



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CARINA KNIDEL

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DA
EPIGALOCATEQUINA GALATO EM *Staphylococcus aureus***

VITÓRIA - ES

2018

CARINA KNIDEL

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DA
EPIGALOCATEQUINA GALATO EM *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck

VITÓRIA - ES

2018

CARINA KNIDEL

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DA
EPIGALOCATEQUINA GALATO EM *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 06 de março de 2018.

Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Marco César Cunegundes Guimarães
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro interno

Prof. Dr. André Romero da Silva
Instituto Federal do Espírito Santo
Membro externo

VITÓRIA - ES

2018

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos que, de alguma forma, contribuíram, ou estiveram ao meu lado no decurso dos meus dois anos de mestrado.

À toda minha família que esteve presente em todos os momentos, em especial, aos meus pais que apoiaram minhas decisões durante este tempo, sempre demonstrando preocupação e carinho. Ao meu querido namorado Divan, meu fiel companheiro e parceiro, que esteve sempre ao meu lado, obrigada pelo carinho, dedicação, pelas conversas e conselhos.

Obrigada a todos os meus amigos do mestrado, que dividiram comigo esta caminhada e que colaboraram direta ou indiretamente na realização desta pesquisa.

Meu agradecimento a todos os amigos do LabCAS e RESBAC, que estiveram comigo durante esse período e que tornaram os dias mais leves e agradáveis. Vou sentir falta do nosso café compartilhado.

Obrigada a todos os professores e a equipe do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (UFES), os quais participaram da minha formação acadêmica. Obrigada ao meu professor e orientador Ricardo Pinto Schuenck pela oportunidade, pelo apoio e orientação durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos laboratórios, RESBAC, LABVIG, LUCCAR e IMUNOBIOLOGIA por terem cedido a estrutura física e equipamentos.

À CAPES, FAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

KNIDEL, C. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme da epigalocatequina galato em *Staphylococcus aureus***. 2018. 81f. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

As infecções bacterianas estão entre os principais problemas para a saúde pública e o surgimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos se torna cada vez mais comum. *Staphylococcus aureus* é um patógeno oportunista, que pode causar uma variedade de infecções, tanto hospitalares como comunitárias. A epigalocatequina galato (EGCG), flavonoide presente nas folhas da planta *Camelia sinensis*, vem sendo estudada por apresentar diferentes atividades biológicas, incluindo potencial atividade antimicrobiana. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano, *in vitro* e *in vivo*, e antibiofilme da EGCG em isolados clínicos de *S. aureus* com diferente *background* genético. Foram utilizadas nove amostras isoladas de diferentes infecções, com distinta susceptibilidade aos antimicrobianos. A atividade antimicrobiana foi realizada por teste de microdiluição em caldo para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e pelo ensaio de curva tempo-morte. Os resultados das CMIs variaram de 7,81 a 62,5 µg/mL e uma atividade bactericida foi observada com o tratamento de 4x a CMI. A atividade antibiofilme foi avaliada após a incubação dos isolados na presença e ausência da EGCG. Concentrações sub-inibitórias foram capazes de inibir de forma significativa a produção de biofilme de *S. aureus*. Com o tratamento, a maior redução na produção de biofilme foi de 100% e as menores entre 50 a 60%. Ensaio de citotoxicidade mostraram que concentrações ≤ 62,5 µg/mL da EGCG não foram citotóxicas para macrófagos murinos. Em relação ao teste *in vivo* utilizando larvas de *G. mellonella*, a EGCG reduziu a mortalidade das larvas infectadas por este patógeno de forma significativa ($P=0,0005$) frente a apenas um isolado. De forma geral, a EGCG mostrou eficácia em inibir o crescimento de diferentes isolados clínicos de *S. aureus* e apresentou relevante propriedade antibiofilme. O tratamento *in vivo* com larvas de *G. mellonella* mostrou efeito variável. Portanto, a EGCG é uma substância promissora para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus*.

Palavras chaves: Epigalocatequina galato. *Staphylococcus aureus*. Antibacteriano. Antibiofilme.

ABSTRACT

KNIDEL, C. **Antimicrobial activity and antibiofilm of epigallocatechin gallate in *Staphylococcus aureus***. 2018. 81f. Thesis of Master in Biotechnology - Postgraduation Biotechnological Programm, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Bacterial infections are among the major public health problems and the emergence of antimicrobial resistant bacteria becomes increasingly common. *Staphylococcus aureus* is an opportunistic pathogen, can cause a variety of infections, both hospital and community. Epigallocatechin gallate (EGCG), a flavonoid present in the leaves of the plant of *Camelia sinensis*, has different biological activities, including antimicrobial potential. The objective of the present study was to evaluate the antimicrobial, *in vitro* and *in vivo*, and antibiofilm potentials of EGCG in clinical *S. aureus* isolates with different genetic backgrounds. Nine strains isolated from different infections and with different antimicrobial susceptibilities were used. The antimicrobial activity was performed by broth microdilution test to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the time-kill curve test. The MIC results ranged from 7.81 to 62.5 µg/mL and bactericidal activity was observed with 4 times the MIC. The activity of antibiofilm was evaluated after incubation of the isolates in the presence and absence of EGCG. Sub-inhibitory concentrations were able to significantly inhibit *S. aureus* biofilm production. The largest reduction in biofilm production was 100% and the smallest reduction among 50-60%. Cytotoxicity assays showed that concentrations ≤ 62.5 µg/mL EGCG were non-cytotoxic to murine macrophages. Regarding the *in vivo* test with *G. mellonella* larvae, EGCG significantly reduced the mortality of larvae infected by this pathogen (P = 0.0005) in only one isolate. In general, EGCG showed efficacy in inhibiting the growth of different clinical isolates of *S. aureus* and exhibited a relevant property of antibiofilm. Thus, EGCG is a promising substance for the treatment of infections caused by *S. aureus*.

Key words: Epigallocatechin gallate. *Staphylococcus aureus*. Antibacterial. Antibiofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de novos antimicrobianos aprovados de 1980 a 2014.....	16
Figura 2: Cronograma da introdução de novos antimicrobianos comparado com a rápida aquisição da resistência.....	17
Figura 3: Estágios de desenvolvimento do biofilme.....	22
Figura 4: Esquema de tratamento do biofilme.....	24
Figura 5: Morfologia de <i>Camellia sinensis</i>	26
Figura 6: Estrutura química de epigalocatequina galato.....	27
Figura 7: Imagem das larvas de <i>Galleria mellonella</i>	29
Figura 8: Curvas tempo-morte dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> em função do tempo (0, 2, 4, 6, 12 e 24 horas) submetidas a 1X e 4X a concentração mínima inibitória de epigalocatequina galato.....	42
Figura 9: Inibição da produção de biofilme de diferentes cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> frente ao tratamento com epigalocatequina galato (EGCG).....	44
Figura 10: Avaliação dos efeitos citotóxicos da epigalocatequina galato em macrófagos de camundongos da linhagem celular J774A.1.....	45
Figura 11: Sobrevivência das larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com 10 ⁵ UFC/larva dos isolados 1155 e 1168 e tratadas com PBS 1X e epigalocatequina galato (200mg/kg) e não infectadas, mas tratadas duas vezes com PBS 1X.....	47
Figura 12: Imagens de <i>Staphylococcus aureus</i> obtidas por microscopia eletrônica de varredura.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de patógenos bacterianos resistentes a antibacterianos, com prioridade para a pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos.....	18
Tabela 2: Fatores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> e síndromes clínicas relacionadas.....	21
Tabela 3: Características gerais das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizadas neste estudo.....	32
Tabela 4: Critério e classificações utilizados na análise da produção de biofilme.....	36
Tabela 5: Concentrações mínimas inibitórias (CMI) da epigallocatequina galato (EGCG) para os isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ATCC - Coleção Norte Americana de Micro-organismos (do inglês: *American Type Culture Collection*)
- CA-MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina adquiridos na comunidade (do inglês: *community-acquired* MRSA)
- CDC - Centros de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês: *Center for Disease Control and Prevention*)
- CDER - Centro de Avaliação e Pesquisa em Drogas (do inglês: *Centers for Drug Evaluation and Research*)
- CHIPS - Proteína Estafilocócica Inibidora de Quimiotaxia (do inglês: *Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus*)
- CLSI - Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (do inglês: *Clinical and Laboratory Standards Institute*)
- CMI - Concentração mínima inibitória
- DNA - Ácido desoxirribonucléico (do inglês: *deoxyribonucleic acid*)
- DO - Densidade óptica
- DO_f - Densidade óptica final
- DP - Desvio padrão
- Eap - Proteína de aderência extracelular (do inglês: *Extracellular adherence protein*)
- EC - Epicatequina
- ECG - Epicatequinagalato
- EGC - Epigalocatequina
- EGCG - Epigalocatequina galato
- EUA - Estados Unidos da América
- FDA - Agência americana de medicamentos e alimentos (do inglês: *Food and Drug Administration*)
- GC - Galato de catequina
- GCG - Galocatequina galato
- GE – Galato de etila
- HA-MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina associados aos cuidados de saúde (do inglês: *hospital-acquired* MRSA)
- HCV - Vírus da hepatite C (do inglês: *Hepatitis C virus*)
- HIV - Vírus da imunodeficiência humana (do inglês: *Human immunodeficiency virus*)

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: *High performance liquid chromatography*)

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MLST - Tipagem de sequência de multilocus (do inglês: *Multilocus sequence typing*)

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (do inglês: *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)

MSCRAMM - moléculas adesivas da matriz reconhecedoras de componentes da superfície (do inglês: *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*)

MSSA - *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (do inglês: *methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*)

OMS - Organização mundial da saúde

OXA - Oxacilina

PBP - proteína ligante de penicilina (do inglês: *penicillin binding protein*)

PBP2a - proteína ligante de penicilina 2a (do inglês: *penicillin-binding protein 2a*)

PBS - Tampão fosfato-salino (do inglês: *Phosphate-buffered saline*)

PFGE - Eletroforese em campo pulsado (do inglês: *pulsed field gel electrophoresis*)

PVL - leucocidina de Panton-Valentine (do inglês: *Panton-Valentine Leukocidin*)

RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium

SCC*mec* - cassete cromossômico estafilocócico *mec* (do inglês: *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*)

SCN - *Staphylococcus* coagulase negativa

SCP - *Staphylococcus* coagulase positiva

ST - Tipo de sequência (do inglês: *sequence type*)

T3SS - Sistemas de secreção do tipo III (do inglês: *Type three secretion system*)

TSB - Caldo soja triptona (do inglês: *Tryptone soya broth*)

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

VAN - Vancomicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	15
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.3 BIOFILMES BACTERIANOS	22
2.4 EPIGALOCATEQUINA GALATO (EGCG).....	25
2.5 USO DA <i>Galleria mellonella</i> COMO MOLEDO <i>in vivo</i> PARA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	29
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS E AQUISIÇÃO DA EGCG.....	32
4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI).....	33
4.3 CURVA TEMPO-MORTE.....	33
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA EGCG.....	34
4.5 CITOTOXICIDADE CELULAR.....	36
4.6 TOXICIDADE <i>in vivo</i> DA EGCG EM <i>Galleria mellonella</i>	37
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA EGCG EM <i>Galleria mellonella</i>	37
4.8 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA BACTERIANA ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	39
5 RESULTADOS.....	40
5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI).....	40
5.2 CURVA TEMPO-MORTE.....	41
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA EGCG.....	42

5.4 CITOTOXICIDADE DA EGCG EM MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS.....	45
5.5 TOXICIDADE DA EGCG EM <i>Galleria mellonella</i>	46
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA EGCG EM <i>G. mellonella</i>	46
5.7 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA BACTERIANA DE ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	47
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÕES.....	56
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
9 APÊNDICE - Artigo científico a ser submetido.....	66

1 INTRODUÇÃO

O contínuo aumento de bactérias resistentes aos antimicrobianos tem se tornado um grande desafio para a saúde pública mundial. A problemática da resistência é atribuída, dentre outros fatores, ao uso excessivo e/ou indevido dos antimicrobianos e a redução considerável no desenvolvimento de novos agentes antibacterianos (MARTIN-LOECHES et al., 2015). Além desses fatores, mecanismos que envolvem a transferência de material genético entre populações tornam esse quadro ainda pior. Com a limitação na eficácia dos antimicrobianos, eleva-se a possibilidade de falhas na terapia, morbidade e mortalidade dos pacientes (PANÁČEK et al., 2016).

Staphylococcus aureus é um patógeno oportunista, causador de graves infecções, tanto no ambiente hospitalar como na comunidade, e caracteriza-se pela rápida capacidade de adquirir resistência aos antimicrobianos utilizados na prática clínica (HERRERA et al., 2016). *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) está associado a altas taxas de morbi-mortalidade e sua disseminação representa grande preocupação, sobretudo no ambiente hospitalar. A capacidade de produzir biofilme é outro fator que dificulta o tratamento de infecções por essa espécie. O biofilme consiste em uma comunidade de células bacterianas interligadas e aderidas a uma superfície, envolvidas por uma matriz extracelular. Esta matriz atua como uma barreira protetora, dificultando a difusão dos agentes antimicrobianos e impedindo que os mesmos alcancem o micro-organismo (CHU et al., 2016; LISTER; HORSWILL, 2014). Além disso, a taxa de transferência de genes é consideravelmente maior em bactérias sésseis do que em células planctônicas, pois no biofilme ocorre alta densidade e baixa mobilidade bacteriana, tornando o ambiente propício para a transferência de genes, os quais podem carrear resistência aos antibacterianos (RABIN et al., 2015).

Diante desse quadro, surge a necessidade do desenvolvimento de novos antimicrobianos que tenham, sobretudo, atividade frente às bactérias multirresistentes da atualidade. Ao longo da história, produtos naturais são conhecidos por possuírem propriedades terapêuticas e desempenharem um papel importante na medicina, nas indústrias farmacêuticas e biotecnológicas. Por possuírem variada composição química e diversidade estrutural, são investigados para diferentes finalidades, tais como: atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-

inflamatória (MATHUR; HOSKINS, 2017). Devido à baixa produção de novos antimicrobianos para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes, os compostos naturais estão se destacando na pesquisa de novos agentes para esse fim (BETTS; WAREHAM, 2014).

A epigallocatequina galato (EGCG) é uma das principais catequinas presentes no chá verde. Estudos que avaliam a atividade antimicrobiana da EGCG em *S. aureus* não abrangem ensaios *in vivo*, ensaios de citotoxicidade e são escassos os que analisam amostras com diferentes *backgrounds* genéticos (BETTS et al., 2015; NOVY et al., 2013; YODA et al., 2004; ZHAO et al., 2001). Além disso, dada a importância do biofilme no contexto hospitalar e tendo grande relevância também em infecções por *S. aureus*, análises da atividade antibiofilme da EGCG tornam-se relevantes e não são recorrentes para esse patógeno (BLANCO et al., 2005; LEE; TAN, 2015; SERRA et al., 2016; STENVANG et al., 2016; VIDIGAL et al., 2014; XU; ZHOU; WU, 2011).

O presente trabalho foi executado no Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana da Universidade Federal do Espírito Santo (LabCAS-UFES), que atua, dentre outros projetos, na prospecção de novos agentes antibacterianos, os quais são testados como forma alternativa para o controle de bactérias patogênicas de importância hospitalar. Esse estudo avaliou a atividade antimicrobiana e antibiofilme de epigallocatequina galato em isolados de *S. aureus* com diferentes linhagens genéticas e de distintas infecções, visando contribuir no desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento de doenças causadas por este micro-organismo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA

O efetivo controle de doenças causadas por bactérias começou com a descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming (FLEMING, 1929). Com esse fato, ocorreu uma redução significativa dessas infecções e a penicilina passou a ser muito utilizada a partir da década de 1940. Porém, o controle das doenças infecciosas não se manteve contínuo, pois, através da transferência e aquisição de genes, as bactérias mostraram que possuem elevada capacidade de adquirir resistência a maioria dos antimicrobianos desenvolvidos (VENTOLA, 2015).

A evolução bacteriana pode ocorrer através da aquisição de elementos genéticos móveis, que proporcionam a bactéria uma variedade de benefícios, tais como, tolerância a diferentes condições ambientais, estabelecimento em novos nichos ecológicos e o desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos (SHOUSHI et al., 2015).

A aquisição de genes de resistência dentro de uma comunidade microbiana pode ocorrer através da transferência horizontal de genes entre diferentes espécies e gêneros. A obtenção de novas sequências de DNA (ácido desoxirribonucleico) ocorre através dos processos de conjugação, transdução e transformação, proporcionando a bactéria uma forma rápida de evolução, adquirindo genes que permitem sua adaptação a um novo ambiente, como também a disseminação de genes entre populações bacterianas (VON WINTERSDORFF et al., 2016).

A busca por terapias alternativas é uma estratégia que deve ser incentivada, pois, a redução do investimento das empresas farmacêuticas em pesquisas e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (Figura 1) restringiu as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento das infecções causadas por bactérias resistentes (VENTOLA, 2015).

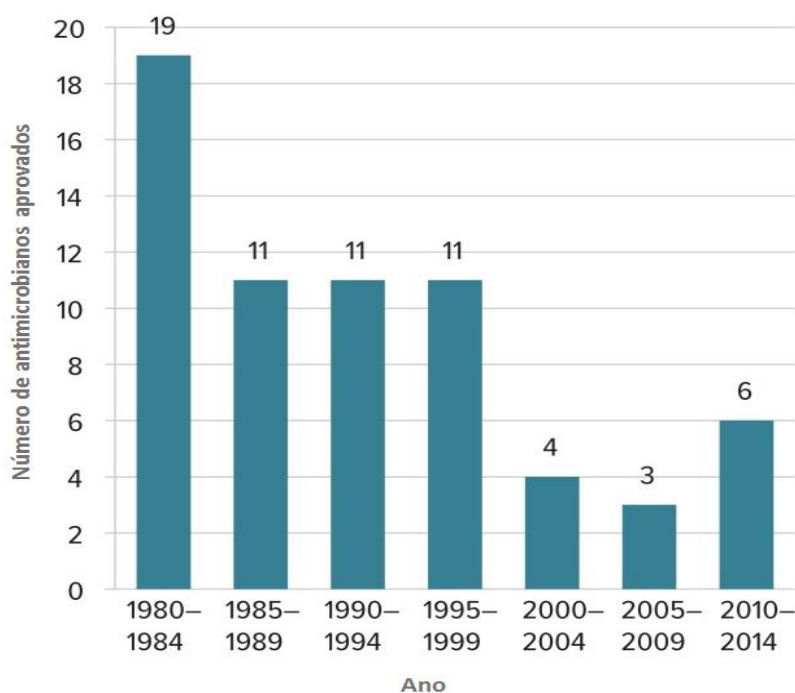


Figura 1: Número de novos antimicrobianos aprovados de 1980 a 2014. Dados do *Center for Drug Evaluation and Research* (CDER) e *Food and Drug Administration* (FDA). Fonte: VENTOLA (2015).

A introdução de novos antibacterianos não acompanha a aquisição da resistência pelos patógenos, pois, muitas vezes, há um tempo relativamente curto entre a chegada dos mesmos ao mercado e o aparecimento da resistência a eles (Figura 2). Atualmente, a resistência já é observada a quase todos os antimicrobianos desenvolvidos e a busca por fármacos alternativos é necessária (CDC, 2013).

