: <<https://ci.nii.ac.jp/naid/10007108018>>. Acesso em: 2 set. 2021.

JOHNSON, Stephen R *et al.* **A biochemical characterization of the major peptides from the Venom of the giant Neotropical hunting ant *Dinoponera australis***. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, v. 55, n. 4, p. 702–10, 1 abr. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010109005108>>. Acesso em: 27 jan. 2018.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. **A new class of genetic element, *staphylococcus cassette chromosome mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus***. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. 6, p. 1549–1555, 2000. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/aac>>. Acesso em: 2 set. 2021.

KIRBY, William M.M. **Extraction of a highly potent penicillin inactivator from**

penicillin resistant staphylococci. *Science*, v. 99, n. 2579, p. 452–453, 1944.

KUMAR, Prashant; KIZHAKKEDATHU, Jayachandran N.; STRAUS, Suzana K. **Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo.** *Biomolecules*, v. 8, n. 1, 1 mar. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29351202/>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

LAKHUNDI, Sahreena; ZHANG, Kunyan. **Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology.** *Clinical microbiology reviews*. [S.l.]: Clin Microbiol Rev. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30209034/>>. Acesso em: 2 set. 2021. , 1 out. 2018

LANDSTEDT, Kristoffer *et al.* **Antibiotic prescriptions for inpatients having non-bacterial diagnosis at medicine departments of two private sector hospitals in Madhya Pradesh, India: A cross-sectional study.** *BMJ Open*, v. 7, n. 4, p. e012974, 1 abr. 2017. Disponível em: <<https://bmjopen.bmj.com/content/7/4/e012974>>. Acesso em: 28 ago. 2021.

LAWRENCE, Jeffrey G.; OCHMAN, Howard. **Amelioration of Bacterial Genomes: Rates of Change and Exchange.** *Journal of Molecular Evolution* 1997 44:4, v. 44, n. 4, p. 383–397, 1997. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/PL00006158>>. Acesso em: 2 set. 2021.

LEE, Andie S. *et al.* **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, n. May, p. 1–23, 2018. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>>.

LEMAITRE, Bruno *et al.* **The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults.** *Cell*, v. 86, n. 6, p. 973–983, 20 set. 1996. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S0092867400801725/fulltext>>. Acesso em: 4 set. 2021.

LIMA, D. B. *et al.* **Antimicrobial effect of *Dinoponera quadriceps* (Hymenoptera: Formicidae) venom against *Staphylococcus aureus* strains.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 117, n. 2, p. 390–396, 2014.

LIMA, D.B. *et al.* **Antiparasitic effect of *Dinoponera quadriceps* giant ant venom.** *Toxicon*, v. 120, p. 128–132, set. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010116302410>>. Acesso em: 25 ago. 2017.

LIMA, Dânya Bandeira *et al.* **The dinoponeratoxin peptides from the giant ant *Dinoponera quadriceps* display in vitro antitrypanosomal activity.** *Biological Chemistry*, v. 399, n. 2, p. 187–196, 26 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/bchm.just-accepted/hsz-2017-0198/hsz-2017-0198.xml>>. Acesso em: 6 dez. 2017.

LIMA, Hilania Valéria Dodou; CAVALCANTE, Carolina Sidrim de Paula; RÁDIS-BAPTISTA, Gandhi. **Antifungal in vitro activity of pilosulin- and ponericin-like**

peptides from the giant ant *Dinoponera quadriceps* and synergistic effects with antimycotic drugs. *Antibiotics*, v. 9, n. 6, p. 1–25, 2020.

LISTER, Jessica L.; HORSWILL, Alexander R. ***Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal.** *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 4, n. DEC, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25566513/>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

LONG, Katherine S.; VESTER, Birte. ***Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome.*** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. [S.l.]: Antimicrob Agents Chemother. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22143525/>>. Acesso em: 2 set. 2021. , fev. 2012

MADSEN, Jonas Stenlørkke *et al.* **The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer.** *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 65, n. 2, p. 183–195, 1 jul. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22444301/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

MARR, Alexandra K.; GOODERHAM, William J.; HANCOCK, Robert EW. **Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook.** *Current opinion in pharmacology*, v. 6, n. 5, p. 468–472, out. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16890021/>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

MARTIN, Michael J.; THOTTATHIL, Sapna E; NEWMAN, Thomas B. **Antibiotics overuse in animal agriculture: A call to action for health care providers.** *American Journal of Public Health*, v. 105, n. 12, p. 2409–2410, 6 nov. 2015. Disponível em: <<http://ajph.aphapublications.org/>>. Acesso em: 28 ago. 2021.

MARXER, Monika; VOLLENWEIDER, Vera; SCHMID-HEMPEL, Paul. **Insect antimicrobial peptides act synergistically to inhibit a trypanosome parasite.** *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 371, n. 1695, 26 maio 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27160603/>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

MATSUHASHI, M. *et al.* **Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*.** *Journal of Bacteriology*, v. 167, n. 3, p. 975–980, 1986. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/jb>>. Acesso em: 2 set. 2021.

MELLO, C.P. Clarissa Perdigão *et al.* **Evaluation of the antichagasic activity of batroxidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland.** *Toxicon*, v. 130, p. 56–62, maio 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010117300776>>. Acesso em: 6 dez. 2017.

MILANI, Richard V. *et al.* **Reducing inappropriate outpatient antibiotic prescribing: Normative comparison using unblinded provider reports.** *BMJ Open Quality*, v. 8, n. 1, 1 fev. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30997411/>>. Acesso em: 28 ago. 2021.

MUNITA JM; ARIAS CA. **Mechanisms of Antibiotic Resistance**. *Microbiology spectrum*, v. 4, n. 2, p. 464–472, maio 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27227291/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

O'NEILL, Jim. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations: the review on antimicrobial resistance; 2016** [Available from: <https://amr-review.org/Publications.html>]. [S.l.: s.n.], 2019. Disponível em: <[https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final paper_with cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf)>. Acesso em: 28 ago. 2021.

OVERHAGE, Joerg *et al.* **Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation**. *Infection and immunity*, v. 76, n. 9, p. 4176–4182, set. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18591225/>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

PUSHPANATHAN, Muthuirulan; GUNASEKARAN, Paramasamy; RAJENDHRAN, Jeyaprakash. **Antimicrobial peptides: versatile biological properties**. *International journal of peptides*, v. 2013, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23935642/>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

RADEK, Katherine; GALLO, Richard. **Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system**. *Seminars in immunopathology*, v. 29, n. 1, p. 27–43, abr. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17621952/>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

RAMMELKAMP, Charles H.; MAXON, Thelma. **Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin**.*: <https://doi.org/10.3181/00379727-51-13986>, v. 51, n. 3, p. 386–389, 9 nov. 2016. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-51-13986>>. Acesso em: 2 set. 2021.

