



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

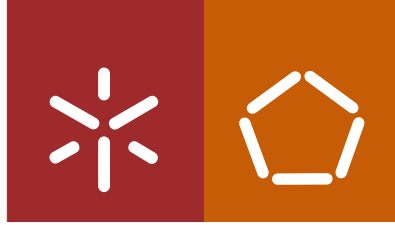
Henrique Gonçalves Ribeiro

**Desenvolvimento de um produto antimicrobiano  
com mel Português e bacteriófagos**

Henrique Gonçalves Ribeiro **Desenvolvimento de um produto antimicrobiano com mel Português e bacteriófagos**

UMinho | 2016

junho de 2016



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Henrique Gonçalves Ribeiro

## **Desenvolvimento de um produto antimicrobiano com mel Português e bacteriófagos**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Bioengenharia

Trabalho efetuado sob a orientação da  
**Doutora Sanna Maria Sillankorva**  
e da  
**Doutora Ana Cristina Afonso Oliveira**  
e da  
**Doutora Ana Filipa Frutuoso Mendes Henriques**

junho de 2016

## AGRADECIMENTOS

Agora que esta pequena jornada chega ao fim, quero expressar o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que direta ou indiretamente me acompanharam e ajudaram na concretização desta dissertação.

Em primeiro lugar quero agradecer à Doutora Ana Oliveira, à Doutora Sanna Sillankorva e à Doutora Ana Henriques pela incansável orientação, motivação, incentivo, ajuda, disponibilidade e dedicação que demonstraram ao longo deste trabalho que foi determinante para a sua realização. Um apreço em especial para a Ana Oliveira por ter sido incansável, desde a primeira hora em que ficou encarregue de orientar um “pinheiro ao alto” no laboratório, agradeço-lhe também toda a simpatia, motivação, confiança, disponibilidade e paciência manifestada durante todo este processo em que às vezes havia “bola”. Em particular a Ana Henriques por motivar, incentivar estar sempre disponível em momentos oportunos e críticos quer no início do trabalho quer na parte final, bem como pelo apoio no meu primeiro congresso. Por fim, mas não menos importante um obrigado a Sanna por numa primeira fase apostar e acreditar em mim para o desenvolvimento deste projeto, motivando e exigindo um compromisso que levasse a bom porto.

Gostava de deixar uma palavra de agradecimento a todos que conviveram comigo no laboratório LMA (Laboratório de Microbiologia Aplicada do CEB) pelo bom ambiente, às vezes de loucura, outras de concentração máxima, pelo companheirismo e solidariedade, apesar do rádio e a música ser o principal ponto de discórdia.

Não posso deixar de agradecer a Célia Rodrigues, pela total disponibilidade e ajuda nas análises por RP- HPLC.

Quero ainda deixar um obrigado aos meus colegas e amigos dos vários laboratórios pela contínua auto motivação entre nós, e fico contente em saber que como equipa somos mais eficazes quer seja dentro do laboratório ou fora dele.

Gostava de agradecer a minha família por toda a força, apoio e incentivo para nunca parar e baixar os braços, por toda a confiança depositada em mim, pelo grande carinho e compreensão ao longo de toda a minha vida. Obrigada pela vossa força. Sem todos vocês esta conquista não seria possível.

Obrigado a Todos



## RESUMO

O surgimento de bactérias multirresistentes, que tem origem na utilização negligente dos antibióticos, juntamente com a inexistência de novas moléculas com efeito antimicrobiano, representam uma séria ameaça à Medicina. Com base nesta realidade, o desenvolvimento de novas abordagens é essencial, sendo explorado neste trabalho o potencial da combinação de duas soluções com efeito antimicrobiano reconhecido: o mel e os bacteriófagos (fagos). Os fagos são predadores exclusivos de bactérias, que através do seu reconhecimento específico as infetam e destroem. A sua multiplicação é exponencial, permitindo que permaneçam no local da infeção enquanto existirem bactérias sensíveis. Por outro lado, o mel, um produto natural descrito e utilizado desde tempos ancestrais como promotor da regeneração e cicatrização de feridas, diminuindo a inflamação, possui também a capacidade de degradar biofilmes. Até ao momento não foram reportados microrganismos que lhe tenham adquirido resistência.

Ambas as soluções podem ser usadas para tratar feridas crónicas, colonizadas por diversas bactérias patogénicas que para além de poderem ser resistentes aos antibióticos, se encontram, protegidas em biofilmes.

Com este trabalho pretende-se conjugar os efeitos de ambas as alternativas apresentadas, através da utilização simultânea de fagos e de mel português, de forma a alcançar uma solução eficaz para combater biofilmes de 24 horas de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias presentes em feridas crónicas. Até o momento não há nenhum outro estudo sobre esta terapia combinada. Os resultados que se obtiveram demonstraram um efeito sinérgico e promissor quando se usou a combinação do fago EC3A com 25% de mel JPC2, no tratamento de *Escherichia coli*, contrariamente ao observado para *Pseudomonas aeruginosa*, em que não se observou nenhuma melhoria na combinação dos antimicrobianos. Contudo, novos fagos e outros méis deverão ser testados, com o intuito de obter melhores desempenhos antimicrobianos em biofilmes.



## ABSTRACT

Nowadays, the rising of multi resistant bacteria due to the misuse of antibiotics, together with the gap in the development of new antimicrobial molecules, represents a serious threat to Medicine. In face of this reality, new approaches to develop new tools to treat multi resistance organisms have been made. In this work, the potential of the combination between two recognized antimicrobial alternatives, honey and Bacteriophages (phages), are explored. Phages are natural bacteria predators that specifically recognize hosts, destroying them. They multiply exponentially in the site of infection while sensitive hosts are present. Besides, the use of honey has demonstrated effectiveness in the treatment of wounds since antiquity. Indeed, honey is a natural product, with recognized antimicrobial properties, even against antibiotic resistant microorganisms. Furthermore, this natural substance is able to degrade biofilms, improve the healing process, decrease inflammation and promote tissue regeneration. Until now, the induction of resistances by honey was never reported.

Indeed, the treatment of chronic wounds, where bacteria colonize the tissues and form biofilms, is highly conditioned and has high probability of failure if the only solutions considered for therapy are the antibiotics.

In this work, the simultaneous use of phages and Portuguese honey were tested, aiming to reach an efficient solution to control 24 hours biofilms of *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria present in chronic wounds. To date there is no other study about this combinatorial therapy.

The obtained results demonstrated a promising synergistic effect when the combination of EC3a phage with 25% honey JPC2 was used to treat *Escherichia coli* biofilms, contrarily to *Pseudomonas aeruginosa*, where no improvement with this combination was observed. However, new phages and other honey samples shall be tested in order to obtain better performance in biofilm control.





# ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Lista de Publicações no Âmbito deste Trabalho.....	xiii
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas.....	xix
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	xxi
1. Introdução.....	23
1.1 Resistências aos antibióticos.....	23
1.2 Feridas e colonização bacteriana.....	23
1.3 Mel.....	25
1.3.1 Breve história.....	25
1.3.2 Definição e principais componentes.....	25
1.3.3 Ação antimicrobiana.....	27
1.3.4 Mel de Manuka.....	28
1.3.5 Mel Português.....	29
1.4 Bacteriófagos (fagos).....	30
1.4.1 Definição e estrutura.....	30
1.4.2 Ciclo de vida.....	31
1.4.3 Vantagens e desvantagens.....	32
1.4.4 Enzimas codificadas pelos fagos.....	33
1.5 Objetivo.....	34
2. Materiais e métodos.....	35
2.1 Amostragem de méis.....	35
2.2 Caracterização físico-química do mel.....	36
2.2.1 Determinação do pH.....	36
2.2.2 Determinação da cor.....	36
2.2.3 Determinação do conteúdo proteico.....	37
2.2.4 Determinação da concentração de hidroximetilfurfural (HMF).....	37

2.2.5	Determinação do conteúdo metilglioxal (MGO) por RP-HPLC.....	38
2.3	Meios de cultura bacterianos e condições de crescimento.....	39
2.4	Avaliação das propriedades antimicrobianas do mel.....	39
2.5	Produção, purificação e quantificação de bacteriófagos.....	40
2.6	Efeito anti biofilme dos bacteriófagos.....	42
2.7	Efeito anti biofilme dos bacteriófagos e mel .....	43
2.8	Análise estatística.....	44
3.	Resultados.....	45
3.1	Determinação do pH .....	45
3.2	Determinação da cor .....	46
3.3	Determinação do conteúdo proteico.....	46
3.4	Determinação da concentração de HMF .....	47
3.5	Determinação da concentração MGO.....	47
3.6	Determinação da CMI.....	47
3.7	Monitorização da viabilidade dos fagos em mel.....	48
3.8	Otimização da concentração de virucida .....	52
3.9	Efeito do mel JPC2 em biofilmes de <i>E. coli</i> .....	52
3.10	Efeito do fago EC3a em biofilmes de <i>E. coli</i> .....	53
3.11	Efeito da ação combinada do fago EC3a e do mel JPC2 em biofilmes de <i>E. coli</i> .....	55
3.12	Efeito do mel JPC2 em biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> .....	57
3.13	Efeito do fago P1 em biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> .....	58
3.14	Efeito da ação combinada do fago P1 e do mel JPC2 em biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> .....	59
3.15	Avaliação do tratamento sequencial da ação do mel JPC2 após ação do fago P1 em biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> .....	62
3.16	Avaliação da ação individual ou combinada do mel de Manuka com fago P1 em biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> .....	63
4.	Discussão e conclusões .....	65
4.1	Caracterização do mel.....	65
4.2	Atividade antimicrobiana do mel.....	68
4.3	Monitorização da viabilidade dos fagos em mel.....	69
4.4	Efeito antimicrobiano da ação do fago EC3a e do mel JPC2 em biofilmes de <i>E. coli</i> .....	70

4.5	Efeito antimicrobiano da ação do fago P1 e do mel JPC2 em biofilme de <i>P. aeruginosa</i> .....	71
4.6	Avaliação do tratamento sequencial da ação do mel JPC2 após ação do fago P1 em biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> .....	73
4.7	Avaliação da ação individual ou combinada do mel de Manuka com fago P1 em biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> .....	73
5.	Perspectivas Futuras.....	75
	Bibliografia .....	77
	Anexo I – Reta de calibração do conteúdo proteico.....	87
	Anexo II – Reta de calibração do conteúdo MGO .....	87
	Anexo III – Imagens de microscopia eletrónica dos fagos EC3a e P1 .....	88



## LISTA DE PUBLICAÇÕES NO ÂMBITO DESTE TRABALHO

### Comunicações orais

\* Autor que apresentou a trabalho.

Henrique Ribeiro, Ana Henriques, Sanna Sillankorva, \*Ana Oliveira. Efeito anti-biofilme: combinação entre bacteriófagos e mel português. p55. IV Congreso Iberico de Apicultura. Salamanca, Abril 2016.

Henrique Ribeiro, Ana Henriques, Sanna Sillankorva, \*Ana Oliveira. Combining bacteriophages and Portuguese honey for biofilm control. Phage therapy world congress. Paris, Junho 2016.

### Apresentação de poster em conferências

\* Autor que apresentou a trabalho.

Ribeiro, H. Henriques, A., Sillankorva, S. \*Oliveira, A. Efeito anti-biofilme: combinação entre bacteriófagos e mel português. p55. IV Congreso Iberico de Apicultura, Salamanca, Abril 2016.

\*Henrique Ribeiro, Ana Henriques, Sanna Sillankorva, Ana Oliveira. Anti-biofilm effect: combining bacteriophages with Portuguese honey. Biofilms7. Porto, Junho 2016.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Varias etapas de formação de biofilme. a) adesão bacteriana a uma superfície, b) crescimento e maturação do biofilme; c) dispersão do biofilme. Adaptado de (Pires, 2015).....	24
Figura 2: A) Estrutura química do hidroximetilfurfural (HMF); B) Estrutura química do metilglioxal (MGO) .....	26
Figura 3: Representação típica da estrutural de um bacteriófago (adaptado Hanlon, 2007).....	31
Figura 4: As conseqüências da infecção por um bacteriófago. As alternativas após infecção são replicação e libertação de partículas virais maduras (conduzindo à lise) ou lisogenia, muitas vezes através da integração do DNA vírico no DNA do hospedeiro, caso dos profagos. A lise pode ser estimulada por condições de <i>stress</i> induzidas para produzir vírus maduros, levando à lise da célula hospedeira (adaptado Madigan et al., 2011).....	32
Figura 5: Monitorização da viabilidade do fago EC3a em mel: concentração (Log PFU.mL <sup>-1</sup> ) de EC3a após suspensão em 25% e 50% de mel JPC2 e Urze 2. Os dados indicados em cada período de tempo (0, 6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. O limite de detecção do método foi de 1000 PFU.mL <sup>-1</sup> .....	49
Figura 6: Monitorização da viabilidade do fago P1 em mel: concentração (Log PFU.mL <sup>-1</sup> ) de P1 após suspensão em 25 % e 50% de mel JPC2, Urze1, Urze 2 e Manuka. Os dados indicados em cada período de tempo (0, 6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. O limite de detecção do método foi de 1000 PFU.mL <sup>-1</sup> .....	50
Figura 7: Monitorização da viabilidade do fago EPA3 em mel: concentração (Log PFU.mL <sup>-1</sup> ) de EPA3 após suspensão em 25% e 50% de mel JPC2, Urze 2 e Manuka. Os dados indicados em cada período de tempo (0, 6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. O limite de detecção do método foi de 1000 PFU.mL <sup>-1</sup> .....	51
Figura 8: Monitorização da viabilidade do fago EPA4 em mel: concentração (Log PFU.mL <sup>-1</sup> ) de EPA4 após suspensão em 25% e 50% de mel JPC2, Urze 2 e Manuka. Os dados indicados em cada período de tempo (0, 6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. O limite de detecção do método foi de 1000 PFU.mL <sup>-1</sup> .....	52
Figura 9: Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de <i>E. coli</i> de 24 h sobre o efeito de duas concentrações de mel JPC2 – 25% e 50%. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. * Indica que os resultados são estatisticamente diferentes (p<0.01).....	53

Figura 10: Redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de <i>E. coli</i> de 24 h sobre o efeito de fago EC3a. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. * Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ). .....	54
Figura 11: Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de <i>E. coli</i> de 24 h sobre o efeito de fago EC3a combinado com mel JPC2 a cada uma das concentrações – 25% e 50%. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. * Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ). .....	55
Figura 12: a) Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de <i>E. coli</i> de 24 h sobre o efeito isolado de fago EC3a ou mel JPC2 25% bem com o efeito combinado do fago EC3a com mel JPC2 25%. b) Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de <i>E. coli</i> de 24 h sobre o efeito isolado de fago EC3a ou mel JPC2 50% bem com o efeito combinado do fago EC3a com mel JPC2 50%. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. * Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ). .....	56
Figura 13: Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> de 24 h sobre o efeito de duas concentrações de mel JPC2 – 25% e 50%. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. * Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ). .....	57
Figura 14: Redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> de 24 h sobre o efeito de fago P1. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. * Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ). .....	58
Figura 15: Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> de 24 h sobre o efeito de fago P1 combinado com mel JPC2 a cada uma das concentrações – 25% e 50%. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. * Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ). .....	59
Figura 16: a) Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> de 24 h sobre o efeito isolado de fago P1 ou mel JPC2 25% bem com o efeito combinado do fago P1 com mel JPC2 25%. b) Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de <i>P. aeruginosa</i>	



de 24 h sobre o efeito isolado de fago P1 ou mel JPC2 50% bem com o efeito combinado do fago P1 com mel JPC2 50%. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. * Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ).....	61
Figura 17: Efeito do mel JPC2 a cada uma das concentrações – 25% e 50% – em biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> de 48 h, após ação do fago P1 durante as 24 h precedentes. Os dados indicados representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. * Indica que os resultados são estatisticamente diferentes do controlo ( $p < 0.01$ ).....	62
Figura 18: Comparação do efeito do mel de Manuka (50%) com o JPC2 (50%) isoladamente, e das respetivas combinações com o fago P1 em biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> de 24 h. Os dados indicados representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. * Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ).....	63
Figura 19: Retas de calibração do conteúdo proteico. A equação da reta obtida foi: $Abs(562\text{ nm}) = 1.30 (\pm 0.09) [Proteína\ (mg.mL^{-1})] + 0.17 (\pm 0.08)$ , com uma correlação $R^2=0.9977$ .....	87
Figura 20: Retas de calibração do padrão MGO 35-45%. A equação da reta obtida foi: $\text{Área} = 4268.4 [MGO\ (mg.kg^{-1})] + 346.6$ , com uma correlação $R^2= 0.9966$ .....	87
Figura 21: Imagem de microscopia eletrónica da coleção do grupo BBiG: a) fago EC3a; b) fago P1 ...	88



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de méis.....	35
Tabela 2: Designação da cor do extrato de mel de acordo Departamento de Agricultura dos E.U.A. ...	37
Tabela 3: As estirpes bacterianas utilizadas como hospedeiro. ....	39
Tabela 4: Bacteriófagos usados e respetivos hospedeiros.....	41
Tabela 5: Parâmetros físico - químicos dos vários méis e respetivas CMI para <i>P. aeruginosa</i> (PA) e <i>E. coli</i> (EC). ....	45
Tabela 6: Valores de pH obtidos nas respetivas concentrações de mel das CMI, dos vários méis. ....	46
Tabela 7: Valores de CMI obtidos em <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> para os diversos méis avaliados. ....	48



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

### Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

3-DG - 3-deoxiglucosulose do inglês *3-deoxyglucosulose*

BCA – Do inglês *Bicinchoninic acid*

BSA – Albumina de soro bovino do inglês *Bovine serum albumin*

CEB – Centro de Engenharia Biológica

CFU – Contagem de células viáveis do inglês *Colony-forming unit*

CMI – Concentração mínima inibitória

DHA – Dihidroxiacetona do inglês *Dihydroxyacetone*

DNA - Ácido desoxirribonucleico do inglês *Deoxyribonucleic acid*

DO – Densidade ótica

FAS – Sulfato de ferro amônio do inglês *Ferrous ammonium sulfate*

HMF – Hidroximetilfurfural do inglês *Hydroxymethylfurfural*

ICTV – Do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*

MBEC – Do inglês *Minimal biofilm eradication concentration*

MGO – Metilglioxal do inglês *Methylglyoxal*

min – Minutos

MOI – Do inglês *Multiplicity of infection*

NCBI – Do inglês *National Center for Biotechnology Information*

OPD – Do inglês *O-phenylenediamine*

PEG – Do inglês *Polyethylene glycol*

PES – Do inglês *Polyethersulfone* (filtros)

PFU – Unidade formadora de placa do inglês *Plaque forming unit*

PIA – Do inglês *Pseudomonas isolation agar*

RNA - Ácido ribonucleico do inglês *Ribonucleic acid*

RP-HPLC – Do inglês *Reverse Phase – High Pressure Liquid Chromatography*

rpm – Rotações por minuto

TSA – Do inglês *Tryptic soy agar*

TSB – Do inglês *Tryptic soy broth*

UMF – Fator único de Manuka do inglês *Unique manuka factor*

USDA – Departamento de Agricultura dos E.U.A. do inglês *United States Department of Agriculture*

UV – Ultravioleta



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Resistências aos antibióticos

A aquisição de resistências aos antibióticos por parte dos microrganismos patogénicos tem vindo a tornar-se um problema cada vez mais patente na população mundial em geral (IDSA Infectious Diseases Society of America, 2004; Tenover et al., 1996). Esta realidade representa uma séria ameaça para a Saúde Pública, de tal modo que o desenvolvimento de alternativas é urgente. A resistência aos antibióticos é causada em grande parte pela utilização inadequada e exagerada de antibióticos (Golkar et al., 2014). O aparecimento de bactérias multirresistentes tem, de facto, representado uma das ameaças mais graves para o tratamento de doenças infecciosas (Kutateladze et al., 2010). Um outro problema que limita as opções terapêuticas com antibióticos é a falta de desenvolvimento de novos princípios ativos eficientes contra bactérias não sensíveis aos já existentes (Conly et al., 2005).

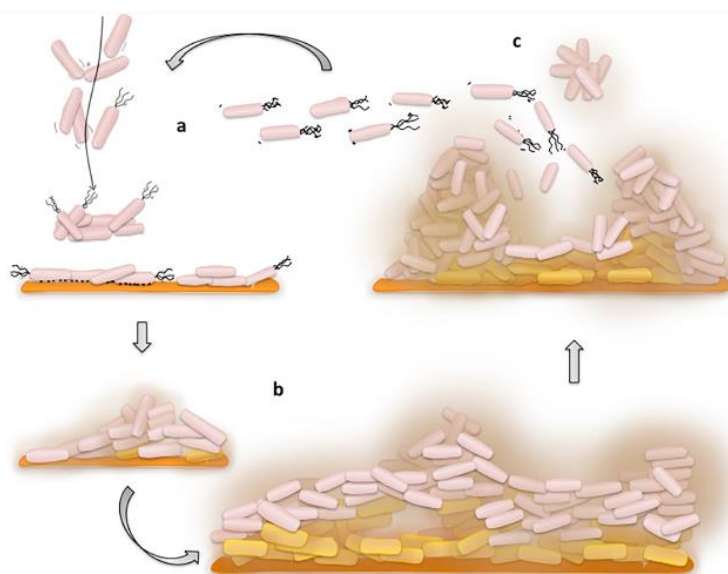
## 1.2 Feridas e colonização bacteriana

A pele é a primeira linha de defesa do organismo do ser Humano, uma vez que, atua como uma barreira física contra a invasão microbiana. Quando ocorre dano nesta barreira, ocorrem feridas, lacerações ou escoriações. Numa primeira fase ocorre colonização das feridas (não sistémicas) por microrganismos comensais Gram positivos, como o *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, numa fase intermédia, por bactérias Gram negativas como a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Acinetobacter spp.* e *Salmonella spp.*, num estado mais avançado, a ferida é colonizada por bactérias anaeróbicas (Ahmad, 2002; Bowler et al., 2001; Dryden, 2010; Revathi et al., 1998). Os ferimentos por queimaduras podem causar este tipo de problema. As queimaduras destroem a barreira cutânea, a rede vascular, e a área queimada é rica em muitos nutrientes utilizados pelas bactérias, criando assim condições favoráveis para ocorrerem variadas infeções (Church et al., 2006; Sevgi et al., 2013).

As feridas crónicas têm maior incidência em grupos de risco que incluem pessoas obesas, diabéticos e idosos, grupos de pessoas com dificuldades na circulação sanguínea, o que compromete a aplicação de agentes antimicrobianos por via sistémica (Bessa et al., 2013; Bowler et al., 2001; Dryden, 2010).

Alguns dos invasores microbianos deste tipo de feridas são multirresistentes a antibióticos (Hsueh et al., 1998; Lu et al., 2011; Rose et al., 2014; Sulakvelidze et al., 2001). As bactérias multirresistentes com maior incidência em feridas crônicas e queimaduras são as *P. aeruginosa* e *E. coli*, ambas Gram negativas e com capacidade de formar biofilme (Ekrami et al., 2007; Laverty et al., 2014; Pires et al., 2011). Os biofilmes têm um papel importante nas feridas crônicas, e definem-se como comunidades estruturadas de microrganismos, organizados em microcolônias com capacidade de aderirem e colonizarem os tecidos celulares. Os biofilmes bacterianos consistem majoritariamente em substâncias poliméricas extracelulares como polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos e em menor quantidade células bacterianas (Ammons, 2010; Costerton et al., 1999) (Representação de biofilme na **Figura 1**).