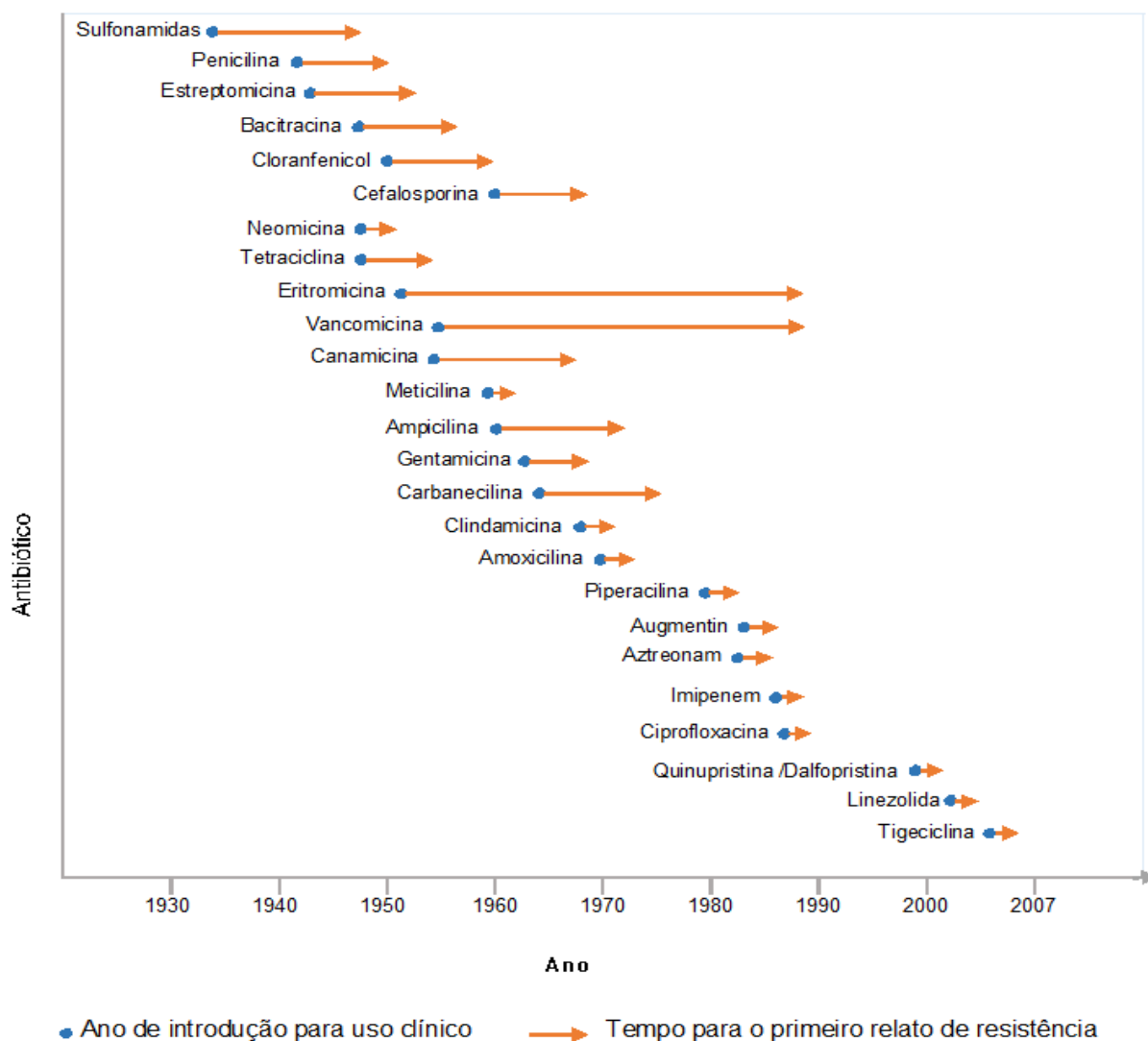


Figura 2: Cronograma da introdução de novos antimicrobianos comparado com a rápida aquisição da resistência. Nota: Algumas datas são estimativas. Fonte: Adaptado de PRAY (2008).

Em fevereiro de 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um relatório intitulado: “Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics”. Esse relatório alertou à população da crise referente ao surgimento de bactérias extremamente resistentes e da importância do desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento desses agentes. As bactérias foram classificadas em três níveis de prioridade: crítico, alto e médio, conforme Tabela 1.

Tabela 1: Lista de patógenos bacterianos resistentes a antibacterianos, com prioridade para a pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos. Fonte: Organização Mundial da Saúde (2017).

Prioridade 1: CRÍTICA
<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos
<i>Enterobacteriaceae</i> * resistente aos carbapenêmicos e cefalosporinas de 3ª geração
Prioridade 2: ALTA
<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina, intermediário e resistente a vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i> resistente a claritromicina
<i>Campylobacter</i> resistente a fluoroquinolonas
<i>Salmonella</i> spp. resistente a fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente a cefalosporinas de 3ª geração, resistente a fluoroquinolonas
Prioridade 3: MÉDIA
<i>Streptococcus pneumoniae</i> não susceptível a penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i> resistente a ampicilina
<i>Shigella</i> spp. resistente a fluoroquinolonas
* <i>Enterobacteriaceae</i> inclui: <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Providencia</i> spp. e <i>Morganella</i> spp..

2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é considerado um patógeno prioritário, o qual é necessário o desenvolvimento e descoberta de novos antimicrobianos ativos contra ele.

Staphylococcus spp. são cocos Gram-positivos de cerca de 0,5 a 1,0 µm de diâmetro que crescem em forma de cachos, pares e, ocasionalmente, em cadeias curtas (FOSTER, 1996). Expressam resistência a diversas condições ambientais, podem resistir em ambientes de baixa umidade, com pH mínimo de 4,0 e máximo de 10 e diferentes temperaturas, com mínima de 7°C e a máxima de 48°C. Além disso, suportam altas concentrações de cloreto de sódio. São anaeróbios facultativos, não

fastidiosos e imóveis (BAIRD-PARKER, 1990). O gênero, atualmente, é composto por 52 espécies e 28 subespécies (LPSN, 2017). Algumas espécies são comensais de vários locais do corpo humano, colonizando, principalmente pele e mucosa (OGUTTU; QEKWANA; ODOI, 2017).

O gênero de *Staphylococcus* pode ser dividido em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). Essa divisão é baseada na produção da enzima coagulase, responsável por promover a coagulação do plasma e fluidos ricos em fibrinogênio. Esta enzima tem a capacidade de transformar o fibrinogênio em fibrina, formando um coágulo ao redor das células estafilocócicas, o que acaba por prejudicar a eficiência do sistema imune do hospedeiro no combate à infecção (BHARADWAZ et al., 2017). Dentre as bactérias de SCP temos: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. hyicus* e *S. pseudintermedius*; já as bactérias pertencentes ao grupo SCN são: *S. equorum*, *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. succinus*, *S. warneri*, *S. vitulinus*, *S. pasteurii*, *S. epidermidis* e *S. lentus* (BLAIOTTA et al., 2010).

S. aureus é um constituinte da microbiota normal humana, podendo ser encontrado como colonizador da pele, flora nasal e orofaringe (MITSUMOTO-KASEIDA et al., 2017), porém, é um agente patogênico oportunista, causando infecções tanto no ambiente hospitalar como na comunidade (HERRERA et al., 2016). Esse micro-organismo é responsável por causar uma variedade de infecções e pode acometer indivíduos saudáveis, mas acomete, principalmente, pacientes em condições de comorbidade. Pode ocorrer em qualquer órgão, mas, geralmente, envolve a pele, tecidos moles, ossos, articulações, infecções associadas a cateteres ou dispositivos protéticos e sepse (HASSOUN; LINDEN; FRIEDMAN, 2017).

Em 1959, a meticilina, um agente antimicrobiano β -lactâmico, foi introduzida para o tratamento de infecções causadas por cepas resistentes a penicilina, porém, a primeira amostra de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi relatada em 1961 (JEVONS, 1961). MRSA é um patógeno que gera grande preocupação, pois, em muitos casos, também é resistente a outras classes de antimicrobianos (CHU et al., 2016). Este patógeno pode estar associado a ocorrência de infecções hospitalares (HA-MRSA), causando bacteremias, pneumonias e infecções invasivas, acometendo, principalmente, pacientes idosos e imunodeprimidos. Porém, MRSA também pode ser adquirido na comunidade (CA-MRSA), e tende causar infecções

cutâneas e em tecidos moles, pode acometer indivíduos saudáveis, sem exposição a instalações de saúde, incluindo adolescente e crianças (MITSUMOTO-KASEIDA et al., 2017).

O principal mecanismo de resistência à metilina se dá pela produção de uma proteína de ligação a penicilina (PBPs, *Penicillin binding proteins*) alterada, que apresenta baixa afinidade às penicilinas (PBP2a), a qual é codificada pelo gene *mecA*. Este gene está inserido no elemento genético móvel denominado *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*). O SCC*mec* também apresenta plasmídeos e transposons que, geralmente, contém genes adicionais de resistência a outras classes de antimicrobianos (RAY; BOUNDY; ARCHER, 2016). Atualmente, existem 11 tipos distintos de SCC*mec*, sendo classificados do tipo I ao XI, que diferem na combinação dos complexos de genes *ccr* e genes *mec* presentes no cassete (http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html, acessado em agosto de 2017). As cepas de HA-MRSA contém, principalmente, SCC*mec* tipo I, II e III, enquanto cepas CA-MRSA contém, principalmente, os cassetes tipo IV e V (MITSUMOTO-KASEIDA et al., 2017).

A patogenicidade do *S. aureus* é decorrente de vários fatores de virulência, que desempenham um papel importante na infecção (Tabela 2). Vários destes fatores proporcionam ao patógeno a capacidade de evadir do sistema imune do hospedeiro, aumentando seu potencial de causar doenças e infecções crônicas (ZECCONI; SCALI, 2013).

Tabela 2: Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* e síndromes clínicas relacionadas. Fonte: adaptado de GORDON; LOWY (2008)

Tipos de fatores de virulência	Exemplos de fatores	Genes	Síndrome clínica relacionada
Aderência	MSCRAMMs (por exemplo, fatores de aglutinação, proteínas de ligação à fibronectina, colágeno e proteínas de ligação à sialoproteína óssea)	<i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>fnbA</i> , <i>fnbB</i> , <i>cna</i> , <i>sdr</i> , <i>bbp</i>	Endocardite, osteomielite, artrite séptica e infecções por próteses ou cateter.
Persistência	Acúmulo de biofilme (por exemplo, polissacarídeo de adesão intercelular), colônias variantes pequenas.	<i>ica locus</i> , mutação <i>hemB</i>	Infecções recorrentes, fibrose cística e síndromes relacionadas.
Evasão	Leucocidinas (por exemplo, PVL e toxina γ), polissacarídeos capsulares, proteína A, CHIPS, Eap e modulinas solúveis em fenol.	<i>lukS-PV</i> , <i>lukF-PV</i> , <i>hlg</i> , <i>cap5</i> , <i>clusters</i> de 8 genes, <i>spa</i> , <i>chp</i> , <i>eap</i> , <i>cluster psm-a</i> .	Infecções cutâneas invasivas, pneumonia necrozante, abscessos
Invasão/ penetração de tecido	Proteases, lipases, nucleases, hialuronato liase, fosfolipase C e metaloproteases.	<i>V8</i> , <i>hysA</i> , <i>hla</i> , <i>plc</i> , <i>sepA</i>	Destruição de tecidos e infecções metastáticas
Mediada por toxina	Enterotoxinas, toxina 1 da síndrome do choque tóxico, toxinas esfoliativas A e B, toxina α , peptidoglicano e ácido lipoteicóico.	<i>sea-q</i> , <i>tstH</i> , <i>eta</i> , <i>etb</i> , <i>hla</i>	Intoxicação alimentar, síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada, impetigo bolhoso e síndrome séptica.

Nota: MSCRAMMs (proteínas da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva do hospedeiro); PVL (Leucocidina de Panton-Valentine); CHIPS (proteína estafilocócica inibidora de quimiotaxia); Eap (proteína de aderência extracelular).

No Brasil, estudos clínicos mostram que *S. aureus* é um importante causador de infecções. Oliveira et al. (2016) realizaram um estudo retrospectivo (2005-2012) avaliando o perfil microbiológico em infecções do sítio cirúrgico em 664 pacientes com fraturas fechadas e abertas. Um total de 529 isolados bacterianos foram recuperados e *S. aureus* predominou em ambas as infecções, com ampla prevalência de MRSA (72%). O estudo de Camargo et al. (2015), realizado em 16 hospitais brasileiros, envolvendo as cinco regiões do Brasil, nos anos de 2007 e 2010, avaliou a incidência de infecção sanguínea nosocomial em pacientes com

transplante de órgãos sólidos, comparando com infecções em pacientes não transplantados. No total, 2.688 micro-organismos foram relatados e *S. aureus* apresentou prevalência em ambas as infecções, com 17% e 15,3%, respectivamente. A frequência de *S. aureus* também foi observada no estudo de Caraciolo et al. (2012) que analisaram um total 30 pacientes com infecções cutâneas e de partes moles. Das 30 amostras coletadas, 29 apresentaram cultura positiva para bactérias e *S. aureus* representou 66% dos isolados. Petry et al. (2014) avaliaram a prevalência de *S. aureus* em 91 pacientes com dermatite atópica e encontraram esse agente em 73,6% deles.

2.3 BIOFILMES BACTERIANOS

Diversas complicações em decorrência de infecções causadas por *S. aureus* estão relacionadas com a produção de biofilmes (BALAMURUGAN et al., 2017).

Os biofilmes são agregados de células microbianas aderidas a uma superfície ou interface, encapsulados em uma matriz envolvida por substância polimérica extracelular, autoproduzida, constituída por proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos (STENVANG et al., 2016). A formação do biofilme pode ser descrita em cinco estágios: ligação inicial, ligação irreversível, maturação I, maturação II e dispersão (Figura 3) (MONROE, 2007).

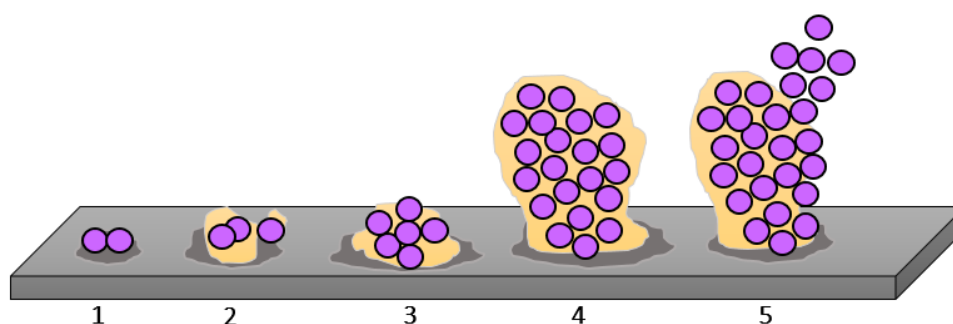


Figura 3: Estágios de desenvolvimento do biofilme. Fase 1: ligação inicial, as bactérias planctônicas aderem à superfície. Fase 2: o agregado de células forma microcolônias e excretam substâncias poliméricas extracelulares, a ligação é irreversível. Fase 3: é formado o biofilme, ele amadurece e as células formam um agregado em várias camadas. Fase 4: crescimento tridimensional e completa maturação, proporcionando proteção contra mecanismos de defesa do hospedeiro e antimicrobianos. Fase 5: o biofilme atinge a massa crítica e ocorre a dispersão das células, as quais podem colonizar outras superfícies.

Na primeira etapa, as células bacterianas se fixam às superfícies de forma reversível. Nesta fase, as bactérias utilizam diversos componentes extracelulares e proteínas para detectar e se fixar à superfície. Em seguida, as células se prendem às superfícies de forma irreversível. A secreção de DNA, proteínas, lipídios e lipopolissacarídeos auxilia na adesão entre bactérias e superfície. Na fase de maturação, as células aderidas nas superfícies se multiplicam e crescem em microcolônias, as bactérias secretam substância polimérica extracelular e se encapsulam, formando uma barreira física entre a comunidade bacteriana e o ambiente extracelular (RENNER; WEIBEL, 2011). A comunidade cresce em uma estrutura tridimensional e amadurece em um biofilme, as bactérias se organizam de acordo com o seu metabolismo, por exemplo, bactérias anaeróbicas preferem manter-se em camadas mais profundas para evitar a exposição ao oxigênio. A dispersão é importante para o ciclo de vida do biofilme. Essa dispersão pode ocorrer em todo o biofilme ou somente em parte dele. A liberação das bactérias permite o início de biofilmes em novos nichos ambientais, promovendo a renovação da comunidade (RABIN et al., 2015).

As bactérias planctônicas possuem altas taxas de reprodução e crescimento celular, porém, a formação do biofilme é um fenômeno natural e importante no ciclo de vida da bactéria, que oferece múltiplas vantagens de proteção, podendo aumentar a tolerância em condições ambientais adversas, permitindo que as mesmas permaneçam dentro de um nicho ou hospedeiro de forma favorável. Em comparação com bactérias livres, o biofilme garante a proteção ambiental contra alterações de pH, dessecação e são melhores adaptados para resistir a ausência de nutrientes. Além disso, a matriz de substância polimérica extracelular protege as células bacterianas, em camadas mais profundas, atuando como uma barreira na difusão de agentes antimicrobianos, limitando sua atuação e oferecendo proteção às bactérias (Figura 4). O biofilme limita a mobilidade bacteriana e aumenta a densidade celular, proporcionando um ambiente favorável para troca de material genético, através da conjugação, alguns dos quais podem codificar resistência a antimicrobianos (RABIN et al; 2015).

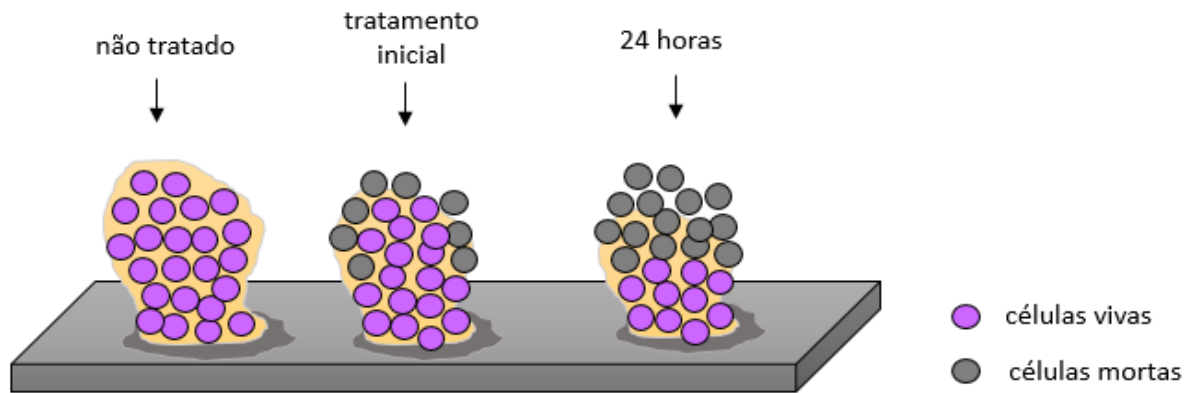


Figura 4: Esquema de tratamento do biofilme. O tratamento inicial com antimicrobianos resulta, normalmente, em atividade incompleta, inibindo as bactérias que estão nas margens das microcolônias do biofilme, desta forma, as bactérias localizadas no interior dessas microcolônias podem permanecer vivas, permitindo que atuem como um foco para a disseminação da infecção.

A produção de biofilme em dispositivos médicos, como implantes cirúrgicos e cateteres, pode funcionar como uma via de fácil introdução de bactérias patogênicas no corpo humano (RENNER; WEIBEL, 2011). Devido a isso, muitas infecções bacterianas estão associadas a formação de biofilme, por exemplo, infecções crônicas do pulmão, feridas e infecções no trato urinário. A fibrose cística no pulmão, causa a produção de muco que obstrui a via aérea e prejudica a respiração do infectado. Grande parte dos pacientes com fibrose cística são infectados por *Pseudomonas aeruginosa* e a formação do biofilme causa inflamações crônicas que geram danos ao tecido pulmonar. O desenvolvimento dos biofilmes nestas infecções está associado ao crescimento lento e adaptações das bactérias às condições dos pulmões, resistência a terapia com antimicrobianos e possuem maior tolerância ao sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro (HØIBY; CIOFU; BJARNSHOLT, 2010).

Os biofilmes também são encontrados em feridas crônicas, tornando-as persistentes e com recuperação lenta. Essas feridas possuem tecido necrótico e a comunidade do biofilme interage com o tecido resultando em fixação estável e nutrição, além de serem mais susceptíveis a infecção, devido à resposta imune do hospedeiro (ZHAO et al., 2013). Um estudo realizado por James e colaboradores (2008), examinou a

presença de biofilmes através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, observando 50 tipos de feridas crônicas e 16 tipos de feridas agudas. Foi demonstrado que 60% das feridas crônicas continham biofilme, contra apenas 6% das feridas agudas, indicando que há uma alta prevalência de biofilme em feridas crônicas (JAMES et al., 2008).