SAGINUR, Raphael *et al.* **Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections**. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 50, n. 1, p. 55–61, 1 jan. 2006. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.50.1.55-61.2006>>. Acesso em: 14 set. 2018.

SÁNCHEZ-GÓMEZ, Susana; MARTÍNEZ-DE-TEJADA, Guillermo. **Antimicrobial Peptides as Anti-biofilm Agents in Medical Implants**. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 5, p. 590–603, 12 jan. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27411324/>>. Acesso em: 15 set. 2020.

SCHITO, G.C. **The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus***. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 12, n. SUPPL. 1, p. 3–8, 1 jan. 2006. Disponível em: <<http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X15600829/fulltext>>. Acesso em: 2 set. 2021.

SEYFI, Roghayyeh *et al.* **Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and**

Mechanism of Action. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 26, n. 3, p. 1451–1463, 2020.

SHANHOLTZER, C. J. *et al.* **MBCs for *Staphylococcus aureus* as determined by macrodilution and microdilution techniques.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 26, n. 2, p. 214–219, 1984. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6486764/>>. Acesso em: 14 set. 2020.

SHIELDS, Ryan K. *et al.* **Emergence of ceftazidime-avibactam resistance due to plasmid-borne blaKPC-3 mutations during treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 3, 1 mar. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28031201/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

Sir Alexander Fleming - **Nobel Lecture: Penicillin** - NobelPrize.org. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/fleming/lecture/>>. Acesso em: 28 ago. 2021.

STEPANOVIC, S *et al.* **A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.** *Journal of microbiological methods*, v. 40, n. 2, p. 175–9, abr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699673>>. Acesso em: 14 set. 2018.

SUN, Yen; SUN, Tzu-Lin; HUANG, Huey W. **Mode of Action of Antimicrobial Peptides on *E. coli* Spheroplasts.** *Biophysical journal*, v. 111, n. 1, p. 132–9, 12 jul. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349516303629>>. Acesso em: 23 jan. 2018.

TEIXEIRA, Vitor; FEIO, Maria J.; BASTOS, Margarida. **Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes.** *Progress in Lipid Research*, v. 51, n. 2, p. 149–177, abr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22245454>>. Acesso em: 23 jan. 2018.

THABIT, Abrar K; CRANDON, Jared L; NICOLAU, David P. **Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials.** *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 16, n. 2, p. 159–177, 22 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25496207>>. Acesso em: 14 set. 2018.

THOMAS, Christopher M.; NIELSEN, Kaare M. **Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria.** *Nature Reviews Microbiology* 2005 3:9, v. 3, n. 9, p. 711–721, set. 2005. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro1234>>. Acesso em: 2 set. 2021.

TORRENT, Marc *et al.* **Antimicrobial peptide action on parasites.** *Current drug targets*, v. 13, n. 9, p. 1138–47, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664071>>. Acesso em: 23 jan. 2018.

TORRES, Alba F. C. *et al.* **Transcriptome Analysis in Venom Gland of the**

Predatory Giant Ant *Dinoponera quadriceps*: Insights into the Polypeptide Toxin Arsenal of Hymenopterans. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. e87556, 31 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24498135>>. Acesso em: 14 set. 2018.

TORRES, Marcelo D.T. *et al.* **Structure-function-guided exploration of the antimicrobial peptide polybia-CP identifies activity determinants and generates synthetic therapeutic candidates.** *Communications Biology*, v. 1, n. 1, p. 1–16, 2018.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES; CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States. *Centers for Disease Control and Prevention*, p. 1–113, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>>. Acesso em: 2 set. 2021.

UTSUI, Y.; YOKOTA, T. **Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 28, n. 3, p. 397–403, 1985. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/aac>>. Acesso em: 2 set. 2021.

VENKATESAN, Nandakumar; PERUMAL, Govindaraj; DOBLE, Mukesh. **Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria.** *Future Microbiology*. [S.l.]: Future Microbiol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26517598/>>. Acesso em: 2 set. 2021. , 1 nov. 2015

VUONG, Cuong; OTTO, Michael. ***Staphylococcus epidermidis* infections.** *Microbes and infection*, v. 4, n. 4, p. 481–9, abr. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932199>>. Acesso em: 14 set. 2018.

WHITBY, M.; MCLAWS, M. L.; BERRY, G. **Risk of death from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: A meta-analysis.** *Medical Journal of Australia*. [S.l.]: Med J Aust. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11587259/>>. Acesso em: 2 set. 2021. , 3 set. 2001

WOLK, D. M. *et al.* **Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in wound specimens and blood cultures:** Multicenter preclinical evaluation of the cepheid Xpert MRSA/SA skin and soft tissue and blood culture assays. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 3, p. 823–826, mar. 2009. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/jcm>>. Acesso em: 2 set. 2021.

YAVARI, Bahram *et al.* **The potential use of peptides for cancer treatment.** *Current Protein & Peptide Science*, v. 19, 11 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29332577>>. Acesso em: 23 jan. 2018.

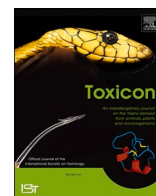
ZASLOFF, Michael. **Antimicrobial peptides of multicellular organisms.** *Nature*, v. 415, n. 6870, p. 389–395, 24 jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807545>>. Acesso em: 1 fev. 2018.