Esta capacidade das bactérias e outros microrganismos para formar biofilmes altamente organizados proporciona-lhes uma proteção adicional contra as terapias antimicrobianas (antibióticos, antissépticos, desinfetantes, etc.) (Ammons, 2010; Majtan et al., 2014). O crescimento de uma comunidade multivariada de espécies presentes no biofilme cria uma plataforma eficiente para a troca de genes de resistência a antimicrobianos pelo fenômeno da transferência lateral de genes (Ammons, 2010; Cookson, 2005). A sua persistência em feridas torna os processos de cura e cicatrização mais difíceis. As características destas infecções tornam assim importante a adaptação do tratamento para os diferentes tipos de ferimentos e para as diferentes infecções que causam biofilmes. Para além do uso frequente de antimicrobianos convencionais tais como os antibióticos (bactericidas ou bacteriostáticos), existem outros tratamentos habitualmente usados, como pensos com prata, curativos de iodo, hidrogéis, fototerapia e imunoterapia (Ammons, 2010; Leaper et al., 2014; Sevgi et al., 2013).



**Figura 1:** Varias etapas de formação de biofilme. a) adesão bacteriana a uma superfície, b) crescimento e maturação do biofilme; c) dispersão do biofilme. Adaptado de (Pires, 2015).



## 1.3 Mel

### 1.3.1 Breve história

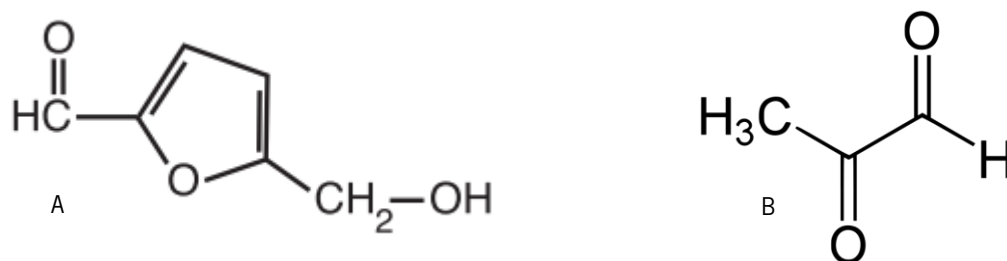
O mel é uma das substâncias mais utilizadas ao longo da história humana, não só como fonte de energia na dieta, mas também tem sido usado, desde os tempos mais remotos, como um cosmético, adjuvante de extratos de ervas e remédio no tratamento de feridas. Os gregos e antigos egípcios, por exemplo, utilizavam o mel como aplicação tópica para o tratamento de feridas na pele e queimaduras, a medicina tradicional Persa documenta que o mel é eficaz no tratamento de feridas, eczema e inflamação (Burlando et al., 2013; Eteraf-Oskouei et al., 2013; McLoone, Warnock, & Fyfe, 2015).

Na altura em que eclodiu a Segunda Guerra Mundial, houve uma descoberta que revolucionou o mundo, a descoberta dos antibióticos pelo Sir Alexander Fleming, o que levou ao abandono e ao desuso de técnicas mais tradicionais como a aplicação do mel. No entanto, a eficiência denotada pelo uso do mel na medicina tradicional tem levantado interesse em táticas clínicas modernas para a cicatrização de feridas (Belcher, 2012) muito devido ao aparecimento de bactérias multirresistentes aos antibióticos. Por exemplo, pensos impregnados com mel tiveram um acentuado desenvolvimento, bem como novas formas de aplicações, nomeadamente por géis, pomadas e cremes da marca MEDIHONEY®.

### 1.3.2 Definição e principais componentes

O mel é uma solução viscosa, supersaturada de açúcar proveniente do néctar reunido e modificado pelas abelhas, *Apis mellifera*, que contém muitos açúcares sendo o seu conteúdo estimado em 40% de frutose, 30% de glucose, 5% de sacarose e 20% de água, bem como outras substâncias, tais como proteínas, enzimas, como diastase, invertase, glucose oxidase assim como aminoácidos livres, vitaminas (principalmente vitamina B6, riboflavina, niacina, tiamina e ácido pantoténico), e compostos fenólicos e minerais essenciais (incluindo cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês, fósforo, sódio, potássio e zinco) (Jull et al., 2008; Pontes et al., 2007; Sato et al., 2000; Silva et al., 2009).

Há uma variedade de méis disponíveis no mercado e suas características dependem muito de fatores ligados à sua produção e processamento, bem como a origem geográfica e, mais importante, o tipo de planta de onde o néctar e pólen foram recolhidos. Desta forma, o mel tem uma grande dificuldade em reproduzir a sua função antimicrobiana, porque a cada ano a sua constituição não é a mesma variando de acordo com a sazonalidade, a fonte floral e o estado de saúde das colmeias, podendo ser mais eficaz num ano e menos no seguinte.



**Figura 2:** **A)** Estrutura química do hidroximetilfurfural (HMF); **B)** Estrutura química do metilglioal (MGO)

O mel tem um composto padrão que permite avaliar a sua qualidade, hidroximetilfurfural (HMF) (Estrutura química do HMF na **Figura 2 a**), é um aldeído, heterocíclico orgânico solúvel em água, derivado a partir da decomposição por desidratação de açúcares como glucose e frutose em condições ácidas. Ocorre naturalmente ao longo do tempo na maioria dos méis, é frequentemente utilizado como fator da qualidade do mel, e é um indicador da frescura e/ou sobreaquecimento do mel (Mavric et al., 2008). Em méis frescos não há praticamente nenhum HMF, contudo os aumentos e níveis elevados de HMF pode ser o resultado de adulteração com aditivos nomeadamente açúcar, armazenamento inadequado, ou tratamento térmico severo durante o armazenamento, em função da temperatura de armazenamento e do pH de mel. Apesar do HMF não ser considerado uma substância nociva, normas alimentares em muitos países regulam os níveis de HMF no mel para um valor máximo de 40 mg.kg<sup>-1</sup> (Basumallick et al., 2013; Keppy et al., 2010; Portuguesa, 2003).

A cor do mel é um parâmetro característico da origem floral e está estreitamente relacionado com o conteúdo de minerais e fenóis. A relação entre a cor dos méis e o seu conteúdo mineral foi descrito por González-Miret et al., (2005) e indica que quanto mais escuro forem os méis maior será a presença de minerais como cálcio, ferro, arsénio e chumbo na sua constituição. A forte presença de fenóis e flavonoides na constituição dos méis mais escuros é responsável por um poder antioxidante superior em relação aos méis mais claros (Aazza et al., 2013).

O mel tem uma atividade antibacteriana de largo espectro e propriedades contra bactérias patogénicas. A sua elevada viscosidade proporciona uma barreira protetora contra as infeções (Mandal et al., 2011), sendo adequado para o cuidado da pele. Pensa-se que o seu uso regular preserva a juventude da pele e retarda o seu envelhecimento (Burlando et al., 2013).

A atividade antibacteriana de mel não é totalmente compreendida, mas os seus efeitos benéficos, por exemplo no tratamento de feridas, são mais do que reconhecidos. Este efeito antimicrobiano foi atribuído ao baixo pH, a elevada osmolaridade, a existência de produção de peróxido de hidrogénio pela enzima glucose oxidase, a presença do péptido antimicrobiano da abelha defesina-1 e componentes fitoquímicos como metilglioal (MGO) (Estrutura química do MGO na **Figura 2 b**), flavonoides e ácidos

aromáticos presentes na sua constituição (Carson et al., 2003; McLoone et al., 2015; Moore et al., 2001; Sherlock et al., 2010).

### 1.3.3 Ação antimicrobiana

O modo de ação antimicrobiano do mel depende de muitos fatores listados abaixo. A alta osmolaridade causada pela alta concentração de açúcares e o baixo teor de humidade (higroscópico) do mel causa *stress* osmótico às bactérias desidratando-as. Um pH baixo é maioritariamente desfavorável para o crescimento de muitos microrganismos. O mel na sua constituição tem enzimas endógenas, que foram introduzidas pela saliva das abelhas durante o processamento do néctar em mel. Um exemplo dessas enzimas é a glucose oxidase, que catalisa a conversão da glucose do mel em ácido glucónico e peróxido de hidrogénio (Maddocks et al., 2013; Mandal et al., 2011; McLoone et al., 2015). Assim, a maioria dos méis geram peróxido de hidrogénio, quando diluídos porque a atividade da glucose oxidase é re-ativada (Mandal et al., 2011). O peróxido de hidrogénio é tóxico para o desenvolvimento dos microrganismos sem catalase, enzima que decompõe o peróxido de hidrogénio (um importante componente antimicrobiano de alguns méis) em hidrogénio e oxigénio. Como as células animais e humanas contêm catalase, se as propriedades antimicrobianas do mel forem devidas apenas à produção de peróxido de hidrogénio, a atividade antimicrobiana pode ser reduzida quando o mel entrar em contato com as células vivas (McLoone et al., 2015). Portanto a decomposição do peróxido de hidrogénio produzido no mel após ser diluído, foi reproduzida em laboratório incubando-se o mel com catalase, e a atividade antimicrobiana do mel diminuiu, mas revelou que existem outros fatores no mel responsáveis por atividade antimicrobiana não dependentes do peróxido de hidrogénio (Mandal et al., 2011; Snow et al., 2004).

Algumas substâncias químicas orgânicas derivadas do néctar das plantas, tais como os polifenóis e os flavonoides, possuem propriedades antibacterianas, conferidas por exemplo pela capacidade da inibição de metabolismo bacteriano, inativando a ação da DNA girase bacteriana (responsável por promover a abertura da dupla cadeia de DNA em hélice, separando-as em cadeias simples para que possam sofrer replicação), ou pela capacidade de comprometer a membrana citoplasmática das células (Cushnie et al., 2005; McLoone et al., 2015).

Portanto, a combinação de todos estes fatores (independentes da ação de peróxido de hidrogénio), juntamente com ação dependente da produção de peróxido de hidrogénio, parecem interagir de forma aditiva ou sinérgica, revelando uma elevada atividade antimicrobiana, ao agirem contra diversos alvos bacterianos em simultâneo, dificultando consequentemente a adaptação das bactérias. Além disso,

até à data, nenhum microrganismo/estirpe foi declarada ou emergiu como sendo resistente ao mel (Maddocks et al., 2013; Mandal et al., 2011; McLoone et al., 2015).

Alguns destes fatores são ainda importantes no processo de cicatrização e inflamação, controlando a angiogénese, promovendo a epitelização, a modulação de citocinas, a proliferação de fibroblastos e o estímulo de linfócitos e fagócitos (Al-Waili et al., 2011; Tonks et al., 2003).

#### 1.3.4 Mel de Manuka

Produzido na Austrália e Nova Zelândia, o mel de Manuka foi descrito como sendo, até à data, um dos melhores méis do mundo para utilizações terapêuticas, sendo já comercializado. A sua elevada atividade antimicrobiana, é muitas vezes atribuída ao “fator único de Manuka” (UMF, do inglês *unique Manuka factor*). Foi estabelecido que a quantificação do UMF seria efetuada contra *Staphylococcus aureus* num ensaio de difusão radial, e calculado de acordo com uma gama de concentrações de soluções de fenol com uma zona semelhante de inibição do crescimento, ao mel a ser testado (McLoone et al., 2015).

A capacidade antimicrobiana do mel de Manuka parece dever-se principalmente à sua fonte floral *Leptospermum scoparium* que lhe fornece compostos fitoquímicos com boas propriedades antimicrobianas, que não dependem significativamente da atividade de peróxido de hidrogénio, das propriedades como baixo pH e conteúdo proteico, mas da existência de grandes quantidades do composto MGO, um metabólito muito citotóxico (Adams et al., 2008; Carnwath, et al., 2014; Majtan et al., 2010; Mavric et al., 2008; McLoone et al., 2015).

Inicialmente o aparecimento da molécula MGO estava apenas associado à chamada reação de Maillard ou reações de caramelização de hidratos de carbono redutores (Mavric et al., 2004), onde se formam compostos como o glioxal e 3-deoxiglucosulose (3-DG) molécula precursora do HMF (Adams et al., 2008; Mavric et al., 2008). No entanto outros estudos mais recentes, sugerem que o MGO no mel de Manuka é sintetizado através da desidratação irreversível e não-enzimática de dihidroxiacetona (DHA) (Atrott et al., 2012; Stephens et al., 2010) presente no néctar das flores de *Leptospermum scoparium*, do qual é derivado o mel de Manuka, sendo esta conversão catalisada e beneficiada pela presença de iões polivalentes como o fosfato (Adams et al., 2009). Esta conversão ocorre lentamente durante o armazenamento do mel.

Do ponto de vista botânico, o MGO é importante em condições de *stress*, como salinidade e seca (Mavric et al., 2008; McLoone et al., 2015).

No entanto, o MGO não é o único fator a contribuir para a atividade antimicrobiana não dependente de peróxido de hidrogénio do mel, mas está diretamente relacionado com a alta atividade antimicrobiana do mel de Manuka (Mavric et al., 2008).

#### 1.3.5 Mel Português

Portugal tem boas e variadas condições geográficas e geofísicas, possuindo um grande número de locais com estatuto de área protegida, para estimular a preservação da fauna e flora naturais, bem como evitar o impacto da poluição na produção de méis portugueses e consequente perda de valor. Em Portugal, existem muitas marcas de mel, mas nem todas têm o certificado como orgânico, porque a caracterização total de mel não é frequente e há uma falta de informação sobre as características exigidas para obter esta classificação (Estevinho et al., 2012; Magkos et al., 2003).

Atualmente, Portugal tem um total de nove méis com a denominação de origem protegida Europeia, pois são produzidos, processados, transformados e elaborados numa área geográfica delimitada com um certificado. A caracterização detalhada dos diferentes tipos de mel existentes é importante, uma vez que permitirá o estabelecimento de especificações técnicas, evitando a ocorrência de adulterações e fraudes (Estevinho et al., 2012; Silva et al., 2009).

Normalmente, o mel Português é declarado e classificado como mel orgânico e monofloral de urze (*Erica spp*), porque têm pólen dessas plantas predominantemente, porém, pode conter outros tipos de pólen derivados de *Lavanda spp*, *Castanea spp*, *Cistus spp*, *Rubus spp* e *Echium spp*. O estatuto de mel monofloral refere-se geralmente à presença de um único tipo de pólen, em quantidades superiores a 45% do teor total de pólen (Estevinho et al., 2012; Gomes et al., 2010).

O mel cru e não processado não é um produto estéril. Os microrganismos que sobrevivem no mel são aqueles capazes de suportar o pH baixo (ácido), açúcares concentrados e outras características antimicrobianas do mel (Estevinho et al., 2012). Os principais contaminantes microbianos incluem leveduras, bolores, bem como os esporos de *Clostridium spp*. e *Bacillus spp*, sendo a sua contagem indicativa da qualidade comercial e segurança dos méis. As principais fontes de contaminação microbiana do mel incluem o próprio pólen, os aparelhos digestivos de abelhas, poeira, ar, solo e néctar que são um pouco difíceis de eliminar. Incluem também fontes devido à manipulação e processamento do mel, que são mais fáceis de controlar e eliminar através da aplicação de boas práticas de fabricação (Gomes et al., 2010), e por fim, o mel pode ser submetido a radiação gama para esterilização caso o mel tenha destino aplicação terapêutica como é o caso do mel de Manuka.

Henriques et al., (2005) foi o primeiro estudo pioneiro com mel Português cru e não processado para avaliar atividade antimicrobiana do peróxido de hidrogênio e a atividade não dependente de peróxido de hidrogênio sobre *Staphylococcus aureus* e concluíram que o mel português tem um efeito antimicrobiano promissor.

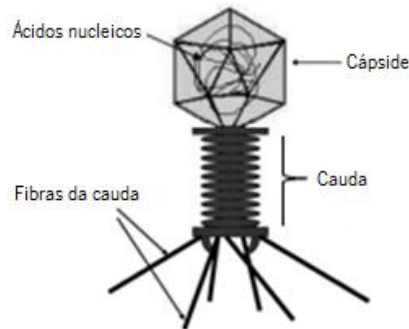
## 1.4 Bacteriófagos (fagos)

### 1.4.1 Definição e estrutura

Os bacteriófagos (fagos) foram descobertos há mais de 100 anos, e desde então têm sido usados como agentes antimicrobianos em humanos em vários países como a Geórgia, Polónia e Rússia (Kutateladze et al., 2010). Os fagos foram descobertos pelo britânico Frederick Twort em 1915, no entanto foi o franco-canadiano Felix d'Herelle que em 1917 propôs o seu uso como agente antimicrobiano (Carlton, 1999; Duckworth, 1976; Sulakvelidze et al., 2001). Estima-se que existe um total de  $10^{31}$  fagos na terra tornando-se a entidade orgânica mais abundante do planeta (Whitman et al., 1998). Sendo de uma diversidade incrível e de uma vasta gama de formas, tamanhos, simetrias e estruturas da cápside. Os seus genomas podem ser de DNA ou de RNA, de cadeia simples (ss - do inglês *single stranded*) ou de cadeia dupla (ds - do inglês *double stranded*). Os fagos são classificados pela ICTV (do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*) que organiza os fagos em diferentes famílias e ordens. A classificação do ICTV é baseada principalmente na análise morfológica, tipo de ácido nucleico e organismo hospedeiro. No entanto, outras propriedades são consideradas regularmente pelo ICTV, tais como: características físico-químicas, valor biológico, quantidade de proteínas e tamanho. Assim existe três famílias principais que pertencem a ordem *Caudovirales*, são eles: *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae* (Drulis-Kawa et al., 2012; Yan, Mao, & Xie, 2014).

Estes vírus são agentes infecciosos bacterianos naturais, com atividade antibacteriana muito específica, sendo que a sua proliferação leva à destruição das bactérias hospedeiras. Além disso, eles são abundantes em todos os ambientes e têm capacidade para atacar apenas as bactérias hospedeiras sem afetar a microflora comensal, sendo também inofensivos para as células de mamífero (Hanlon, 2007; Kutateladze et al., 2010). Os fagos são facilmente manipulados geneticamente para melhorar o seu desempenho de acordo com o nosso objetivo. Assim, o potencial para o controlo de doenças infecciosas e microrganismos multirresistentes é uma ferramenta que pode ainda ser melhorada (Golkar et al., 2014).

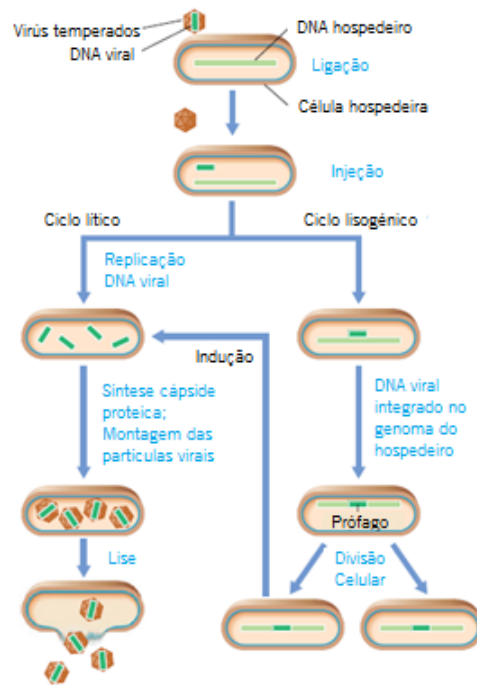
Os fagos pertencentes a ordem *Caudovirales* têm uma estrutura simples, mas robusta (**Figura 3**), que consiste em uma cápside de proteínas ou cabeça, normalmente icosaédrica. Esta cápside, contém e protege o genoma viral. A cauda pode ou não ser uma estrutura contráctil. Em alguns casos, seis fibras de cauda estão ligadas, contendo recetores específicos que reconhecem locais de ligação específicos na superfície das células bacterianas hospedeiras (Hanlon, 2007).



**Figura 3:** Representação típica da estrutura de um bacteriófago (adaptado Hanlon, 2007).

#### 1.4.2 Ciclo de vida

Os fagos podem ter dois ciclos de vida, lítico ou lisogénico representados na **Figura 4**. Um ciclo de vida, lítico, que resulta na lise da parede da celular hospedeira, leva à destruição das bactérias e à libertação de novas partículas virais. Em relação ao ciclo de vida lisogénico, o DNA viral é incorporado no genoma das células hospedeiras ou em plasmídeos (tal como um profago) ficando num estado de repouso. Os profagos são propagados para as gerações bacterianas seguintes através da divisão celular e sem causar lise. No entanto, sob condições de *stress* que comprometam o hospedeiro, como mudanças bruscas de temperatura, salinidade ou presença de antibióticos em concentrações sub-clínicas, os profagos podem desencadear o ciclo lítico, excisando-se do genoma bacteriano e induzindo a expressão de todo o seu genoma de forma a produzir novas partículas virais, usando a maquinaria celular do hospedeiro. O conhecimento da fisiologia de cada fago destina-se a ser utilizado numa eventual terapia fágica sendo determinante esse estudo para evitar eventualmente uma utilização abusiva de fagos. Assim fagos temperados (fagos não virulentos que são capazes de se integrar no genoma bacteriano com ciclo lisogénico) não devem ser utilizados em terapia. De facto, além de nem sempre causarem a destruição das bactérias hospedeiras podem também ser responsáveis pela transmissão horizontal de genes virulentos entre bactérias (por exemplo, toxinas ou proteínas que aumentem a toxicidade ou genes de resistência a antibióticos) (Hanlon, 2007; Lenski, 1988; Sulakvelidze et al., 2001).



**Figura 4:** As consequências da infecção por um bacteriófago. As alternativas após infecção são replicação e libertação de partículas virais maduras (conduzindo à lise) ou lisogenia, muitas vezes através da integração do DNA vírico no DNA do hospedeiro, caso dos profagos. A lise pode ser estimulada por condições de *stress* induzidas para produzir vírus maduros, levando à lise da célula hospedeira (adaptado Madigan et al., 2011).

#### 1.4.3 Vantagens e desvantagens

Os fagos também têm várias vantagens e diferenças quando comparados aos antibióticos. As preparações de fagos são rápidas e facilmente produzidas, fáceis de aplicar e não mostraram, até agora, qualquer reação adversa aparente nos ensaios de terapia fágica em humanos (Babalova et al., 1968; Chanishvili, 2012; Kutateladze et al., 2010; Slopek et al., 1983a, 1983b; Slopek et al., 1984). A gama de hospedeiros fágicos é mais seletiva do que a dos antibióticos, porque a maioria dos fagos são específicos para as espécies bacterianas hospedeiras patogênicas alvo, enquanto os antibióticos de largo espectro destroem todas as células bacterianas não resistentes, independentemente do facto de serem ou não patogênicas. O uso indiscriminado de antibióticos pode afetar a fisiologia do corpo humano, mostrando efeitos secundários graves, tais como a eliminação da flora bacteriana comensal, toxicidade celular como hepatotoxicidade, que leva à dificuldade na metabolização e consequente eliminação desses fármacos, etc. Ao contrário dos fagos que, na presença do hospedeiro continuam a proliferar (auto-replicação), a concentração de antibiótico no organismo humano começa a diminuir após a sua administração. Por essa razão, uma única dose de fago pode ser o suficiente para um tratamento eficaz (não havendo necessidade de levar a cabo administrações periódicas) (Alisky et al, 1998; Hanlon, 2007). Juntamente com estas vantagens, o desenvolvimento de resistências à terapia fágica pode ser superado



com a utilização de cocktails de fagos (preparações contendo vários tipos de fagos que permitam o combate de múltiplas espécies ou vários fagos seletivos para uma mesma espécie).