O uso de biomateriais em infecções no trato urinário, como os cateteres, elevam a probabilidade de formação do biofilme bacteriano agravando a infecção. *S. aureus* é um importante patógeno envolvido em infecções do trato urinário e a maioria das cepas encontradas nessas infecções são produtoras de biofilme (RAHIMI; KATOULI; KARIMI, 2016; YOUSEFI et al., 2016). As infecções relacionadas a próteses articulares também podem ser agravadas com a formação do biofilme e entre os patógenos mais comuns nessas infecções está *S. aureus* (FERNÁNDEZ; GREENWOOD-QUAINTANCE; PATEL, 2016).

Além da necessidade da busca por novos antimicrobianos, abordagens alternativas para melhorar o controle de biofilmes e terapias direcionadas poderiam ser desenvolvidas para melhorar, por exemplo, a cicatrização de feridas, novas estratégias para destruir ou impedir a formação de biofilme ao redor de dispositivos implantados, prevenindo um componente que é responsável pelo prolongamento de infecções (ZHAO et al., 2013).

2.4 EPIGALOCATEQUINA GALATO (EGCG)

Com passar dos anos, a humanidade passou a utilizar produtos disponíveis na natureza para tratar uma variedade de enfermidades, com destaque para as substâncias derivadas das plantas, que são utilizadas na medicina tradicional há séculos. Atualmente, diversos produtos naturais estão sendo investigados por apresentarem possíveis propriedades medicinais. Os mesmos são estudados com o intuito de gerar novas drogas, fazendo com que estes possam apresentar um papel importante nos cuidados primários à saúde humana (CRAGG; NEWMAN, 2013). Os principais compostos naturais, responsáveis pela atividade antimicrobiana das plantas incluem: compostos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenóides e alcaloides. As variações nas estruturas e na composição

química destes compostos resultam em diferentes atividades biológicas (GYAWALI; IBRAHIM, 2014). Os polifenóis são metabólitos secundários encontradas em plantas superiores, e, geralmente, são divididos entre flavonoides e não flavonoides. Ao longo dos anos, os mesmos foram caracterizados por apresentarem potencial terapêutico (DAGLIA, 2012), fazendo com que a atividade antimicrobiana dos polifenóis fosse investigada contra diversos micro-organismos (REYGAERT, 2014).

O chá verde é feito a partir das folhas da planta *Camellia sinensis* (Figura 5), sendo considerada uma das bebidas mais consumidas no mundo. Os componentes mais abundantes do chá verde são os polifenóis, sendo os flavonoides os mais importantes (WANG; HO, 2009). Os principais flavonoides são as catequinas, que representam cerca de 30% do peso da folha seca de *C. sinensis*. Muitas propriedades biológicas do chá verde são atribuídas às catequinas, sendo as principais a epigalocatequina (EGC), epicatequina (EC), epicatequinagalato (ECG) e a epigalocatequina galato (EGCG). A EGCG representa em torno de 60% das catequinas totais presentes nas folhas do chá verde (REYGAERT, 2014).



Figura 5: Morfologia de *Camellia sinensis*. Fonte: RAVINDRANATH et al. (2006)

Muitos estudos vêm demonstrando que a EGCG (Figura 6) presente no chá verde, pode exercer um papel importante na saúde humana e trazer diversas vantagens fisiológicas e farmacológicas, como por exemplo: apresentar atividade antibacteriana, antiviral, podendo, inclusive, interferir na infecção do vírus da hepatite C (BHAT et al., 2014) ou utilizado como agente adicional contra o HIV (vírus

da imunodeficiência humana), representando um potencial agente medicinal alternativo (LI; HATTORI; KODAMA, 2011). Além disso, apresenta potente atividade antioxidante (YANG et al., 2016) e antitumoral, sendo capaz de induzir apoptose em células cancerígenas, podendo ser tornar um complemento ao tratamento para pacientes com câncer (HONG et al., 2017; MENG et al., 2017);

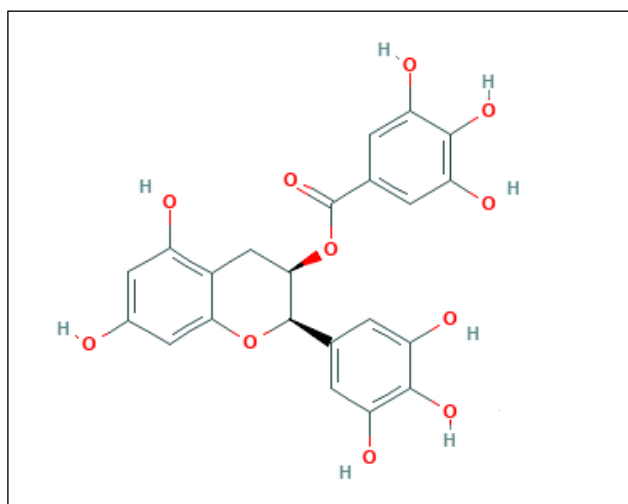


Figura 6: Estrutura química de epigalocatequina galato. Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

A análise da atividade antimicrobiana de EGCG foi realizada em uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Acinetobacter baumannii* (LEE; RAZQAN; KWON, 2017), *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (BAZZAZ et al., 2016), *Klebsiella pneumoniae* (DEY et al., 2016), *Enterococcus faecalis* (LEE; TAN, 2015) e *Escherichia coli* (NAKAYAMA et al., 2013).

Foram relatados diversos mecanismos pelos quais a EGCG exerce seus efeitos antimicrobianos. Foi observado que seu mecanismo de ação difere em Gram-positivas e Gram-negativas. Em *S. aureus*, a EGCG pode ligar-se diretamente à camada de peptidoglicano e interferir nas estruturas de proteínas através da ligação do hidrogênio do grupo hidroxila ou do grupo galoil presente na estrutura da EGCG e assim causar sua degradação. Já em *E. coli*, ocorrem mudanças temporárias na parede celular, lesões semelhantes a poros. Tais danos podem ser causados pelo estresse oxidativo através do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) gerado a partir da EGCG, que pode interferir nos ácidos graxos poli-insaturados e provocar a peroxidação lipídica, afetando assim, a fluidez da membrana bacteriana (CUI et al.,

2012). A EGCG inibe o sistema de secreção do tipo III (T3SS) em bactérias Gram-negativas, que desempenha um papel importante na infecção, como um importante fator de virulência. As cepas que apresentam T3SS defeituosos possuem uma patogenicidade reduzida, causando a inibição da hemólise, invasão e adesão celular e apoptose, que são funções do T3SS (NAKASONE et al., 2017).

O mecanismo de ação das catequinas também foi investigado para verificar sua interação com as proteínas de membrana, utilizando *E. coli* como modelo. Os dados mostraram que a EGCG foi encontrada depositada na camada mais externa da superfície celular e verificou-se que a mesma interage com proteínas da membrana externa, como por exemplo, a porina OmpG, e também com os aminoácidos lisina arginina e histidina. Desta forma, ocorre a inibição das funções das proteínas porinas, prejudicando assim o transporte passivo de moléculas hidrofílicas, como por exemplo a glicose, o que acaba por promover a inibição do crescimento da bactéria (NAKAYAMA et al., 2013).

As bombas de efluxo tem papel relevante na resistência a diversos antimicrobianos. Um estudo realizado por Kanagaratnam et al., (2017) mostrou que a EGCG pode interferir no funcionamento da bomba de efluxo MexAB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa*. A bomba de efluxo contribui para a resistência ao realizar o bombeamento do antimicrobiano do meio intracelular para o meio extracelular.

Os ácidos graxos possuem funções biológicas importantes nas bactérias, como compor as membranas celulares. O chá verde, principalmente a EGCG, inibe redutases específicas, como FabI e FabG, interferindo na síntese bacteriana de ácidos graxos tipo II (LI et al., 2006; ZHANG; ROCK, 2004). Além destes, a atividade antibacteriana da EGCG pode ocorrer através do efeito sinérgico com antimicrobianos convencionais, podendo sensibilizar bactérias multirresistentes através da interferência da EGCG no funcionamento das bombas de efluxo (LEE; RAZQAN; KWON, 2017; SUDANO ROCCARO et al., 2004). A sinergia da EGCG com antimicrobianos beta-lactâmicos também pode ocorrer, pois, ambos atuam na parede celular bacteriana (ZHAO et al., 2001).

Em conjunto, estes estudos mostram que existem diversos mecanismos pelos quais a EGCG exerce seus efeitos antimicrobianos, tendo potencial para contribuir no desenvolvimento de novas formas de tratamento e colaborar na terapia das doenças infecciosas.

2.5 USO DA *Galleria mellonella* COMO MOLEDO *in vivo* PARA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS

Uma droga candidata a um novo agente antibacteriano, necessita passar por um complexo processo, envolvendo a descoberta inicial da substância, os testes *in vitro* e sua eficácia em testes *in vivo* (HUGHES; KARLÉN, 2014).

Galleria mellonella é um inseto da ordem Lepidoptera e família Pyralidae (mariposas), coloquialmente conhecidas como “vermes de cera”, devido seu estilo de vida natural de infestar colmeias e consumir cera de abelha (OLSEN et al., 2011). A mesma passa por uma fase de metamorfose completa e desenvolve-se através de quatro estágios de vida: ovo, larva, pupa e mariposa (KWADHA et al., 2017). As larvas do inseto (Figura 7), e não a traça adulta, são utilizadas para avaliar *in vivo* a eficácia antimicrobiana de diversas substâncias. Quando comparadas aos modelos tradicionais de mamíferos utilizados para os testes *in vivo*, as larvas de *G. mellonella* são de criação relativamente fácil e barata, pois, não requerem o uso de equipamentos laboratoriais específicos para sua manutenção, além disso, o seu uso não requer aprovação ética (TSAI; LOH; PROFT, 2016). As larvas apresentam várias vantagens técnicas: são relativamente grandes (~2cm e 250mg) permitindo a injeção de doses definidas de bactérias e substâncias; podem ser mantidas em temperaturas variadas, entre 15 e 37°C, podendo imitar um ambiente corporal de mamíferos, ideal para o crescimento bacteriano (RAMARAO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012).



Figura 7: Imagem das larvas de *Galleria mellonella*.

O sistema imunológico de *G. mellonella* apresenta um alto grau de semelhança estrutural e funcional com o sistema imune inato dos vertebrados. Devido a essas similaridades, suas larvas são amplamente utilizadas em estudos com patógenos humanos (COOK; MCARTHUR, 2013). O sistema imune de *G. mellonella* consiste na resposta celular e humoral. A resposta celular é mediada por células fagocíticas, chamadas de hemócitos, estes se encontram livremente na hemolinfa ou superfície de órgãos internos da *G. mellonella*. Os hemócitos estão envolvidos na fagocitose e em outros importantes processos imunológicos, como a nodulação e encapsulação (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013; SATYAVATHI; MINZ; NAGARAJU, 2014). A resposta humoral é desencadeada por proteínas efetoras solúveis que imobilizam ou matam o patógeno e inclui proteínas do complemento, melanina e peptídeos antimicrobianos (TSAI; LOH; PROFT, 2016).

Diversos trabalhos mostram a eficácia de *G. mellonella* para estudos *in vivo* de terapias combinadas, tanto com antimicrobianos comercialmente disponíveis, como em experimentos com substâncias com potencial para novos antimicrobianos. O estudo de Yang et al. (2015) avaliou a eficácia combinada de daptomicina e colistina para o tratamento de larvas infectadas com doses letais de *Acinetobacter baumannii*. Desbois e Coote (2011) utilizaram as larvas para avaliar o efeito de vancomicina, penicilina e daptomicina frente a infecções por MRSA. A eficácia de extratos de *Punica granatum* (romã) contra o patógeno periodontal *Porphyromonas gingivalis* foi avaliada usando *G. mellonella* como modelo *in vivo* (APARECIDA PROCÓPIO GOMES et al., 2016). Maekawa et al. (2015) avaliaram a eficácia *in vivo* de diferentes extratos de *Zingiber officinale* (gengibre) em larvas infectadas com *Enterococcus faecalis*.

Diante do exposto, a larva de *G. mellonella* é um modelo preliminar eficiente, utilizado para avaliar a eficácia *in vivo*, o que reduz experimentos e estudos com mamíferos (DESBOIS; COOTE, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades antibiofilme e antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* da epigalocatequina galato em diferentes isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração mínima inibitória *in vitro* de EGCG nos isolados de *Staphylococcus aureus* de diferentes linhagens genéticas;
- Investigar a atividade bacteriostática e/ou bactericida da EGCG em relação ao tempo, através do ensaio de curva tempo-morte;
- Avaliar a capacidade de EGCG de inibir a produção de biofilme em *S. aureus*;
- Avaliar a citotoxicidade de EGCG em macrófagos murinos;
- Avaliar a toxicidade de EGCG em *Galleria mellonella*;
- Analisar a atividade antibacteriana de EGCG *in vivo* frente às amostras *S. aureus* utilizando *Galleria mellonella* como modelo de infecção;
- Verificar a presença de alterações morfológicas nos isolados de *S. aureus* submetidos ao tratamento com EGCG através da microscopia eletrônica de varredura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS E AQUISIÇÃO DA EGCG

Para o presente estudo, foram selecionados nove isolados de *S. aureus* com características fenotípicas e genotípicas distintas (Tabela 3) (SCHUENCK et al., 2012). As amostras pertencem a coleção de culturas do Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana, do Departamento de Patologia-UFES. As mesmas são mantidas em criotubos com 1 mL de TSB (caldo de soja triptona, HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia), suplementado com 20% glicerol a -20°C.

A epigalocatequina galato (EGCG) (>95% de pureza por HPLC) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (Missouri, EUA).

Tabela 3: Características gerais das amostras de *Staphylococcus aureus* utilizadas neste estudo.

N° da amostra	Fonte de isolamento	Presença de genes de virulência ¹	Pulsotipo (PFGE)	ST ² (MLST)	Susceptibilidade a oxacilina/SCCmec	CMI (µg/mL) ³	
						OXA	VAN
1125	prótese articular	<i>ica, cna, fnbA, ebpS</i>	A1	1	MRSA/SCCmecIV	64	1
1128	prótese articular	<i>ica, cna, fnbA, ebpS</i>	A2	1	MSSA	<0,5	2
1154	osteomielite	<i>ica, fnbA, ebpS</i>	B	5	MSSA	<0,5	2
1155	osteomielite	<i>pvl, ica, cna, fnbA, bbp, ebpS</i>	C	30	MRSA/SCCmecIV	8	1
1158	sangue	<i>ica, fnbA, ebpS</i>	D	5	MRSA/SCCmecIV	32	1
1168	ferida cirúrgica	<i>pvl, ica, cna</i>	E	1462	MSSA	<0,5	1
39 ^a	sangue	<i>fnbA, ebpS</i>	F	5	MRSA/SCCmecII	>256	1
92 ^a	secreção traqueal	<i>fnbA, ebps</i>	G	5	MRSA/ SCCmecIV	128	1
102 ^a	sangue	<i>fnbA, fnbB, pvl</i>	H	8	MRSA/SCCmecIV	96	1

¹Genes de virulência: *cna* (que codifica a proteína ligadora de colágeno), *bbp* (proteína ligadora de sialoproteína óssea), *ebpS* (proteína ligadora de elastina), *fnbB* (proteína B ligadora de fibronectina), *fnbA* (proteína A ligadora de fibronectina), *pvl* (leucocidina de Panton-Valentine) e *ica* (produção do adesina polissacarídica intercelular relacionada a formação de biofilme); ²Sequence type, ³CMI (concentração mínima inibitória), OXA (oxacilina), VAN (vancomicina).

4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

A avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) foi realizada através da técnica de microdiluição em placas de 96 poços com fundo em “U” (Nest Biotech, Wuxi, China), de acordo com a metodologia estabelecida pelo manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

Os isolados bacterianos foram cultivados em ágar nutriente (HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia), por 18-24 horas a 35°C. A partir do crescimento bacteriano foi preparada uma suspensão em solução de NaCl 0,9% (m/v), equivalente a escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Esta suspensão foi diluída 1:20 em solução de NaCl 0,9%, para se obter uma concentração de 5×10^6 UFC/mL. Diluições seriadas (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81 e 3,90 $\mu\text{g/mL}$) da EGCG foram preparadas em caldo mueller-hinton cátion ajustado (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra).

A cada poço da placa de microdiluição foram adicionados 180 μL de caldo contendo as soluções de EGCG e inoculado 20 μL da suspensão bacteriana, obtendo um volume final de 200 μL . A concentração bacteriana final foi de $\sim 5 \times 10^5$ UFC/mL. A placa foi incubada a 35°C por 24 horas. Os testes foram realizados em duas repetições biológicas e acompanhados dos controles de crescimento. A leitura do crescimento bacteriano foi realizada visualmente, em local iluminado, observando-se a turvação macroscópica. A concentração de EGCG presente no poço que não houve turvação foi considerada a CMI.

4.3 CURVA TEMPO-MORTE

A curva tempo-morte foi realizada para determinar o efeito da EGCG sobre o crescimento bacteriano *in vitro* de *S. aureus* em função do tempo. O ensaio foi realizado segundo Zhou et al. (2013), utilizando as concentrações de 1 x a CMI e 4 x a CMI de cada isolado. Essas concentrações foram previamente determinadas nos ensaios de microdiluição em caldo, onde foi determinado a CMI da EGCG para cada amostra. As amostras bacterianas foram cultivadas em ágar nutriente por 18-24 horas a 35°C. Posteriormente, as colônias foram suspensas em solução de NaCl

0,9%, equivalente a escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Esta suspensão foi diluída 1:20 em solução de NaCl 0,9%, para se obter uma concentração de 5×10^6 UFC/mL. O teste foi executado em microplaca de poliestireno de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 180 μ L das concentrações de EGCG, previamente diluídos em caldo mueller-hinton cátion ajustado e uma alíquota de 20 μ L de cada amostra bacteriana suspensa em NaCl 0,9%, obtendo um volume final de 200 μ L por poço e concentração bacteriana de $\sim 10^5$ UFC/mL. Para cada isolado foi realizada um controle de crescimento positivo, contendo apenas o inóculo bacteriano e caldo mueller-hinton. A placa foi incubada em estufa bacteriológica a 35°C. Para realizar os testes, uma alíquota de 10 μ L foi retirada nos tempos de 0, 2, 4, 6, 12 e 24 horas, seguida de diluições (1:10) em solução de NaCl 0,9%, 20 μ L da diluição de interesse foram plaqueados em ágar nutriente. O procedimento foi feito em triplicada e as placas foram incubadas a 35°C por 18-24 horas, seguida da análise do crescimento bacteriano e contagem de UFC/mL.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA EGCG

O efeito da EGCG na formação de biofilme em *S. aureus* foi avaliado pelo método de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços (Nest Biotech, Wuxi, China), seguindo o método proposto por Stepanović et al. (2007).

Os isolados bacterianos foram cultivados em ágar nutriente e incubados a 35°C por 18-24 horas. A partir do crescimento bacteriano, foi preparada uma suspensão em solução de NaCl 0,9%, equivalente a escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, 180 μ L de diferentes concentrações de EGCG (0,5 x CMI a 0,97 μ g/mL), previamente diluídas em caldo TSB suplementado com 1% de glicose, foram dispensados em cada poço, seguido da adição de 20 μ L da suspensão bacteriana. A placa foi incubada a 35 °C durante 24 horas para formação de biofilme. Os testes foram realizados em triplicata.

Após o período de incubação, o meio foi descartado por inversão em recipiente contendo solução de hipoclorito de sódio a 2,5% e cada poço foi lavado por três vezes com 200 μ L de água destilada estéril. Em seguida, foi realizada a fixação do biofilme a 60°C por 1 hora. A coloração do biofilme foi feita utilizando 200 μ L de

cristal violeta 0,1% (m/v) e incubada a temperatura ambiente por 45 min, seguido de três lavagens com água destilada estéril e seca a 37°C por 30 min. O biofilme formado em cada poço foi solubilizado com álcool-éter 97%. *Escherichia coli* DH5-alpha e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada no espectrofotômetro Varioskan® Flash (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) a 570nm. O valor da DO dos isolados foi subtraído pela DO da amostra controle negativo, a qual não é produtor de biofilme. A porcentagem da produção de biofilme foi obtida através da fórmula:

$$\% \text{ produção de biofilme} = \left(\frac{\text{DO biofilme}_{\text{tratado}}}{\text{DO biofilme}_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

As análises dos dados foram realizadas no GraphPad Prism 7, utilizando One-Way ANOVA, comparando a produção de biofilme da amostra controle, em relação a amostra incubada com o tratamento. A significância foi definida em $P < 0,05$.