ZHANG, Ling Juan; GALLO, Richard L. **Antimicrobial peptides.** *Current Biology*. [S.l.]: Curr Biol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26766224/>>. Acesso em: 4 set. 2021. , 11 jan. 2016

ANEXO A

ARTIGO CIENTÍFICO:

***“Dinoponera quadriceps* venom as a source of active agents against *Staphylococcus aureus*”**



Dinoponera quadricaps venom as a source of active agents against *Staphylococcus aureus*

Larissa Queiroz Rocha^a, Mar Orzaéz^b, Alicia Belén García-Jareño^b, Joao Victor Serra Nunes^a,
Bruna Ribeiro Duque^a, Tiago Lima Sampaio^a, Renata Sousa Alves^a, Dânya Bandeira Lima^a,
Alice Maria Costa Martins^{a,*}

^a Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^b Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Staphylococcus aureus
Antimicrobial peptides
Methicillin-resistant
Biofilm
Dinoponeratoxins

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a highly virulent pathogen, capable of biofilm formation and responsible for thousands of deaths each year. The prevalence of Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) strains has increased in recent years and thus, the development of new antibiotics has become necessary. Antimicrobial Peptides (AMPs) are effective against a variety of multidrug-resistant bacteria and low levels of resistance have been reported regarding these molecules. *Dinoponera quadricaps* ant venom (DqV) has been described regarding its effect against *S. aureus*. In this study, we have evaluated the antibacterial effect of DqV-AMPs, the dinoponeratoxins (DNTxs), against Methicillin-Sensitive and a Methicillin-Resistant *S. aureus* strains. Our results show DNTx M-PONTX-Dq3a as a potent inhibitor of both strains, being able to prevent biofilm formation at low micromolar range (0.78–3.12 μ M). It also showed a short-time effect through membrane disruption. M-PONTX-Dq3a opens up new perspectives for the prevention of biofilm formation through the development of anti-adhesive surface coatings on medical devices, as well as the treatment of resistant strains in skin or soft tissue infections.

1. Introduction

In recent years, the prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains has increased, being responsible for nearly 50,000 deaths every year in the United States and Europe (O'Neil, 2014). *S. aureus* infection can cause bacteremia, infective endocarditis, skin and soft tissue infections, osteoarticular infections, pleuro-pulmonary infections and device-related infections, being able to form a biofilm on their surface. The biofilm provides a protective matrix around the encased bacteria and this physical barrier is highly resistant to antimicrobials and host immune defenses and thus, the surgical removal of the device becomes necessary to eradicate the infection (Hassoun et al., 2017; Tong et al., 2015). They increase patient mortality and morbidity, prolong hospital length of stay and cause heavy economic losses (Sánchez-Gómez and Martínez-de-Tejada, 2017). Thus, the development of new therapies to treat/prevent biofilm formation or multidrug-resistant bacteria is urgent (Thabit et al., 2015).

Antimicrobial peptides (AMPs) are desirable for antimicrobial drug development because they have been reported as being effective against

a variety of low-resistance and multidrug-resistant bacteria (Ashby et al., 2017; De Carvalho et al., 2019). These molecules are found in arthropod venoms (Sabiá Júnior et al., 2019), such as in *Dinoponera quadricaps* ant venom (DqV). The Dinoponeratoxins (DNTxs), AMPs from DqV, show homology with AMPs with broad-spectrum antimicrobial activity, such as pilosulins (Wanandy et al., 2015) and ponerinins (Johnson et al., 2010), also being called pilosulin- and ponerin-like peptides (Mariano et al., 2019).

Our group has previously demonstrated that DqV showed antibacterial effect against MRSA and Methicillin-Sensitive *S. aureus* (MSSA) standard strains (Lima et al., 2014). However, the peptide components responsible for this activity have not been explored. So, the aim of this study was evaluate the antibacterial effect of the four DNTxs (M-PONTX-Dq3a, -Dq3b, -Dq3c and -Dq4e) against MRSA and MSSA strains, as well their mechanism of action and effects on biofilm formation inhibition. Here we show that one of the peptides present in the DqV, M-PONTX-Dq3a, is a potent inhibitor of both MRSA and MSSA strains, being able to prevent biofilm formation.

* Corresponding author.

E-mail address: alice@ufc.br (A.M.C. Martins).

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.11.003>

Received 21 September 2020; Received in revised form 28 October 2020; Accepted 8 November 2020

Available online 11 November 2020

0041-0101/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2. Materials and methods

2.1. Peptides and drugs

The four DNTxs, M-PONTX-Dq4e, M-PONTX-Dq3c, M-PONTX-Dq3b, and M-PONTX-Dq3a, were synthesized by solid phase synthesis (LibertyBlue, Kamp-Lintfort, Germany) in *Centro de Investigación Principe Felipe* (Valencia, Spain), purified by HPLC and characterized by mass spectrometry analysis, as previously described (Lima et al., 2018). Peptide stock solutions were prepared at 1 mM with Phosphate Buffered Saline (PBS), divided into aliquots and kept at -20°C until they were used. Oxacillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and vancomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were weighted and reconstituted at each experiment. The amino acid sequences and physicochemical properties of DNTxs are described in Table 1.

2.2. Microbial strains

MSSA ATCC 6538P and MRSA ATCC 33591 strains were kindly donated by Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ. Bacterial cultures were maintained on Nutrient agar (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil) slope at 4°C and subcultured every 8 weeks.

2.3. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Lethal Concentration (MLC)

The MIC and MLC of the four peptides M-PONTX-Dq4e, M-PONTX-Dq3c, M-PONTX-Dq3b, M-PONTX-Dq3a against *S. aureus* were evaluated using the microdilution broth method (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015). Aliquots of the *S. aureus* suspensions at a concentration of 10^6 Colony-Forming Units per mL (CFU/mL) were prepared in Mueller-Hinton broth (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil) and incubated in 96-well plates with different concentrations of peptides (0.19–25 μM) or antibiotics (0.095–200 μM) for 24 h/ 37°C . The MIC was determined by the lowest concentration able to inhibit visible microbial growth. As experiment controls, oxacillin or vancomycin were used as positive controls, whereas PBS was used as negative control. The MLC was determined after plating wells with no visible microbial growth in plate count agar (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil) and the counting of viable cells after 24h/ 37°C of incubation (Shanholtzer et al., 1984). The MLC was the lowest concentration capable of killing 99.9% of cells from the initial inoculum.

2.4. Determination of Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC)

S. aureus ATCC 6538P and 33591 suspensions (10^6 CFU/mL) were incubated with different concentrations of M-PONTX-Dq3a (0.19–25 μM) or antibiotics (0.095–200 μM) in Tryptic Soy Broth (TSB) with 1% (p/v) of glucose for 24 h/ 37°C . The biofilm was obtained and its mass was quantified using the crystal violet technique (De Carvalho et al., 2019; Stepanovic et al., 2000). The wells were washed with 0.85% sterile saline solution and fixed with 99% methanol for 15 min. After fixation, the crystal violet solution (CV, Cromato Produtos Químicos, São Paulo, Brazil) 2% (p/v) was added for 15 min. The CV uptake by the

bacterial cells was released by acetic acid at 33% for 15 min and optical density reading was performed at 570 nm on a microplate reader (Biotek ELX-800, Winooski, VT, USA). The MBIC was the lowest concentration able to inhibit the formation of bacterial biofilm.