No entanto, existem também algumas desvantagens em relação aos fagos, tais como a possibilidade de despoletarem uma resposta imunitária no organismo Humano, o que pode diminuir a sua eficácia numa aplicação futura pela segregação de anticorpos, a falta da legislação sobre a utilização da terapia fágica ou a sensibilidade dos fagos ao pH baixo (Drulis-Kawa et al., 2012; Jończyk et al., 2011; Loc-Carrillo et al., 2011). A sua alta especificidade poderá em certos casos ser vista como desvantajosa, uma vez que, cada fago apenas afeta o seu hospedeiro, não possuindo um largo espectro como os antibióticos.

#### 1.4.4 Enzimas codificadas pelos fagos

A terapia fágica pode em muitos casos ser combinada com antibióticos para a otimização dos seus efeitos contra as bactérias, atuando sinergicamente (Golkar et al., 2014; Ho, 2001).

Além disso, ainda é possível utilizar, em vez da totalidade do fago, as enzimas líticas produzidas durante a proliferação destes que têm os mesmos efeitos. Na verdade, os fagos produzem várias enzimas líticas (hidrolases) chamadas endolisinas, que atuam na degradação do peptidoglicano da parede celular bacteriana (Adhya et al., 2014; Brovko et al., 2012; Endersen et al., 2014). Estas enzimas são sintetizadas no final do ciclo de vida lítico do fago causando lise das células hospedeiras de dentro para fora permitindo libertar as novas partículas virais (Adhya et al., 2014; Brovko et al., 2012; Endersen et al., 2014). As endolisinas fágicas têm sido altamente eficazes contra bactérias Gram positivas, quando adicionadas externamente, e quando testadas *in vitro* conduziram a uma rápida destruição bacteriana (Adhya et al., 2014; Brovko et al., 2012; Nelson et al., 2001; Nobrega et al., 2015).

## 1.5 Objetivo

O objetivo deste estudo é determinar o efeito antimicrobiano da combinação de mel Português e fagos no tratamento de hospedeiros presentes em feridas crônicas. Para isso, um número de diferentes tipos, fontes e preparações dos méis portugueses não transformados, bem como fagos já caracterizados pelo grupo BBiG (Pires et al., 2015; Andrade 2014) serão testadas contra bactérias plantónicas e em biofilmes de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, individualmente e em combinação. O efeito do mel na viabilidade do fago será avaliado também.

A possibilidade de utilizar o mel e os bacteriófagos sinergicamente pode ter potencial para controlar, prevenir e tratar infecções por bactérias multirresistentes e, além disso, até à data não há nenhum estudo sobre esta terapia combinada.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem de méis

Neste estudo, foram testadas 13 amostras de mel produzidas em Portugal e uma amostra de mel Manuka (MEDIHONEY® - 100% Medical Honey cedida pela Dra Rose Cooper - Cardiff Metropolitan University, Reino Unido). As amostras de mel português foram cedidas por apicultores regionais e recolhidas de diferentes áreas geográficas. Todos os méis foram cedidos na sua forma crua, não transformada nem processada e foram armazenados à temperatura ambiente. A origem floral foi apenas reportada pelos apicultores para os méis: rosmaninho, urze, cerejeira, castanheiro e eucalipto, dessa forma os restantes méis foram considerados de origem indefinida e multifloral como representado na

#### Tabela 1.

Tabela 1: Lista de méis

Mel	Origem Floral	Data de recolha
Castanheiro	Castanheiro	2015
Cerejeira	Cerejeira	2014
Eucalipto 1	Eucalipto	2015
Eucalipto 2	Eucalipto	2015
Multifloral JPC1	Multifloral	2015
Multifloral JPC2	Multifloral	2015
Manuka	<i>Leptospermum scoparium</i>	Comercial
Multifloral RO	Multifloral	2015
Rosmaninho 1	Rosmaninho	2014
Rosmaninho 2	Rosmaninho	2015
Rosmaninho 3	Rosmaninho	2015
Urze 1	Urze	2014
Urze 2	Urze	2015

## 2.2 Caracterização físico-química do mel

A concentração de 50% de mel foi obtida diluindo-se uma determinada massa de mel no mesmo volume de diluente. Para concentração de 25% de mel, utilizou-se o mel a 50% e de seguida realizou-se uma diluição 1:2.

### 2.2.1 Determinação do pH

O pH do mel foi determinado seguindo o método descrito pela *International Honey Commission* (Bogdanov et al., 2002). Foram usadas 5 g de cada mel, previamente equilibrados a 20 °C durante 24 h, e posteriormente dissolvidos com auxílio do vortex em 5 mL de água (também equilibrada simultaneamente) de modo a obter uma solução 50% de mel, o pH da solução final foi medido no pH neutro Hanna instruments HI 2210.

Devido à capacidade do mel acidificar o meio quando diluído foram realizadas diluições sucessivas de méis de forma a se obterem as percentagens utilizadas nos ensaios das CMI (**secção 2.4.1**). O pH dessas soluções foi medido para verificar se ocorreria alguma mudança significativa no pH. Assim fizeram-se as diluições de mel em água esterilizada para se obter as percentagens de mel correspondentes às CMI de 25%-12.5% para além do pH já obtido a 50%. Assim as diluições de 50% de mel foram feitas num tudo de 1.5 mL e as restantes foram realizadas em diluições sucessivas numa microplaca de 96 poços onde já existia 100 µL de água estéril e se carregou com 100 µL da solução de mel concentrada anterior. O pH foi determinado usando tiras de papel indicadoras de pH.

### 2.2.2 Determinação da cor

A cor de todas as amostras de mel foi determinada por densidade óptica (DO) medindo a 560 nm (BioTek – Synergy) a absorvância das soluções de 50% de mel de acordo com a recomendação da *National Honey Board*. A absorvância foi multiplicada por 2, para obter o valor de absorvância total da solução sem diluição. Os méis foram categorizados de acordo com os padrões já estabelecidos pelo Departamento de Agricultura dos E.U.A (**Tabela 2**) (United States Department of Agriculture, 1985).

**Tabela 2:** Designação da cor do extrato de mel de acordo Departamento de Agricultura dos E.U.A.

USDA Designação dos padrões de cor	Densidade óptica
Water white	0.0945
Extra white	0.189
White	0.378
Extra Ligth Amber	0.595
Ligth Amber	1.389
Amber	3.008
Dark Amber	>3.008

### 2.2.3 Determinação do conteúdo proteico

O conteúdo de proteína total foi determinado por colorimetria utilizando o *Kit BCA Protein Assay* (Pierce), compatível com detergentes e que funciona à base de BCA (do inglês *bicinchoninic acid*). A quelatação de duas moléculas de BCA com um íon cuproso, produz um complexo de cor púrpura solúvel em água, que exibe uma forte absorvância a 562 nm. Essa absorvância é quase linear com concentrações crescentes de proteína. A albumina de soro bovino (BSA), foi usada como referência na determinação de padrões de concentração proteicos, nomeadamente de 0-2 mg.mL<sup>-1</sup>. As amostras analisadas – soluções de 50% de mel foram preparadas em água desionizada, assim como as respetivas diluições (1:100, 1:500, 1:700, 1:1000). O protocolo foi desempenhado de acordo com as instruções do fabricante. O procedimento foi efetuado em microplaca por requer um menor volume de amostra de proteína (10-25 µL) e proporcionar um fácil manuseamento. A absorvância foi lida a 562 nm (Synergy HT – BioTek). Através da equação da reta padrão de BSA obtida (**Equação 1- Anexo I**) determinou-se a concentração de proteínas nas amostras de mel. Cada uma das amostras foi medida em triplicado.

**Equação 1:** Curva padrão de BSA: Absorvância 562 nm = 1.30 (± 0.09) [Proteína mg.mL<sup>-1</sup>] + 0.17 (± 0.08)

### 2.2.4 Determinação da concentração de hidroximetilfurfural (HMF)

O hidroximetilfurfural (HMF) do mel foi determinado utilizando o método descrito por White, (1979). Amostras de 0.5 g de cada mel foram pesadas em tubos de 50 mL, adicionando-se de seguida 12.5 mL de água e 250 µL de Solução I de Carrez (150 mg.mL<sup>-1</sup> de ferrocianeto de potássio) a cada tubo. A solução foi homogeneizada e 250 µL de solução de Carrez II (300 mg.mL<sup>-1</sup> de acetato de zinco) foram adicionados a cada um dos tubos de 50 mL, perfazendo com água até um volume final de 25 mL. Esta solução foi homogeneizada e filtrada com filtros PES 0.2 µM. Recolheram-se 2.5 mL de cada amostra de mel para dois novos tubos de 15 mL, A (amostra) e B (branco). Posteriormente adicionou 2.5 mL de água ao tubo A, e 2.5 mL de 0.2% (m/v) de bissulfito de sódio (substância que decompõe o

HMF) ao tubo B. As soluções foram bem misturadas e a absorvância lida em triplicado a 284 e 336 nm (espectrofotômetro UV-3100PC VWR). A absorvância a 284 nm corresponde a amostra com água e a absorvância a 336 nm corresponde ao branco com bissulfito de sódio 0.2% (m/v). O HMF foi calculado usando a **Equação 2**:

$$\text{Equação 2: HMF (mg.Kg}^{-1}\text{ mel)} = (A_{284}-A_{336}) \times 149.7 \times 5 / \text{ massa da amostra (g)}$$

#### 2.2.5 Determinação do conteúdo metilglioxal (MGO) por RP-HPLC

A determinação do MGO, presente no mel foi adaptada de Adams et al., (2008) e efetuada por cromatografia líquida de alta pressão por fase reversa (RP – HPLC, *Reverse Phase – High Pressure Liquid Chromatography* - Shimadzu), numa coluna C18 (Merck®, USA), através da quantificação das quinoxalinas resultantes da derivação desse composto com OPD (do inglês *O-phenylenediamine*).

Numa fase inicial efetuou-se, o passo de derivatização onde o MGO e a DHA reagiram com o OPD formando os respetivos derivados. Para isso, o mel (0.6 g) foi dissolvido em água ultra pura a 30% (m/v). A solução de mel foi misturada com 750 µl de solução OPD 2% (m/v) em tampão fosfato 0.5 M a pH 6.5 durante 16 h. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente no escuro e filtradas (0.22 µm). Para o método de RP-HPLC, a fase móvel utilizada foi de 0.075% (v/v) de ácido acético em água (solvente A) e 80% (v/v) de metanol em água (solvente B) numa proporção de 50:50. A fase móvel começou com um gradiente de 10% de solvente B durante 4 min e depois elevou-se gradualmente até 100% de B ao longo de 31 min, e mantendo-se depois por 3 min tempo após o qual, a concentração foi novamente alterada para 10% de B por 6 min. O fluxo foi de 0.3 mL.min<sup>-1</sup>, a separação foi realizada a 30 °C, o volume de injeção de solução de amostra foi de 20 µl e os picos foram detetados através da medição da absorvância de UV a 312 nm. O MGO foi eluído por volta dos 21 min (e DHA perto dos 13 min). A concentração de MGO foi determinada através da reta de calibração obtida a partir da solução padrão de MGO com 35%-40% (m/v) de pureza, na seguinte gama de concentrações: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 mg.kg<sup>-1</sup> (**Anexo II**).

## 2.3 Meios de cultura bacterianos e condições de crescimento

As estirpes bacterianas utilizadas neste estudo encontram-se listadas na **Tabela 3**. O meio de cultura líquido usado foi TSB (do inglês *Tryptic soy broth* - VWR), enquanto os meios de cultura sólidos usados foram o TSA (do inglês *Tryptic soy agar*), ou seja TSB suplementado com 1.2% (m/v) de agar (Kasvi - Liofilchem), bem como *MacConkey agar* (Merck-chemicals) e PIA (do inglês *Pseudomonas Isolation Agar* - Sigma Aldrich) sendo estes dois últimos meios seletivos usados na contagem de células viáveis (CFU) de *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) respetivamente.

**Tabela 3:** As estirpes bacterianas utilizadas como hospedeiro.

Espécie	Referência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 22644
<i>Escherichia coli</i>	CECT 434

Todas as bactérias utilizadas estavam armazenadas a -80 °C, em TSB com 15% de glicerol. As condições de incubação em meio sólido foram a 37 °C durante cerca de 16 h. Para a preparação de inóculos, uma colónia isolada de cada bactéria foi suspensa em 10 mL de TSB em tubos de 50 mL, e a suspensão resultante incubada durante 16 h a 37 °C com agitação 120 rpm.

## 2.4 Avaliação das propriedades antimicrobianas do mel

### 2.4.1 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A atividade antimicrobiana foi determinada através da determinação da CMI de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Andrews, 2003). Em resumo, realizou-se um inóculo de *P. aeruginosa* ou *E. coli* em TSB, por incubação durante 16 h a 37 °C com agitação de 120 rpm. A respetiva DO620 nm foi ajustada para 0.13 (aproximadamente  $3 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>) sendo de seguida feita uma diluição de 1:30 em TSB. As CMI para vários tipos de mel em estudo foram determinadas utilizando um volume final de 100 µL numa microplaca de 96 poços e uma gama de concentrações de mel de 50% até 0%, com diluições sucessivas de fator 2. As placas foram incubadas a 37 °C durante 20 h. Os ensaios foram realizados cinco vezes e cada um em triplicado. As leituras das CMI foram avaliadas por observação visual, tendo-se considerado a CMI a que provocou ausência de turbidez na suspensão do poço. Estes resultados foram confirmadas por espectrofotometria DO620 nm (Synergy HT – BioTek). A média e os desvios padrões das CMI foram calculados.

#### 2.4.2 Avaliação do efeito anti biofilme do mel e capacidade de degradação de biofilme

O efeito antimicrobiano em biofilmes bacterianos foi avaliado determinando a concentração de células vivas em CFU.mL<sup>-1</sup>. Este método foi adaptado do protocolo para avaliação das MBECs (do inglês *Minimal biofilm eradication concentration*) (Innovotech Inc., 1996). Assim como anteriormente, os inóculos para *P. aeruginosa* e *E. coli*, com DO620≈0.13 foram diluídos 1:10. Os biofilmes foram formados em microplacas de 96 poços com 200 µL e incubados durante 24 h a 37 °C com agitação de 120 rpm. Após 24 h, repetiu-se 3 vezes a lavagem dos poços com TSB fresco, de modo a remover as células não aderidas. Para preparar as soluções de mel a testar, 25% e 50%, este foi diluído em TSB e tampão SM numa proporção 1:1 (este diluente foi otimizado de forma a uniformizar os procedimentos com os testes seguintes, em que se usou fago). O mel foi adicionado aos poços após lavagem e re-incubados pelos períodos de tempo a testar: 0, 6 12, 19 e 24 h. Para quantificar as células do biofilme em cada período de tempo, numa primeira fase as células plânticas foram retiradas através de 3 lavagens sucessivas com NaCl 0.9% sendo depois raspadas do fundo e das paredes do poço da microplaca. Recolhida a biomassa em NaCl 0.9% procedeu-se às diluições sucessivas em solução de virucida FAS 1mM (secção 2.6.1) (solução usada para ajustar o método aquando da utilização de fagos) determinando-se a concentração, os CFU.mL<sup>-1</sup>, pela técnica da “lágrima”, dispensando-se uma gota de 10 µL de cada diluição sobre a placa de meio, e deixando-se escorrer na vertical. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 16 h.

#### 2.5 Produção, purificação e quantificação de bacteriófagos

Para a produção e quantificação de bacteriófagos (fagos) para além de placas com TSA 1.2% (m/v) agar, utilizou-se uma camada superior de agar com TSA 0.6% (m/v) que se denominará *top agar*. Os fagos produzidos foram obtidos da coleção do Centro de Engenharia Biológica (CEB), e encontram-se referidos na **Tabela 4**, juntamente com os respetivos hospedeiros.

O procedimento de produção de fagos, consistiu inicialmente, em misturar 100 µL do hospedeiro bacteriano na fase exponencial (DO620≈0.6) com 3 mL de *top agar* (proporção 1:30), e verter sobre as placas de TSA para a formação de “tapetes” bacterianos do que se denominarão de *lawns* bacterianos. De seguida espalhou-se 5 µL de fago na camada de *top agar* contendo o *lawn* do hospedeiro, com a ajuda de uma pinça e tiras de papel estéreis. Após uma incubação durante 16 h a 37 °C, a cada placa foram adicionados 3-5 mL de tampão SM (5.8 g.L<sup>-1</sup> de NaCl - NZYtech, 2 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - VWR, 50 mL.L<sup>-1</sup> 1 M tris-HCl pH 7.5) e novamente incubadas a 4 °C com agitação de 50 rpm durante pelo menos



3 h. Posteriormente, procedeu-se à purificação e concentração do lisado assim obtido. Todo o líquido existente em cada placa foi recolhido para um *erlenmeyer* de 250 mL ao qual foi adicionado NaCl (0.6 g por cada 10 mL de líquido decantado) incubando 1 h a 4 °C. De seguida adicionou-se PEG 6000 (Acros Organics) (1 g por cada 10 mL de líquido decantado) deixando durante 16 h a 4 °C. Após esse período efetuou-se uma centrifugação da suspensão a 9000 ×g, a 4 °C por 10 min, para se obter um *pellet* com fagos. O *pellet* foi suspenso num pequeno volume de tampão SM (3 mL para permitir a concentração do fago). À suspensão resultante foi adicionada clorofórmio na proporção 1:4. Após misturar bem, realizou-se uma centrifugação de 3500 ×g, a 4 °C por 15 min, formando-se duas fases, tendo-se recolhido cuidadosamente a fase superior (aquosa), que continha os fagos rejeitando-se a de baixo (fase orgânica), com detritos celulares. De seguida, a fase aquosa foi filtrada com filtros 0.2 µm PES e armazenada a 4 °C.

**Tabela 4:** Bacteriófagos usados e respetivos hospedeiros.

Bacteriófago	Nome no neste documento	Hospedeiro bacteriano	Origem	Taxonomia (Familia)
vB_EcoS_CEB_EC3a	EC3a	<i>Escherichia coli</i>	Isolado clinico	<i>Siphoviridae</i>
vB_PaeM_CEB_DP1	P1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 22644	Efluente hospitalar	<i>Myoviridae</i>
vB_PaeM_EPA3	EPA3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 22644	Efluente fluvial	<i>Myoviridae</i>
vB_PaeP_EPA4	EPA4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 22644	Efluente fluvial	<i>Podoviridae</i>

Para a determinação da concentração dos fagos produzidos foram realizadas diluições sucessivas e usado 100 µL de cada diluição. A este volume adicionou-se 100 µL de hospedeiro bacteriano na fase exponencial (DO620≈0.6) e seguidamente 3 mL de *top agar* (proporção 1:1:30), esta mistura foi vertida sobre a placa de TSA e deixada a secar antes de incubar. A concentração foi também determinada usando a técnica da “lágrima”, em que após a formação do *lawn* de hospedeiro como descrito anteriormente, se dispensou uma gota de 10 µL de cada diluição de fagos e se deixa escorrer pela superfície. As placas foram incubadas durante 16 h a 37 °C período após o qual foram contadas os PFU (do inglês *plaque forming units*).

## 2.6 Efeito anti biofilme dos bacteriófagos

### 2.6.1 Otimização da concentração de virucida

De forma a garantir que a determinação do número de células viáveis presentes nos biofilmes não é afetada por fagos que possam ficar aderidos ao biofilme (matriz e bactérias) mesmo após as lavagens, o que resultaria numa contagem imprecisa e por defeito, foi utilizado um sal com ação virucida - o sal FAS (do inglês *ferrous ammonium sulfate* - Applichem Panreac) como descrito em Alves et al., (2015); McNerney et al., (1998); Park et al., (2003) com algumas otimizações. O objetivo foi encontrar a concentração mínima de FAS capaz de inibir a ação dos fagos sem afetar a bactéria hospedeira. O virucida é suplementado numa solução de NaCl 0.9% permitindo fazes diluições sucessivas. Numa primeira fase colocou-se os fagos em contacto com as seguintes concentrações de FAS: 5 mM, 2.5 mM, 2 mM e 1 mM. De seguida testou-se a mínima concentração que inibiu os fagos nas duas bactérias em estudo *P. aeruginosa* e *E. coli*. Em ambos os casos a determinação dos PFU.mL<sup>-1</sup> e os CFU.mL<sup>-1</sup> recorreu-se a técnica da “lágrima” sendo feito primeiro um *lawn* bacteriano para os fagos.

### 2.6.2 Avaliação do efeito anti biofilme dos fagos e capacidade de degradação de biofilme

Para avaliar a ação do fago em biofilme, o procedimento efetuado para a formação de biofilme de 24 h foi o mesmo descrito anteriormente, bem como os intervalos de tempo de incubação analisados. A concentração de fagos (P1 ou EC3a), utilizada foi de 2×10<sup>9</sup> PFU.mL<sup>-1</sup>. Após lavagem do biofilme (3 vezes com TSB), foi adicionado em cada poço 100 µL de fago suspenso em tampão SM e 100 µL de TSB. Incubou-se a placa a 37°C com agitação 120 rpm. Nos poços usados para controlo adicionou-se 100 µL de tampão SM e 100 µL de TSB. A concentração de bactéria foi determinada com a técnica da “lágrima”, as diluições sucessivas foram efetuadas com NaCl 0.9% suplementado com FAS 1mM. A MOI (do inglês *Multiplicity of infection*) utilizada em cada ensaio foi obtida após o cálculo da proporção entre fago e hospedeiro no biofilme, de acordo com a **Equação 3**.

$$\text{Equação 3: } MOI = \frac{[Fagos] \text{ PFU.mL}^{-1}}{[Hospedeiro] \text{ CFU.mL}^{-1}}$$

## 2.7 Efeito anti biofilme dos bacteriófagos e mel

### 2.7.1 Avaliação da viabilidade de fagos em mel

A viabilidade dos fagos EC3a, P1, EPA3 e EPA4 foram testadas com méis que revelaram um efeito antimicrobiano promissor, determinado pelas CMI's caso do JPC2, e um conteúdo elevado de MGO, caso dos méis de Urze 1, Urze 2 e Manuka. A concentração de fagos usado foi de  $2 \times 10^8$  PFU.mL<sup>-1</sup> e a de mel variou entre 50% e 25%. Para se obter a diluição de mel a 50%, o mel foi diluído diretamente na suspensão de fagos em tampão SM, no caso de 25%, o mel a 50% foi diluído em água estéril e adicionado a suspensão de fagos num volume final de 0.5 mL. A incubação ocorreu na estufa com 37 °C, tendo-se retirado amostras em triplicado às 0, 6, 12 e 24 h. Em seguida determinou-se a concentração de fago (PFU.mL<sup>-1</sup>) que ainda era viável ao longo do tempo, por diluições sucessivas em placas de 96 poços com tampão SM, plaqueando pela técnica da “lágrima” as respectivas diluições em *lawns* bacterianos do respetivo hospedeiro como descrito anteriormente.