As amostras tratadas e controles, foram classificadas em quatro categorias: não produtoras, fracas, moderas ou fortes produtoras de biofilme, fundamentadas no valor da DO, obtido a partir do biofilme bacteriano formado. Para cada amostra analisada com as diferentes concentrações da EGCG, foi determinado um valor (chamado de N), que corresponde à média aritmética dos valores encontrados nos três poços da amostra. O valor da densidade ótica final (DO_f) considerado para determinar a produção de biofilme foi obtido calculando-se a média aritmética dos três poços da amostra controle negativo, acrescida três vezes o valor do desvio padrão encontrado para essa amostra (DO_f = P/3 + (3 x DP)), onde P é a soma algébrica dos valores das DOs nos 3 poços do controle negativo e DP é o desvio padrão. A Tabela 4 apresenta as possíveis classificações.

Tabela 4: Critério e classificações utilizados na análise da produção de biofilme.

Critérios	Classificações
$N \leq \text{Dof}$	Amostras não produtoras de biofilme
$\text{Dof} < N \leq 2 \text{ Dof}$	Amostras fracas produtoras de biofilme
$2 \text{ Dof} < N < 4 \text{ Dof}$	Amostras moderadamente produtoras de biofilme
$N \geq 4 \text{ Dof}$	Amostras fortes produtoras de biofilme

4.5 CITOTOXICIDADE CELULAR

Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram realizados com a linhagem celular J774A.1 (ATCC® TIB-67™) de macrófagos de camundongos, conforme protocolo padronizado ISO 10993-5 (2009). As células foram cultivadas em garrafas de cultura, com meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) suplementado com soro fetal bovino (Vitrocell, São Paulo, Brasil), L-glutamina (Sigma-Aldrich) e Na_2CO_3 (Dinâmica, São Paulo, Brasil). As células foram mantidas em estufa a 37°C , com 5% de CO_2 , para crescimento. A remoção das células para serem utilizadas no teste foi realizada com *cell scraper*, seguido da contagem das mesmas em câmara de Neubauer com corante azul de Trypan (LGC, São Paulo, Brasil).

Para o ensaio, 100 μL de células, com a concentração de 5×10^4 células/mL por poço, foram colocadas em uma placa de 96 poços. A placa foi incubada por 24 horas, para que as células pudessem aderir. Em seguida, foram acrescentadas diferentes concentrações da EGCG (1000 a 0,97 $\mu\text{g/mL}$) previamente diluídas em meio RPMI. Os testes foram feitos em triplicata, com três experimentos independentes. Após incubação por 48 horas, a viabilidade celular foi verificada através do corante AlamarBlue® (Sigma-Aldrich). A leitura foi realizada no aparelho espectrofotômetro Varioskan® Flash e os dados foram analisados através das fórmulas:

Intensidade = média da fluorescência *tratado* – média da fluorescência *branco*

$$\% \text{ inibição} = \left[\left(\frac{\text{intensidade}_{\text{tratamento}}}{\text{intensidade}_{\text{controle}}} \right)^{-1} \right] \times 100$$

4.6 TOXICIDADE *in vivo* DA EGCG EM *Galleria mellonella*

A criação e a manutenção das larvas de *G. mellonella* foram realizadas no próprio laboratório, onde as mesmas foram mantidas a temperatura ambiente e a alimentação feita utilizando dieta artificial. O ensaio foi realizado seguindo a metodologia de Betts et al. (2017), com adaptações.

Inicialmente, as larvas foram inoculadas com diferentes doses da EGCG (10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400 mg/kg), previamente diluídas em tampão fosfato-salino (PBS 1X), através da superfície ventral, na altura do último par de pseudo pé, diretamente na hemolinfa. Dez larvas foram utilizadas para cada condição experimental. Como controle foram utilizadas larvas inoculadas apenas com PBS 1X. As larvas foram mantidas a 35°C por 72 horas e a mortalidade foi observada a cada 24 horas.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA EGCG EM *Galleria mellonella*

A atividade antimicrobiana da EGCG em *G. mellonella* foi avaliada frente aos isolados 1155 e 1168 que foram selecionados a partir dos resultados obtidos nos ensaios de curva tempo-morte. Essas amostras apresentaram padrões distintos de crescimento bacteriano quando incubadas com a concentração de 1X a CMI. A amostra 1155 (MRSA) obteve maior percentual de inibição enquanto a amostra 1168 (MSSA) o menor. O teste foi realizado seguindo a metodologia de Ramarao, Nielsen-Leroux e Lereclus (2012) e Betts et al. (2017), com adaptações.

As amostras bacterianas foram cultivadas em ágar nutriente por 24 horas a 35°C. Posteriormente, as colônias foram suspensas em caldo mueller-hinton e a DO da suspensão foi ajustada para 0,1, em um comprimento de onda de 630nm. Em seguida, a suspensão foi incubada (4h30min) até se obter uma concentração de 10^8 UFC/mL. Esta suspensão foi diluída 1:10 em solução de PBS 1X, para se obter uma concentração de 10^7 UFC/mL. A infecção foi realizada com a inoculação de 10µL da suspensão bacteriana na hemolinfa das larvas, usando seringas de insulina, obtendo a concentração final de 10^5 UFC/larva. Após 30 min da inoculação, as larvas foram

tratadas com 200mg/kg da EGCG e larvas-controle que foram infectadas, mas que não receberam tratamento, foram inoculadas com PBS 1X. Como controle, larvas não infectadas, mas tratadas com duas inoculações de PBS 1X foram utilizados, a fim de confirmar que as fraturas pelas injeções não foram responsáveis pela mortalidade. Os testes foram realizados em três repetições biológicas, utilizando 15 larvas para cada condição experimental. As mesmas foram mantidas a 35°C por 72 horas e a mortalidade foi observada a cada 24 horas.

As análises foram realizadas no GraphPad Prism 7, as curvas de sobrevivência foram feitas utilizando o método de Kaplan-Meier, as diferenças na sobrevivência foram calculadas usando o teste Log-rank. Valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.8 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA BACTERIANA

A avaliação da morfologia bacteriana foi realizada com as amostras 1128 (MSSA) e 92A (MRSA). As mesmas foram selecionadas de forma aleatória e tratadas com EGCG. O isolado 1128 foi tratado com 7,81 µg/mL e 3,90 µg/mL e a amostra 92A foi tratada com 31,25 µg/mL e 15,62 µg/mL da EGCG, concentrações que representam a CMI e 0,5 X a CMI. O tratamento foi realizado através da técnica de microdiluição em placas, conforme descrito no item 4.2.

A solução contendo as amostras tratadas com EGCG, foram aliquotadas e centrifugadas a 5.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, adicionados 500 µL de tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 para lavagem. Em seguida, a solução foi centrifugada novamente. Ao *pellet* formado, foram adicionados 500 µL do fixador tamponado (glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH7,2) por 24 horas. Após a fixação, o material foi lavado com água ultrapura e adicionado tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% em cacodilato 0,1M e ferrocianeto de potássio a 1,25% por 30min, seguida de lavagem com tampão cacodilato e água ultrapura. Após esse processo, a amostra foi desidratada com uma série crescente de etanol (Neon, São Paulo, Brasil) a 30, 50, 70, 90 e 100%. Entre cada etapa uma centrifugação foi realizada para retirar o excesso de solvente (5000 rpm por 2 min). Após a completa desidratação, 10µL do material foram

gotejados em uma lamínula de vidro e levado para secagem em ponto crítico (Autosandri-815, Tousimis) e posterior cobertura de ouro em metalizador (Desk V, Denton Vacuum). As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV, Tóquio, Japão). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins do Departamento de Morfologia da UFES.

5 RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

Para avaliar a atividade antimicrobiana da EGCG foram testadas diferentes concentrações, que variaram de 1000 a 3,90 µg/mL. Todas as nove amostras de *S. aureus* submetidas ao tratamento apresentaram as CMIs conforme mostrado na Tabela 5.

Diferentes concentrações da EGCG foram necessárias para inibição do crescimento das amostras de *S. aureus*, uma vez que as CMIs variaram de 7,81 a 62,5 µg/mL. As amostras 1128, 1168 e 102A apresentaram inibição do crescimento bacteriano em concentrações menores (7,81 µg/mL). A maior concentração mínima inibitória de EGCG encontrada foi 62,5 µg/mL (amostra 1155).

As concentrações mínimas inibitórias da EGCG não foram dependentes da susceptibilidade antimicrobiana dos isolados. Não foi observado um padrão das CMIs, tanto entre as amostras MRSA, quanto para as amostras MSSA.

Tabela 5: Concentrações mínimas inibitórias (CMIs) da epigalocatequina galato (EGCG) para os isolados de *Staphylococcus aureus*.

Amostra	CMI (µg/mL)
1125 (MRSA)	31,25
1128 (MSSA)	7,81
1154 (MSSA)	31,25
1155 (MRSA)	62,50
1158 (MRSA)	15,62
1168 (MSSA)	7,81
39A (MRSA)	31,25
92A (MRSA)	31,25
102A (MRSA)	7,81

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina;
MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina.

5.2 CURVA TEMPO-MORTE

A curva tempo-morte permitiu analisar a atividade antibacteriana da EGCG contra *S. aureus* em relação ao tempo de exposição da amostra ao agente. Os resultados foram obtidos após a exposição dos nove isolados de *S. aureus* a 1X e 4X a CMI das amostras nos diferentes tempos (0, 2, 4, 6, 12 e 24 horas).

A partir dos resultados obtidos na curva tempo-morte (Figura 8) foi observado que a EGCG apresentou atividade bacteriostática na concentração de 1X a CMI, pois, todos os isolados analisados apresentaram, com o tratamento, a mesma concentração do inóculo inicial ($\sim 10^5$ UFC/mL) até 4 horas de incubação e as amostras 1125, 1128 e 1154 até 6 horas de incubação, mostrando assim, que a EGCG inibe o crescimento bacteriano por este tempo. Na amostra 1155, a EGCG mostrou atividade bacteriostática por 24 horas.

Quando as amostras foram submetidas ao tratamento da EGCG em concentrações de 4X a CMI, foi observada uma atividade bactericida para todos os isolados testados e a contagem bacteriana diminuiu de forma constante para todas as amostras durante todos os tempos analisados.

Devem ser ressaltados os resultados das amostras 39A e 92A, onde as mesmas apresentaram uma redução considerável na contagem bacteriana quando submetidos a 4X a CMI, reduzindo a concentração do inóculo inicial para $1,6 \times 10^2$ UFC/mL e $3,3 \times 10^1$ UFC/mL, respectivamente.

Não foram observadas diferenças nas atividades bacteriostática e bactericida da EGCG entre as amostras MRSA e MSSA.

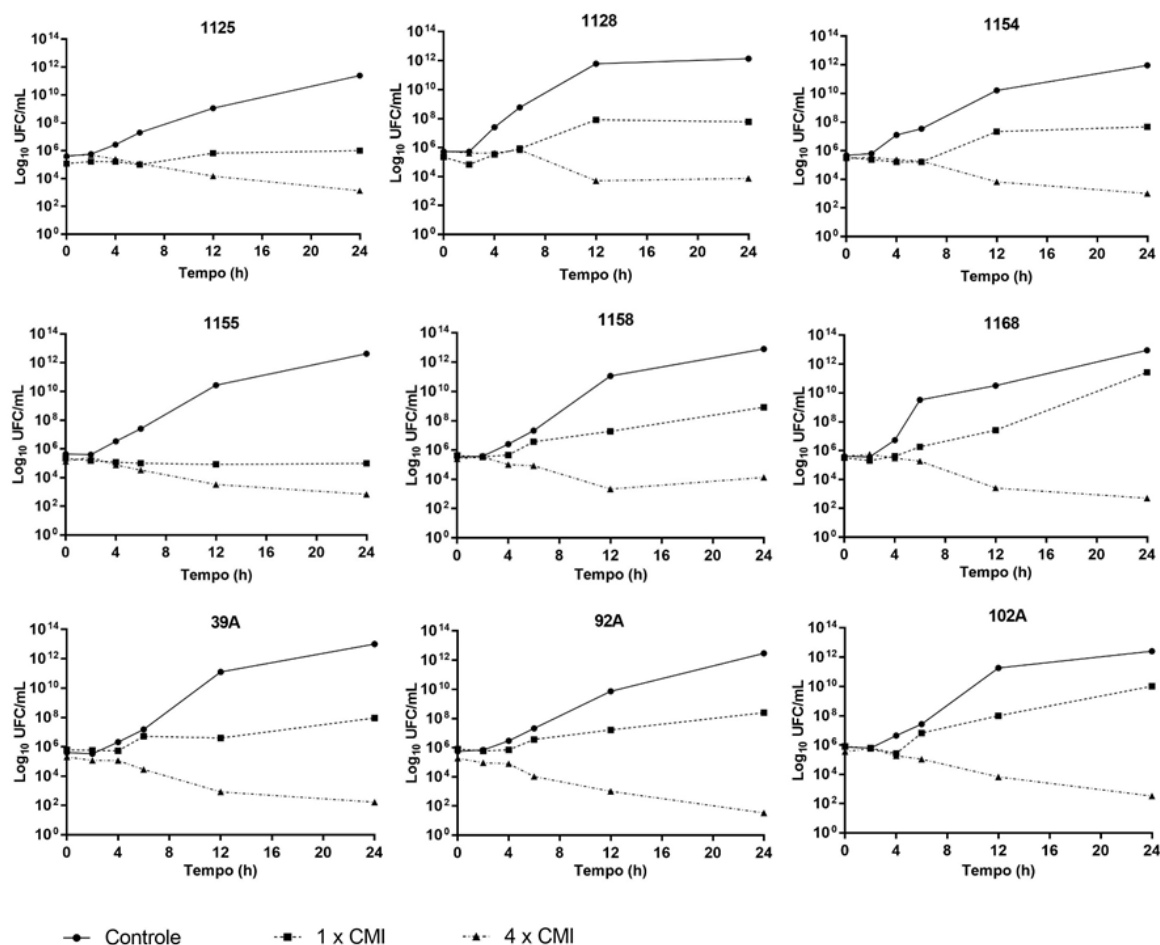


Figura 8: Curvas tempo-morte dos isolados de *Staphylococcus aureus* em função do tempo (0, 2, 4, 6, 12 e 24 horas) submetidas a 1X e 4X a concentração mínima inibitória de epigallocatequina galato.

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA EGCG

A produção de biofilme pelas amostras de *S. aureus* foi analisada na presença de concentrações sub-inibitórias da EGCG.

Os resultados demonstraram que ocorreu uma redução concentração-dependente na produção do biofilme em todas as amostras testadas (Figura 9).

A produção de biofilme reduziu consideravelmente ($P < 0,05$) quando os isolados de *S. aureus* foram incubados com EGCG durante 24 horas.

A amostra 102A passou de forte produtora de biofilme a não produtora, apresentando inibição total da produção de biofilme quando incubada com apenas 3,90 µg/mL da EGCG.

As amostras 39A e 1168 apresentaram redução de mais de 90% quando submetidas a 15,62 e 3,90 µg/mL de EGCG, respectivamente, passando de moderadas produtoras à não produtoras de biofilme. A amostra 92A foi forte produtora de biofilme, porém, ao ser incubada na presença de diferentes concentrações da EGCG sua produção diminuiu significativamente, passando a fraca produtora de biofilme. As amostras 1158, 1154 e 1128 obtiveram em torno de 50 a 60% de inibição da produção de biofilme quando submetidas às concentrações de 7,81, 15,62 e 3,90 µg/mL, respectivamente. Essas amostras passaram de moderadas a fracas produtoras de biofilme. As amostras 1125 e 1155 eram fracamente produtoras de biofilme e com o tratamento passaram a não produzir biofilme.

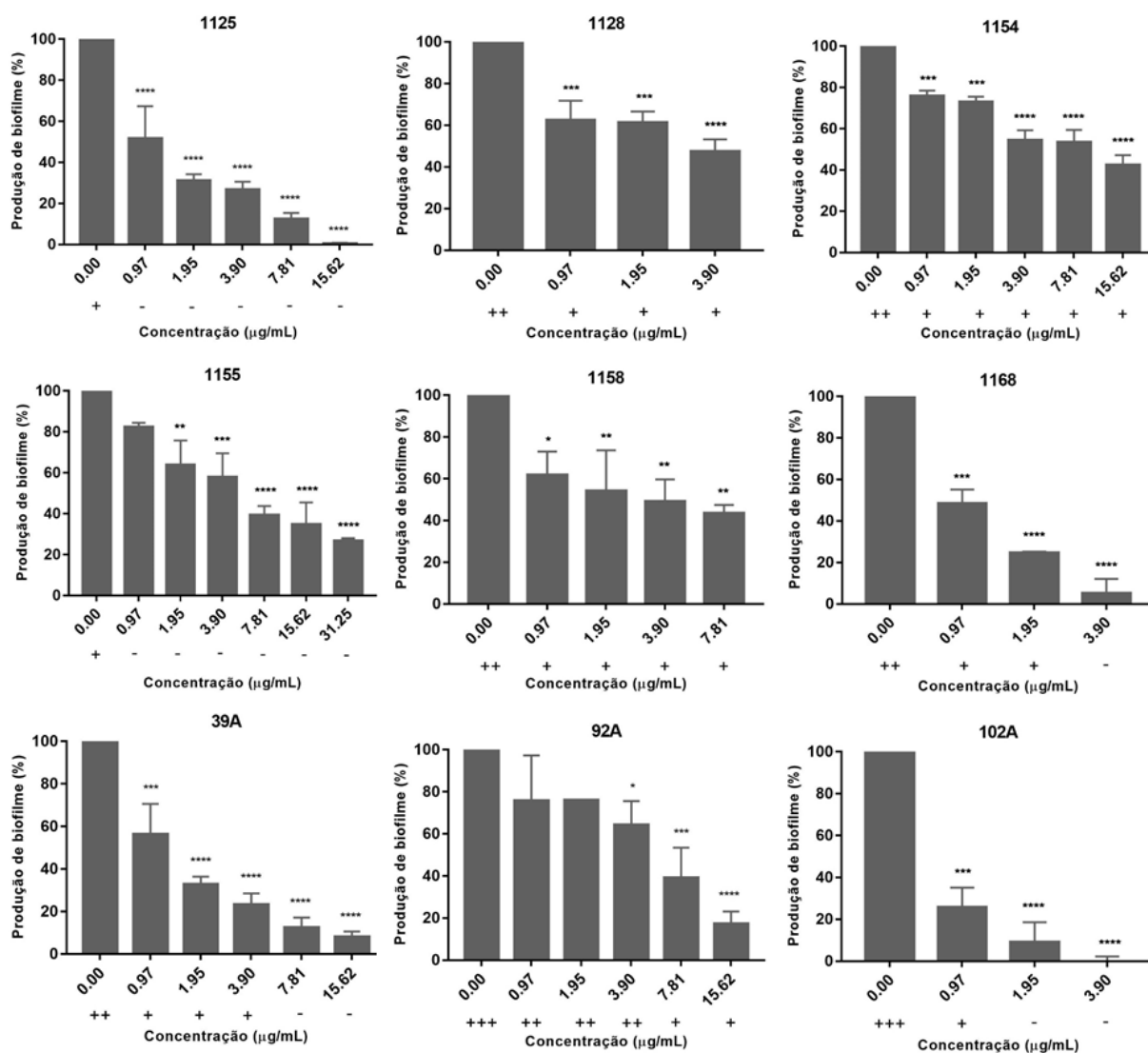


Figura 9: Inibição da produção de biofilme de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* frente ao tratamento com epigallocatequina galato (EGCG). Os biofilmes foram produzidos por 24 horas na presença de diferentes concentrações de EGCG (de 0,5X a concentração mínima inibitória até 0,97 µg/mL), como controle foi utilizado a produção de biofilme da amostra sem tratamento. * valores de P entre 0,05 e 0,01; ** valores de P entre 0,01 e 0,001; *** valores de P entre 0,001 e 0,0001; **** valores de $P < 0,0001$. +++ Forte produtora de biofilme; ++ Moderada produtora de biofilme; + Fraca produtora de biofilme; - Não produtora de biofilme.