2.5. Rate of kill assessment

M-PONTX-Dq3a at concentrations corresponding to MIC and MLC was incubated with *S. aureus* ATCC 6538P suspension (10^6 CFU/mL) on exponential growth in Muller-Hinton broth in 96-well microplates. The microplates were incubated at 37°C and aliquots were removed at different times of incubation (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 24 h), diluted in 0.85% sterile saline solution and plated on plate count agar for colony counting after 24 h/ 37°C of incubation. *S. aureus* cultures treated with PBS were used as the experimental control. The results were expressed in \log_{10} CFU/mL.

2.6. Crystal violet (CV) assay

Alterations in membrane permeability induced by M-PONTX-Dq3a were evaluated through the CV assay (Lima et al., 2014). *S. aureus* 6538P suspensions were subcultured and incubated at 37°C overnight in BHI broth. Cells were harvested at 4500 g for 5 min at 4°C , washed twice and suspended in PBS (10^8 CFU/mL). M-PONTX-Dq3a (MIC, MLC and 2 x MLC), oxacillin (MLC), positive control (ethylenediaminetetraacetic acid—EDTA 0.25 M; Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) and negative control (sterile PBS) were added to bacterial suspensions and incubated for 30 min at 37°C . After this incubation time, samples were centrifuged at 9300 g for 5 min and resuspended in CV 10 $\mu\text{g/mL}$ for 10 min at 37°C . Finally, samples were centrifuged at 13,400 g for 15 min and the optical density of the supernatant was read at 570 nm using a microplate reader (Biotek ELX-800, Winooski, VT, USA). The CV solution absorbance was considered to be 100% and the percentage of CV uptake in the samples was calculated.

2.7. Scanning electron microscopy (SEM)

Changes in bacterial morphology induced by M-PONTX-Dq3a were assessed using SEM. *S. aureus* cultures (10^6 CFU/mL) were incubated in Mueller-Hinton broth and treated with M-PONTX-Dq3a at concentrations corresponding to the MIC and MLC for 6 h. After incubation, the cells were fixed for 2 h with a glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania) solution at 2.5%, washed twice in PBS, washed in distilled water, dehydrated with gradient ethanol (30–100%) for 5 min each time, dried with CO_2 , coated with gold and observed in a FEG Quanta 450 scanning electron microscope (FEI, Oregon, USA).

2.8. Statistical analysis

All experiments were performed three times in triplicate. The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's post-test. Statistical significance was achieved if $*p < 0.05$.

Table 1
Amino acid sequences and physicochemical properties of dinoponeratoxins.

Peptide		Net charge	H	μH
M-PONTX-Dq3a	FWGTLAKWALKAI PAAMGMKQNK	5.0	0.509	0.248
M-PONTX-Dq3b	FWGTLAKWALKAI	3.0	0.823	0.531
M-PONTX-Dq3c	FWGTLAKWALK	3.0	0.781	0.523
M-PONTX-Dq4e	GLKDWNNKHDKIVKVVKEMGKAGINAAGK	6.1	0.148	0.458

Sequences and physicochemical properties of M-PONTX-Dq3a, M-PONTX-Dq3b, M-PONTX-Dq3c and M-PONTX-Dq4e were previously described by Lima et al. (2018). The synthetic versions are all amidated, as in the venom. Net charge at neutral pH, hydrophobicity (H) and hydrophobic moment (μH) were calculated from <http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>.

3. Results

Four AMPs from DqV (M-PONTX-Dq3a, -Dq3b, -Dq3c and -Dq4e) were tested against the methicillin-sensitive *S. aureus* ATCC 6538P at different concentrations to evaluate MIC and MLC. Among all of them, M-PONTX-Dq3a was the most potent one, while M-PONTX-Dq3c showed no effect. M-PONTX-Dq4e and M-PONTX-Dq3b showed the same MLC, but M-PONTX-Dq3b showed a lower MIC. Oxacillin and vancomycin were used as positive controls of bacterial death induction. These antibiotics showed MIC and MLC values similar to that observed for M-PONTX-Dq3a (0.39–0.78 μM vs 0.78–1.56 μM) (Table 2).

Thus, the activity of the most potent peptide, M-PONTX-Dq3a, was studied on the MRSA ATCC 33591 strain and biofilm formation. M-PONTX-Dq3a showed MIC and MLC of 0.78 and 1.56 μM , respectively. This is of particular relevance, given that oxacillin effect on this MRSA strain showed a MIC of 200 μM , while vancomycin showed the same MIC and MLC values obtained for M-PONTX-Dq3a (Table 2).

Interestingly, in studies of biofilm formation, M-PONTX-Dq3a showed MBIC of 1.56 and 3.12 μM in MSSA and MRSA, respectively. It was effective at low concentrations, when oxacillin was not, maintaining a similar activity range to that produced by the commonly used treatment (vancomycin) (Table 2).

To better understand the mechanism of action of the M-PONTX-Dq3, we first evaluated the rate of kill in MSSA ATCC 6538P (Fig. 1). The treatment with M-PONTX-Dq3a was able to kill all the bacteria at 1.56 μM (MLC) after 6 h of incubation.

To study the capacity of M-PONTX-Dq3a to induce membrane permeation in the bacterial strain, we analyzed the uptake of crystal violet (CV) by bacteria treated at MIC, MLC and 2 x MLC concentrations. In contrast to oxacillin, the treatment with M-PONTX-Dq3a was able to increase the uptake of CV by *S. aureus* to 28–33%, suggesting different mechanisms of action for them. The chelating agent (disodium EDTA, 0.25 M) was included as a positive control, which also was able to increase CV uptake (Fig. 2).

To ensure membrane disruption is taking place, we performed SEM studies in bacterial cultures treated with M-PONTX-Dq3a. The cells treated with PBS showed integrity of membrane surface and preserved cell-to-cell adherence (Fig. 3A and B). Interestingly, the lowest concentration of M-PONTX-Dq3a (0.78 μM) produced the disruption of membranes (Fig. 3C, see white arrows) and the highest (1.56 μM) showed bubbles or blisters protruding from the bacterial surface as a result of the peptide-membrane interaction (Fig. 3D, see white arrows), thus confirming that M-PONTX-Dq3a causes bacterial wall disruption.