### 2.7.2 Avaliação do efeito anti biofilme da combinação entre fagos e mel na capacidade de degradação de biofilme

O teste da combinação de ambos os componentes antimicrobianos, mel 50% e 25% com fago EC3a para *E. coli* e P1 para *P. aeruginosa* foi feito com um procedimento muito semelhante aos descritos para cada um individualmente, quer na formação de biofilme, quer na sua quantificação depois do tratamento. Foram feitas as seguintes adaptações: para atingir a concentração final de 50% de mel este foi previamente diluído numa concentração de 55% de mel, de forma a obter a concentração final após a adição de fago.

No caso da concentração final de 25% de mel, preparava-se uma solução de mel a 50% e esta de seguida era diluída 1:2 numa suspensão de fagos em tampão SM. A concentração final de fago em ambos os tratamentos foi de  $1 \times 10^9$  PFU.mL<sup>-1</sup>.

## 2.8 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada usando o *software* GraphPad Prism 5. Foram usados os conjuntos de valores obtidos de cada ensaio independente para a mesma condição, sendo os gráficos dos resultados apresentados como as médias obtidas ( $\pm$  o desvio padrão). Os resultados foram comparados por análise de variância *One-way* ANOVA e *Two-Away* ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. As diferenças entre as condições foram consideradas estatisticamente significativas quando *p-value* < 0.01.

### 3. RESULTADOS

Todos os parâmetros obtidos das diferentes análises físico-químicas realizadas aos méis estão resumidos na **Tabela 5**.

**Tabela 5:** Parâmetros físico - químicos dos vários méis e respectivas CMI para *P. aeruginosa* (PA) e *E. coli* (EC).

Mel	pH	Cor	[Proteína] mg.g <sup>-1</sup>	HMF mg.kg <sup>-1</sup>	MGO mg.kg <sup>-1</sup>	CMI PA	CMI EC
Rosmaninho 1	3.9	<i>Extra White</i>	49.2 ± 2.3	191.6 ± 6.4	31.5 ± 3.3	25% ± 0	25% ± 0
Rosmaninho 2	3.3	<i>Extra White</i>	8.9 ± 3.8	73.4 ± 0.0	32.1 ± 1.5	25% ± 0	25% ± 0
Multifloral RO	4.4	<i>Extra Ligth Amber</i>	45.6 ± 4.9	45.7 ± 7.4	39.5 ± 7.8	25% ± 0	12.5% ± 0
Castanheiro	4.6	<i>Extra Ligth Amber</i>	19.1 ± 4.3	73.4 ± 2.1	47.5 ± 8.3	25% ± 0	25% ± 0
Eucalipto 2	4.2	<i>Extra White</i>	25.7 ± 5.5	65.9 ± 4.2	77.8 ± 10.4	25% ± 0	25% ± 0
Cerejeira	4.4	<i>White</i>	55.9 ± 5.4	50.1 ± 1.1	123.9 ± 2.9	25% ± 0	25% ± 0
Eucalipto 1	3.7	<i>White</i>	31.5 ± 4.9	77.1 ± 1.1	135.4 ± 17.0	12.5% ± 0	12.5% ± 0
Rosmaninho 3	3.6	<i>White</i>	56.5 ± 8.6	115.3 ± 6.4	155.4 ± 1.3	25% ± 0	25% ± 0
Multifloral JPC1	3.2	<i>Extra White</i>	24.2 ± 4.0	77.1 ± 5.3	184.2 ± 12.0	25% ± 0	25% ± 0
Multifloral JPC2	4.1	<i>White</i>	16.6 ± 7.8	47.9 ± 2.1	316.6 ± 20.9	12.5% ± 0	12.5% ± 0
Manuka	3.5	<i>Ligth Amber</i>	60.9 ± 2.2	189.4 ± 1.1	756.5 ± 15.1	25% ± 0	12.5% ± 0
Urze 1	4.1	<i>Ligth Amber</i>	75.3 ± 5.2	745.5 ± 2.1	989.0 ± 130.6	25% ± 0	25% ± 0
Urze2	4.3	<i>Extra Ligth Amber</i>	10.8 ± 7.3	151.9 ± 5.3	1266.4 ± 19.0	25% ± 0	25% ± 0

#### 3.1 Determinação do pH

Os valores de pH obtidos encontram-se dentro da gama de pH previamente esperados para méis (pH 3 a 5.5) (Bogdanov et al., 2004). Deste modo, o mel mais ácido corresponde ao mel JPC1 com um pH de 3.2 e por oposição o mel menos ácido é o mel de Castanheiro com pH de 4.6, pH característico deste tipo de mel (Oddo et al., 2004).

Relativamente à medição do pH das soluções de mel diluídas, concentrações estas utilizadas nos ensaios de determinação das CMI, na **Tabela 6** observa-se que os valores de pH se mantêm constantes.

**Tabela 6:** Valores de pH obtidos nas respectivas concentrações de mel das CMI, dos vários méis.

Mel	CMI		
	50%	25%	12.5%
JPC1	3.2	3.5	-
Rosmaninho 2	3.3	3-3.5	-
Manuka	3.5	3-3.5	3.5
JPC2	3.6	3.5-4	3.5-4
Eucalipto 1	3.7	3.5-4	3.5-4
Rosmaninho 1	3.9	3.5	-
Urze 1	4.1	3.5-4	-
Cerejeira	4.4	4-4.5	-
RO	4.4	4-4.5	4-4.5
Castanheiro	4.6	4.5	-

### 3.2 Determinação da cor

A origem e os vários compostos endógenos que os méis possam ter resultaram numa variação da cor dos méis testados. Foram observadas quatro tonalidades, nomeadamente *Extra White*, *White*, *Extra Ligth Amber* e *Ligth Amber* que foram assim classificadas de acordo com a **Tabela 2** padronizada da USDA. A incidência das tonalidades *Extra White* e *White* predominam com 31% respetivamente. *Extra Ligth Amber* apresenta uma incidência menor (23%) e um menor número de méis tem a cor *Ligth Amber* com 15% de incidência.

### 3.3 Determinação do conteúdo proteico

Relativamente ao conteúdo proteico de cada mel calculado de acordo com a reta: Abs (562 nm) = 1.30 ( $\pm$  0.09) [Proteína (mg.mL<sup>-1</sup>)] + 0.17 ( $\pm$  0.08) ( $R^2=0.9977$ ), verificou-se que cada mel possui um conteúdo proteico próprio e individual que varia de acordo com as suas propriedades intrínsecas.

Assim o índice proteico varia numa gama entre 8.9 mg.g<sup>-1</sup> (mel Rosmaninho 2) até 75.3 mg.g<sup>-1</sup> (mel Urze 1).

### 3.4 Determinação da concentração de HMF

O conteúdo em HMF é frequentemente usado para avaliar a qualidade do mel, sendo este legislado com um valor máximo de 40 mg.kg<sup>-1</sup> (Portuguesa, 2003). Verifica-se que todos os méis testados possuem uma quantidade superior à legislada. Este parâmetro incide fundamentalmente na frescura do mel e nas suas possíveis alterações, pois quanto mais velho e processamentos sofrer maior será o conteúdo em HMF. As concentrações de HMF dos méis analisados variaram de 45.7 mg.kg<sup>-1</sup> até 745.5 mg.kg<sup>-1</sup>, caso do multifloral RO e Urze 1 respetivamente.

### 3.5 Determinação da concentração MGO

O conteúdo do composto MGO foi determinado para cada mel por RP-HPLC através da **Equação 4**: Área = (4268.4 x [MGO (mg.kg<sup>-1</sup>)] + 346.6 (R<sup>2</sup>= 0.9966).

A quantificação dos níveis de MGO nos méis evidenciou que existe uma grande discrepância entre os valores de MGO obtidos em méis com a mesma origem floral reportada e com aproximadamente o mesmo valor de HMF. A gama de valores de MGO varia entre 31.5 mg.kg<sup>-1</sup> e 1266.4 mg.kg<sup>-1</sup>, casos do mel Rosmaninho 1 e Urze 2 respetivamente.

### 3.6 Determinação da CMI

As CMI dos diferentes méis para *P. aeruginosa* e *E. coli* são apresentadas na **Tabela 7**. Da observação da tabela 7 pode constatar-se que a gama de CMIs para todos os méis testados se situou entre 25% e 12.5%. As CMI foram muito semelhantes em ambas as bactérias, contudo, verificou-se que para *E. coli* se obteve um maior número de amostras de mel com CMI de 12.5% (Manuka e Multifloral RO), mostrando ser mais sensível a este antimicrobiano. Em ambas as estirpes de bactérias testadas, o mel Eucalipto 1 e JPC2 obtiveram a mesma CMI de 12.5%. Com base nestes resultados selecionou-se para os subsequentes testes de avaliação da ação antimicrobiana em biofilmes, o mel JPC2, uma vez que, dos méis com CMI mais baixas (Eucalipto 1 e Multifloral JPC2) para ambas as bactérias em estudo, este foi o que apresentou um conteúdo de MGO superior.

**Tabela 7:** Valores de CMI obtidos em *P. aeruginosa* e *E. coli* para os diversos méis avaliados.

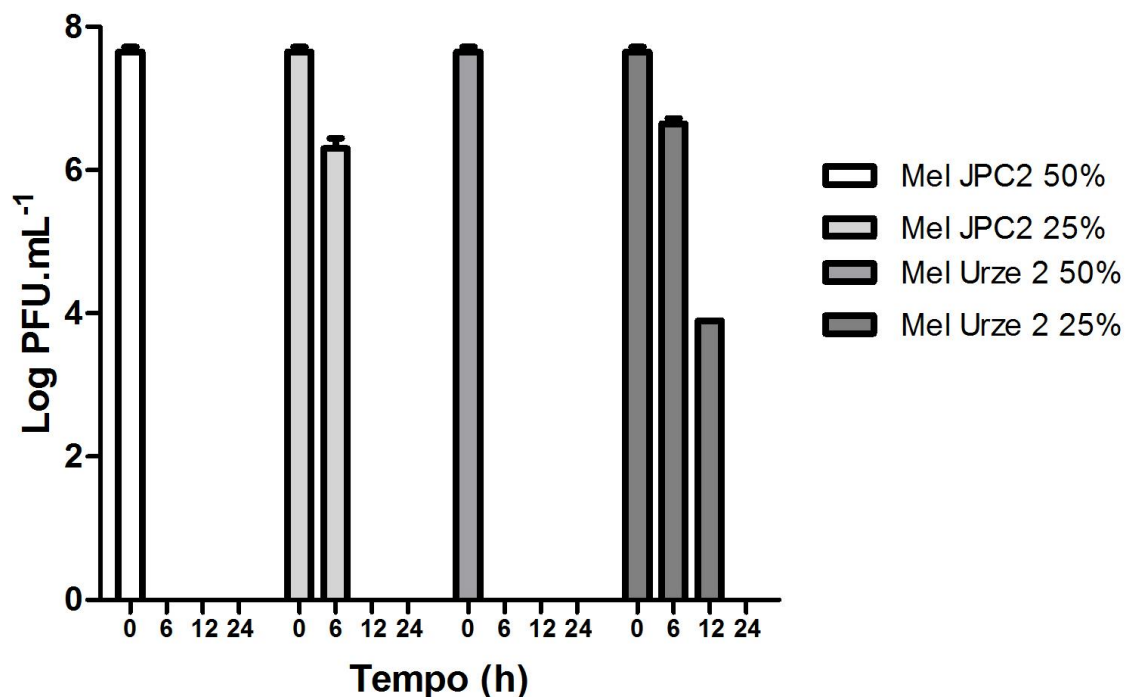
Mel	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Castanheiro	25%	25%
Cerejeira	25%	25%
Eucalipto 1	12.5%	12.5%
Eucalipto 2	25%	25%
Multifloral JPC1	25%	25%
Multifloral JPC2	12.5%	12.5%
Manuka	25%	12.5%
Multifloral RO	25%	12.5%
Rosmaninho 1	25%	25%
Rosmaninho 2	25%	25%
Rosmaninho 3	25%	25%
Urze 1	25%	25%
Urze 2	25%	25%

### 3.7 Monitorização da viabilidade dos fagos em mel

De modo a avaliar se o uso combinado de fagos com mel não inviabiliza a ação dos primeiros, realizou-se a monitorização da concentração dos fagos após suspensão em vários méis ao longo de 24 h (limite de deteção de 1000 PFU.mL<sup>-1</sup>), uma vez que o objetivo do trabalho prende-se com a avaliação do efeito combinado dos dois agentes antimicrobianos. Inicialmente, testou-se a viabilidade e estabilidade dos fagos EC3a e P1 em dois méis, o JPC2 por ter uma CMI bastante baixa e o Urze 2 por ser o mel português com o conteúdo de MGO mais elevado.

Da análise dos resultados obtidos (**Figura 5**), verificou-se que o fago EC3a perdeu a infetividade logo após 6 h de contacto com 50% dos méis JPC2 e Urze 2. Para a concentração de 25% dos mesmos méis, o fago foi inviabilizado ao final de 12 h de contacto com JPC2, e de 24 h com Urze 2. Neste último caso, contrariamente ao que aconteceu com o JPC2, às 12 h foram recuperados fagos na ordem dos 4 Log de PFU.mL<sup>-1</sup>



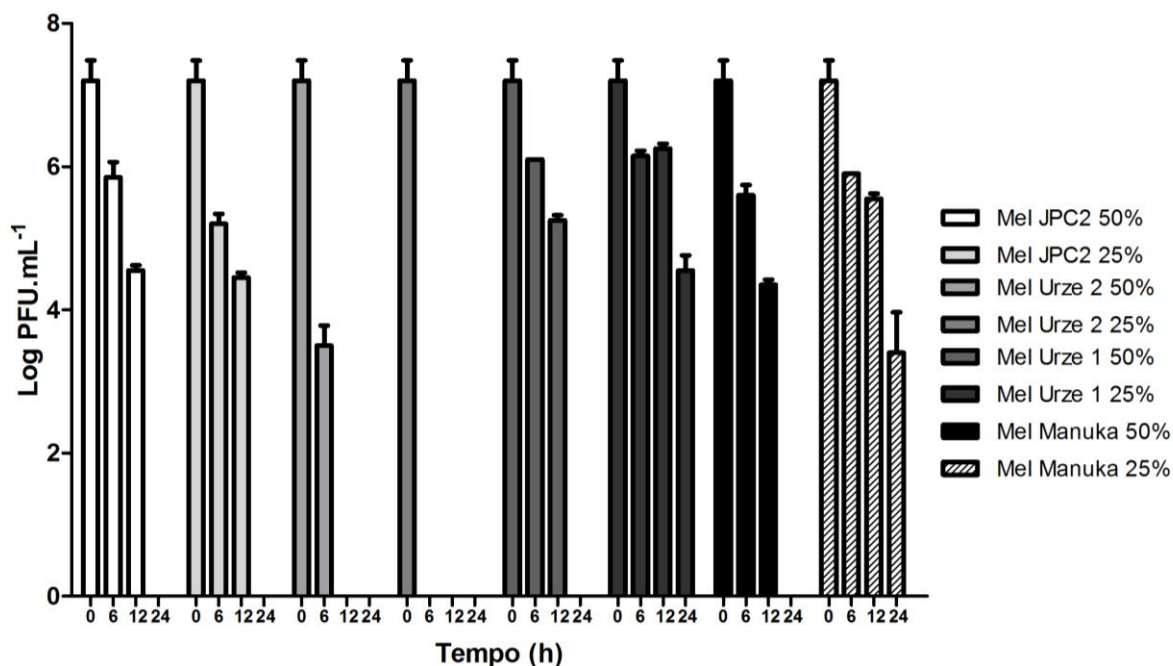


**Figura 5:** Monitorização da viabilidade do fago EC3a em mel: concentração (Log PFU.mL<sup>-1</sup>) de EC3a após suspensão em 25% e 50% de mel JPC2 e Urze 2. Os dados indicados em cada período de tempo (0, 6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. O limite de deteção do método foi de 1000 PFU.mL<sup>-1</sup>.

Na avaliação da viabilidade do fago P1 em 50% de mel JPC2 e 50% de mel Urze 2 (**Figura 6**), verificou-se total perda de infetividade 12 h após o contacto com Urze 2, enquanto, no mesmo período de tempo, se observou mais de 4 Log de PFU.mL<sup>-1</sup> em JPC2. No qual ao fim de 24 h de contacto não existiam fagos viáveis.

Para a concentração de 25%, verificou-se que o mel Urze 2 foi uma vez mais, o mel mais agressivo, pois, ao fim de 6 h de contacto já não se detetou a presença de fagos. No que respeita ao JPC2, a total inviabilização dos fagos só sucedeu às 24 h.

Devido ao efeito do mel Urze 2 na viabilidade dos fagos, decidiu-se usar o mel JPC2 para os ensaios de avaliação do efeito antimicrobiano de mel em biofilme de *E. coli* e *P. aeruginosa*.



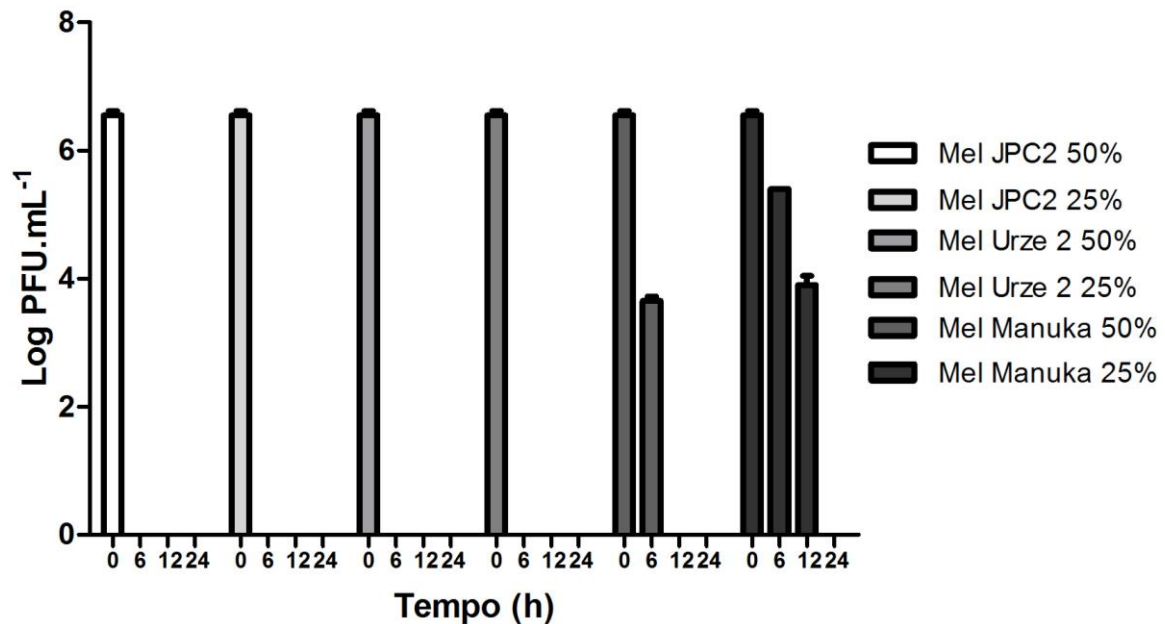
**Figura 6:** Monitorização da viabilidade do fago P1 em mel: concentração (Log PFU.mL<sup>-1</sup>) de P1 após suspensão em 25 % e 50% de mel JPC2, Urze1, Urze 2 e Manuka. Os dados indicados em cada período de tempo (0, 6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. O limite de deteção do método foi de 1000 PFU.mL<sup>-1</sup>.

Devido a resultados pouco promissores no efeito anti biofilme obtidos nos ensaios do mel JPC2 suplementado com fago P1 em biofilmes de *P. aeruginosa* (secção 3.14), procuraram-se: i) méis alternativos que melhorassem a ação do fago P1 em biofilmes, pelo seu conteúdo em MGO, tendo-se avaliado a ação do fago na outra amostra de mel de Urze 1 (MGO=989 mg.kg<sup>-1</sup>) e em mel de Manuka (MGO=756.5 mg.kg<sup>-1</sup>); ii) outros fagos de *P. aeruginosa* que não fossem tão afetados pelo mel, e para isto realizaram-se testes com os fagos EPA3 e EPA4, distintos morfologicamente (*Myoviridae* e *Podoviridae*, respetivamente e previamente avaliados pelo grupo como de sendo de elevada ação em biofilmes) em mel JPC2, Urze 2 e Manuka (nesta fase dos ensaios já não havia mel de Urze 1 disponível para realizar este teste).

Os resultados obtidos com P1 no mel Urze 1 e Manuka encontram-se ilustrados na **Figura 6**. Tal como se verificou com 50% de mel JPC2, os resultados com 50% de Urze 1 e 50% de Manuka, revelaram que às 12 h ainda se recuperou fagos numa ordem de grandeza superior a 4 Log de PFU.mL<sup>-1</sup>, mas que ao fim de 24 h de contacto não existiam fagos viáveis. A suspensão de fagos P1 em 25% de mel de Urze 1 e 25% de mel de Manuka, não foi completamente inviabilizada, uma vez que, no final das 24 h de incubação ainda se observaram fagos numa ordem de grandeza superior a 3 Log de PFU.mL<sup>-1</sup>.