5.4 CITOTOXICIDADE DA EGCG EM MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS

O grau de citotoxicidade foi analisado considerando o protocolo padronizado ISO 10993-5 (2009), que considera uma substância citotóxica quando a viabilidade celular for <70% em relação ao controle não tratado, ou seja, o tratamento com EGCG poderia causar a morte de no máximo 30% das células para ser considerado não citotóxico.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 10), as concentrações acima de 125 µg/mL foram citotóxicas para a célula, sendo observada uma sobrevivência inferior a 70%. A concentração de 62,5 µg/mL foi considerada não citotóxica, pois acima de 70% das células estavam viáveis. O tratamento das células com as concentrações inferiores a 31,25 µg/mL da EGCG não apresentou nenhuma citotoxicidade, pois, após o tratamento, foi observada a sobrevivência de 100% das células.

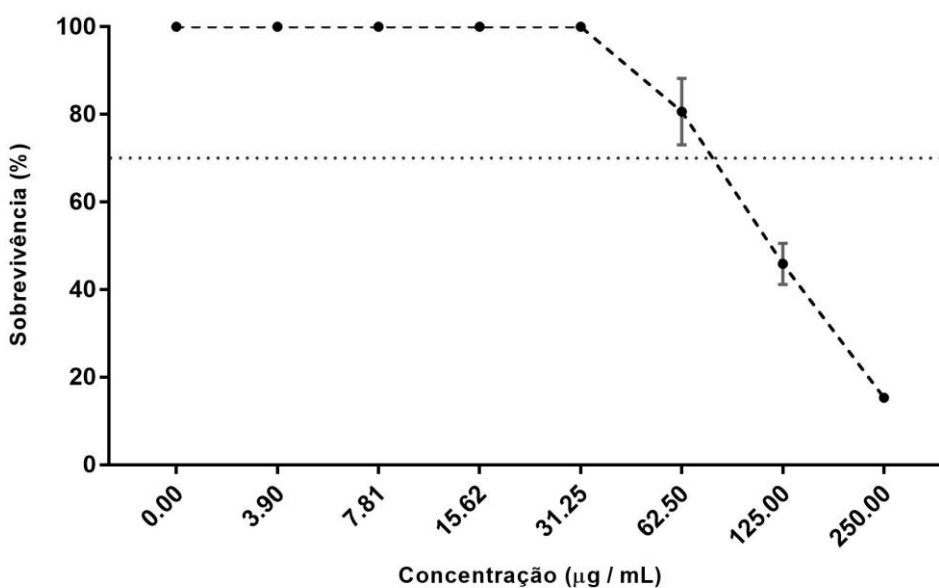


Figura 10: Avaliação dos efeitos citotóxicos da epigalocatequina galato em macrófagos de camundongos da linhagem celular J774A.1. As células foram utilizadas a uma concentração de 5×10^4 células/mL e incubadas durante 48 horas a diferentes concentrações de EGCG (0,97 a 1000 µg/mL).

5.5 TOXICIDADE DA EGCG EM *Galleria mellonella*

A avaliação da toxicidade da EGCG no modelo *in vivo* *G. mellonella* foi realizada mediante concentrações de 10 a 400 mg/kg. Observou-se a sobrevivência de 100% das larvas, durante todo o experimento, indicando assim, que a EGCG não apresenta efeito tóxico e não causa a morte das larvas de *G. mellonella* perante as concentrações testadas.

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA EGCG EM *G. mellonella*

Para esse experimento, as larvas foram infectadas com os isolados 1155 e 1168, seguidas do tratamento com EGCG na concentração de 200 mg/kg e PBS 1X para fins de comparação.

Os resultados dos ensaios com o tratamento *in vivo* da EGCG (Figura 11) mostraram que EGCG aumentou a sobrevivência das larvas infectadas com o isolado 1155 de forma significativa ($P=0,0005$) ao longo das 72 horas de infecção. No entanto, EGCG não foi capaz de aumentar significativamente a sobrevivência das larvas infectadas com o isolado 1168 ($P=0,3404$). Não foi observada mortalidade no grupo controle.

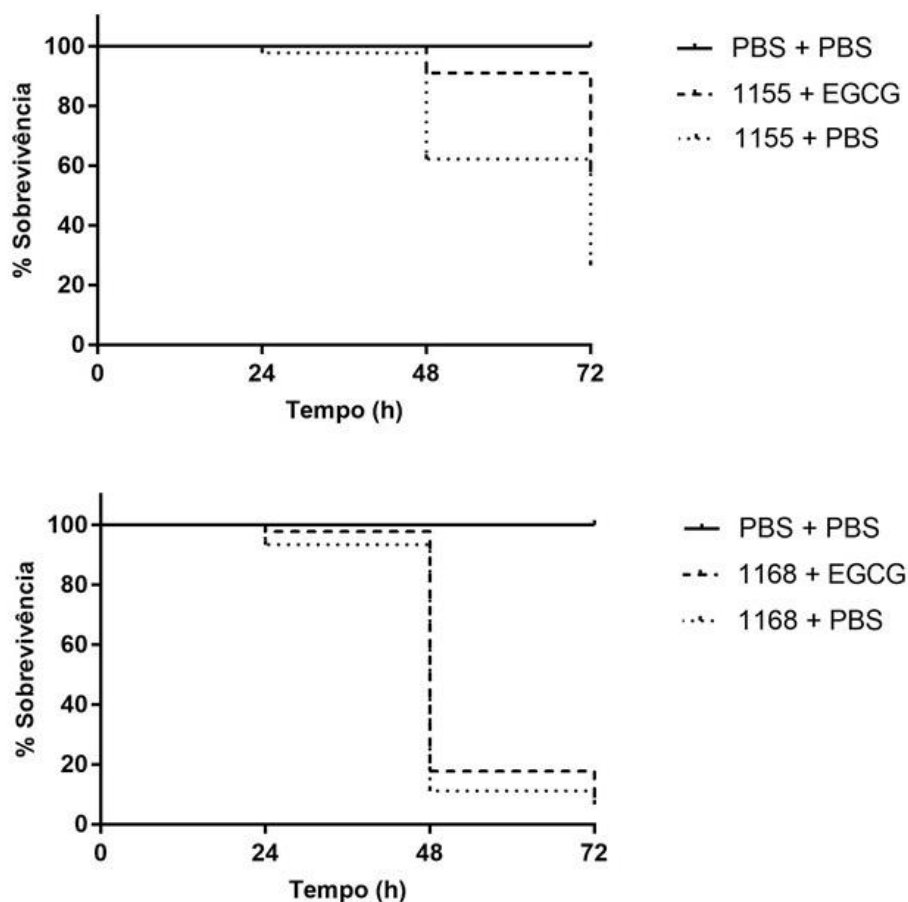


Figura 11: Sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com 10^5 UFC/larva dos isolados 1155 e 1168 e tratadas com PBS 1X e epigalocatequina galato (200 mg/kg) e não infectadas, mas tratadas duas vezes com PBS 1X.

5.7 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA BACTERIANA

Foram realizadas imagens de microscopia eletrônica de varredura objetivando comparar a morfologia dos isolados de *S. aureus* tratados e não tratados com EGCG. A análise foi realizada com duas amostras, 92A e 1128, selecionadas de forma aleatória, sendo executada após 24 horas de incubação, a 35°C, na presença de EGCG em concentrações mínimas inibitórias e sub-inibitórias, diminuindo assim, o risco da destruição total da célula e aumentando a probabilidade de observar alguma alteração morfológica.

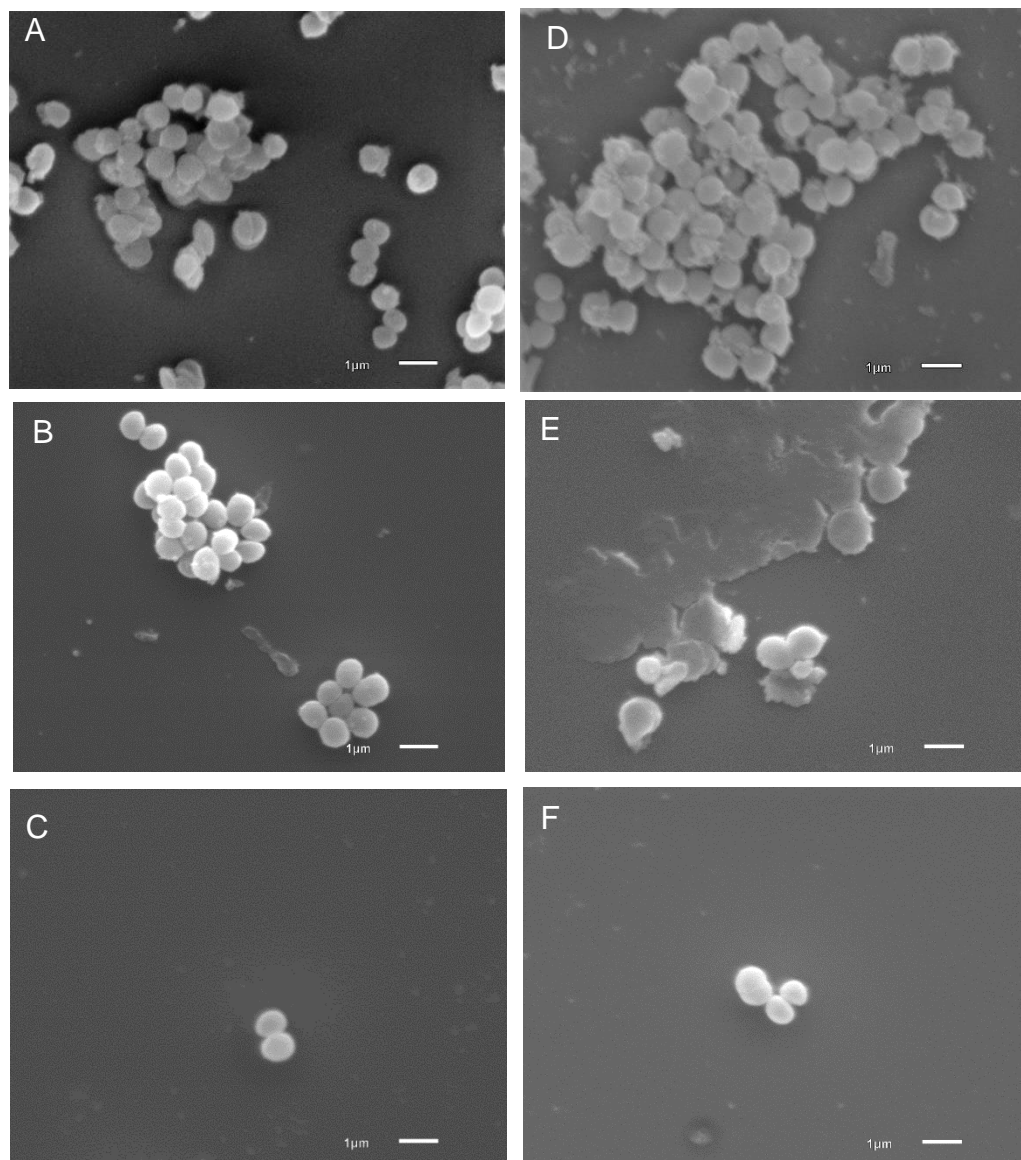


Figura 12: Imagens de *Staphylococcus aureus* obtidas por microscopia eletrônica de varredura. A – controle da amostra 92A; B – amostra 92A tratada com 15,62 µg/mL da epigalocatequina galato (EGCG); C - amostra 92A tratada com 31,25µg/mL da EGCG; D – controle da amostra 1128; E – amostra 1128 tratada com 3,90 µg/mL da EGCG; F -amostra 1128 tratada com 7,81 µg/mL da EGCG.

De acordo com as imagens (Figura 12), a amostra 92A não apresentou alterações morfológicas quando tratadas com 31,25 µg/mL e 15,62 µg/mL, em relação ao controle não tratado. Na amostra 1128, quando submetida a 3,90 µg/mL, foi observado um material amorfo e provável degradação celular.

6 DISCUSSÃO

Atualmente, as infecções bacterianas continuam sendo uma preocupação para a saúde pública mundial. Esse cenário tem se agravado devido a elevada taxa de resistência e a redução considerável de novos fármacos direcionados para o tratamento das doenças infecciosas (OMS, 2017).

No presente estudo, as atividades antimicrobiana e antibiofilme da EGCG foram avaliadas frente a nove isolados geneticamente distintos de *S. aureus*.

As CMI's da EGCG encontradas no presente estudo variaram de 7,81 a 62,4 µg/mL. Assim como em nosso estudo, a capacidade inibitória da EGCG em *S. aureus* já foi descrita (BETTS et al., 2015; HU et al., 2002; NOVY et al., 2013). Kono et al. (1994) realizaram um estudo onde as CMI's da EGCG variaram de 32-64 µg/mL em 53 isolados clínicos de MRSA. Blanco e colaboradores et al. (2005) avaliaram a eficácia da EGCG em 20 isolados clínicos e duas cepas-padrão (oito isolados de *S. aureus* e 14 isolados de *S. epidermidis*) e as CMI's variaram de 125-500 µg/mL. Yoda et al. (2004) demonstraram atividade significativa da EGCG, com CMI's variando de 50-100 µg/mL, em quatro isolados de *S. aureus*, enquanto Novy et al. (2013) ao analisarem a atividade da EGCG em oito amostras *S. aureus*, sendo quatro cepas clínicas e quatro cepas padrão, encontraram CMI de 104 µg/mL. Devemos destacar que as CMI's encontradas em nosso estudo foram inferiores às dos demais trabalhos. Além disso, vale ressaltar que, nosso trabalho foi realizado utilizando apenas amostras clínicas, retiradas de diferentes fontes de isolamento. As mesmas foram selecionadas por apresentarem características clonais e fenotípicas distintas e diferenças na susceptibilidade aos antimicrobianos, abrangendo tanto amostras de MRSA quanto de MSSA.

Outros estudos avaliaram o potencial antibacteriano de diferentes catequinas. Anderson et al. (2011) analisaram a atividade da epicatequinagalato (ECG) contra um isolado clínico de MRSA e a CMI encontrada foi de 128 µg/mL. Soe et al. (2010) avaliaram a atividade da galato de etila (GE) e ECG frente a quatro isolados de *S. aureus* (dois isolados clínicos de MSSA, um isolado clínico MRSA e uma cepa padrão ATCC 43300) e as CMI's encontradas para GE e ECG foram de 1024 µg/mL e 128 µg/mL, respectivamente. Outro estudo, realizado por Stapleton et al., (2004),

determinou a atividade de diferentes catequinas, entre elas, epigalocatequina (EGC), epicatequina (EC), ECG, galocatequina galato (GCG) e catequina galato (GC), contra três isolados de MRSA (dois isolados clínicos e a cepa-padrão BB568) e as CMI's de EGC, ECG, GCG e GC variaram de 64-128 µg/mL enquanto a CMI de EC foi >256 µg/mL.

A atividade antimicrobiana da EGCG também foi comprovada em outros microorganismos Gram-positivos. Xu, Zhou e Wu (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana em *Streptococcus mutans* e o crescimento bacteriano foi inibido com 31,25 µg/mL. Lee e Tan (2015) analisaram o efeito antibacteriano da EGCG em *Enterococcus faecalis* e a CMI foi de 5 µg/mL.

Segundo Holetz et al. (2002) a atividade antimicrobiana de novas substâncias naturais pode ser considerada eficiente quando a CMI for inferior a 100 µg/mL, quando a CMI for de 100 a 500 µg/mL a atividade antimicrobiana pode ser considerada moderada, se a CMI for entre 500 a 1000µg/mL a atividade pode ser considerada fraca e CMI >1000 µg/mL a substância pode ser considerada inativa. Diante do exposto, foi demonstrado nesse estudo que a EGCG apresenta capacidade antimicrobiana eficaz ao inibir crescimento de *S. aureus* em baixas concentrações, sugerindo uma possibilidade de análises mais aprofundadas para seu uso clínico.

A análise da curva tempo-morte demonstrou que EGCG apresentou atividade bacteriostática na concentração de 1X a CMI e bactericida na concentração de 4X a CMI contra os isolados de *S. aureus*. Resultados semelhantes foram encontrados por Kono et al. (1994) que observaram atividade bacteriostática da EGCG na concentração de 1-2X a CMI e bactericida a 6X a CMI contra MRSA. Vidigal et al. (2014) avaliaram o efeito da EGCG contra *Stenotrophomonas maltophilia* através da curva tempo-morte e mostraram que a mesma apresentou atividade bactericida na concentração de 2-4X a CMI. Xu, Zhou e Wu (2011) analisaram a atividade da EGCG em *S. mutans* utilizando o ensaio de curva tempo-morte e também observaram atividade bactericida na concentração de 2-4X a CMI.

A eficácia da EGCG em inibir o crescimento de *S. aureus* é relatada devido a sua capacidade em danificar a parede celular através da ligação direta com a camada de peptidoglicano (CUI et al., 2012; ZHAO et al., 2001). A atividade antimicrobiana da

EGCG também pode ocorrer através da geração de espécies reativas de oxigênio (ARAKAWA et al., 2004).

Quando analisada por microscopia eletrônica de varredura, as duas amostras se comportaram de maneira distinta. A amostra 1128, quando submetida à 3,90µg/mL, concentração subinibitória, apresentou um material amorfo, que pode ser resquício de degradação celular. Por outro lado, a amostra 92A não apresentou alterações detectáveis. Cui et al. (2012) observaram alterações morfológicas de *S. aureus* e *S. mutans* através da microscopia de força atômica, após submeter as amostras a concentrações sub-inibitórias da EGCG. Foi observado um enrugamento e agregação das células. Nakayama e colaboradores (2011) avaliaram células de *S. aureus* tratadas com EGCG através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) e observaram a EGCG depositada na superfície das células bacterianas, indicando a fixação da mesma em sua superfície. Da mesma forma, Nakayama et al., (2015) analisaram a interação da EGCG com *Bacillus subtilis* por MET e também observaram a presença da EGCG na superfície celular. A interação da EGCG com Gram-positivas também foi observada por Morin et al. (2015), ao avaliarem, por MET, células de *Solobacterium moorei* tratadas com EGCG, e notaram danos estruturais, como a degradação da membrana plasmática e vazamento do conteúdo citoplasmático.

Uma vez que os biofilmes formam uma barreira que dificulta a penetração de antimicrobianos, estes estão associados a diversas infecções crônicas, principalmente, relacionadas à implantes ou dispositivos médicos, dificultando o tratamento destas infecções (SINGH et al., 2016). Antimicrobianos de uso clínico que são destinados ao tratamento de biofilmes são escassos e produtos que atuam na prevenção da formação de biofilmes, interrompendo os processos iniciais, podem ser utilizados no desenvolvimento de implantes e dispositivos médicos (RABIN et al., 2015).

A capacidade da EGCG em inibir a produção de biofilme é relatada por diversos autores (BLANCO et al., 2005; LEE; TAN, 2015; SERRA et al., 2016; VIDIGAL et al., 2014; XU; ZHOU; WU, 2011). Apesar do efeito bactericida da EGCG nos isolados de *S. aureus* terem sido observados apenas na concentração de 4X a CMI, concentrações sub-inibitórias foram capazes de inibir a produção de biofilme em *S. aureus* de forma significativa e dose-dependente. Blanco et al. (2005) analisaram a

atividade antibiofilme da EGCG em isolados *S. aureus* e *S. epidermidis* e observaram a inibição da produção do biofilme em metade, um quarto e um oitavo de CMI, sendo a resposta proporcional a dose da EGCG. Vidigal et al. (2014) avaliaram a capacidade da EGCG em inibir a produção de biofilme de *S. maltophilia* em concentrações sub-inibitórias e demonstraram que as amostras apresentaram redução significativa na produção de biofilme, porém, o efeito sobre a redução do biofilme não foi dose-dependente.