Table 2

Antimicrobial effect of dinoponeratoxins over *Staphylococcus aureus* strains.

	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P (MSSA)			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 (MRSA)		
	MIC (μM)	MLC (μM)	MBIC (μM)	MIC (μM)	MLC (μM)	MBIC (μM)
M-PONTX-Dq4e	12.5	25	nd	nd	Nd	Nd
M-PONTX-Dq3c	>50	>50	nd	nd	Nd	Nd
M-PONTX-Dq3b	6.25	25	nd	nd	Nd	Nd
M-PONTX-Dq3a	0.78	1.56	1.56	0.78	1.56	3.12
Oxacillin	0.39	0.39	0.19	200	>200	200
Vancomycin	0.39	0.78	0.19	0.78	1.56	0.78

Legend: Micromolar: μM ; MRSA: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA: Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*; ATCC: American Type Culture Collection; MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MLC: Minimum Lethal Concentration; MBIC: Minimum Biofilm Inhibitory Concentration; nd: Not done.

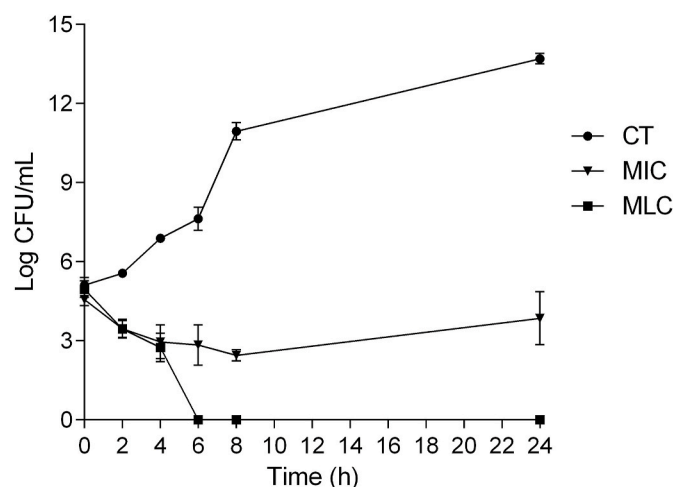


Fig. 1. Time-exposure effect of M-PONTX-Dq3a on *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P viability. (CT: Control, cells treated with Phosphate Buffer in Saline, MIC: Minimum Inhibitory Concentration of M-PONTX-Dq3a; MLC: Minimum Lethal Concentration of M-PONTX-Dq3a).

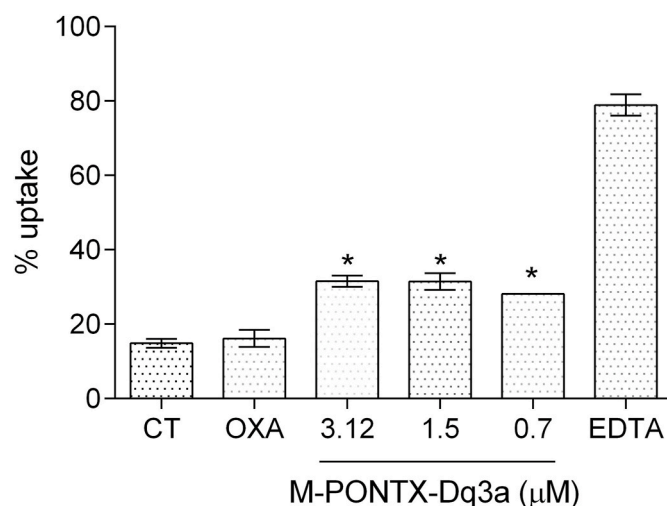


Fig. 2. Crystal violet uptake of M-PONTX-Dq3a-treated *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. (CT: Control, cells treated with Phosphate Buffer in Saline; OXA: cells treated with oxacillin 0.39 μM ; EDTA: cells treated with disodium EDTA 0.25 M). The mean \pm SEM for three replicates is shown, *p < 0.05.

4. Discussion

Dinoponera quadricaps ant venom is rich on DNTxs, of which amino acid sequences can vary with environmental characteristics (Cologna et al., 2013). The antimicrobial effect of the four DNTxs evaluated in this study has been recently described against Gram-negative bacteria (Dodou Lima et al., 2020) and fungi (Lima et al., 2020). However, their potential against *S. aureus*, which is suggested by the activity of their original venom (Lima et al., 2014), has not been explored yet.

In this study, we evaluated the effect of M-PONTX-Dq3a, M-PONTX-Dq3b, M-PONTX-Dq3c, and M-PONTX-Dq4e over two ATCC strains of *S. aureus*, MSSA 6538P and MRSA 33591, the same strains used in the study that assessed the original venom (Lima et al., 2014). Both are *S. aureus* biofilm-forming strains (Batista et al., 2017). DNTxs were evaluated for their antimicrobial effect according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2015) and their biofilm formation inhibition was assessed using the CV technique (De Carvalho et al., 2019; Stepanovic et al., 2000), which are classic methods that