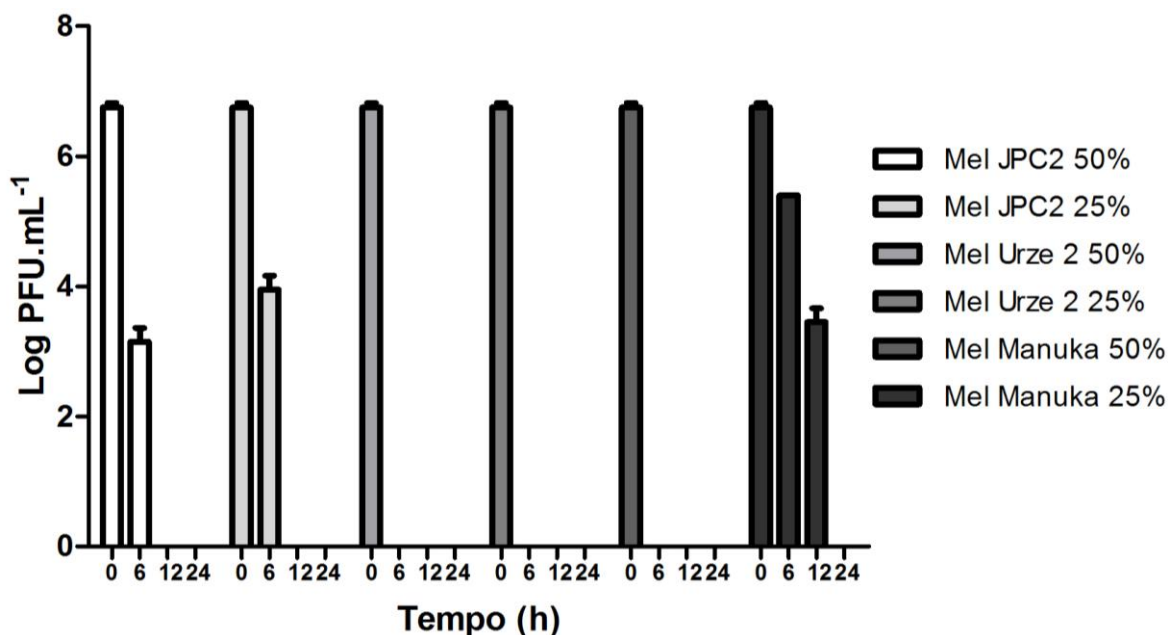
No que respeita ao uso de outros fagos de *P. aeruginosa*, EPA3 e EPA4, os resultados encontram-se nas **Figuras 7 e 8** respetivamente. O fago EPA3 revelou-se altamente sensível nos méis a 50% de JPC2 e Urze 2, pois após 6 h de contacto já não se observaram fagos viáveis. Para o mel de Manuka com a

mesma concentração, isto só se observou ao fim de 12 h de contacto. Para os méis JPC2, Urze 2 e Manuka, com 25% de concentração, verificou-se a mesma tendência tendo sido o mel de Manuka o único a permitir recuperar fagos ao fim de 12 h, com cerca de 4 Log de PFU.mL<sup>-1</sup> de fago EPA3, após 24 h de incubação, a viabilidade deste fago foi completamente perdida.



**Figura 7:** Monitorização da viabilidade do fago EPA3 em mel: concentração (Log PFU.mL<sup>-1</sup>) de EPA3 após suspensão em 25% e 50% de mel JPC2, Urze 2 e Manuka. Os dados indicados em cada período de tempo (0, 6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. O limite de deteção do método foi de 1000 PFU.mL<sup>-1</sup>.

Na avaliação da viabilidade, do fago EPA4 nos méis JPC2, Urze 2 e Manuka a 50% verificou-se que este fago foi altamente sensível nos méis Urze 2 e Manuka, porque em 6 h de contacto não se recuperaram fagos viáveis, enquanto no mel de JPC2 isso só aconteceu ao fim de 12 h de contacto. Para a concentração de 25% dos méis JPC2, Urze 2 e Manuka verificou-se que o mel Urze 2 foi o mais agressivo para o fago EPA4, pois mesmo com 25% o fago foi inviabilizado após 6 h de contacto, enquanto o mel de JPC2, ao fim de 6 h de contacto ainda permitiu a contagem de cerca 4 Log de PFU.mL<sup>-1</sup> (que desaparecem ao final de 12 h). Com 25% de mel de Manuka ainda se recuperaram cerca de 3.5 Log de PFU.mL<sup>-1</sup> de fago EPA4 ao fim de 12 h, mas que acabam por ser totalmente inviabilizados após 24 h de incubação.



**Figura 8:** Monitorização da viabilidade do fago EPA4 em mel: concentração (Log PFU.mL<sup>-1</sup>) de EPA4 após suspensão em 25% e 50% de mel JPC2, Urze 2 e Manuka. Os dados indicados em cada período de tempo (0, 6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. O limite de deteção do método foi de 1000 PFU.mL<sup>-1</sup>.

### 3.8 Otimização da concentração de virucida

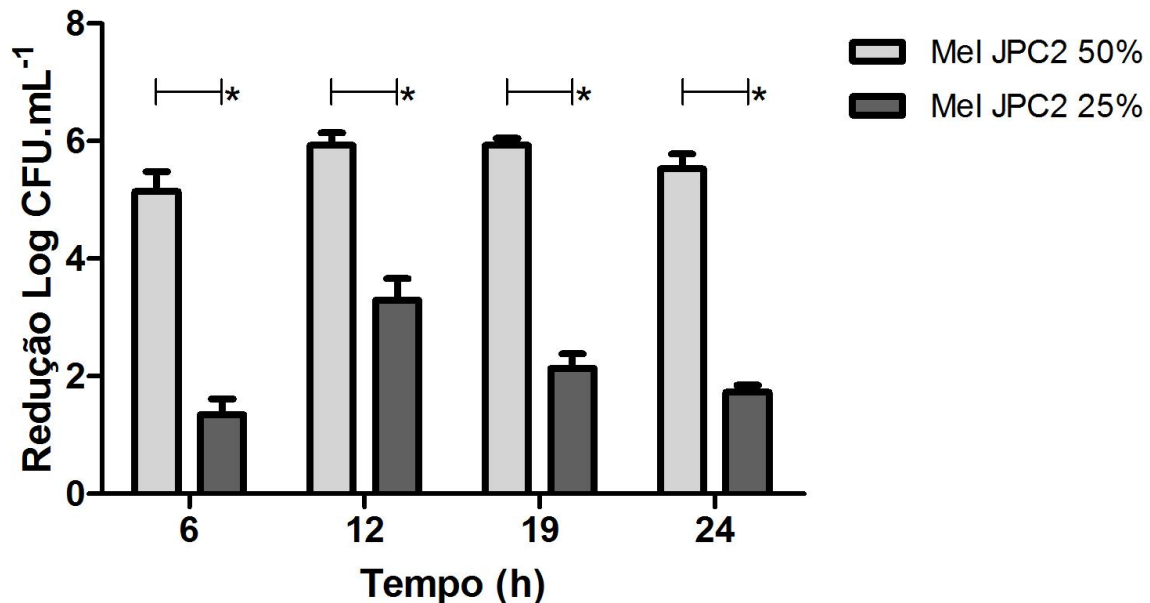
Relativamente ao uso de virucida (FAS) para inibir a ação dos fagos na medição das células viáveis, após os procedimentos de otimização descritos, a concentração que se determinou usar para as diluições sucessivas das bactérias retiradas do biofilme foi de 1 mM, que inviabilizou a ação dos fagos (P1 e EC3a) e não fez diminuir a concentração de *E. coli* nem de *P. aeruginosa* (dados não mostrados).

### 3.9 Efeito do mel JPC2 em biofilmes de *E. coli*

O efeito do mel em biofilmes de *E. coli* foi estudado com apenas um dos méis caracterizados - o mel JPC2. Avaliou-se a redução logarítmica de células viáveis de duas concentrações de mel, 50% e 25%, superiores às CMI, por ser esperado, tal como acontece com a utilização de antibióticos, que em biofilme haja uma maior tolerância ao mel (Olson et al., 2002).

Na avaliação da ação do mel JPC2 em biofilme de *E. coli*, cujos resultados estão apresentados na **Figura 9**, foram analisadas as diferenças entre o efeito de 50% e 25% de mel ao longo do tempo. Neste caso foi possível verificar que o mel mais concentrado produziu uma maior redução celular em todos os períodos de tempo ( $p < 0.01$ ). Ambas as concentrações promoveram a redução logarítmica

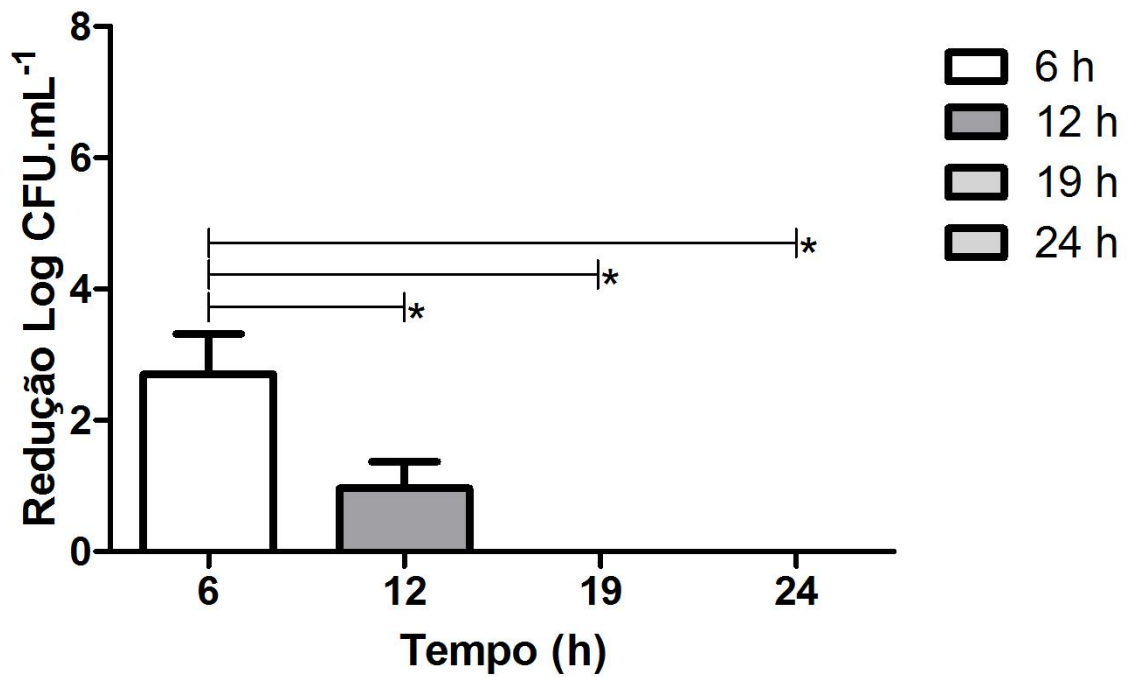
máxima às 12 h, aproximadamente de 5.9 e 3.3 Log com 50% e 25% de mel, respetivamente. A ação de 25% de mel após 19 e 24 h foi inferior à que se verificou às 12 h ( $p < 0.01$ ).



**Figura 9:** Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de *E. coli* de 24 h sobre o efeito de duas concentrações de mel JPC2 – 25% e 50%. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. \* Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ).

### 3.10 Efeito do fago EC3a em biofilmes de *E. coli*

Na avaliação da ação do fago EC3a em biofilmes de *E. coli*, (**Figura 10**) verificou-se que este fago teve uma ação máxima após 6 h de tratamento, apresentando uma redução logarítmica de células viáveis na ordem dos 2.7 Log, decrescendo sucessivamente a sua ação no biofilme, para 1 Log de redução ao final de 12 h de exposição ao tratamento ( $p < 0.01$ ). A partir das 19 h e até ao final do ensaio, o fago deixou de ter qualquer efeito no biofilme. A MOI utilizada, obtida após contagem celular às 0 h, foi em média de 15.

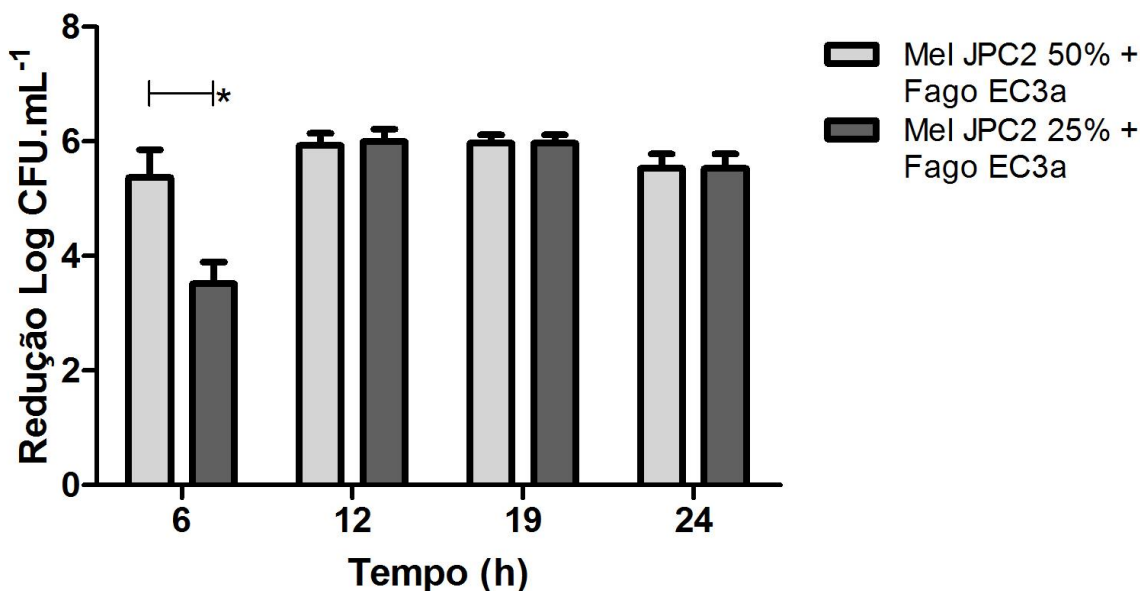


**Figura 10:** Redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de *E. coli* de 24 h sobre o efeito de fago EC3a. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. \* Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ).

Comparando a ação individual do mel JPC2 com a do fago EC3a, o efeito do mel para ambas as concentrações testadas (25% e 50%) (**Figura 12 a/b**), foi estatisticamente superior à do fago em todos os períodos de tempo avaliados ( $p < 0.01$ ), com exceção do resultado obtido às 6 h com 25% de JPC2, em que o EC3a provocou uma redução de 2.7 Log, estatisticamente superior à obtida com o mel, 1.4 Log ( $p < 0.01$ ).

### 3.11 Efeito da ação combinada do fago EC3a e do mel JPC2 em biofilmes de *E. coli*

Após avaliação da ação de fago e mel individualmente em biofilmes de *E. coli*, estudou-se os efeitos, da sua ação combinada. O gráfico representado na **Figura 11** ilustra os resultados obtidos.



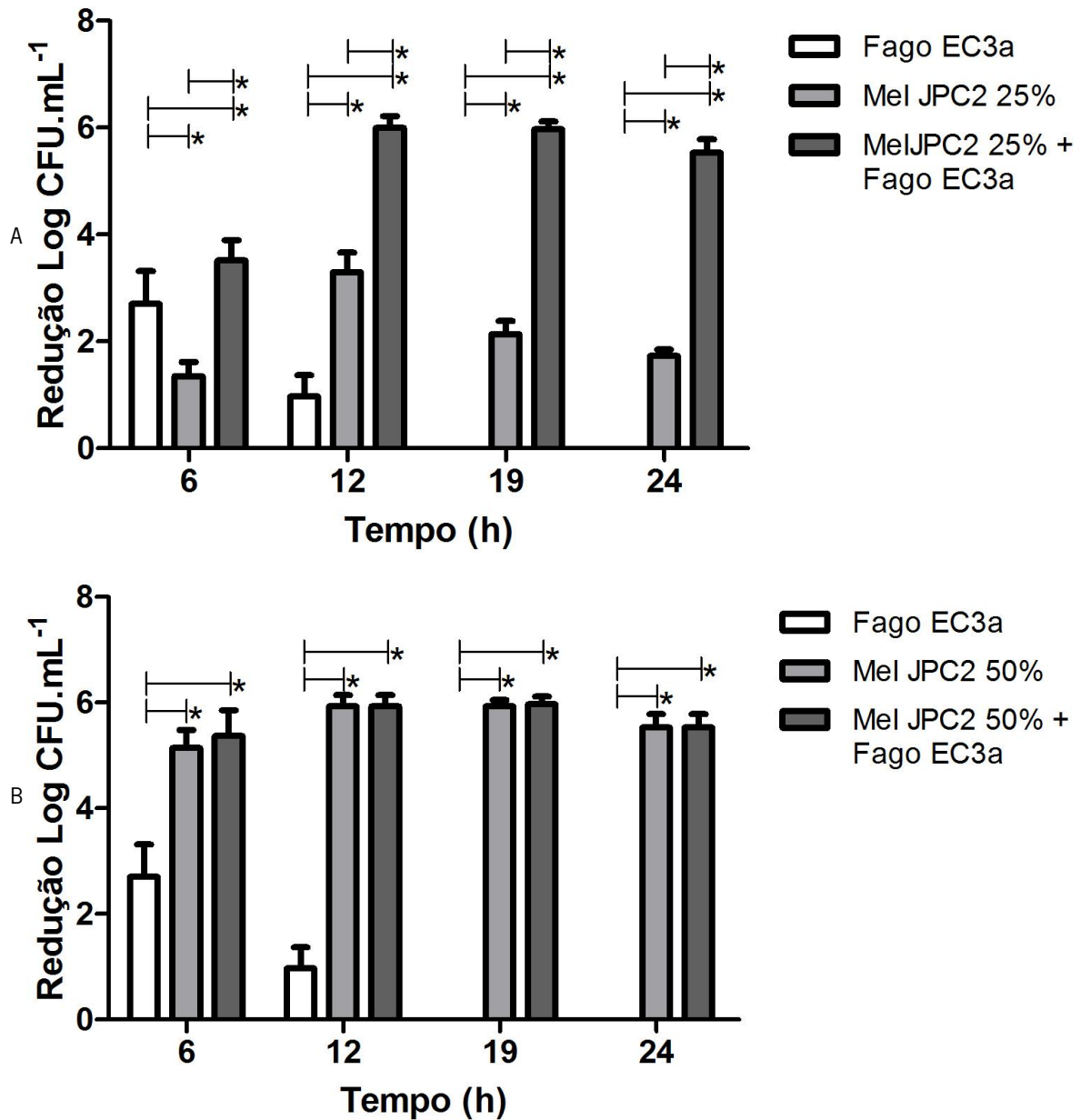
**Figura 11:** Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de *E. coli* de 24 h sobre o efeito de fago EC3a combinado com mel JPC2 a cada uma das concentrações – 25% e 50%. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. \* Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ).

Comparando a ação combinada do fago para cada uma das concentrações de mel usadas, apenas se observaram diferenças nas primeiras 6 h de tratamento do biofilme: 50% de JPC2 com fago revelou-se mais eficaz, com uma redução logarítmica de células viáveis de 5.4 Log, do que 25% JPC2 com fago, que apenas reduziu a concentração celular do biofilme em 3.5 Log. Nos restantes períodos de tempo estudados não se verificaram diferenças significativas ( $p < 0.01$ ) e ambas condições promoveram uma redução logarítmica de aproximadamente de 6 Log.

Apesar do fago EC3a individualmente deixar de ter efeito antimicrobiano no biofilme a partir das 12 h (**Figura 10**), a sua combinação com mel JPC2, tanto a 50% como 25%, resultou numa redução de células viáveis de 6 Log que se manteve constante ( $p > 0.01$ ) até ao final dos ensaios. A comparação do efeito do mel JPC2 com e sem fago, revelou que no caso de 50% de mel JPC2 não houve diferenças significativas na redução de células viáveis ao longo das 24 h (6 Log de redução para ambos) (**Figura 12 b**), contrariamente ao que se verificou com 25% de mel JPC2 em que a combinação com fago revelou um efeito sempre superior ( $p < 0.01$ ) a obtida individualmente pelo mel, com uma diferença na redução de 0.8, 5, 6 e 6 Log obtidas às 6, 12, 19 e 24 h, respetivamente (**Figura 12 a**).

A partir das 12 h, 25% de mel JPC2 suplementado com fago EC3a revelou um efeito sinérgico na destruição das células do biofilme onde a ação combinada dos dois antimicrobianos provocou uma

redução de 6 Log, que é superior à soma da ação individual do fago (redução de 1 Log) com a do mel (redução de 3.3 Log).



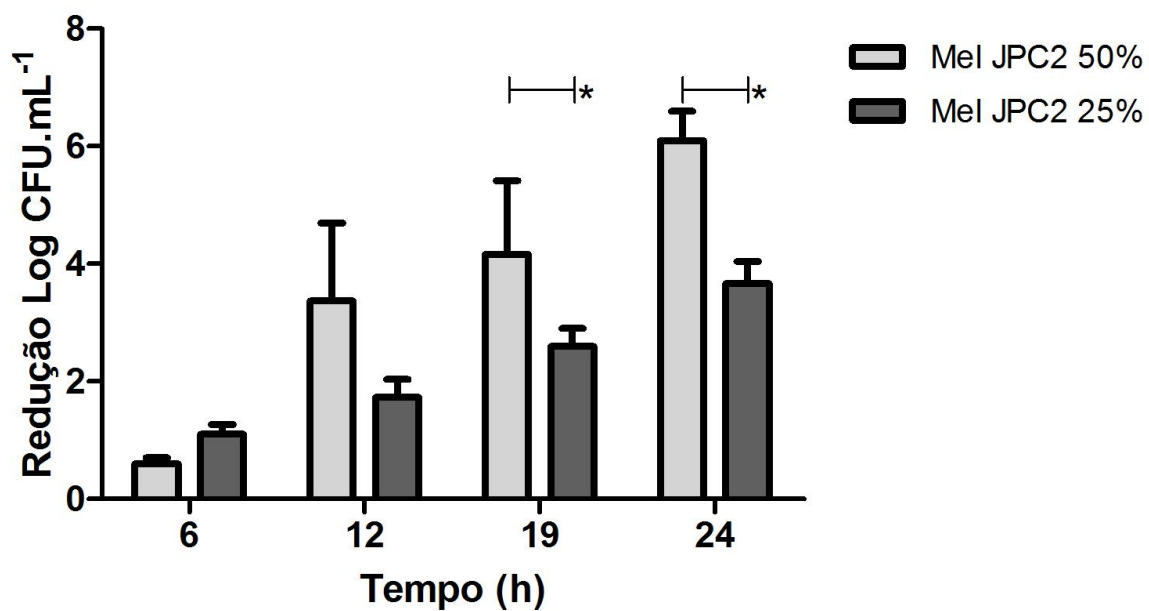
**Figura 12:** a) Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de *E. coli* de 24 h sobre o efeito isolado de fago EC3a ou mel JPC2 25% bem com o efeito combinado do fago EC3a com mel JPC2 25%. b) Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de *E. coli* de 24 h sobre o efeito isolado de fago EC3a ou mel JPC2 50% bem com o efeito combinado do fago EC3a com mel JPC2 50%. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. \* Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ).



### 3.12 Efeito do mel JPC2 em biofilmes de *P. aeruginosa*

A avaliação da ação do mel JPC2, com concentrações de 50% e 25% em biofilme de *P. aeruginosa* encontra-se representado na **Figura 13**. Da análise dos resultados foi possível verificar que, nas primeiras 12 h de tratamento não existem diferenças significativas ( $p > 0.01$ ) na redução logarítmica das células em biofilmes entre as duas concentrações de mel testadas. O mesmo não acontece após este período, às 19 h e às 24 h, em que 50% de JPC2 tem um efeito anti biofilmes superior ( $p < 0.01$ ) ao obtido com 25% de JPC2 ( $p < 0.01$ ) de 1.6 Log e 2.5 Log, respetivamente.