A capacidade da EGCG em inibir a produção de biofilme pode estar relacionada a sua eficácia em ligar-se a parede celular e inibir a aderência das células à superfície, interrompendo o processo inicial para a formação de biofilmes maduros (VIDIGAL et al., 2014; XU; ZHOU; WU, 2011). A EGCG também pode interferir na formação dos polissacarídeos, os quais compõem a matriz extracelular envolto do biofilme (BLANCO et al., 2005). A matriz extracelular do biofilme também é composta por fibras amiloides, que agem como um importante componente estrutural, a EGCG interfere na montagem das fibras amiloides, afetando assim, a matriz do biofilme (SERRA et al., 2016)

O desenvolvimento de novos produtos terapêuticos é um processo extenso e custoso. O ensaio de citotoxicidade é relevante, pois, avalia a possibilidade de um composto causar efeitos adversos e induzir toxicidade (GREENE et al., 2010; ZHANG et al., 2015). Para avaliar o potencial citotóxico *in vitro* da EGCG, foi utilizado a linhagem celular de macrófagos de camundongos J774A.1. Os macrófagos pertencem ao sistema de fagócitos, que desempenham um papel importante na eliminação de bactérias, resíduos ou resto de substâncias, como subprodutos do metabolismo. Estes também estão envolvidos na resposta inflamatória a patógenos, atuando na defesa do organismo (WANG; WU; REINHARD, 2012).

Através do teste de citotoxicidade foi possível observar que em doses mais altas (≥ 125 $\mu\text{g/mL}$) a EGCG apresentou atividade citotóxica, causando a morte de mais de 30% das células J774A.1. Contudo, em doses menores (≤ 62.5 $\mu\text{g/mL}$), não apresentou efeito citotóxico. Estas doses não citotóxicas foram capazes de inibir o crescimento bacteriano de todos os isolados testados, pois, as CMIs encontradas em nosso estudo foram inferiores, além disso, apresentaram grande potencial em inibir a formação de biofilme por *S. aureus* em concentrações ainda menores.

Weisburg et al. (2004) avaliaram a citotoxicidade do extrato polifenólico do chá verde, composto por 58,2% da EGCG, contra fibroblastos gengivais humanos normais (GN56 e HGF-1) e a atividade citotóxica inicial foi observada a 50 µg/mL. Lao e colaboradores (2015) analisaram a citotoxicidade da EGCG utilizando pré-adipócitos da linhagem celular 3T3-L1 e verificaram a redução da viabilidade celular na concentração de 68 µg/mL.

O presente trabalho verificou a toxicidade *in vivo* da EGCG em larvas *G. mellonella* com as concentrações variando de 10 a 400 mg/kg. A EGCG não causou efeito tóxico sobre as larvas e a ausência de melanização foi observada nos insetos durante as 72 horas do ensaio. Os efeitos toxicológicos de polifenóis, como epicatequina e teaflavina contra *G. mellonella* também foram avaliados por Betts et al. (2017). Neste estudo, as larvas não apresentaram melanização ou morte com o tratamento de 1000 mg/kg indicando ausência de efeitos tóxicos.

Um estudo, realizado por Isbrucker et al. (2006), avaliou a toxicidade da EGCG em modelos mamíferos. O efeito tóxico em altas concentrações foi limitado a pequenas irritações dérmicas em ratos e não causou irritações em coelhos. Não foram observados efeitos adversos em administrações dietéticas em ratos com preparações contendo até 500 mg/kg/dia de EGCG.

O desenvolvimento de novas drogas requer ensaios pré-clínicos *in vivo*, os quais são necessários para avaliar a eficácia de um novo composto terapêutico (ZELMER et al., 2012). Os dados do tratamento *in vivo* contra isolados 1155 e 1168 sugerem que a atividade da EGCG em *G. mellonella* não é similar entre eles. Essa diferença pode estar relacionada com a diversidade genética entre os isolados e a virulência das amostras no processo de infecção das larvas, interferindo assim, no tratamento e na mortalidade das mesmas frente a infecção. A disponibilidade da EGCG nas larvas também pode interferir, pois, em baixas concentrações a multiplicação celular dos isolados em relação ao tempo é distinto, conforme mostrado na curva tempo-morte. Os estudos que mostram a atividade antimicrobiana de polifenóis *in vivo* utilizando o modelo *G. mellonella* são escassos, sendo a primeira publicação realizada por Betts et al. (2017). Mais estudos são necessários para avaliar o potencial antimicrobiano da EGCG *in vivo*, tanto utilizando as larvas *G. mellonella* como modelo de infecção, como também outros modelos animais.

Os polifenóis penetram efetivamente em vários tecidos, porém, é difícil alcançar as concentrações adequadas para realizar a atividade *in vivo* (BETTS; WAREHAM, 2014). A biodisponibilidade relativamente fraca das catequinas deve ser notada ao avaliar o potencial terapêutico em situações *in vivo*. Em sua maioria, a EGCG não entra na circulação sanguínea, a mesma é absorvida e excretada, preferencialmente, através da bile para o cólon (LEE et al., 2002).

Novas alternativas para o tratamento de infecções são necessárias, em virtude do surgimento crescente da resistência bacteriana aos antimicrobianos de uso clínico (VENTOLA, 2015). Essas novas estratégias podem ser utilizadas em tratamentos independentes ou terapias complementares (BETTS; WAREHAM, 2014). Apesar da dificuldade em atingir concentrações da EGCG *in vivo* adequadas para o tratamento de infecções (GORDON; WAREHAM, 2010), os polifenóis do chá verde, já foram utilizados topicamente, não proporcionando lesão epitelial (CAMOUSE et al., 2009; STRATTON et al., 2000). Sendo assim, uma finalidade complementar da EGCG seria a utilização da mesma como aplicações tópicas, em pacientes que possuem lesões na pele, como feridas ou queimaduras infectadas (GORDON; WAREHAM, 2010), pois, pacientes com lesões na pele são comumente susceptíveis a infecções por *S. aureus* e apresentam maior probabilidade em adquirir lesões crônicas (HALCON; MILKUS, 2004).

A colonização nasal por MRSA aumenta o risco de uma infecção subsequente, quando comparado a não portadores. A descolonização de pacientes que transportam MRSA pode ser de grande importância, como por exemplo, para aquelas submetidas a cirurgias eletivas (ABAD; PULIA; SAFDAR, 2013). A EGCG poderia ser estudada para verificar a sua aplicabilidade tópica para a descolonização nasal de MRSA, sendo uma estratégia que poderia ajudar a diminuir o risco de infecções.

Além disso, os biomateriais necessitam apresentar biocompatibilidade com o tecido e também têm que evitar a adesão de células bacterianas, uma vez que as mesmas podem aderir à superfície e proliferar em forma de biofilme. Inibir a formação de biofilmes em biomateriais pode ser considerada uma estratégia para limitar as infecções (TRENTIN et al., 2015). Em nosso estudo, a EGCG apresentou boa capacidade em inibir a produção de biofilme em *S. aureus*, sendo assim, o revestimento com EGCG poderia ser avaliado como um agente de proteção em

biomateriais e implantes, utilizados na prática clínica, sendo uma alternativa para reduzir as infecções associadas a dispositivos médicos e implantes.

7 CONCLUSÕES

- A EGCG apresentou atividade antimicrobiana em baixas concentrações contra todos os isolados clínicos de *S. aureus* avaliados, indicando ser uma substância promissora para o tratamento de infecções causadas por esse agente.
- Atividade bacteriostática da EGCG foi observada com o tratamento de 1X a CMI e bactericida a 4X a CMI.
- Em concentrações sub-inibitórias, a EGCG mostrou ter a capacidade de reduzir, de forma significativa, a produção *in vitro* de biofilme.
- As concentrações mínimas inibitórias e sub-inibitórias da EGCG não apresentaram citotoxicidade sobre macrófagos murinos.
- A EGCG não apresentou efeito tóxico sobre as larvas de *G. mellonella* nas concentrações de 10-400 mg/kg.
- A atividade antimicrobiana *in vivo* utilizando as larvas *G. mellonella* como modelo de infecção demonstrou uma eficácia variável do tratamento. Mais estudos são necessários para avaliar a eficácia *in vivo* da EGCG.
- Análises das alterações morfológicas de *S. aureus*, através da microscopia eletrônica de varredura, mostraram que a EGCG pode atuar alterando a estrutura externa bacteriana.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, C. L.; PULIA, M. S.; SAFDAR, N. Does the Nose Know? An Update on MRSA Decolonization Strategies. **Current Infectious Disease Reports**, v. 15, n. 6, p. 455–464, 24 dez. 2013.

ANDERSON, J. C. et al. Anti-staphylococcal activity and β -lactam resistance attenuating capacity of structural analogues of (-)-epicatechin gallate. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 23, p. 6996–7000, dez. 2011.

APARECIDA PROCÓPIO GOMES, L. et al. *Punica granatum* L. (Pomegranate) Extract: In Vivo Study of Antimicrobial Activity against *Porphyromonas gingivalis* in *Galleria mellonella* Model. **The Scientific World Journal**, v. 2016, p. 1–5, 2016.

ARAKAWA, H. et al. Role of Hydrogen Peroxide in Bactericidal Action of Catechin. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 3, p. 277–281, 2004.

BAIRD-PARKER, A. C. The *staphylococci*: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, n. 1948, p. 1S–8S, jan. 1990.

BALAMURUGAN, P. et al. *Staphylococcus aureus* Quorum Regulator SarA Targeted Compound, 2-[(Methylamino)methyl]phenol Inhibits Biofilm and Down-Regulates Virulence Genes. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–10, 11 jul. 2017.

BAZZAZ, B. S. F. et al. Effect of Catechins, Green tea Extract and Methylxanthines in Combination with Gentamicin Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* - Combination therapy against resistant bacteria -. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 19, n. 4, p. 312–318, 31 dez. 2016.

BETTS, J. W. et al. In Vitro Activity of Epigallocatechin Gallate and Quercetin Alone and in Combination versus Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 8, p. 2145–2148, 28 ago. 2015.

BETTS, J. W. et al. In vitro and In vivo Activity of Theaflavin–Epicatechin Combinations versus Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 6, n. 3, p. 435–442, 21 set. 2017.

BETTS, J. W.; WAREHAM, D. W. In vitro activity of curcumin in combination with epigallocatechin gallate (EGCG) versus multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 172, 2014.

BHARADWAZ, M. et al. Isolation, purification, and characterization of staphylocoagulase, a blood coagulating protein from *Staphylococcus* sp. MBBJP S43. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 1312–1321, set. 2017.

BHAT, R. et al. Structure–activity studies of (-)-epigallocatechin gallate derivatives as HCV entry inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 17, p. 4162–4165, set. 2014.

BLAIOTTA, G. et al. Diversity of *Staphylococcus* Species Strains Based on Partial kat (Catalase) Gene Sequences and Design of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for Identification and Differentiation of Coagulase-Positive Species (*S. aureus* , *S. delphini* ,) . **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 192–201, jan. 2010.

BLANCO, A. R. et al. Epigallocatechin Gallate Inhibits Biofilm Formation by Ocular Staphylococcal Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4339–4343, 1 out. 2005.

BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence**, v. 4, n. 7, p. 597–603, 27 out. 2013.

CAMARGO, L. F. A. et al. Nosocomial bloodstream infections in a nationwide study: comparison between solid organ transplant patients and the general population. **Transplant Infectious Disease**, v. 17, n. 2, p. 308–313, abr. 2015.

CAMOUSE, M. M. et al. Topical application of green and white tea extracts provides protection from solar-simulated ultraviolet light in human skin. **Experimental Dermatology**, v. 18, n. 6, p. 522–526, jun. 2009.

CARACIOLO, F. B. et al. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates obtained from skin and soft tissue infections of outpatients from a university hospital in Recife -PE, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 6, p. 857–861, dez. 2012.

CDC. **ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

CHU, M. et al. Role of Berberine in the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24748, 22 jul. 2016.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Approved Standard-Tenth Edition. **CLSI document M07-A10**. jan. 2015.

COOK, S. M.; MCARTHUR, J. D. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 350–353, 3 jul. 2013.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, jun. 2013.

CUI, Y. et al. AFM study of the differential inhibitory effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Food Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 80–87, fev. 2012.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in**

Biotechnology, v. 23, n. 2, p. 174–181, abr. 2012.

DESBOIS, A. P.; COOTE, P. J. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. 1785–1790, 1 ago. 2011.

DEY, D. et al. Polyphenolic Secondary Metabolites Synergize the Activity of Commercial Antibiotics against Clinical Isolates of β -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 2, p. 272–282, fev. 2016.

FERNÁNDEZ, J.; GREENWOOD-QUAINTANCE, K. E.; PATEL, R. In vitro activity of dalbavancin against biofilms of staphylococci isolated from prosthetic joint infections. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 4, p. 449–451, ago. 2016.

FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B. influenzae. **Clinical Infectious Diseases**, v.2, n. 1, p. 129-139, 1 jan. 1929.

FOSTER, T. *Staphylococcus*. In Medical Microbiology, 4^a edição, ed. S. Baron (Galveston, TX: University of Texas Medical Branch), pp. 187–197, 1996.

GORDON, N. C.; WAREHAM, D. W. Antimicrobial activity of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 2, p. 129–131, ago. 2010.

GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. S5, p. S350–S359, jun. 2008.

GREENE, N. et al. Using an in vitro cytotoxicity assay to aid in compound selection for in vivo safety studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 17, p. 5308–5312, set. 2010.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412–429, 2014.

HALCON, L.; MILKUS, K. and wounds: A review of tea tree oil as a promising antimicrobial. **American Journal of Infection Control**, v. 32, n. 7, p. 402–408, nov. 2004.

HASSOUN, A.; LINDEN, P. K.; FRIEDMAN, B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. **Critical Care**, v. 21, n. 1, p. 211, 14 dez. 2017.

HERRERA, M. et al. In vitro selection of *Staphylococcus aureus* mutants resistant to tigecycline with intermediate susceptibility to vancomycin. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 15, 8 dez. 2016.

HØIBY, N.; CIOFU, O.; BJARNSHOLT, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. **Future Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1663–1674, nov. 2010.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, out. 2002.

HONG, O.-Y. et al. Epigallocatechin gallate inhibits the growth of MDA-MB-231 breast cancer cells via inactivation of the β -catenin signaling pathway. **Oncology Letters**, v. 14, n. 1, p. 441–446, jul. 2017.

HU, Z.-Q. et al. Epigallocatechin Gallate Synergistically Enhances the Activity of Carbapenems against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 558–560, 1 fev. 2002.

HUGHES, D.; KARLÉN, A. Discovery and preclinical development of new antibiotics. **Uppsala Journal of Medical Sciences**, v. 119, n. 2, p. 162–169, 19 maio 2014.

ISBRUCKER, R. A. et al. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: Dermal, acute and short-term toxicity studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 5, p. 636–650, maio 2006.

ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. **International Standard**, v. 3 Ed, p. 42, 2009.

JAMES, G. A. et al. Biofilms in chronic wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 1, p. 37–44, jan. 2008.

JEVONS, M. P. "Celbenin"-resistant staphylococci. **British medical journal**, v. 1, p. 124–125, 1961.

KANAGARATNAM, R. et al. An efflux pump (MexAB-OprM) of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with antibacterial activity of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG). **Phytomedicine**, v. 36, n. August, p. 194–200, dez. 2017.

KONO, K. et al. Antibacterial Activity of Epigallocatechin Gallate against *Staphylococcus aureus*. **Kansenshogaku Zasshi The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases**, v. 68, n. 12, p. 1518–1522, 1994.

KWADHA, C. A. et al. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. **Insects**, v. 8, n. 2, p. 61, 9 jun. 2017.

LAO, W. et al. Comparison of Cytotoxicity and the Anti-Adipogenic Effect of Green Tea Polyphenols with Epigallocatechin-3-Gallate in 3T3-L1 Preadipocytes. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 43, n. 6, p. 1177–1190, jan. 2015.

LEE, M. J. et al. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: Formation of different metabolites and individual variability. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 11, n.

10, p. 1025–1032, 2002.

LEE, P.; TAN, K. S. Effects of Epigallocatechin gallate against *Enterococcus faecalis* biofilm and virulence. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 3, p. 393–399, mar. 2015.

LEE, S.; RAZQAN, G. S. AL; KWON, D. H. Antibacterial activity of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its synergism with β -lactam antibiotics sensitizing carbapenem-associated multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Phytomedicine**, v. 24, p. 49–55, jan. 2017.

LI, B.-H. et al. Inactivation mechanism of the β -ketoacyl-[acyl carrier protein] reductase of bacterial type-II fatty acid synthase by epigallocatechin gallate. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 84, n. 5, p. 755–762, out. 2006.

LI, S.; HATTORI, T.; KODAMA, E. N. Epigallocatechin gallate inhibits the HIV reverse transcription step. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 21, n. 6, p. 239–243, 2011.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. December, p. 1–9, 23 dez. 2014.

LPSN. List of prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html> . Acessado em: 30 dezembro 2017.

MAEKAWA, L. E. et al. Different Extracts of *Zingiber officinale* Decrease *Enterococcus faecalis* Infection in *Galleria mellonella*. **Brazilian Dental Journal**, v. 26, n. 2, p. 105–109, abr. 2015.

MARTIN-LOECHES, I. et al. Resistance patterns and outcomes in intensive care unit (ICU)-acquired pneumonia. Validation of European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) classification of multidrug resistant organi. **Journal of Infection**, v. 70, n. 3, p. 213–222, mar. 2015.

MATHUR, S.; HOSKINS, C. Drug development: Lessons from nature. **Biomedical Reports**, v. 6, n. 6, p. 612–614, jun. 2017.

MENG, J. et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth and induces apoptosis in esophageal cancer cells through the demethylation and reactivation of the p16 gene. **Oncology Letters**, v. 14, n. 1, p. 1152–1156, jul. 2017.

MITSUMOTO-KASEIDA, F. et al. Clinical and pathogenic features of SCCmec type II and IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 23, n. 2, p. 90–95, fev. 2017.

MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **PLoS Biology**, v. 5, n. 11, p. e307, 13 nov. 2007.

MORIN, M.-P. et al. Green tea extract and its major constituent epigallocatechin-3-gallate inhibit growth and halitosis-related properties of *Solobacterium moorei*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 48, 10 dez. 2015.

NAKASONE, N. et al. Epigallocatechin gallate inhibits the type III secretion system of Gram-negative enteropathogenic bacteria under model conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 13, 15 jul. 2017.

NAKAYAMA, M. et al. Difference of EGCg adhesion on cell surface between *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* visualized by electron microscopy after novel indirect staining with cerium chloride. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 1, p. 97–103, jul. 2011.

NAKAYAMA, M. et al. A study of the antibacterial mechanism of catechins: Isolation and identification of *Escherichia coli* cell surface proteins that interact with epigallocatechin gallate. **Food Control**, v. 33, n. 2, p. 433–439, out. 2013.

NAKAYAMA, M. et al. Mechanism for the antibacterial action of epigallocatechin gallate (EGCg) on *Bacillus subtilis*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 79, n. 5, p. 845–854, 4 maio 2015.

NOVY, P. et al. Synergistic interactions of epigallocatechin gallate and oxytetracycline against various drug resistant *Staphylococcus aureus* strains in vitro. **Phytomedicine**, v. 20, n. 5, p. 432–435, mar. 2013.

OGUTTU, J. W.; QEKWANA, D. N.; ODOI, A. An Exploratory Descriptive Study of Antimicrobial Resistance Patterns of *Staphylococcus* Spp. Isolated from Horses Presented at a Veterinary Teaching Hospital. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 269, 22 dez. 2017.

OLIVEIRA, P. R. et al. The incidence and microbiological profile of surgical site infections following internal fixation of closed and open fractures. **Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)**, v. 51, n. 4, p. 396–399, jul. 2016.

OLSEN, R. J. et al. Virulence of serotype M3 Group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). **Virulence**, v. 2, n. 2, p. 111–119, 2011.

OMS. **GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH , DISCOVERY , AND DEVELOPMENT OF**. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

PANÁČEK, A. et al. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant *Enterobacteriaceae*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 142, p. 392–399, jun. 2016.

PETRY, V. et al. Prevalence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance in patients with atopic dermatitis in Porto Alegre, Brazil. **International Journal of Dermatology**, v. 53, n. 6, p. 731–735, jun. 2014.

PRAY, L.A. Antibiotic R&D: resolving the paradox between unmet medical need and commercial incentive. **Cambridge Healthtech Institute**, Needham, MA, 2008.

RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 493–512, mar. 2015.

RAHIMI, F.; KATOULI, M.; KARIMI, S. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. **Microbial Pathogenesis**, v. 98, p. 69–76, set. 2016.

RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. **Journal of Visualized Experiments**, n. 70, p. 1–7, 11 dez. 2012.

RAVINDRANATH, M. H. et al. Epicatechins Purified from Green Tea (*Camellia sinensis*) Differentially Suppress Growth of Gender-Dependent Human Cancer Cell Lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 237–247, 2006.

RAY, M. D.; BOUNDY, S.; ARCHER, G. L. Transfer of the methicillin resistance genomic island among staphylococci by conjugation. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 4, p. 675–685, maio 2016.

RENNER, L. D.; WEIBEL, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **MRS Bulletin**, v. 36, n. 5, p. 347–355, 18 maio 2011.

REYGAERT, W. C. The antimicrobial possibilities of green tea. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. AUG, p. 1–8, 20 ago. 2014.

SATYAVATHI, V. V.; MINZ, A.; NAGARAJU, J. Nodulation: An unexplored cellular defense mechanism in insects. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 8, p. 1753–1763, ago. 2014.

SCHUENCK, R. P. et al. *Staphylococcus aureus* isolates belonging to different multilocus sequence types present specific virulence gene profiles. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 501–504, 2012.

SERRA, D. O. et al. The green tea polyphenol EGCG inhibits *E. coli* biofilm formation by impairing amyloid curli fibre assembly and downregulating the biofilm regulator CsgD via the σ E -dependent sRNA RybB. **Molecular Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 136–151, jul. 2016.

SHOUSA, A. et al. Bacteriophages Isolated from Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 14, p. 4600–4606, 15 jul. 2015.

SINGH, R. et al. Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 6, p. ftw056, ago. 2016.

SOE, W. M. et al. In vitro drug interactions of gallates with antibiotics in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 2, n. 2, p. 668–72, 2010.

STAPLETON, P. D. et al. Modulation of β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 5, p. 462–467, maio 2004.

STENVANG, M. et al. Epigallocatechin Gallate Remodels Overexpressed Functional Amyloids in *Pseudomonas aeruginosa* and Increases Biofilm Susceptibility to Antibiotic Treatment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 51, p. 26540–26553, 16 dez. 2016.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891–899, ago. 2007.

STRATTON, S. P. et al. Dermal toxicity of topical (-)epigallocatechin-3-gallate in BALB/c and SKH1 mice. **Cancer Letters**, v. 158, n. 1, p. 47–52, set. 2000.

SUDANO ROCCARO, A. et al. Epigallocatechin-Gallate Enhances the Activity of Tetracycline in Staphylococci by Inhibiting Its Efflux from Bacterial Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 1968–1973, 1 jun. 2004.

TRENTIN, D. S. et al. Natural Green Coating Inhibits Adhesion of Clinically Important Bacteria. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 8287, 6 jul. 2015.

TSAI, C. J.-Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214–229, 2 abr. 2016.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T: A peer-reviewed journal for formulary management (2015)**, v. 40, n. 4, p. 277–83, 2015.

VIDIGAL, P. G. et al. Effects of Green Tea Compound Epigallocatechin-3-Gallate against *Stenotrophomonas maltophilia* Infection and Biofilm. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e92876, 1 abr. 2014.

VON WINTERSDORFF, C. J. H. et al. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–10, 19 fev. 2016.

WANG, H.; WU, L.; REINHARD, B. M. Scavenger Receptor Mediated Endocytosis of Silver Nanoparticles into J774A.1 Macrophages Is Heterogeneous. **ACS Nano**, v. 6, n. 8, p. 7122–7132, 28 ago. 2012.

WANG, Y.; HO, C.-T. Polyphenolic Chemistry of Tea and Coffee: A Century of Progress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8109–8114, 23 set. 2009.

WEISBURG, J. H. et al. In vitro Cytotoxicity of Epigallocatechin Gallate and Tea Extracts to Cancerous and Normal Cells from the Human Oral Cavity. **Pharmacology and Toxicology**, v. 95, n. 4, p. 191–200, out. 2004.

XU, X.; ZHOU, X. D.; WU, C. D. The Tea Catechin Epigallocatechin Gallate Suppresses Cariogenic Virulence Factors of *Streptococcus mutans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1229–1236, mar. 2011.

YANG, H. et al. In vivo activity of daptomycin/colistin combination therapy in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 2, p. 188–191, fev. 2015.

YANG, Y. et al. Green tea catechins are potent anti-oxidants that ameliorate sodium iodate-induced retinal degeneration in rats. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 29546, 7 set. 2016.

YODA, Y. et al. Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 1, p. 55–58, 2004.

YOUSEFI, M. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation in Urinary Tract Infection. **Iranian Journal of Public Health**, v. 45, n. 4, p. 485–493, 2016.

ZECCONI, A.; SCALI, F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. **Immunology Letters**, v. 150, n. 1–2, p. 12–22, fev. 2013.

ZELMER, A. et al. A new in vivo model to test anti-tuberculosis drugs using fluorescence imaging. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 8, p. 1948–1960, 1 ago. 2012.

ZHANG, X. et al. Intracellular concentrations determine the cytotoxicity of adefovir, cidofovir and tenofovir. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 1, p. 251–258, fev. 2015.

ZHANG, Y.-M.; ROCK, C. O. Evaluation of Epigallocatechin Gallate and Related Plant Polyphenols as Inhibitors of the FabG and FabI Reductases of Bacterial Type II Fatty-acid Synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 30, p. 30994–31001, 23 jul. 2004.

ZHAO, G. et al. Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 7, p. 389–399, set. 2013.

ZHAO, W. et al. Mechanism of Synergy between Epigallocatechin Gallate and β -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 1737–1742, 2001.

ZHOU, Y. et al. Comparison of microplate and macrodilution methods in time–kill study of new antimicrobial drugs. **Folia Microbiologica**, v.58, n.1,p.9–6, 9 jan. 2013.

9 APÊNDICE

ARTIGO

Artigo preparado conforme modelo da revista “Journal of Natural Products” Edição on-line ISSN:1520-6025; Edição impressa ISSN: 0163-3864.

Epigallocatechin gallate has antimicrobial and antibiofilm activity in methicillin resistant and susceptible *Staphyococcus aureus* of different lineages, in non-cytotoxic concentrations

Carina Knidel[†], Monalessa Fábila Pereira[†], Divan Henrique Fernandes Barcelos[†], Daniel Cláudio de Oliveira Gomes[†], Ricardo Pinto Schuenck^{†*}

[†]Department of Pathology, Center of Health Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

*Corresponding author: ricardo.schuenck@ufes.br; +55 27 33357498

ABSTRACT

Bacterial infections are among the major public health problems and the emergence of antimicrobial resistant bacteria becomes increasingly common. *Staphylococcus aureus* is an opportunistic agent that can cause a variety of infections, both hospital and community. Epigallocatechin gallate (EGCG), a flavonoid present in the leaves of the plant of *Camelia sinensis*, has different biological activities, including antimicrobial potential. Here we proposed was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm potential of EGCG in nine clinical strains of *S. aureus* with different genetic origins isolated from different infections with different antimicrobial susceptibilities. The antimicrobial activity was carried out by broth microdilution and the time-kill curve tests. Minimum inhibitory concentrations (MIC) ranged from 7.81 to 62.5 $\mu\text{g/mL}$ and bactericidal activity was observed at 4 time the MIC. Sub-inhibitory concentrations were able to significantly inhibit *S. aureus* biofilm production. Cytotoxicity assays showed that concentrations $\leq 62.5 \mu\text{g/mL}$ EGCG were non-cytotoxic to murine macrophages. EGCG reduced the mortality of significantly infected *Galleria mellonella* larvae in only one isolate. EGCG showed efficacy in inhibiting the growth of different clinical isolates of *S. aureus* and exhibited a relevant antibiofilm property, indicating that it is a promising substance for the treatment of infections caused by this agent.

Bacterial resistance to antimicrobials is a major challenge for the treatment of infections caused by resistant pathogens.¹ This problem is attributed to the excessive use of antimicrobials and considerable reduction in the development of new drugs.² Additional alternatives are necessary to treat infectious diseases.³

Staphylococcus aureus is considered an opportunistic pathogen and causes serious nosocomial infection, involving skin infections,⁴ soft tissue infections,⁵ catheter-associated infections and a major cause of bacteremia.⁶ Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is characterized by the rapid capacity to acquire resistance to antimicrobials used in clinical practice, and is associated with high rates of morbidity and mortality⁷. Although the asymptomatic colonization of methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) is common, this is an opportunistic pathogen, and attributes its pathogenicity to the failures of the host immune system.⁸

Several *S. aureus* infections are related to biofilm production, and the ability to adhere to medical implants and host tissue, playing an important role in the persistence of chronic infections.⁹ Traditional antimicrobials eliminate planktonic cells, thus, the sessile cells that survive within the biofilm proliferate after discontinuation of treatment, in this sense the biofilm acts as a barrier representing a threat and causing failures in the treatment of biofilm-related infections.¹⁰

Green tea is made from the plant *Camellia sinensis*, is considered one of the most consumed drinks in the world and its consumption is considered beneficial to human health.¹¹ Epigallocatechin gallate (EGCG) is one of the main polyphenols present in green tea and has antibacterial activity against different bacteria.¹²⁻¹⁴ The antibacterial activity of EGCG in *S. aureus* can occur through its binding with the peptidoglycan layer and, thus, causes bacterial cell wall degradation.^{14,15} In addition, EGCG can cause cell damage through oxidative stress,¹⁵ interfere with the functioning of efflux pumps¹⁶ and modify the synthesis of type II

fatty acids.¹⁷ EGCG is also reported as an agent capable of inhibiting biofilm formation,^{18–20} preventing the adhesion of cells to the surface of the host and proliferation of mature biofilms.¹⁸

Galleria mellonella (order Lepidoptera and family Pyralidae) is an alternative model for the study of microbial infections and used for the tests of new antimicrobial agents, its larvae are used for the experiments, being considered a simple and cheap alternative to evaluate the *in vivo* efficacy of the antimicrobial agent studied.²¹

Here we proposed was to evaluate antimicrobial activity, the ability to inhibit the *in vitro* biofilm production of EGCG in clinical isolates of *S. aureus* of different genetic lineages. Furthermore, the cytotoxicity in murine macrophage and antibacterial capacity *in vivo* using *G. mellonella* of EGCG were evaluated.

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The antibacterial activity of EGCG was tested against nine clinical isolates of *S. aureus* (Table 2), drawn from different sources of isolation. They have different clonal and phenotypic characteristics and present differences in antimicrobial susceptibility. EGCG was active against all isolates, MIC values ranged from 7,81 µg/mL to 62,5 µg/mL (Table 1). Previous studies have demonstrated that EGCG exerts antimicrobial activity against a variety of organisms,^{3,15} including *S. aureus*.^{13,14,22,23} The MICs found in our study were lower than the other studies.^{14,20,22}

Time-Kill Curve. The time-killing curve analysis showed that EGCG was bacteriostatic against strains *S. aureus* at one time the MIC and bactericidal at 4 times the MIC over a 24-h incubation period, bacterial count decreases steadily for all samples during all times analyzed (Figure 1). No standard was observed in susceptibility against EGCG, both

between the MRSA samples and the MSSA samples. The efficacy of EGCG in inhibiting bacterial growth in *S. aureus* is reported because of its ability to damage the cell wall of Gram-positive bacteria by direct binding with the peptidoglycan layer.^{15,24}

Effect of EGCG on Biofilm Formation. Biofilms form a barrier to the penetration of antimicrobials, these are associated with several chronic infections, mainly related to some implant or medical device, contributing to the resistance and making difficult the treatments of these infections.²⁵ Most of the strains, five isolates, were moderate biofilm-forming on a polystyrene surface, two isolates presented a strong biofilm-forming, while, two isolates, showed a weak ability to produce a biofilm (Table 1). Sub-inhibitory EGCG concentrations were able to inhibit biofilm production in *S. aureus* significantly and dose-dependent (Figure 2). Notably, the strain 102A changed from a strong biofilm producer to a non-biofilm producer, presenting total inhibition of biofilm when incubated with 3.90 µg/mL of EGCG and strains 39A and 1168 showed a reduction of more than 90% when submitted to 15.62 and 3.90 µg/mL EGCG, respectively, passing from moderate to non-biofilm producers.

The ability of EGCG to inhibit biofilm production was reported by other authors.^{3,20} The capacity of EGCG to inhibit biofilm production may be related to its efficacy in binding to the cell wall and inhibiting the adhesion of cells to the surface, disrupting the initial process for the formation of mature biofilms.^{3,18} EGCG may also interfere with the formation of the polysaccharides, which constitute the extracellular matrix enveloped the biofilm.²⁰

Cytotoxicity of EGCG. The development of new therapeutic products is an extensive and costly process. The cytotoxicity assay is relevant because it evaluates the possibility of a compound causing adverse effects and inducing toxicity, thereby increases the probability of developing therapeutically formulations with clinical applicability.^{26,27} The cytotoxic effect of EGCG was evaluated on the macrophage cell line of J774A.1 mice. The degree of cytotoxicity was analyzed considering the standard protocol ISO 10993-5 (2009).²⁸ Through

the cytotoxicity test, it was possible to observe that, at higher doses ($\geq 125 \mu\text{g/mL}$), EGCG showed cytotoxic activity, causing the death of more than 30% of J774A.1 cells, but at lower doses ($\leq 62.5 \mu\text{g/mL}$), EGCG showed no cytotoxic effect (Figure 3). These non-cytotoxic doses were able to inhibit the bacterial growth of all the isolates tested, since the MICs found in our study were lower, in addition, they presented great potential in inhibiting the biofilm formation by *S. aureus*.

Treatment Assays *in vivo*. A drug candidate for a new antibacterial agent needs to undergo a complex process, involving the initial discovery of the substance, the *in vitro* tests and its effectiveness *in vivo* tests.²⁹

The present study verified the *in vivo* toxicity of EGCG in *G. mellonella* larvae. The tests were performed from 10 to 400 mg/kg and survival of 100% of the larvae was observed, thus indicating that EGCG does not present toxic effect on the larvae under the conditions of the experiment. The toxicological effects of polyphenols, such as epicatechin and theaflavin, against *G. mellonella* were also evaluated by Betts et al. (2017), who observed the absence of melanization or death on 1000 mg/kg treatment. *G. mellonella* larvae infected with isolates 1155 and 1168 were used, followed by treatment with 200 mg/kg EGCG and PBS for comparison purposes. Treatment *in vivo* EGCG assay (Figure 4) show that EGCG increased the survival of infected larvae with isolate 1155 significantly ($P = 0.0005$) over the 72 hours of infection. However, EGCG was not able to significantly increase the survival of infected larvae with isolate 1168 ($P = 0.3404$). No mortality was observed in the control group. *In vivo* treatment data against isolates 1155 and 1168 suggest that EGCG activity in *G. mellonella* is not similar between them. This difference could be related to the genetic diversity between the isolates and the virulence of the samples in the process of infection of the larvae, thus interfering in the treatment and the mortality of the same ones against the infection. Studies

showing the antimicrobial activity of polyphenols *in vivo* using the *G. mellonella* model are scarce.³⁰

EGCG showed antimicrobial activity at low concentrations against all *S. aureus* clinical isolates evaluated, indicating that it is a promising substance for the treatment of infections caused by this agent. At sub-inhibitory concentrations, EGCG was shown to have the ability to significantly reduce *in vitro* biofilm production. Minimum inhibitory and sub-inhibitory concentrations of EGCG did not show cytotoxicity on murine macrophages. *In vivo* antimicrobial activity using *G. mellonella* larvae as a model of infection demonstrated a variable treatment efficacy.

EXPERIMENTAL SECTION

Bacterial strains and EGCG. Nine isolates of *S. aureus* with distinct phenotypic and genotypic characteristics were used in this study (Table 2)³¹. As strains are maintained in the laboratory at -20 ° C in cryotubes with 1 mL TSB (Tryptone Soy Broth, HiMedia Laboratories, India) supplemented with 20% glycerol. Epigallocatechin gallate (EGCG) (> 95% purity by HPLC) was purchased from Sigma- Aldrich (Missouri, USA).

Minimum Inhibitory Concentrations. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by according to the broth microdilution methods suggested by the CLSI.³² The EGCG was serially diluted with cation-adjusted muller-hinton broth (Oxoid, England) from a concentration of 1000 µg/mL to 3.90 µg/mL. Strains of *S. aureus* were inoculated in every well at a concentration of 5×10⁵ CFU/mL, bacterial growth was determined visually after 24 hours of incubation at 35°C. MIC was defined as the lowest EGCG concentration that inhibited bacterial growth.

Time-kill assays. Time-kill assays were performed using the microplate method,³³ at concentrations of 1 time and 4 times the MIC from EGCG of each isolate and approximately 10^5 CFU/mL was used as the starting inoculum. Cultures were incubated at 35 °C for 24 h. At time intervals of 0, 2, 4, 6, 12 and 24 h postinoculation, 10 μ L samples were collected, serially diluted, and plated onto nutrient agar (HiMedia Laboratories, India). Colonies were counted after plates were incubated at 35 °C for 18-24 hours.

Inhibition of biofilm formation by EGCG. *S. aureus* biofilm production was analyzed by 96-well polystyrene microtiter plates, according to the method proposed by Stepanovic et al. (2007).³⁴ After 24 hours of incubation at 35°C, with different concentrations of EGCG (0,5 time the MIC to 0.97 μ g/mL), the control wells contained medium in the absence EGCG. After incubation, was performed the staining with 0.1% crystal violet and the optical density (OD) of each well was measured at 570 nm. *Escherichia coli* DH5 α and *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) were used as negative and positive controls, respectively. Based on the OD obtained, the isolates were classified into four categories: non-producer, weak producer, moderate or strong biofilm producer. The cutoff was defined through of the OD of the negative control, plus three times the value of the standard deviation (ODc). The isolates were classified as follows: $OD \leq ODc$ = non-biofilm producer; $ODc < OD \leq 2ODc$ = weak biofilm producer; $2ODc < OD < 4ODc$ = moderate biofilm producer; and $OD \geq 4ODc$ = strong biofilm producer. To calculate the percentage of biofilm inhibition the OD value obtained was subtracted from the OD of the negative control, which is non-biofilm producer. The percentage of inhibition was calculated using the equation: $(OD \text{ treated} / OD \text{ of non-treated control}) \times 100$.

Cytotoxicity assay. Cytotoxicity tests were performed with the ATCC J774A.1 (ATCC[®] TIB-67[™]) mouse macrophage cell line, used the protocol ISO 10993-5 (2009).²⁸ Cells were grown in culture flasks with RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, USA),

supplemented with fetal bovine serum, L-glutamine and NaCO₃. Cells were grown in culture flasks with RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, USA), supplemented with fetal bovine serum, L-glutamine and NaCO₃. For the assay, cells were placed at a concentration of 5 x 10⁴ cells /mL per well in a 96-well plate, the plate was incubated for 24 hours, so that they could adhere. Then, different concentrations of EGCG (0,97 to 1000µg/mL), previously diluted in RPMI medium were added. After incubation for 48 hours, cell viability was verified through alamarBlue® dye.

Toxicity in *Galleria mellonella*. In vivo toxicity tests were performed with *G. mellonella* as a model of infection, kept at room temperature with artificial diet. The larvae were inoculated with different doses of EGCG (10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 and 400 mg/kg), previously diluted in phosphate-buffered saline solution (PBS 1X), through the ventral surface of the abdomen. Ten larvae were used for each experimental condition, as control larvae inoculated with PBS alone. The larvae were kept at 35 ° C for 72 hours and mortality was observed every 24 hours.

Treatment Assays. *G. mellonella* larvae were infected with 10⁵ CFU/larvae from isolates 1155 or 1168. These isolates were selected from the results obtained in the time-kill assay, which showed distinct patterns of bacterial growth when incubated under minimal inhibitory concentrations. Among the isolates analyzed, the 1155 sample obtained higher inhibition and 1168 lower growth inhibition when subjected to EGCG concentrations at 1 x MIC. The test was carried out following the methodology of Ramarao, Nielsen-Leroux and Lereclus (2012) and Betts et al. (2017),^{30,35} with adaptations. Thirty minutes after infection, a second injection was administered from EGCG (200 mg/kg) or PBS. The larvae were incubated at 35 ° C to verify survival (alive / dead) at 0, 24, 48 and 72 h. The tests were performed in three biological replicates, using fifteen larvae for each experimental condition.