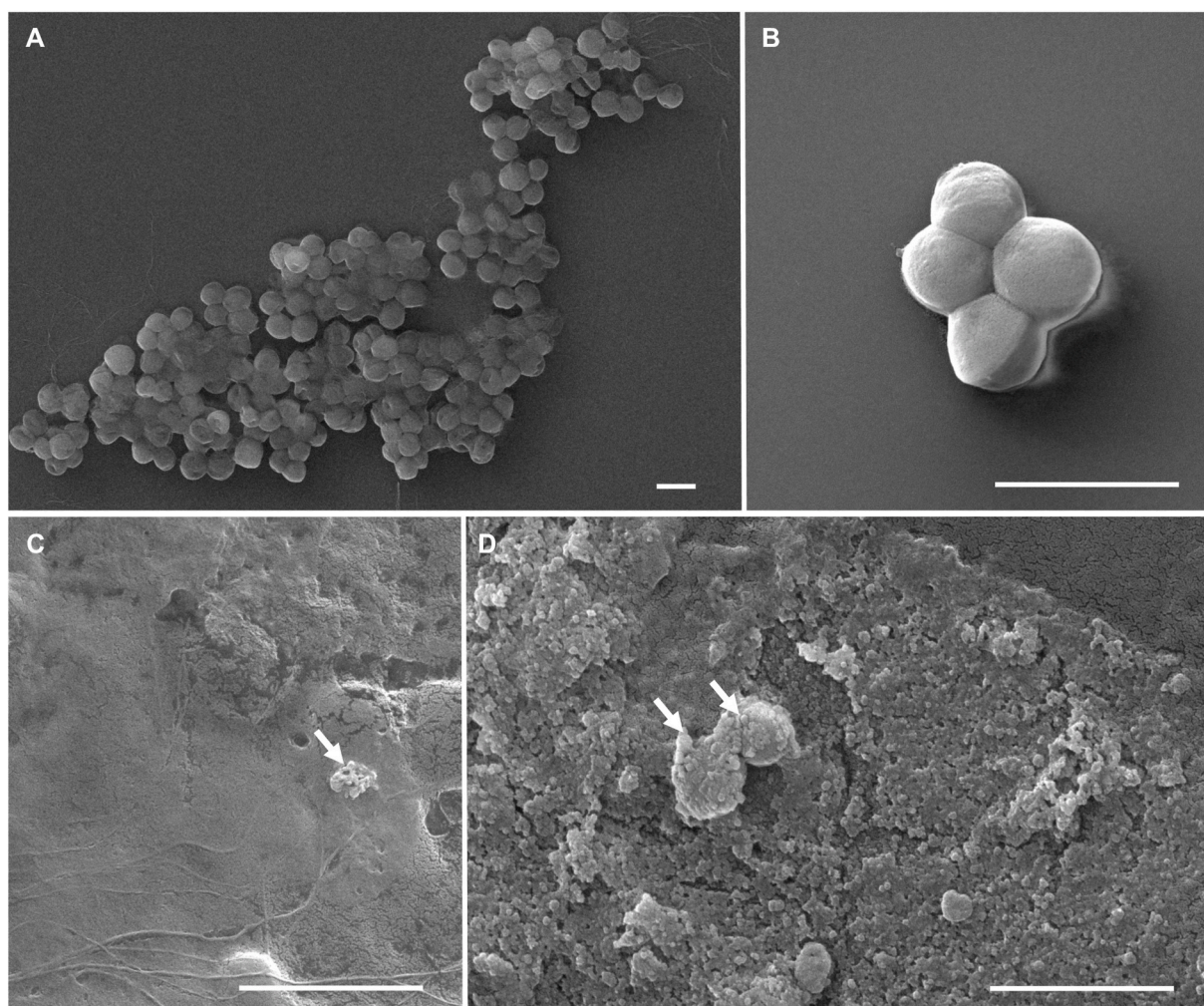


Fig. 3. Scanning electron microscopy images of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Cells without exposure to M-PONTX-Dq3a showing normal size, shape and cell-to-cell adherence (A–B). Cells exposed to M-PONTX-Dq3a 0.78 μ M showing membrane disruption (C; see white arrows). Cells exposed to M-PONTX-Dq3a 1.56 μ M showing bubbles or blisters protruding from the bacterial surface as a result of the peptide-membrane interaction (D, see white arrows). Scale bar: 2 μ m (μ m).

have been used for decades. The action mechanism was also evaluated using the CV assay and SEM, which are able to show membrane disruption using biochemical (Lima et al., 2014) and morphological (Hollmann et al., 2018) methods.

Previously, M-PONTX-Dq3a, a 23-residue peptide related to ponericin W and a sequence derived from M-PONTX-Dq4e (an amidated, 28-residue peptide) related to ponericin G, were evaluated against Gram-negative resistant bacteria, in which M-PONTX-Dq4e-derived peptide was effective, but M-PONTX-Dq3a was not (Dodou Lima et al., 2020). However, in this study, M-PONTX-Dq3a was shown to be the most potent peptide, including against a MRSA strain, while M-PONTX-Dq4e showed low potency against *S. aureus*.

The DNTxs M-PONTX-Dq4a, M-PONTX-Dq4b and U1-PONTX-Dq4d (Cologna et al., 2013; Touchard et al., 2016) have high homology with M-PONTX-Dq4e and these four peptides showed the highest activity against Gram-negative strains, with low or none activity over *S. aureus*.

M-PONTX-Dq3b and M-PONTX-Dq3c are two fragments of M-PONTX-Dq3a, which have 13 and 11 residues, respectively. They showed lower potency than the parent peptide regarding some biological activities (Lima et al., 2018, 2020), and a similar profile was observed in this study. M-PONTX-Dq3b showed low potency and M-PONTX-Dq3c showed no effect at the tested concentrations.

The net charge of cationic AMPs has been indicated as necessary to interact with negatively charged components of microorganism

membranes (Lima et al., 2018, 2020). However, some physicochemical characteristics, such as hydrophobic moment and hydrophobicity, have also been correlated with membrane interaction (Drin and Antonny, 2010; Teixeira et al., 2012). Active peptides in biological membranes frequently show hydrophobicity between 0.1 and 0.6 and a hydrophobic moment higher than 0.2 (Dodou Lima et al., 2020). M-PONTX-Dq3b and M-PONTX-Dq3c display lower net charge than M-PONTX-Dq3a and hydrophobicity higher than 0.6 (Lima et al., 2018), which, taken together, could explain the lower potency of these two peptides, as shown in this study.

Some peptides from ant venoms have demonstrated biotechnological potential as new antimicrobial agents, such as bicarinalin from *Tetramorium bicarinatum* venom (Eales et al., 2018; Guzman et al., 2017; Téné et al., 2016), ponericin-Q42 from *Ectatomma quadridens* venom (Pluzhnikov et al., 2014) and pilosulins from *Myrmecia pilosula* venom. Some pilosulins showed MIC values lower than 6.5 μ M (Wanandy et al., 2015), while M-PONTX-Dq3a showed a MIC value lower than 1 μ M against a MSSA strain. Thus, we continued the assays testing a MRSA, assessing the mechanism of action and biofilm formation with M-PONTX-Dq3a, the most promising peptide.

S. aureus infections are generally treated with oxacillin when the infection is caused by sensitive strains, but in cases of methicillin-resistant ones, these infections are treated with vancomycin (Thabit et al., 2015). Vancomycin has been the mainstay of anti-MRSA therapy, despite important shortcomings, such as poor tissue and intracellular

penetration, slow bactericidal effect (>12h) and the recent emergence of decreased vancomycin susceptibility in some isolated *S. aureus* strains (Hagihara et al., 2012). In this study, M-PONTX-Dq3a showed a fast bactericidal effect (6 h), disclosing an advantage for the actual treatment of MRSA infections. Furthermore, MIC values of M-PONTX-Dq3a found in this study are similar to the effect of MIC values of vancomycin on both strains.