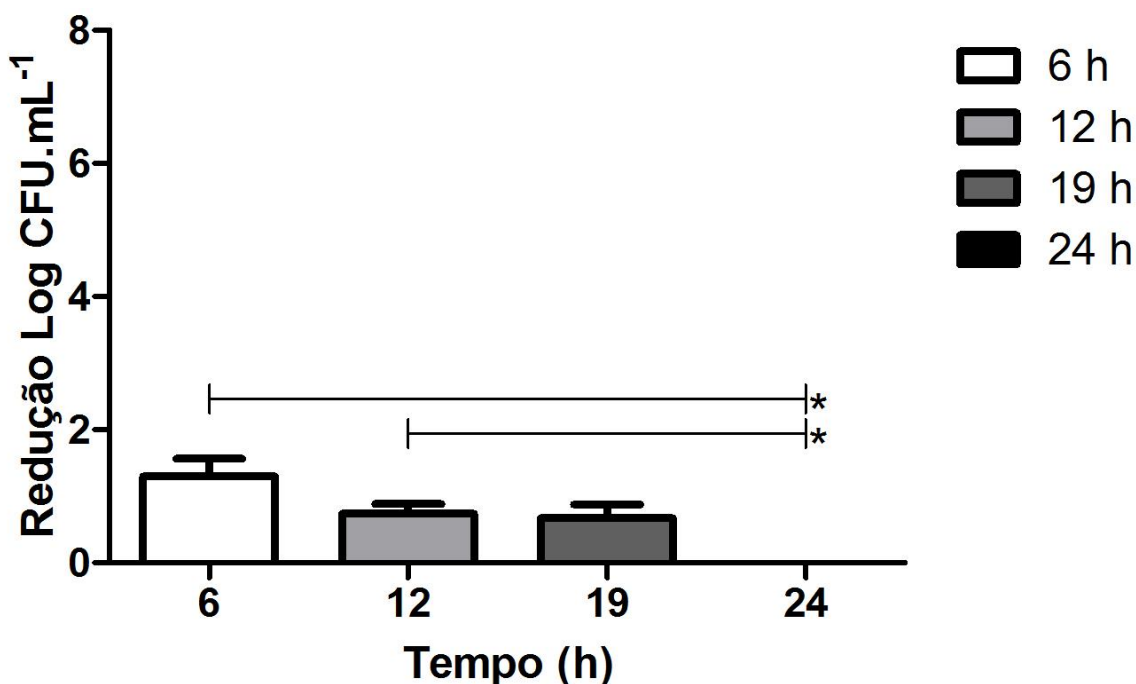
Avaliando a ação ao longo do tempo de 50% de mel JPC2 verificou-se que a redução logarítmica de células viáveis foi aumentando gradualmente de acordo com o tempo de exposição ao mel. Assim, observou-se uma redução logarítmica de células viáveis em média de 0.6 Log às 6 h, aumentando para, em média 3.4 Log às 12 h. Às 19 h não houve diferenças significativas relativamente ao período de tempo anterior ( $p > 0.01$ ), no entanto o efeito aumentou significativamente das 19 para as 24 h, com uma redução logarítmica de 6.1 Log. No caso do efeito de 25% de JPC2, a redução logarítmica das células viáveis aumentou nas primeiras 19 h, no entanto este aumento só foi significativo das 19 para as 24 h de tratamento, causando uma redução logarítmica de aproximadamente 3.6 Log.



**Figura 13:** Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de *P. aeruginosa* de 24 h sobre o efeito de duas concentrações de mel JPC2 – 25% e 50%. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. \* Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ).

### 3.13 Efeito do fago P1 em biofilmes de *P. aeruginosa*

Quando se avaliou o efeito provocado pela ação individual do fago P1 no respectivo hospedeiro de *P. aeruginosa* em biofilme (Figura 14), verificou-se que o fago teve uma ação máxima após 6 h de tratamento sendo a redução logarítmica das células viáveis na ordem dos 1.3 Log, que se manteve sem alterações estatisticamente relevantes ( $p > 0.01$ ) até às 19 h. Ao contrário deste período de tempo, os resultados obtidos às 24 h mostraram uma total ausência de efeito do fago no biofilme. A MOI utilizada, obtida após contagem celular às 0 h, foi em média de 2.



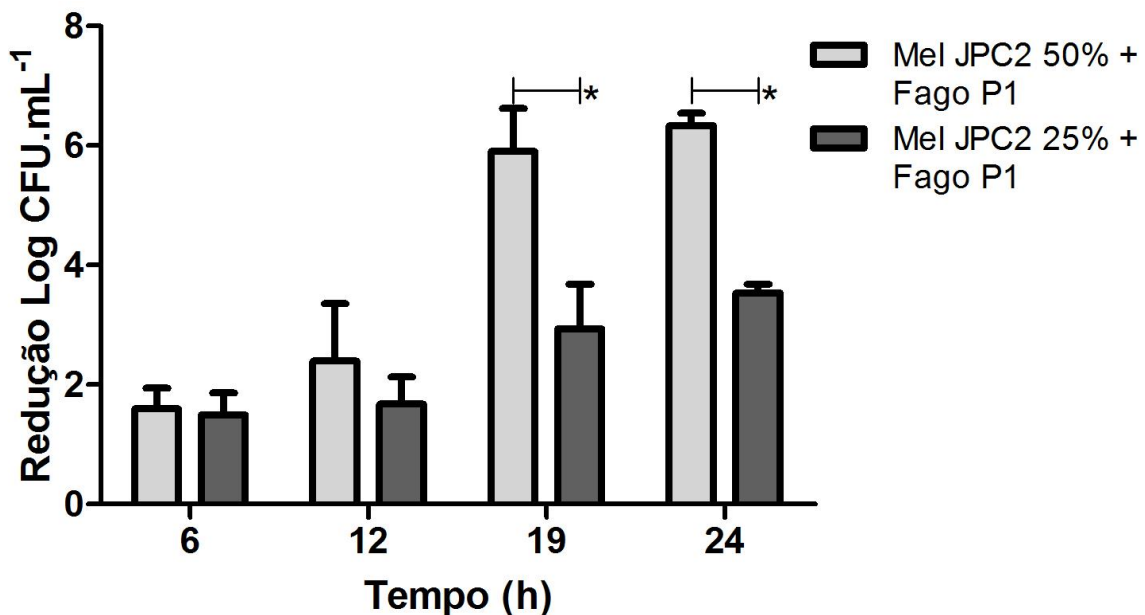
**Figura 14:** Redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de *P. aeruginosa* de 24 h sobre o efeito de fago P1. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. \* Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ).

Comparando a ação individual do mel JPC2 com a do fago P1, o efeito do mel para ambas as concentrações testadas (25% e 50%), foi estatisticamente superior ao do fago a partir das 12 h ( $p < 0.01$ ) (Figura 16 a/b), com exceção do resultado obtido às 6 h em que foi estatisticamente igual ( $p > 0.01$ ) quer a 50% ou 25% de mel.

### 3.14 Efeito da ação combinada do fago P1 e do mel JPC2 em biofilmes de *P. aeruginosa*

Na avaliação da ação combinada do fago P1 com 25% e 50% de mel JPC2 em biofilmes de *P. aeruginosa*, cujos resultados estão representado na **Figura 15**, verificou-se que as duas condições são diferentes somente quando medidas após 19 e 24 h de tratamento ( $p < 0.01$ ). Nestes períodos de tempo, o mel JPC2 a 50% com fago revelou-se mais eficaz, com uma redução logarítmica média das células viáveis de 5.9 Log às 19 h e de 6.4 Log às 24 h, comparativamente com o tratamento com 25% com reduções médias de 2.9 às 19 h e 3.5 Log às 24 h.

No caso de 50% de mel JPC2 com fago P1 observou-se que a redução de células viáveis no biofilme não foi estatisticamente diferente ( $p > 0.01$ ) entre as 6 e as 12 h, bem com entre as 19 e as 24 h. Às 12 h constatou-se uma redução logarítmica média de 1.6 Log, e às 19 h redução logarítmica média de 5.9 Log. Para a combinação do fago com 25% de mel JPC2, a tendência de redução logarítmica das células viáveis é semelhante, no entanto o aumento significativo de eficácia ocorre às 19 h, com uma redução logarítmica média de 1.5 Log, e para as 24 h com uma redução logarítmica média de 3.5 Log.

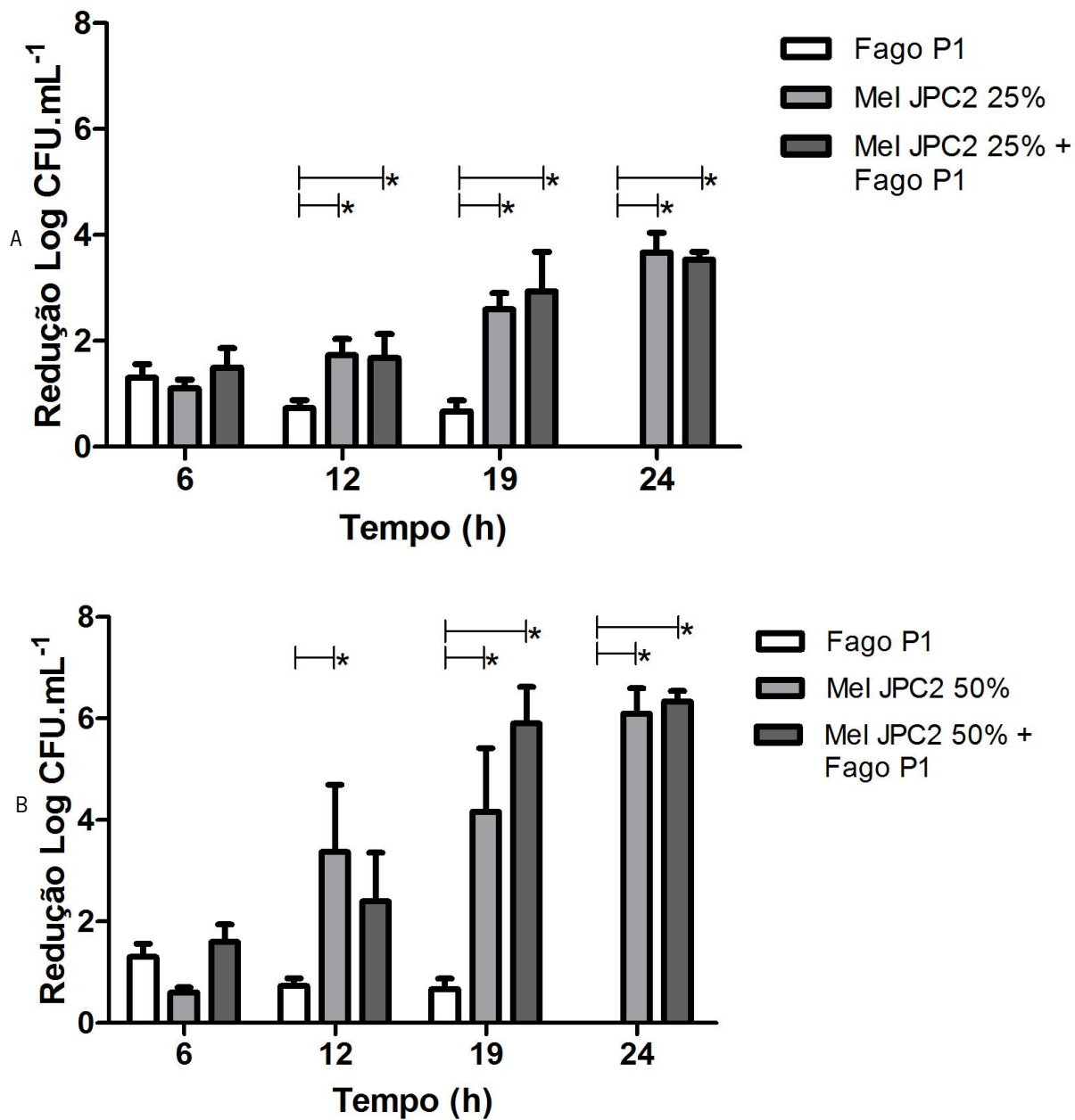


**Figura 15:** Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de *P. aeruginosa* de 24 h sobre o efeito de fago P1 combinado com mel JPC2 a cada uma das concentrações – 25% e 50%. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. \* Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ).

Comparando agora o efeito provocado pelo fago P1 individualmente (**Figura 14**), com a sua combinação com JPC2 (**Figura 16 a/b**), verificou-se que, enquanto o fago não reduziu mais do que 1.3 Log de células viáveis no biofilme às 6 h, a sua combinação com mel JPC2 50%, a partir das 19 h foi estatisticamente superior ( $p < 0.01$ ), atingindo às 24 h uma redução média de 6.1 Log. Relativamente à adição de fago P1 a 25% de mel JPC2, foi possível verificar que a ação combinada foi estatisticamente superior à do P1 individualmente logo às 12 h, e manteve-se até às 24 h, ( $p < 0.01$ ) tendo reduzido a concentração celular do biofilme ao fim deste período em 3.6 Log.

No caso dos biofilmes de *P. aeruginosa*, a presença de fago em nada contribui para aumentar o poder antimicrobiano do mel, não ocorrendo nenhum efeito de adição ou sinergia no combate ao biofilme com 25% ou 50%.

A comparação entre a ação individual do mel JPC2 com a mistura entre JPC2 e fago revelou mesmo que em todos os períodos de tempo estudados não houve diferenças significativas ( $p > 0.01$ ) de redução bacteriana nos biofilmes.



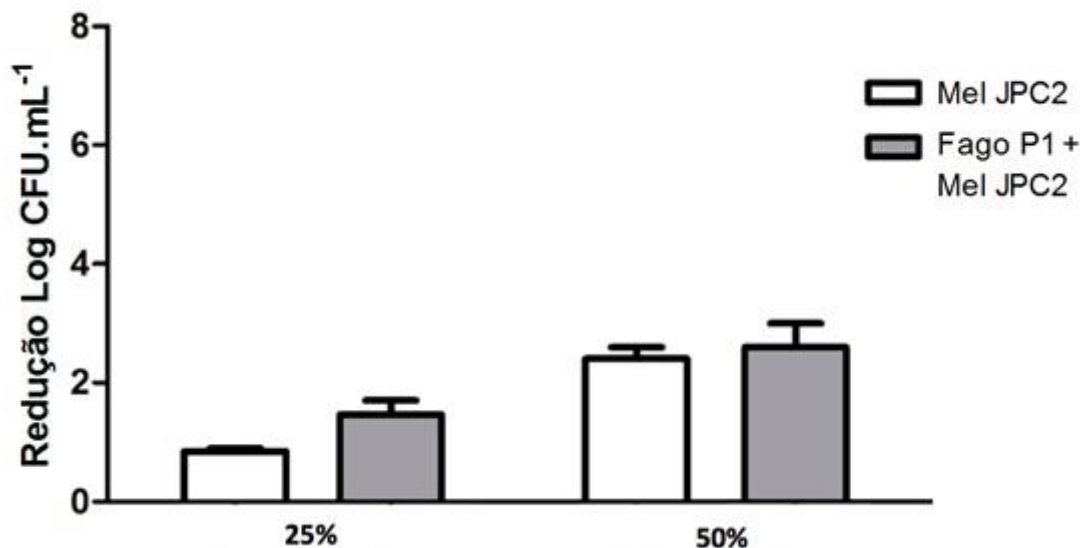
**Figura 16:** a) Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de *P. aeruginosa* de 24 h sobre o efeito isolado de fago P1 ou mel JPC2 25% bem com o efeito combinado do fago P1 com mel JPC2 25%. b) Comparação da redução logarítmica das células viáveis em biofilmes de *P. aeruginosa* de 24 h sobre o efeito isolado de fago P1 ou mel JPC2 50% bem com o efeito combinado do fago P1 com mel JPC2 50%. Os dados indicados em cada período de tempo (6, 12, 19, 24 h) representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. \* Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ).

### 3.15 Avaliação do tratamento sequencial da ação do mel JPC2 após ação do fago P1 em biofilmes de *P. aeruginosa*

Dos resultados obtidos na secção 3.13 (só fago P1) verificou-se que, se nas primeiras horas de tratamento do biofilme com fago, há células que lhe são sensíveis, em biofilmes mais maduros (24 h) isso deixa de acontecer. Assim, e de modo a avaliar o efeito do mel em biofilmes de *P. aeruginosa* não sensíveis ao fago P1 (Pires, 2015), realizou-se um ensaio sequencial de ambos os antimicrobianos, cujos resultados se ilustram na **Figura 17**.

Após a ação do fago P1 durante 24 h, num biofilme, que tal como o esperado, a contagem de células viáveis revelou que não teve qualquer ação antimicrobiana, adicionou-se 25% e 50% de mel JPC2.

Quando se adicionou 25% de mel JPC2 observou-se uma redução de 1.4 Log ao fim de 24 h, e com 50% de mel JPC2, uma diminuição de 2.6 Log. Em comparação, no controlo em que o fago foi substituído por TSB, a redução celular observada no biofilme foi de 0.8 Log e 2.4 Log com 25% e 50% de mel JPC2, respetivamente. As diferenças obtidas para cada concentração relativamente ao controlo, não se revelaram estatisticamente relevantes ( $p > 0.01$ ). Foi ainda possível verificar que a redução de células viáveis num biofilme de 24 h após a ação do mel JPC2 foi superior ( $p < 0.01$ ) (como já foi descrito, 3.6 Log com 25% e 6.1 Log com 50%), à obtida num biofilme de 48 h após a ação do mesmo mel.



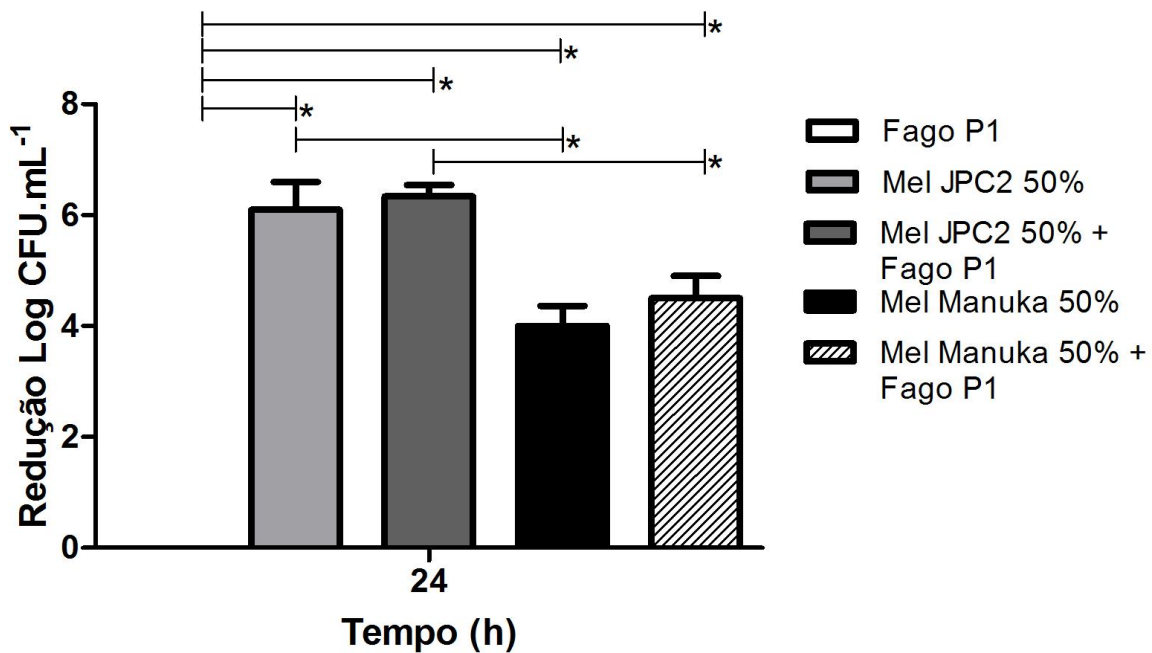
**Figura 17:** Efeito do mel JPC2 a cada uma das concentrações – 25% e 50% – em biofilmes de *P. aeruginosa* de 48 h, após ação do fago P1 durante as 24 h precedentes. Os dados indicados representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. \* Indica que os resultados são estatisticamente diferentes do controlo ( $p < 0.01$ ).

### 3.16 Avaliação da ação individual ou combinada do mel de Manuka com fago P1 em biofilmes de *P. aeruginosa*

Atendendo ao facto do mel de Manuka ser amplamente descrito como o melhor mel para o combate a infeções bacterianas, para além de possuir um elevado conteúdo de MGO que pode ser preponderante na degradação de biofilmes, realizou-se um ensaio exploratório de forma a avaliar a sua ação individual e combinada com o fago P1. Para verificar se tem potencial para melhorar os efeitos obtidos com o P1 em JPC2, a concentração do mel usada foi de 50%, e o efeito foi medido após 24 h (Figura 18).

Verificou-se que não existem diferenças significativas entre o efeito do mel Manuka com o efeito do mel Manuka combinado com fago ( $p > 0.01$ ), atingindo em ambos os casos reduções logarítmicas de cerca de 4 Log. Esta redução é significativamente superior à ocorrida apenas com fago ( $p < 0.01$ ).

Comparativamente com o mel JPC2, para as mesmas condições, foi possível observar que tanto a sua ação individual como a ação combinada com fago, resultaram em reduções celulares estatisticamente superiores às obtidas com mel de Manuka ( $p < 0.01$ ).



**Figura 18:** Comparação do efeito do mel de Manuka (50%) com o JPC2 (50%) isoladamente, e das respetivas combinações com o fago P1 em biofilmes de *P. aeruginosa* de 24 h. Os dados indicados representam a média de ensaios realizados em triplicado. As barras de erro indicam o desvio padrão. \* Indica que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p < 0.01$ ).





## 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No âmbito deste trabalho, numa primeira fase realizou-se a caracterização físico-química de vários méis, com o objetivo de tentar correlacionar as suas várias propriedades com a sua atividade antimicrobiana. De seguida testou-se a ação antimicrobiana dos méis selecionados e dos fagos em estudo, tanto individualmente como de forma combinada, em biofilmes de *P. aeruginosa* e *E. coli*. Estes agentes antimicrobianos, fago e mel, foram selecionados porque ambos tem sido apontados como promissores no controlo de infeções microbianas, mesmo em biofilmes (Kutateladze et al., 2010; McLoone et al., 2015).

### 4.1 Caracterização do mel

Os vários parâmetros físicos e químicos avaliados nos méis (Tabela 5) utilizados estão na sua maioria de acordo com a gama de valores indicados na literatura. No entanto, todos os méis avaliados tiveram valores de HMF superior ao permitido pela legislação Portuguesa (Decreto-Lei n.º 214/2003 de 18 de Setembro) de 40 mg.kg<sup>-1</sup>.

No caso do seu pH, todos os méis são ácidos com um valor de pH geralmente compreendido entre 3 e 5.5, devido à presença de ácidos orgânicos que contribuem para o típico sabor do mel e efeito antimicrobiano (Bogdanov et al., 2004). No mel o principal ácido presente é o ácido glucónico equilibrado com as lactonas ou ésteres correspondentes e iões minerais como o fósforo e o cloreto (Silva et al., 2009) criando assim um efeito tampão (Iglesias et al., 2012). Estes valores de pH estão em sintonia com valores obtidos em estudos com méis portugueses, nomeadamente em Gomes et al., (2010); Gomes et al., (2011); Henriques et al., (2005); Silva et al., (2009), e estudos com méis das mais variadas zonas e climas do globo, como é o caso de méis algerianos (Khalil et al., 2012; Moussa et al., 2012), turcos (Kayacier et al., 2008), indianos (Saxena et al., 2010) ou brasileiros (Azeredo et al., 2003).