Statistics. Data analyzes were performed on GraphPad Prism 7, using One-Way ANOVA, for antibiofilm assays. Larvae *G. mellonella* survival curves were plotted by using the Kaplan-Meier method, differences in survival were calculated using the log-rank test. Significance was defined as $P < 0.05$.

REFERENCES

- (1) Martin-Loeches, I.; Torres, A.; Rinaudo, M.; Terraneo, S.; de Rosa, F.; Ramirez, P.; Diaz, E.; Fernández-Barat, L.; Li bassi, G. L.; Ferrer, M. *J. Infect.* **2015**, *70* (3), 213–222.
- (2) Ludvigsson, J. F.; Hadjipanayis, A.; del Torso, S.; Mercier, J.-C.; Valiulis, A.; Stiris, T. *Acta Paediatr.* **2017**, *106* (5), 691–691.
- (3) Vidigal, P. G.; Müsken, M.; Becker, K. A.; Häussler, S.; Wingender, J.; Steinmann, E.; Kehrmann, J.; Gulbins, E.; Buer, J.; Rath, P. M.; Steinmann, J. *PLoS One* **2014**, *9* (4), e92876.
- (4) Sonesson, A.; Przybyszewska, K.; Eriksson, S.; Mörgelin, M.; Kjellström, S.; Davies, J.; Potempa, J.; Schmidtchen, A. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 8689.
- (5) Macmorran, E.; Harch, S.; Athan, E.; Lane, S.; Tong, S.; Crawford, L.; Krishnaswamy, S.; Hewagama, S. *Epidemiol. Infect.* **2017**, *145* (13), 2817–2826.
- (6) Guembe, M.; Pérez-Granda, M. J.; Capdevila, J. A.; Barberán, J.; Pinilla, B.; Martín-Rabadán, P.; Bouza, E. *J. Hosp. Infect.* **2017**, *97* (3), 260–266.
- (7) Ray, M. D.; Boundy, S.; Archer, G. L. *Mol. Microbiol.* **2016**, *100* (4), 675–685.
- (8) Grinberg, A.; Biggs, P. J.; Zhang, J.; Ritchie, S.; Oneroa, Z.; O’Neill, C.; Karkaba, A.; Velathanthiri, N. S.; Coombs, G. W. *J. Infect.* **2017**, *75* (4), 326–335.
- (9) Balamurugan, P.; Praveen Krishna, V.; Bharath, D.; Lavanya, R.; Vairaprakash, P.; Adline Princy, S. *Front. Microbiol.* **2017**, *8* (JUL), 1–10.
- (10) Tan, X.; Qin, N.; Wu, C.; Sheng, J.; Yang, R.; Zheng, B.; Ma, Z.; Liu, L.; Peng, X.; Jia, A. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 11997.
- (11) Reygaert, W. C. *Front. Microbiol.* **2014**, *5* (AUG), 1–8.
- (12) Bazzaz, B. S. F.; Sarabandi, S.; Khameneh, B.; Hosseinzadeh, H. *J. Pharmacopuncture* **2016**, *19* (4), 312–318.
- (13) Betts, J. W.; Sharili, A. S.; Phee, L. M.; Wareham, D. W. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (8), 2145–2148.
- (14) Yoda, Y.; Hu, Z.-Q.; Shimamura, T.; Zhao, W.-H. *J. Infect. Chemother.* **2004**, *10* (1), 55–58.
- (15) Cui, Y.; Oh, Y. J.; Lim, J.; Youn, M.; Lee, I.; Pak, H. K.; Park, W.; Jo, W.; Park, S. *Food Microbiol.* **2012**, *29* (1), 80–87.
- (16) Lee, S.; Razqan, G. S. Al; Kwon, D. H. *Phytomedicine* **2017**, *24*, 49–55.
- (17) Li, B.-H.; Zhang, R.; Du, Y.-T.; Sun, Y.-H.; Tian, W.-X. *Biochem. Cell Biol.* **2006**, *84* (5), 755–762.
- (18) Xu, X.; Zhou, X. D.; Wu, C. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (3), 1229–1236.
- (19) Serra, D. O.; Mika, F.; Richter, A. M.; Hengge, R. *Mol. Microbiol.* **2016**, *101* (1), 136–151.
- (20) Blanco, A. R.; Sudano-Roccaro, A.; Spoto, G. C.; Nostro, A.; Rusciano, D. *Antimicrob.*

- Agents Chemother.* **2005**, 49 (10), 4339–4343.
- (21) Tsai, C. J.-Y.; Loh, J. M. S.; Proft, T. *Virulence* **2016**, 7 (3), 214–229.
- (22) Novy, P.; Rondevaldova, J.; Kourimska, L.; Kokoska, L. *Phytomedicine* **2013**, 20 (5), 432–435.
- (23) Hu, Z.-Q.; Zhao, W.-H.; Asano, N.; Yoda, Y.; Hara, Y.; Shimamura, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46 (2), 558–560.
- (24) Zhao, W.; Hu, Z.; Okubo, S.; Hara, Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45 (6), 1737–1742.
- (25) Singh, R.; Sahore, S.; Kaur, P.; Rani, A.; Ray, P. *Pathog. Dis.* **2016**, 74 (6), ftw056.
- (26) Greene, N.; Aleo, M. D.; Louise-May, S.; Price, D. A.; Will, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20 (17), 5308–5312.
- (27) Zhang, X.; Wang, R.; Piotrowski, M.; Zhang, H.; Leach, K. L. *Toxicol. Vitro.* **2015**, 29 (1), 251–258.
- (28) ISO 10993-5. *Int. Stand.* **2009**, 3 Ed, 42.
- (29) Hughes, D.; Karlén, A. *Ups. J. Med. Sci.* **2014**, 119 (2), 162–169.
- (30) Betts, J. W.; Hornsey, M.; Wareham, D. W.; La Ragione, R. M. *Infect. Dis. Ther.* **2017**, 6 (3), 435–442.
- (31) Schuenck, R. P.; Cavalcante, F. S.; Emery, E.; Marval, M. G. de; dos Santos, K. R. N. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2012**, 65 (3), 501–504.
- (32) CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M07A10_sample.pdf.
- (33) Zhou, Y.; Hou, Z.; Fang, C.; Xue, X.; Da, F.; Wang, Y.; Bai, H.; Luo, X. *Folia Microbiol. (Praha)*. **2013**, 58 (1), 9–16.
- (34) Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Bonaventura, G. DI; Djukić, S.; Ćirković, I.; Ruzicka, F. *APMIS* **2007**, 115 (8), 891–899.
- (35) Ramarao, N.; Nielsen-Leroux, C.; Lereclus, D. *J. Vis. Exp.* **2012**, No. 70, 1–7.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Table 1: Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Epigallocatechin gallate (EGCG) in of *Staphylococcus aureus* strains and biofilm production

Strain ^a	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Biofilm production
1125 (MRSA)	31.25	Weak
1128 (MSSA)	7.81	Moderate
1154 (MSSA)	31.25	Moderate
1155 (MRSA)	62.5	Weak
1158 (MRSA)	15.62	Moderate
1168 (MSSA)	7.81	Moderate
39A (MRSA)	31.25	Moderate
92A (MRSA)	31.25	Strong
102A (MRSA)	7.81	Strong

^aMSSA = methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*

MRSA= methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

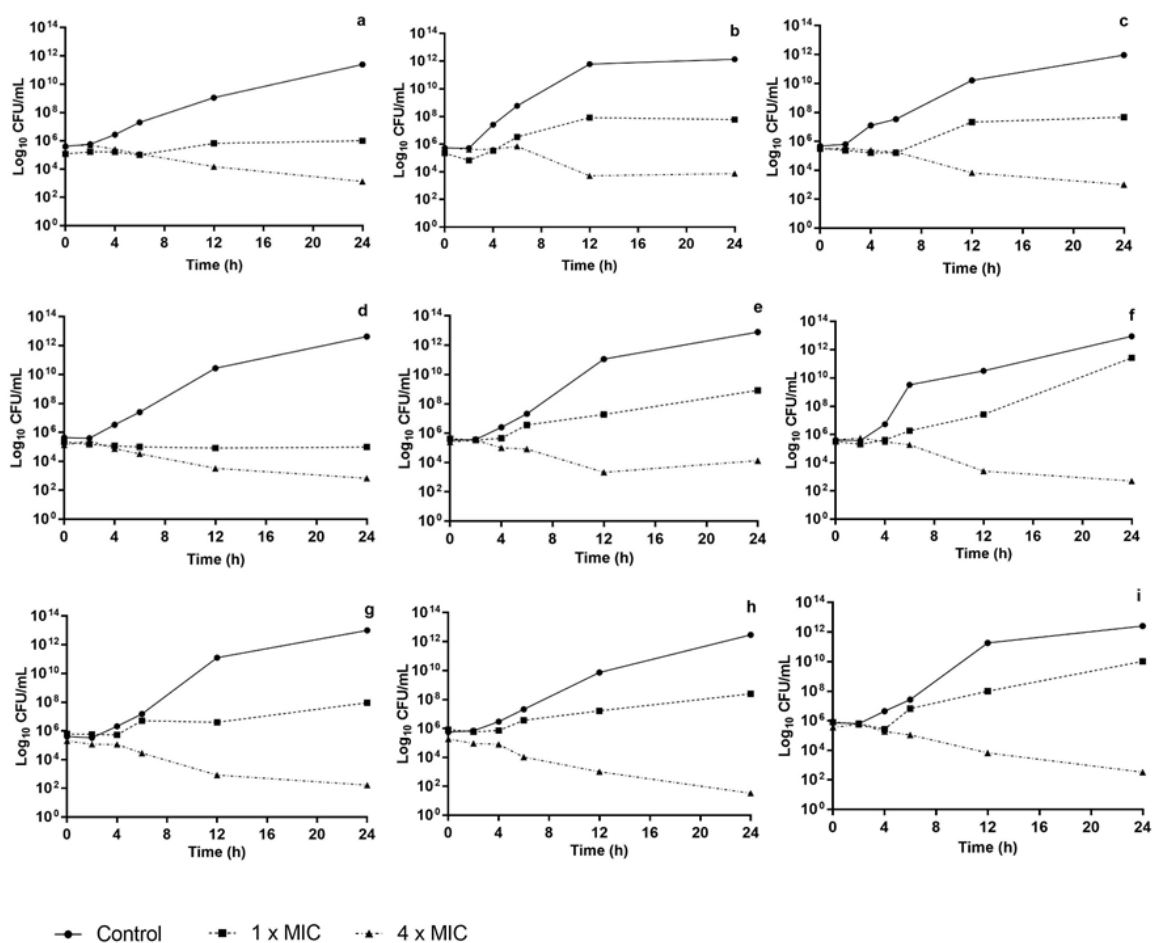


Figure 1: Time-kill curves of epigallocatechin gallate against *Staphylococcus aureus* isolates (0, 2, 4, 6, 12 and 24 hours) submitted to 1 time and 4 times at minimum inhibitory concentration. (a) 1125, (b) 1128, (c) 1154, (d) 1155, (e) 1158, (f) 1168, (g) 39A, (h) 92A and (i) 102A.

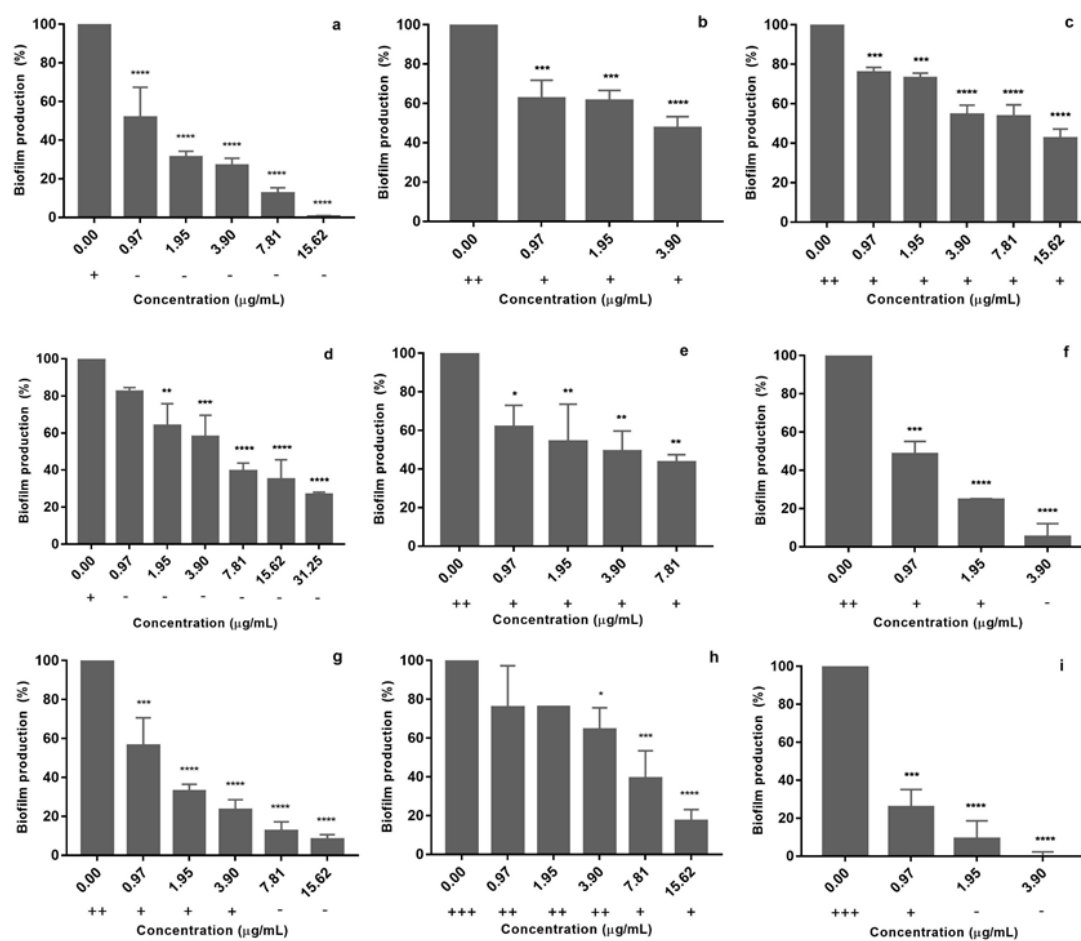


Figure 2: Inhibition of the biofilm production of different strains of *Staphylococcus aureus* by epigallocatechin gallate (EGCG). +++ strong biofilm producer, ++ moderate biofilm producer, + weak biofilm producer, - non biofilm producer. (a) 1125, (b) 1128, (c) 1154, (d) 1155, (e) 1158, (f) 1168, (g) 39A, (h) 92A and (i) 102A.

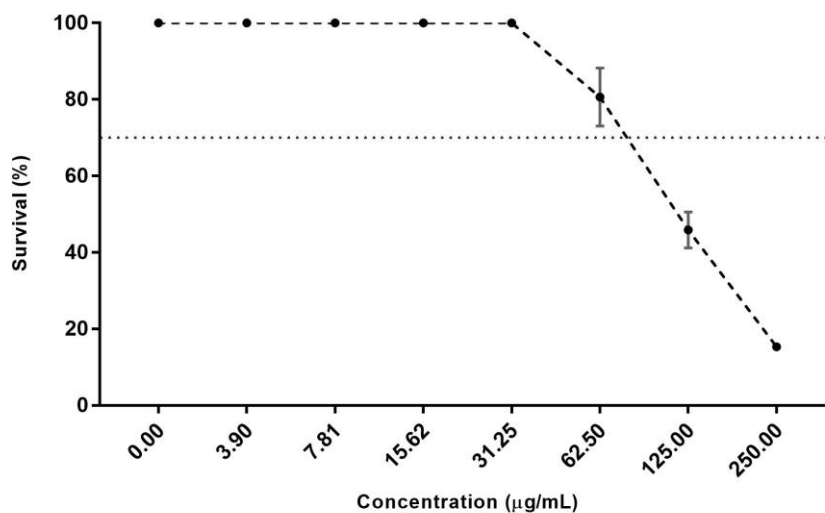


Figure 3: Evaluation of the cytotoxic effects of epigallocatechin gallate on macrophages of the J774A.1 cell line. The cells were used at a concentration of 5×10^4 cells / ml, distributed in a 96-well plate and incubated for 48 hours at different concentrations of EGCG (1000 to 0.97 $\mu\text{g/ml}$). The figure shows the cytotoxicity of the concentration of 250 to 3.90 $\mu\text{g/mL}$.

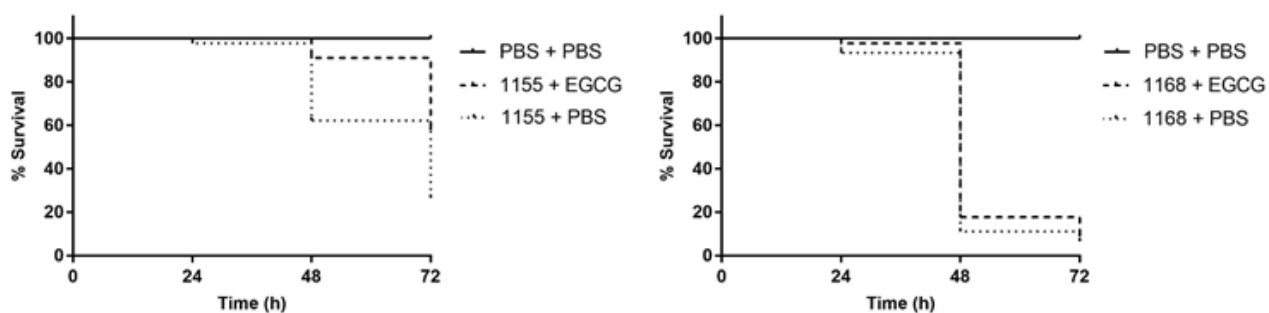


Figure 4: Survival of *Galleria mellonella* larvae infected with 10^5 CFU / larvae of isolates 1155 and 1168 after treatment with: PBS 1X; epigallocatechin gallate (200 mg/kg) and uninfected but treated twice with PBS 1X.

Table 2: General characteristics of *Staphylococcus aureus* strains used in this study.

Strain number	Source	Virulence genes ^a	Pulsotype (PFGE) ^b	ST ^c (MLST)	Susceptibility to oxacillin/SCCmec	MIC (µg/mL) ^d	
						OXA	VAN
1125	joint prosthesis	<i>ica, cna, fnbA, ebpS</i>	A1	1	MRSA/ SCCmecIV	64	1
1128	joint prosthesis	<i>ica, cna, fnbA, ebpS</i>	A2	1	MSSA	<0,5	2
1154	osteomyelitis	<i>ica, fnbA, ebpS</i>	B	5	MSSA	<0,5	2
1155	osteomyelitis	<i>pvl, ica, cna, fnbA, bbp, ebpS</i>	C	30	MRSA/ SCCmecIV	8	1
1158	blood	<i>ica, fnbA, ebpS</i>	D	5	MRSA/ SCCmecIV	32	1
1168	surgical wound infection	<i>pvl, ica, cna</i>	E	1462	MSSA	<0,5	1
39A	blood	<i>fnbA, ebpS</i>	F	5	MRSA/ SCCmecII	>256	1
92A	tracheal secretion	<i>fnbA, ebps</i>	G	5	MRSA/ SCCmecIV	128	1
102A	blood	<i>fnbA, fnbB, pvl</i>	H	8	MRSA/ SCCmecIV	96	1

^aVirulence genes: *cna* (encodes the collagen-binding protein), *bbp* (bone-sialoprotein-binding protein), *ebpS* (elastin binding protein), *fnbB* (fibronectin-binding protein B), *fnbA* (fibronectin-binding protein A), *pvl* (panton-valentine leucocidin) and *ica* (production of the intercellular polysaccharide adhesin related to biofilm formation); ^bPGGE (Pulsed-field gel electrophoresis); ^csequence type; ^d minimum inhibitory concentration, OXA (oxacillin), VAN (vancomycin).