The emergence of pathogens with different resistance mechanisms has intensified the challenges associated with infection control and treatment strategies and thus, new action mechanisms have become necessary (Thabit et al., 2015). Previously, our research group demonstrated the trypanocidal effect of M-PONTX-Dq3a through membrane disruption (Lima et al., 2018), as well as the effect of other peptides obtained from ant venom, resulting in bacterial membrane damage (Dekan et al., 2017). In this study, M-PONTX-Dq3a caused cell permeability alterations (CV assay), while oxacillin did not. Oxacillin inhibits bacterial cell-wall biosynthesis, without directly affecting the membrane, while M-PONTX-Dq3a seems to act directly on the cell wall.

Furthermore, membrane disruption was described as the action mechanism of DqV over *S. aureus* (Lima et al., 2014) and SEM was used to confirm the effect on the bacterial cell membrane by M-PONTX-Dq3a, as suggested by the CV assay. SEM images showed drastic membrane damage, with the presence of multiple blisters protruding from the cell surface, confirming the effect on the membrane.

The presence of multiple blisters or bubbles protruding from the cell surface is a result of the peptide-membrane interaction, which could lead to the cell involution disruption (Hollmann et al., 2018). Our SEM images showed this effect with the MLC (1.56 µM), which is the same concentration able to inhibit biofilm formation.

AMPs have great potential as anti-biofilm agents, such as polymyxin E (colistin), a clinically available AMP, which is frequently used as drug of last recourse in biofilm-associated infections, when there is resistance to all the other drugs. The use of AMPs for the development of anti-adhesive surface coatings have been evaluated as strategies to fight or prevent biofilm-associated infections of medical implants (Sánchez-Gómez and Martínez-de-Tejada, 2017). In this study, we described an AMP that showed an inhibition effect on biofilm formation in MSSA and MRSA at low concentrations (1.56–3.12 µM).

However, M-PONTX-Dq3a has shown toxicity in mammalian cells at concentrations of approximately 25 µM (Lima et al., 2018); in this study, we showed MIC and MLC values in MSSA and MRSA that were respectively 32 and 16 times lower than toxic concentrations. In addition, we also showed inhibition of biofilm formation for both strains, opening up new perspectives for the development of anti-adhesive surface coatings for medical devices.

Furthermore, a physicochemical-guided peptide design strategy could be used to improve AMPs. By adjusting physicochemical parameters, such as helical fraction, hydrophobicity, and hydrophobic moment, it is possible to design nontoxic synthetic peptides with enhanced sub-micromolar antimicrobial potency *in vitro* and anti-infective activity *in vivo* (Torres et al., 2018).

In conclusion, this study describes an AMP active against MSSA and MRSA, which is also able to inhibit the formation of their biofilms. M-PONTX-Dq3a opens up new perspectives to prevent biofilm formation of *S. aureus*, as well as treat resistant strains.

Funding

This research was funded by the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant numbers #431539/2018-9 #435426/2018-4, #306614/2019-7) and Coordenacao de aperfeicoamento de pessoal de nível superior (CAPES; PNPD fellowship of D. B. L., process number: 88887.368537/2019-00).

CRediT authorship contribution statement

Larissa Queiroz Rocha: Conceptualization, Methodology, Validation, Visualization, Investigation, Formal analysis, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Mar Orzaéz:** Writing - review & editing, Funding acquisition. **Alicia Belén García-Jareño:** Methodology. **Joao Victor Serra Nunes:** Methodology. **Bruna Ribeiro Duque:** Methodology. **Tiago Lima Sampaio:** Methodology, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Renata Sousa Alves:** Methodology, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Dânia Bandeira Lima:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Alice Maria Costa Martins:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We are thankful to the Analytical Center and Laboratory of Clinical and Toxicological Analysis (LACT) from Federal University of Ceará for the technical support on Electron Microscopy studies and support in microbiological assays. We also thank MSc. Pedro Aurio Maia Filho and PhD. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes for the technical support with the microplate reader.

References

- Ashby, M., Petkova, A., Gani, J., Mikut, R., Hilpert, K., 2017. Use of peptide libraries for identification and optimization of novel antimicrobial peptides. *Curr. Top. Med. Chem.* 17, 537–553. <https://doi.org/10.2174/1568026616666160713125555>.
- Batista, A.H.M., Moreira, A.C.D., de Carvalho, R.M., Sales, G.W.P., Nogueira, P.C.N., Grangeiro, T.B., Medeiros, S.C., Silveira, E.R., Nogueira, N.A.P., 2017. Antimicrobial effects of violacein against planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 22, 1534. <https://doi.org/10.3390/molecules22101534>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2015. M07-A10 methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—tenth edition. *Clin. Infect. Dis.* 35 <https://doi.org/10.1093/cid/ciw353>.
- Cologna, C.T., Cardoso, J. dos S., Jourdan, E., Degueldre, M., Upert, G., Gilles, N., Uetanabaro, A.P.T., Costa Neto, E.M., Thonart, P., de Pauw, E., Quinton, L., 2013. Peptidomic comparison and characterization of the major components of the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four different areas of Brazil. *J. Proteomics* 94, 413–422. <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2013.10.017>.
- De Carvalho, D.B., Fox, E.G.P., Dos Santos, D.G., De Sousa, J.S., Freire, D.M.G., Nogueira, F.C.S., Domont, G.B., De Castilho, L.V.A., De Alcântara Machado, E., 2019. Fire ant venom alkaloids inhibit biofilm formation. *Toxins* 11. <https://doi.org/10.3390/toxins11070420>.
- Dekan, Z., Headey, S.J., Scanlon, M., Baldo, B.A., Lee, T.H., Aguilar, M.I., Deuis, J.R., Vetter, I., Elliott, A.G., Amado, M., Cooper, M.A., Alewood, D., Alewood, P.F., 2017. Δ-Myrtoxin-Mp1a is a helical heterodimer from the venom of the jack jumper ant that has antimicrobial, membrane-disrupting, and nociceptive activities. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 8495–8499. <https://doi.org/10.1002/anie.201703360>.
- Dodou Lima, H.V., Sidrim de Paula Cavalcante, C., Rádís-Baptista, G., 2020. Antimicrobial activity of synthetic Dq-3162, a 28-residue ponerin G-like dinoponeratoxin from the giant ant *Dinoponera quadriceps* venom, against carbapenem-resistant bacteria. *Toxicol* 187, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2020.08.015>.
- Drin, G., Antony, B., 2010. Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS Lett.* 584, 1840–1847. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.022>.
- Eales, M.G., Ferrari, E., Goddard, A.D., Lancaster, L., Sanderson, P., Miller, C., 2018. Mechanistic and phenotypic studies of bicarinalin, BP100 and colistin action on *Acinetobacter baumannii*. *Res. Microbiol.* 169, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.04.005>.
- Guzman, J., Téné, N., Touchard, A., Castillo, D., Belkhef, H., Haddioui-Hbab, L., Treilhou, M., Sauvain, M., 2017. Anti-*Helicobacter pylori* properties of the ant-venom peptide bicarinalin. <https://doi.org/10.3390/toxins10010021>.
- Hagihara, M., Wiskirchen, D.E., Kuti, J.L., Nicolau, D.P., 2012. In vitro pharmacodynamics of vancomycin and cefazolin alone and in combination against