Na avaliação da variação do pH nas diferentes diluições de mel correspondente às CMI (Tabela 6), foi possível verificar que pH não variou.

De uma interpretação globalizada do parâmetro da cor e da atividade antimicrobiana (pH, MGO e CMI), a cor não parece ser mais do que um indicador da origem floral e dos constituintes minerais e fenólicos, como já referido, não sendo sugestiva que um mel mais ou menos escuro revele um poder antimicrobiano mais ou menos acentuado: por exemplo os méis multifloral RO e JPC2, Eucalipto 1 e Manuka têm tonalidades diferentes e todos têm um bom poder antimicrobiano constatado pelas CMI.

Para a quantificação do conteúdo proteico usou-se o método de BCA, este método combina a redução de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  pela proteína num meio alcalino (reação de biureto) com a deteção colorimétrica altamente sensível e seletiva do catião cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) usando um único reagente contendo BCA (Smith et al., 1985). A quelatação de duas moléculas de BCA com um ião cuproso, produz uma reação de cor púrpura. Este complexo solúvel em água, exibe uma forte absorvância a 562 nm que é quase linear com concentrações crescentes de proteína. Este método utilizado na determinação do conteúdo proteico não é um método de ponto estático, porque a cor púrpura do complexo continua a desenvolver-se. No entanto, a seguir à incubação, a taxa de desenvolvimento da cor do complexo é suficientemente lenta para permitir que um grande número de amostras seja analisado em conjunto simultaneamente. A formação de cor púrpura do complexo proteico com BCA, está relacionado com a estrutura macromolecular das proteínas, da presença de determinados aminoácidos (cisteína, cistina, tirosina e triptofano) e o número de ligações peptídicas (Wiechelman et al., 1988). Com este ponto apenas são determinados o conteúdo total de proteínas presentes nos diversos méis, sem procurar por proteínas ou enzimas específicas quer provenientes da fonte vegetal ou provenientes das abelhas que processam e produzem o mel. No entanto, atualmente existe um debruçar mais acentuado para as proteínas presentes no mel como sendo uma alternativa à identificação da origem floral do mel pelos seus grãos de pólen, pois esta técnica clássica exige um cuidado extremo e uma perícia elevada do operador na identificação dos grãos de pólen, como descrito nos trabalhos de Di Girolamo et al., (2012); Mohammed et al., (2012).

Como já referido acima, o único parâmetro que não estava em conformidade com as normas é o HMF. Contudo este composto não é classificado como nocivo para a saúde pública sendo apenas um indicador do tempo de vida e da qualidade do mel. Mediante a origem floral, o seu processamento, condições de armazenamento, possível aditivamento e/ou aquecimento (intencional ou não), o HMF, está presente em maior ou em menor quantidade, sendo que méis recentemente colhidos apresentam um baixo HMF (Gomes et al., 2010; Silva et al., 2009; Zappalà et al., 2005). Quando a origem floral é a urze, é normal que os méis possuam um HMF alto, pois a sua colheita é feita em época de verão, altura de maior calor (Oddo et al., 2004), Como esperado os méis de urze utilizados neste estudo têm valores superiores aos estabelecidos  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$ , mais concretamente o mel de Urze 1 têm  $745.5 \text{ mg.kg}^{-1}$  e o de Urze 2 têm  $151.9 \text{ mg.kg}^{-1}$ . No entanto, com esta discrepância de valores parece que o mel de Urze 1 foi envelhecido para além da sua própria tendência natural para elevados valores de HMF.

Outro fator que poderá estar a potenciar os elevados níveis de HMF nos méis é o facto de todos os méis portugueses serem recolhidos dos produtores sem que tenham sofrido qualquer processo de

irradiação gama, uma vez que o processo de esterilização por este mecanismo físico induz uma diminuição da presença de HMF no mel e pode intensificar a cor do mel (Hussein et al., 2014).

O único mel neste estudo que sofreu este processo de esterilização foi o mel comercial de Manuka e, mesmo assim, este mel tem um conteúdo de HMF de 189.4 mg.kg<sup>-1</sup>. No entanto este lote (número 1537) tem um das cores mais escuras obtidas no estudo.

O tratamento térmico aplicado ao mel induz a formação de MGO através de uma reação não enzimática, implicando a presença de uma elevada quantidade de MGO, o que acaba por ser benéfico do ponto de vista da utilização de mel como um tratamento antimicrobiano. Uma vez que, o mel de Manuka não está destinado ao consumo alimentar Humano e a presença de altos níveis de HMF não são tóxicos para o Homem, não existem problemas de ordem de saúde pública (Adams et al., 2009; Atrott et al., 2012; Mavric et al., 2008; Stephens et al., 2010).

Por outro lado, o MGO é formado ao longo do tempo, ou seja aumenta a sua quantidade enquanto o seu precursor diminui ao longo do tempo (Adams et al., 2009), e como com o passar do tempo o mel envelhece, então é sinónimo que com o envelhecimento os teores de HMF e MGO estejam relacionados e tenham a tendência de aumentar, sem que ocorra necessariamente um processo térmico. Entende-se como um elevado conteúdo de MGO quando as quantidades são superiores a 700 mg.kg<sup>-1</sup>, baixa de entre 300 mg.kg<sup>-1</sup> e 700 mg.kg<sup>-1</sup>, muito baixa entre 300 mg.kg<sup>-1</sup> e 5 mg.kg<sup>-1</sup> e residual quando ronda valores de 5 mg.kg<sup>-1</sup> (Atrott et al., 2012; Mavric et al., 2008).

No nosso estudo verificou-se esta tendência para alguns méis: méis com HMF superiores a 120 mg.kg<sup>-1</sup>, geralmente têm quantidades de MGO altas, como é o caso do mel de Manuka, Urze 1 e Urze 2, possuindo 756.5 mg.kg<sup>-1</sup>, 989 mg.kg<sup>-1</sup> e 1266.4 mg.kg<sup>-1</sup> respetivamente. Isto apenas não se verificou para o mel de Rosmaninho 1, que apesar de ter um alto HMF tem uma quantidade muito baixa de MGO (31.5 mg.kg<sup>-1</sup>). No entanto isto é normal e aceitável, porque nem todos os tipos de méis têm a capacidade de formar MGO, se não possuírem hidratos de carbono que possam ser degradados na reação de Maillard, nem possuam a molécula precursora da reação não enzimática de MGO no néctar da origem floral.

Por outro lado, outros méis não comprovaram aquela tendência. Existem méis com teores de HMF menores que 120 mg.kg<sup>-1</sup> e teores de MGO relativamente consideráveis se tivermos em conta o facto de não serem méis com origem de *Leptospermum scoparium*. Este é o caso em particular do mel de JPC2 que tem uma quantidade de MGO de 316.6 mg.kg<sup>-1</sup> e um HMF de 47.9 mg.kg<sup>-1</sup>. Uma possível explicação para isto está na origem floral do mel JPC2, que até a data permanece desconhecida, sendo preciso nos trabalhos futuros identificá-la. Esta origem floral poderá ser uma alternativa ou concorrente à origem floral do mel de Manuka, pois é capaz de produzir um conteúdo de MGO baixo, revelando ter

um potencial efeito antimicrobiano mesmo sem envelhecimento. Além disso tem a vantagem de ser de origem portuguesa. Portanto, apesar de ainda não se ter identificado a origem e responsabilidade dos níveis de MGO do mel JPC2, esta situação é bastante reveladora porque existem méis portugueses que conseguem atingir os mesmos valores de MGO que os méis de Manuka referenciam.

O mecanismo de ação do MGO prende-se ao facto de reagir com lisinas e argininas das proteínas o que poderá ser um indicador de que méis com elevado MGO tenham um baixo conteúdo proteico. Tal fator poderá contribuir para a redução da enzima glucose oxidase, motivo pelo qual o mel de Manuka gera pouco peróxido de hidrogénio (Allen et al., 1991), bem como reduzir a quantidade de enzimas endógenas das próprias abelhas que se misturam com o mel aquando do seu processamento, como é o caso da enzima defensina-1 (Majtan et al., 2012).

## 4.2 Atividade antimicrobiana do mel

A avaliação da capacidade antimicrobiana dos méis em células planctónicas foi obtida através da determinação das CMI dos vários méis (Tabela 5). Observou-se que estas variaram entre 12.5% e 25%, gama semelhante à verificada por outros autores. Por exemplo Sherlock et al., (2010) reportaram CMI de 12.5% com mel de Manuka e de Ulmo para *E. coli* e *P. aeruginosa*. Pelos resultados obtidos foi possível deduzir que o valor das CMIs não estão diretamente relacionadas com a quantidade de MGO nem de proteína do mel, já que, por exemplo os méis JPC2 e Eucalipto 1, mostraram CMI de 12.5% para *E. coli* e para *P. aeruginosa*, e são méis que possuem uma quantidade de MGO inferior aos méis de Manuka, Urze 1 e Urze 2 que apenas tem uma CMI de 25%. Já os méis de Rosmaninho 1, multifloral de RO, Cerejeira, Rosmaninho 3, Manuka e Urze 1 possuem um elevado conteúdo proteico e na sua maioria tem uma CMI de 25%. Os valores das CMI também não parecem variar com o valor de pH, já que não se observaram diferenças relevantes entre os méis relativas a este parâmetro nem com o valor de HMF, que variou o seu valor independente das CMI.

Para um mesmo conjunto de méis testados observou-se que a para além dos méis JPC2 e Eucalipto 1 que tem uma CMI de 12.5% em ambas as bactérias (*P. aeruginosa* e *E. coli*), existem dois outros méis (Manuka e multifloral RO) que exibem uma CMI de 12.5% em *E. coli* indicando ser mais suscetível para o mesmo conjunto de méis testados, do que a *P. aeruginosa*. A maior sensibilidade a agentes antimicrobianos por parte da *E. coli* comparativamente com a *P. aeruginosa* foi verificada também por Russell, (1984), que obteve CMIs inferiores para *E. coli* K12, em relação a *P. aeruginosa* 799 usando antibióticos (avoparcina e flavomicina). Apesar dos méis de Urze e de Manuka não terem as CMIs mais baixas, estes foram usados uma vez que possuem na sua composição elevados níveis de

MGO que podem revelar-se vantajosos no combate aos biofilmes pela sua degradação da matriz (Jervis-Bardy et al., 2011; Kilty et al., 2011; J. Lu et al., 2014; Majtan et al., 2014; Nassar et al., 2012).

### 4.3 Monitorização da viabilidade dos fagos em mel

Após análise do efeito dos vários méis em células plantónicas, realizou-se a sua avaliação em biofilme em combinação com fagos (Figura 5-8). Para isto foi necessário avaliar o efeito do mel na viabilidade dos fagos em estudo: EC3a e P1. A concentração de mel usada, 25% e 50% foi superior às CMI (25% e 12.5%), porque, de acordo com Kilty et al., (2011) a concentração de mel necessária para degradar células em biofilme é superior à necessária para destruir células plantónicas.

Os resultados obtidos mostram que o fago EC3a é rapidamente inviabilizado com 50% de qualquer um dos méis testados (JPC2 e Urze 2), o mesmo não acontecendo com 25% dos mesmos méis. Isto poderá ocorrer devido à alta sensibilidade dos fagos a concentrações mais elevadas de açúcares ou a pH mais baixos (Jończyk et al., 2011). Por outro lado, segundo Majtan et al., (2012), o MGO tem a capacidade de interagir com proteínas, induzindo uma rápida modificação não enzimática de aminoácidos (lisina e arginina), conduzindo a mudanças na estrutura, o que pode inativar a sua função. Esta propriedade poderá estar a contribuir para a inviabilização dos fagos, que são maioritariamente constituídos por proteínas. Consequentemente, de acordo com esta justificação, uma concentração inferior de mel (25%), e portanto de MGO, estará a possibilitar que o fago se mantenha viável por mais tempo.

Com estes resultados, mesmo percebendo que a infetividade dos fagos não resistiria ao mel JPC2 até ao final do ensaio, a avaliação do efeito combinado foi realizada com este mel por ter uma CMI baixa. Inferiu-se que antes da inativação, o fago seria capaz de infetar células em biofilme que permitiria a libertação de novos fagos, e assim sucessivamente.

O fago P1 revelou-se mais resistente aos vários méis testados neste estudo, sendo apenas afetado pelo mel de Urze 2 que, como já referido, tem um elevado MGO e poderá estabelecer interações com as proteínas que constituem a estrutura dos fagos.

As diferenças de viabilidade entre os fagos EC3a e P1, podem dever-se ao facto de pertencerem a grupos taxonómicos diferentes, *Siphoviridae* e *Myoviridae* respetivamente. Assim a sua fisiologia pode conferir características de modo a que não sejam facilmente afetados pelo mel, por exemplo, o fago EC3a tem uma cápside proteica pequena com cerca de 60 nm e uma longa cauda flexível não contráctil; por outro lado, o fago P1 tem uma estrutura mais rígida com uma cápside proteica de aproximadamente 70 nm e uma cauda contráctil (**Anexo III**).

#### 4.4 Efeito antimicrobiano da ação do fago EC3a e do mel JPC2 em biofilmes de *E. coli*

No que respeita à ação do mel em biofilmes de *E. coli* (Figura 9), os ensaios realizados revelaram que com 50% de mel JPC2 houve uma redução muito acentuada desde as 6 h de tratamento. Já com 25% de mel JPC2 a atividade antimicrobiana atingiu o máximo às 12 h, tendo diminuído às 19 h. Esta tendência foi verificada por outros autores em biofilmes, no entanto, não de *E. coli*. Cooper et al, (2009), observou o máximo de ação do mel de Manuka às 11 h, em biofilmes de *P. aeruginosa*, por ter esgotado a atividade não peróxido.

De uma forma geral, neste trabalho, a ação de 25% de mel JPC2 foi sempre inferior à verificada com 50% de mel JPC2, resultado este que foi corroborado pelos mesmos autores referidos (Cooper et al, 2009), que também observaram que um mel concentrado é mais eficaz que um mel diluído na redução da biomassa total dos biofilmes.

Relativamente à ação do fago EC3a na degradação de biofilmes de *E. coli* (Figura 10), a ação máxima foi observada às 6 h, deixando de ter atividade às 19 h. Esta variação da eficácia de fagos foi já verificada noutros estudos (Chibeu et al., 2012). A perda de atividade do fago nesta fase do ensaio pode provavelmente dever-se à combinação de vários fatores: i) ao facto de se tratar de um biofilme mais maduro, provavelmente com células em estado estacionário com atividade metabólica limitada (Fauvart et al., 2011) que não é favorável à replicação dos fagos (pois estes precisam que as células hospedeiras estejam numa fase ativa de crescimento exponencial onde se multipliquem (Sillankorva et al., 2008)) ii) à pressão seletiva das bactérias não sensíveis ao fago que conseguem proliferar no biofilme (Fauvart et al., 2011; Pires, 2015); iii) à incapacidade dos fagos para permearem a matriz do biofilme e acederem às bactérias que estejam numa localização mais protegida devido há existência de interações hidrofóbicas e electrostáticas entre a matriz e o fago (Van Voorthuizen et al., 2001).

A ação do fago revelou-se menos promissora do que a do mel (diferença no número de células viáveis reduzidas superior a 2 Log), quando avaliado isoladamente.

O efeito provocado pelo tratamento usando 25% e 50% de mel JPC2 suplementado com fago EC3a (Figura 11-12) apenas foi distinta entre concentrações às 6 h. A partir das 12 h, o efeito antibacteriano é estatisticamente semelhante, para ambas as concentrações de mel. Esta tendência revela o efeito sinérgico de 25% de mel JPC2 com fago, que se confirma quando se comparam as reduções microbianas obtidas neste tratamento com as obtidas pelo mel e pelo fago separadamente.

O efeito sinérgico na redução bacteriana poderá ter acontecido por diversas razões, tais como: i) o facto do MGO estar mais diluído, não fica disponível para interagir com as proteínas do fago (que hipoteticamente o podem inviabilizar); ii) a produção de peróxido de hidrogénio ser mais elevada, uma

vez que, dada a viscosidade ser mais reduzida, a glucose oxidase se encontrar com maior liberdade para catalisar o seu substrato; iii) uma maior mobilidade do próprio fago na suspensão de mel com menor viscosidade; iv) uma menor concentração de açúcares e sais que são prejudiciais ao fago quando presentes em elevadas quantidades (Jończyk et al., 2011); v) o fago EC3a ter na sua cauda ação de depolimerases, enzimas com capacidade de degradar certos componentes da matriz do biofilme, nomeadamente polissacarídeos que constituem uma barreira física para que ocorra a infeção por parte do fago (Andrade, 2014; Yan et al., 2014).

A existência de sinergia, a partir das 12 h, mesmo sabendo que a ação individual do fago é inferior neste período de tempo, pode indicar que o fago e o mel atuaram nas primeiras 6 h de tratamento nas bactérias à superfície do biofilme degradando-o, permitindo depois que o fago acesse a bactérias em camadas mais profundas do biofilme. No entanto existem fagos que comprovadamente atingem todas as camadas do biofilme nas primeiras horas de infeção (Vilas Boas et al., 2016).

#### 4.5 Efeito antimicrobiano da ação do fago P1 e do mel JPC2 em biofilme de *P. aeruginosa*

O efeito do mel JPC2 (25% e 50%) em biofilmes de *P. aeruginosa* não se verificou tão eficaz como em *E. coli* (Figura 13). Apesar de JPC2 (25% e 50%) terem uma atividade antimicrobiana crescente ao longo do tempo, o máximo das suas atividades ocorreu apenas ao fim de 24 h de tratamento. Esta tendência é contrariada pelo estudo de Cooper, et al. (2009) no tratamento de biofilmes de *P. aeruginosa* com mel de Manuka, que perde atividade às 24 h.

A partir das 19 h, verificou-se que a atividade de 50% de mel JPC2 foi sempre superior à de 25% desse mel, resultado corroborado por Cooper et al (2009), que reporta que um tratamento com mel mais concentrado tem um melhor desempenho do que um tratamento menos concentrado. A ausência de células viáveis no biofilme de *P. aeruginosa* obteve-se apenas com 50% de mel, e ao fim de 24 h de tratamento (de acordo com o limite de deteção do método, ocorreu uma redução de pelo menos 6 Log). Este resultado sugere, comparativamente com os biofilmes de *E. coli*, que os biofilmes de *P. aeruginosa* são mais difíceis de eliminar e não são tão susceptíveis ao mel. No entanto Olson et al (2002) constatou que os biofilmes de *E. coli* são mais resistentes do que os biofilmes de *P. aeruginosa* para uma série de antibióticos testados (Olson et al., 2002).

O desempenho do fago P1 no combate de biofilme de *P. aeruginosa* (Figura 14) revelou-se pouco promissor ao longo do tempo, cessando a atividade antimicrobiana ao fim de 19 h. O máximo de ação (1.3 Log redução) verificada às 6 h foi também constatado por estudos semelhantes, em biofilmes de

24 h (Pires et al., 2011; Pires et al., 2013): nestes estudos verificou-se uma atividade máxima entre as 2 e as 6 h após infecção, e às 24 h constatou-se que as bactérias hospedeiras adquiriram resistência ao fago.

A combinação de mel JPC2 (25% e 50%) com fago P1 (Figura 15-16), não surtiu qualquer efeito aditivo ou sinérgico nos biofilmes tratados, sendo o resultado da ação combinatória semelhante ao tratamento somente com mel JPC2 (25% e 50%). Esta observação acontece contrariamente ao verificado por um estudo, onde foi usado um tratamento combinado de mel de Manuka com antibiótico gentamicina, que demonstrou haver um efeito aditivo no tratamento de biofilmes de *P. aeruginosa* (Campeau et al., 2014).

A ausência de sinergia pode ser explicado por: i) o efeito observado às 6 h da combinação mel JPC2 (50%) com fago poderá ser influência do fago, pois o resultado da ação combinada às 6 h, é mais semelhante ao efeito do fago isolado (mesmo para *p-value* de 0.01 seja não significativo, quando comparado com o mel), sendo nas horas posteriores, mais semelhante ao efeito do mel JPC2 (50%) isoladamente; ii) contrariamente com o que acontece com o fago EC3a, este fago P1 não codifica uma depolimerase capaz de degradar a matriz do biofilme (Pires et al., 2015). Apenas uma pequena fração dos fagos estudados e cujo genoma se encontra depositado na base de dados da NCBI tem presente uma depolimerase (Pires et al., 2016). No entanto, isto não significa que fagos desprovidos de depolimerases sejam pouco eficazes em biofilmes (Sillankorva et al., 2008).

Considerando que o fago P1 não é inviabilizado pelo mel JPC2 antes das 24 h de contacto, e mesmo assim este não acrescenta uma mais valia ao desempenho do mel JPC2 (25% e 50%) no combate aos biofilmes de *P. aeruginosa*, pode inferir-se que: i) o fago poderá ficar aderido à matriz do biofilme através de interações electrostática e hidrofóbicas (Van Voorthuizen et al., 2001), deixando de haver fagos disponíveis para infetar as células do biofilme, ii) o fago apenas atua nas primeiras 6 h de tratamento, momento a partir do qual podem surgir células que já não são sensíveis ao fago (Pires, 2015), promovendo assim apenas a ação do mel JPC2. No entanto com 25% de mel JPC2 aditivado ou não com fago P1, o máximo da atividade antimicrobiana aconteceu às 24 h e esta não passou de uma redução de 4 Log, indicando que o mel não tem capacidade de degradar o biofilme de modo a permitir uma atuação prolongada do fago. Com 50% de mel JPC2 aditivado ou não com fago P1, às 24 h de tratamento consegue-se atingir uma diminuição do número de células viáveis no biofilme (6 Log) até ao limite de deteção do método, que acontece apenas devido ao efeito que o mel exerce sobre o biofilme, uma vez que a presença do fago P1 em nada beneficiou a globalidade do tratamento.



#### 4.6 Avaliação do tratamento sequencial da ação do mel JPC2 após ação do fago P1 em biofilmes de *P. aeruginosa*

Relativamente ao tratamento sequencial aplicado em biofilmes de *P. aeruginosa* (Figura 17) constatou-se que o mel JPC2 (25% e 50%) tem capacidade de eliminar bactérias não sensíveis ao fago P1, tal como acontece em estudos onde se testa a ação do mel em bactérias resistentes a antibióticos (Mandal et al., 2011). Porém é mais difícil eliminar um biofilme que teve uma formação de 48 h (com 24 h de exposição ao fago sem efeito) do que um biofilme de 24 h de formação. Isto acontecerá devido ao estado de maturação das bactérias, ao seu estado metabólico e a matriz ser mais complexa às 48 h do que às 24 h. Ou seja, a adição ao mel de um fago eficiente no combate a biofilmes de 48 h poderá ser preponderante na eficiência do tratamento de feridas, contrariamente ao que indicam os resultados do mel em biofilmes de 24 h.

#### 4.7 Avaliação da ação individual ou combinada do mel de Manuka com fago P1 em biofilmes de *P. aeruginosa*

Com o ensaio exploratório da atividade antimicrobiana da combinação do fago P1 em mel de Manuka (Figura 18), conclui-se que apesar de ter um conteúdo de MGO mais elevado não tem um desempenho substancial na eliminação do biofilme, assim como o contributo do fago não foi relevante. Portanto o mel JPC2 deverá ter alguma característica que o torna mais eficiente na eliminação de biofilmes que ainda não foi caracterizada. Essa característica poderá ser a atividade peróxido que é substancialmente menor em méis de Manuka (Majtan et al., 2012).