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 202–207. <https://doi.org/10.1128/AAC.05473-11>.
- Hassoun, A., Linden, P.K., Friedman, B., 2017. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit. Care*. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1801-3>.
- Hollmann, A., Martinez, M., Maturana, P., Semorile, L.C., Maffia, P.C., 2018. Antimicrobial peptides: interaction with model and biological membranes and synergism with chemical antibiotics. *Front. Chem.* 6, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00204>.
- Johnson, S.R., Copello, J.A., Evans, M.S., Suarez, A.V., 2010. A biochemical characterization of the major peptides from the Venom of the giant Neotropical hunting ant *Dinoponera australis*. *Toxicon* 55, 702–710. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.10.021>.
- Lima, D.B., Mello, C.P., Bandeira, I.C.J., De Menezes, R.R.P.P.B., Sampaio, T.L., Falcão, C.B., Morlighem, J.-É.É.R.L., Rádis-Baptista, G., Martins, A.M.C., 2018. The dinoponeratoxin peptides from the giant ant *Dinoponera quadriceps* display in vitro antitrypanosomal activity. *Biol. Chem.* 399, 187–196. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0198>.
- Lima, D.B., Torres, A.F.C., Mello, C.P., de Menezes, R.R.P.P.B., Sampaio, T.L., Canuto, J. A., da Silva, J.J.A., Freire, V.N., Quinet, Y.P., Havt, A., Monteiro, H.S.A., Nogueira, N.A.P., Martins, A.M.C., 2014. Antimicrobial effect of *Dinoponera quadriceps* (Hymenoptera: formicidae) venom against *Staphylococcus aureus* strains. *J. Appl. Microbiol.* 117, 390–396. <https://doi.org/10.1111/jam.12548>.
- Lima, H.V.D., Cavalcante, C.S. de P., Rádis-Baptista, G., 2020. Antifungal in vitro activity of pilosulin- and ponerisin-like peptides from the giant ant *dinoponera quadriceps* and synergistic effects with antimycotic drugs. *Antibiotics* 9, 1–25. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060354>.
- Mariano, D.O.C., de Oliveira, Ú.C., Zaharenko, A.J., Pimenta, D.C., Rádis-Baptista, G., Prieto-Da-Silva, Á.R. de B., 2019. Bottom-up proteomic analysis of polypeptide venom components of the giant ant *Dinoponera quadriceps*. *Toxins* 11, 448. <https://doi.org/10.3390/toxins11080448>.
- O'Neil, J., 2014. Review on Antibiotic Resistance. Antimicrobial Resistance : Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. Health and Wealth Nations.
- Pluzhnikov, K.A., Kozlov, S.A., Vassilevski, A.A., Vorontsova, O.V., Feofanov, A.V., Grishin, E.V., 2014. Linear antimicrobial peptides from *Ectatomma quadridens* ant venom. *Biochimie* 107, 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.09.012>.
- Sabiá Júnior, E.F., Menezes, L.F.S., de Araújo, I.F.S., Schwartz, E.F., 2019. Natural occurrence in venomous arthropods of antimicrobial peptides active against Protozoan parasites. *Toxins* 11, 563. <https://doi.org/10.3390/toxins11100563>.
- Sánchez-Gómez, S., Martínez-de-Tejada, G., 2017. Antimicrobial peptides as anti-biofilm agents in medical implants. *Curr. Top. Med. Chem.* 17, 590–603. <https://doi.org/10.2174/1568026616666160713141439>.
- Shanholtzer, C.J., Peterson, L.R., Mohn, M.L., Moody, J.A., Gerding, D.N., 1984. MBCs for *Staphylococcus aureus* as determined by macrodilution and microdilution techniques. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26, 214–219. <https://doi.org/10.1128/AAC.26.2.214>.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40, 175–179.
- Teixeira, V., Feio, M.J., Bastos, M., 2012. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res.* 51, 149–177. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>.
- Téné, N., Bonnafé, E., Berger, F., Rifflet, A., Guilhaudis, L., Ségalas-Milazzo, I., Pipy, B., Coste, A., Leprince, J., Treilhou, M., 2016. Biochemical and biophysical combined study of bicarinalin, an ant venom antimicrobial peptide. *Peptides* 79, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.04.001>.
- Thabitz, A.K., Crandon, J.L., Nicolau, D.P., 2015. Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials. *Expert Opin. Pharmacother.* 16, 159–177. <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.993381>.
- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G., 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>.
- Torres, M.D.T., Pedron, C.N., Higashikuni, Y., Kramer, R.M., Cardoso, M.H., Oshiro, K.G. N., Franco, O.L., Silva Junior, P.I., Silva, F.D., Oliveira Junior, V.X., Lu, T.K., de la Fuente-Nunez, C., 2018. Structure-function-guided exploration of the antimicrobial peptide polybia-CP identifies activity determinants and generates synthetic therapeutic candidates. *Commun. Biol.* 1, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0224-2>.
- Touchard, A., Aili, S.R., Fox, E.G.P., Escoubas, P., Orivel, J., Nicholson, G.M., Dejean, A., 2016. The biochemical toxin arsenal from ant venoms. *Toxins*. <https://doi.org/10.3390/toxins8010030>.
- Wanandy, T., Gueven, N., Davies, N.W., Brown, S.G.A., Wiese, M.D., 2015. Pilosulins: a review of the structure and mode of action of venom peptides from an Australian ant *Myrmecia pilosula*. *Toxicon*. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.013>.