## 5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho apresenta resultados *in vitro*, da atividade antibacteriana de um mel português contra bactérias plantónicas, e em biofilmes de 24 h de mono-espécie de *E. coli* e *P. aeruginosa*. Apesar de indicativos, estes resultados não podem ser diretamente extrapolados para feridas crónicas, já que a complexidade da matriz bacteriana neste caso é dependente de outros fatores, tais como a circulação sanguínea, as células epiteliais, a variedade e duração da colonização bacteriana, o tipo de matriz do biofilme que se forma, etc.

Por isso é importante que ensaios semelhantes sejam realizados com biofilmes mais maduros, (48 h, 72 h, etc), e em placas com poços com maior diâmetro. Para além disso, devem ser testados em biofilmes multi-espécies incluindo outras bactérias com incidência nas fases mais problemáticas das feridas crónicas, tal como a *Acinetobacter baumannii*. Ensaios com biofilmes formados em modelos *ex vivo* (por exemplo pele artificial ou pele fresca de suíno), que melhor mimetizam a realidade de uma ferida crónica, serão determinantes para avaliar a eficiência de uma formulação.

No caso de se isolarem fagos promissores para a degradação deste tipo de biofilmes, que não se mantenham viáveis no mel, a encapsulação poderá ser uma alternativa a considerar, com a vantagem de possibilitar a libertação controlada dos mesmos.

A procura e completa caracterização de méis portugueses com elevado potencial antimicrobiano também deve ser efetuada num maior número de amostras, com origens mais heterogéneas, de modo a estabelecer correlações entre parâmetros observados e o seu potencial antimicrobiano.



## BIBLIOGRAFIA

- Aazza, S., Lyoussi, B., Antunes, D., & Miguel, M. G. (2013). Physicochemical characterization and antioxidant activity of commercial portuguese honeys. *Journal of Food Science*, *78*(8). doi:10.1111/1750-3841.12201
- Adams, C. J., Boulton, C. H., Deadman, B. J., Farr, J. M., Grainger, M. N. C., Manley-Harris, M., & Snow, M. J. (2008). Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate Research*, *343*(4), 651–659. doi:10.1016/j.carres.2007.12.011
- Adams, C. J., Manley-Harris, M., & Molan, P. C. (2009). The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate Research*, *344*(8), 1050–1053. doi:10.1016/j.carres.2009.03.020
- Adhya, S., Merrill, C. R., & Biswas, B. (2014). Therapeutic and prophylactic applications of bacteriophage components in modern medicine. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *4*(1), 1–14. doi:10.1101/cshperspect.a012518
- Ahmad, S. I. (2002). Treatment of post-burns bacterial infections by bacteriophages, specifically ubiquitous *Pseudomonas* spp. notoriously resistant to antibiotics. *Medical Hypotheses*, *58*(4), 327–331. doi:10.1054/mehy.2001.1522
- Alisky, J., Iczkowski, K., Rapoport, a, & Troitsky, N. (1998). Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *The Journal of Infection*, *36*(1), 5–15. doi:10.1016/S0163-4453(98)92874-2
- Allen, K. L., Molan, P. C., & Reid, G. M. (1991). A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *43*(12), 817–22. doi:10.1111/j.2042-7158.1991.tb03186.x
- Alves, D. R., Perez-Esteban, P., Kot, W., Bean, J. E., Arnot, T., Hansen, L. H., ... Jenkins, A. T. A. (2015). A novel bacteriophage cocktail reduces and disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and flow conditions. *Microbial Biotechnology*. doi:10.1111/1751-7915.12316
- Al-Waili, N., Salom, K., & Al-Ghamdi, A. a. (2011). Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice. *TheScientificWorldJournal*, *11*, 766–787. doi:10.1100/tsw.2011.78
- Ammons, C. B. M. (2010). Anti-biofilm strategies and the need for innovations in wound care. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, *5*(1), 10–17. doi:10.2174/157489110790112581
- Andrade, M. S. M. (2014). *Avaliação da terapia fágica em biofilmes bacterianos presentes em feridas crônicas*. Universidade do Minho.
- Andrews, J. M. (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, *9*(8), 1–7. doi:10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x
- Atrott, J., Haberlau, S., & Henle, T. (2012). Studies on the formation of methylglyoxal from dihydroxyacetone in Manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate Research*, *361*, 7–11.

doi:10.1016/j.carres.2012.07.025

- Azeredo, L. D. C., Azeredo, M. a a, De Souza, S. R., & Dutra, V. M. L. (2003). Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*, *80*(2), 249–254. doi:10.1016/S0308-8146(02)00261-3
- Babalova, E. G., Katsitadze, K. T., Sakvarelidze, L. A., Imnaishvili, N. S., Sharashidze, T. G., Badashvili, V. A., ... Dekanosidze, N. G. (1968). [Preventive value of dried dysentery bacteriophage]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*, *45*(2), 143–145.
- Basumallick, L., & Rohrer, J. (2013). Determination of Hydroxymethylfurfural in Honey and Biomass. *Thermo Fisher Scientific*, 1–6.
- Belcher, J. (2012). A review of medical-grade honey in wound care. *British Journal of Nursing*, *21*(15), S4–S9. doi:10.12968/bjon.2012.21.Sup15.S4
- Bessa, L. J., Fazii, P., Di Giulio, M., & Cellini, L. (2013). Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *International Wound Journal*, 1–6. doi:10.1111/iwj.12049
- Bogdanov, S., Martin, P., Lüllmann, C., Borneck, R., Vorwohl, G., Russmann, H., ... Ivanov, T. (2002). Harmonised methods of the European Honey Commission. *International Honey Commission*, *XXXIII*(2), 81–87. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
- Bogdanov, S., Rouff, K., & Persano Odd, L. (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, *37*, 452–461.
- Bowler, P. G., Duerden, B. I., & Armstrong, D. G. (2001). Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clinical Microbiology Reviews*, *14*(2), 244–269. doi:10.1128/CMR.14.2.244-269.2001
- Brovko, L. Y., Anany, H., & Griffiths, M. W. (2012). *Bacteriophages for Detection and Control of Bacterial Pathogens in Food and Food-Processing Environment*. *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 67). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-394598-3.00006-X
- Burlando, B., & Cornara, L. (2013). Honey in dermatology and skin care: A review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *12*(4), 306–313. doi:10.1111/jocd.12058
- Campeau, M. E. M., & Patel, R. (2014). Antibiofilm Activity of Manuka Honey in Combination with Antibiotics, 2014.
- Carlton, R. M. (1999). Phage therapy: past history and future prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *47*(5), 267–274.
- Carnwath, R., Graham, E. M., Reynolds, K., & Pollock, P. J. (2014). The antimicrobial activity of honey against common equine wound bacterial isolates. *Veterinary Journal*, *199*(1), 110–114. doi:10.1016/j.tvjl.2013.07.003
- Carson, C. F., & Riley, T. V. (2003). Non-antibiotic therapies for infectious diseases. *Communicable Diseases Intelligence*, *27 Suppl*, S143–S146. doi:10.3201/eid0101.950109

- Chanishvili, N. (2012). *A literature review of the practical application of bacteriophage research*. Nova Biomedical Books.
- Chibeu, A., Lingohr, E. J., Masson, L., Manges, A., Harel, J., Ackermann, H. W., ... Boerlin, P. (2012). Bacteriophages with the ability to degrade uropathogenic Escherichia Coli biofilms. *Viruses*, *4*(4), 471–487. doi:10.3390/v4040471
- Church, D. . B. C. E., Elsayed, S. . B., Reid, O. ., Winston, B. ., & Lindsay, R. . (2006). Burn wound infections. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*(2), 403–434. doi:10.1128/CMR.19.2.403
- Conly, J. M., & Johnston, B. L. (2005). Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, *16*(3), 159–160.
- Cookson, B. (2005). A review: Clinical significance of emergence of bacterial antimicrobial resistance in the hospital environment. *Journal of Applied Microbiology*, *99*(5), 989–996. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02693.x
- Cooper, R. (2009). Honey modulates biofilms of Pseudomonas aeruginosain a time and dose dependent manner. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, *1*(1), 6–10. doi:10.3896/IBRA.4.01.1.03
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y.)*, *284*, 1318–1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *26*(5), 343–356. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002
- Di Girolamo, F., Amato, A., & Righetti, P. G. (2012). Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools. *Journal of Proteomics*, *75*(12), 3688–3693. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.029
- Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., Maciejewska, B., Delattre, A.-S., & Lavigne, R. (2012). Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Current Protein & Peptide Science*, *13*(8), 699–722. doi:10.2174/138920312804871193
- Dryden, M. S. (2010). Complicated skin and soft tissue infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *65*(SUPPL. 3), 35–44. doi:10.1093/jac/dkq302
- Duckworth, D. H. (1976). “ Who Discovered Bacteriophage?”. *Bacteriological Reviews*, *40*(4), 739–802. Retrieved from <http://mibr.asm.org/content/40/4/793.full.pdf\npapers2://publication/uuid/AD053DE2-A716-417D-9CAB-CCFCCCAB192A>
- Ekrami, A., & Kalantar, E. (2007). Bacterial infections in burn patients at a burn hospital in Iran. *The Indian Journal of Medical Research*, *126*(6), 541–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18219081>
- Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2014). Phage therapy in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, *5*, 327–49. doi:10.1146/annurev-food-030713-092415
- Estevinho, L. M., Feás, X., Seijas, J. a., & Pilar Vázquez-Tato, M. (2012). Organic honey from Trás-Os-Montes region (Portugal): Chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(2), 258–264. doi:10.1016/j.fct.2011.10.034

- Eteraf-Oskouei, T., & Najafi, M. (2013). Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: A review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *16*(6), 731–742.
- Fauvart, M., de Groot, V. N., & Michiels, J. (2011). Role of persister cells in chronic infections: Clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *Journal of Medical Microbiology*, *60*(6), 699–709. doi:10.1099/jmm.0.030932-0
- Golkar, Z., Bagasra, O., & Gene Pace, D. (2014). Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. *Journal of Infection in Developing Countries*, *8*(2), 129–136. doi:10.3855/jidc.3573
- Gomes, S., Dias, L. G., Moreira, L. L., Rodrigues, P., & Estevinho, L. (2010). Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(2), 544–548. doi:10.1016/j.fct.2009.11.029
- Gomes, T., Feás, X., Iglesias, A., & Estevinho, L. M. (2011). Study of organic honey from the northeast of Portugal. *Molecules*, *16*(7), 5374–5386. doi:10.3390/molecules16075374
- González-Miret, M. L., Terrab, A., Hernanz, D., Fernández-Recamales, M. Á., & Heredia, F. J. (2005). Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(7), 2574–2580. doi:10.1021/jf048207p
- Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *30*(SUPPL. 2), 118–121. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.04.006
- Henriques, A., Burton, N. F., & Cooper, R. A. (2005). Antibacterial activity of selected Portuguese honeys. *Journal of Apicultural Research*, *44*, 119–123.
- Ho, K. (2001). Bacteriophage therapy for bacterial infections. Rekindling a memory from the pre-antibiotics era. *Perspectives in Biology and Medicine*, *44*(1), 1–16.
- Hsueh, P. R., Teng, L. J., Yang, P. C., Chen, Y. C., Ho, S. W., & Luh, K. T. (1998). Persistence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in an intensive care burn unit. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*(5), 1347–1351.
- Hussein, S. Z., Yusoff, K. M., Makpol, S., & Yusof, Y. a M. (2014). Does gamma irradiation affect physicochemical properties of honey? *Clinica Terapeutica*, *165*(2), e125–e133. doi:10.7471/ct.2014.1695
- IDSIA Infectious Diseases Society of America. (2004). Bad Bugs, No Drugs. *Idsociety.Org*, (July), 37. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Bad+bugs,+no+drugs#1>
- Iglesias, A., Feás, X., Rodrigues, S., Seijas, J. a., Vázquez-Tato, M. P., Dias, L. G., & Estevinho, L. M. (2012). Comprehensive study of honey with protected denomination of origin and contribution to the enhancement of legal specifications. *Molecules*, *17*(7), 8561–8577. doi:10.3390/molecules17078561
- Innovotech Inc. (1996). The MBEC High-throughput (HTP) Assay-for antimicrobial susceptibility testing of biofilms. *Manual*, 1–16.
- Jervis-Bardy, J., Foreman, A., Bray, S., Tan, L., & Wormald, P. J. (2011). Methylglyoxal-infused honey mimics the



- anti-Staphylococcus aureus biofilm activity of manuka honey: Potential Implication in Chronic Rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 121(5), 1104–1107. doi:10.1002/lary.21717
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, a. (2011). The influence of external factors on bacteriophages -review. *Folia Microbiologica*, 56(3), 191–200. doi:10.1007/s12223-011-0039-8
- Jull, A. B., Rodgers, A., & Walker, N. (2008). Honey as a topical treatment for wounds. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4). doi:10.1002/14651858.CD005083.pub2
- Kayacier, A., & Karaman, S. (2008). Rheological and some physicochemical characteristics of selected Turkish honeys. *Journal of Texture Studies*, 39(1), 17–27. doi:10.1111/j.1745-4603.2007.00127.x
- Keppy, N. K., Allen, M. W., Ph, D., & Scientific, T. F. (2010). The Determination of HMF in Honey with an Evolution Array UV-Visible Spectrophotometer. *Thermo Fisher Scientific*, 2–3.
- Khalil, M. I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, M. A., Islam, M. N., ... Gan, S. H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of algerian honey. *Molecules*, 17(9), 11199–11215. doi:10.3390/molecules170911199
- Kilty, S. J., Duval, M., Chan, F. T., Ferris, W., & Slinger, R. (2011). Methylglyoxal: (active agent of manuka honey) in vitro activity against bacterial biofilms. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 1(5), 348–50. doi:10.1002/alr.20073
- Kutateladze, M., & Adamia, R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 28(12), 591–595. doi:10.1016/j.tibtech.2010.08.001
- Laverty, G., Gorman, S., & Gilmore, B. (2014). Biomolecular Mechanisms of Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli Biofilm Formation. *Pathogens*, 3(3), 596–632. doi:10.3390/pathogens3030596
- Leeper, D. J., Schultz, G., Carville, K., Fletcher, J., Swanson, T., & Drake, R. (2014). Extending the TIME concept : what have we learned in the past 10 years ?\*.
- Lenski, R. (1988). Dynamics of Interactions between Bacteria and Virulent Bacteriophage. In K. C. Marshall (Ed.), *Advances in Microbial Ecology SE - 1* (Vol. 10, pp. 1–44). Springer US. doi:10.1007/978-1-4684-5409-3\_1
- Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111–114. doi:10.4161/bact.1.2.14590
- Lu, J., Turnbull, L., Burke, C. M., Liu, M., Carter, D. a, Schlothauer, R. C., ... Harry, E. J. (2014). Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by Staphylococcus aureus strains with different biofilm-forming abilities. *PeerJ*, 2, e326. doi:10.7717/peerj.326
- Lu, T. K., & Koeris, M. S. (2011). The next generation of bacteriophage therapy. *Current Opinion in Microbiology*, 14(5), 524–531. doi:10.1016/j.mib.2011.07.028
- Maddocks, S. E., & Jenkins, R. E. (2013). Honey: a sweet solution to the growing problem of antimicrobial resistance? *Future Microbiology*, 8, 1419–29. doi:10.2217/fmb.13.105
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2011). *Biology of Microorganisms* (Thirteenth.).
- Magkos, F., Arvaniti, F., & Zampelas, A. (2003). Organic food: nutritious food or food for thought? A review of the

- evidence. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 54(5), 357–71. doi:10.1080/09637480120092071
- Majtan, J., Bohova, J., Horniackova, M., Klaudiny, J., & Majtan, V. (2014). Anti-biofilm effects of honey against wound pathogens proteus mirabilis and enterobacter cloacae. *Phytotherapy Research*, 28(1), 69–75. doi:10.1002/ptr.4957
- Majtan, J., Klaudiny, J., Bohova, J., Kohutova, L., Dzurova, M., Sediva, M., ... Majtan, V. (2012). Methylglyoxal-induced modifications of significant honeybee proteinous components in manuka honey: Possible therapeutic implications. *Fitoterapia*, 83(4), 671–677. doi:10.1016/j.fitote.2012.02.002
- Majtan, J., & Majtan, V. (2010). Is manuka honey the best type of honey for wound care? *Journal of Hospital Infection*, 74(3), 305–306. doi:10.1016/j.jhin.2009.08.010
- Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), 154–160. doi:10.1016/S2221-1691(11)60016-6
- Mavric, E., Kumpf, Y., Schuster, K., Kappenstein, O., Scheller, D., & Henle, T. (2004). A new imidazolinone resulting from the reaction of peptide-bound arginine and oligosaccharides with 1,4-glycosidic linkages. *European Food Research and Technology*, 218(3), 213–218. doi:10.1007/s00217-003-0817-x
- Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., & Henle, T. (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(4), 483–489. doi:10.1002/mnfr.200700282
- McLoone, P., Warnock, M., & Fyfe, L. (2015). Honey: A realistic antimicrobial for disorders of the skin. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 1–7. doi:10.1016/j.jmii.2015.01.009
- McNerney, R., Wilson, S. ., Sidhu, A. ., Harley, V. ., Al Suwaidi, Z., Nye, P. ., ... Stoker, N. . (1998). Inactivation of mycobacteriophage D29 using ferrous ammonium sulphate as a tool for the detection of viable *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis*. *Research in Microbiology*, 149(7), 487–495. doi:10.1016/S0923-2508(98)80003-X
- Mohammed, S. E. A., & Azim, M. K. (2012). Characterisation of natural honey proteins: Implications for the floral and geographical origin of honey. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(2), 362–368. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02847.x
- Moore, O. a, Smith, L. a, Campbell, F., Seers, K., McQuay, H. J., & Moore, R. a. (2001). Systematic review of the use of honey as a wound dressing. *BMC Complement Altern Med*, 1, 2. doi:10.1186/1472-6882-1-2
- Moussa, A., & Saad, A. (2012). The Influence of Botanical Origin and Physico-chemical Parameters on the Antifungal Activity of Algerian Honey. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 03(05). doi:10.4172/2157-7471.1000132
- Nassar, H. M., Li, M., & Gregory, R. L. (2012). Effect of honey on *Streptococcus mutans* growth and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 536–540. doi:10.1128/AEM.05538-11
- Nelson, D., Loomis, L., & Fischetti, V. a. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of

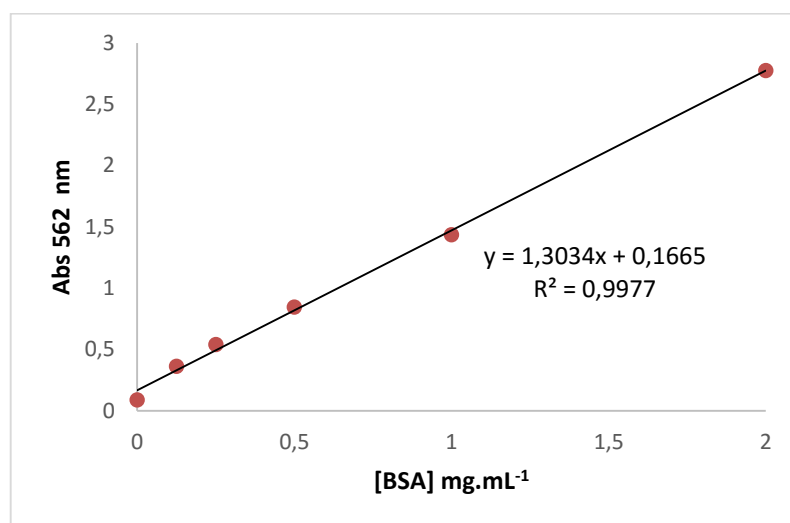
- mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(7), 4107–4112. doi:10.1073/pnas.061038398
- Nobrega, F. L., Costa, A. R., Kluskens, L. D., & Azeredo, J. (2015). Revisiting phage therapy: new applications for old resources. *Trends in Microbiology*, 1–7. doi:10.1016/j.tim.2015.01.006
- Oddo, P., & Piro, R. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, *37*, S38–S81.
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *66*(2), 86–92.
- Park, D. J., Drobniewski, F. A., Meyer, A., & Wilson, S. M. (2003). Use of a phage-based assay for phenotypic detection of mycobacteria directly from sputum. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(2), 680–8. doi:10.1128/JCM.41.2.680-688.2003
- Pires, D., Oliveira, H., Melo, L. D. R., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2016). Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1–11. doi:10.1007/s00253-015-7247-0
- Pires, D. P. P. (2015). Synthetic biology approaches to shape bacteriophages towards *Pseudomonas aeruginosa* biofilm control. Retrieved from <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/41531>
- Pires, D. P., Sillankorva, S., Kropinski, A. M., Lu, T. K., & Azeredo, J. (2015). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* phage vB\_PaeM\_CEB\_DP1. *Genome Announce*, *3*(5), e00918–15. doi:10.1128/genomeA.00918-15
- Pires, D. P., Silva, S., Almeida, C., Henriques, M., Anderson, E. M., Lam, J. S., ... Azeredo, J. (2013). Evaluation of the ability of *C. albicans* to form biofilm in the presence of phage-resistant phenotypes of *P. aeruginosa*. *Biofouling*, *29*(10), 1169–1180. doi:10.1080/08927014.2013.831842
- Pires, D., Sillankorva, S., Faustino, A., & Azeredo, J. (2011). Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. *Research in Microbiology*, *162*(8), 798–806. doi:10.1016/j.resmic.2011.06.010
- Pontes, M., Marques, J. C., & Câmara, J. S. (2007). Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, *74*(1), 91–103. doi:10.1016/j.talanta.2007.05.037
- Portuguesa. (2003). Decreto-lei N° 214/2003. *DIÁRIO DA REPÚBLICA—I SÉRIE-A*, 6057–6060.
- Revathi, G., Puri, J., & Jain, B. K. (1998). Bacteriology of burns. *Burns*, *24*(4), 347–349. doi:10.1016/S0305-4179(98)00009-6
- Rose, T., Verbeken, G., Vos, D. De, Merabishvili, M., Vanechoutte, M., Jennes, S., ... Pirnay, J. (2014). Experimental phage therapy of burn wound infection : difficult first steps, *4*(2), 66–73.
- Russell, A. D. (1984). Sensitivity of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* to avoparcin, flavomycin and virginiamycin. *FEMS Microbiology Letters*, *23*(2-3), 289–291. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb01080.x>

- Sato, T., & Miyata, G. (2000). The nutraceutical benefit, Part III: Honey. *Nutrition*, *16*(6), 468–469. doi:10.1016/S0899-9007(00)00271-9
- Saxena, S., Gautam, S., & Sharma, A. (2010). Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chemistry*, *118*(2), 391–397. doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.001
- Sevgi, M., Toklu, A., Vecchio, D., & Michael, H. (2013). Topical Antimicrobials for Burn Infections – An Update. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, *29*(6), 161–197. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021
- Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S., & Humphreys, H. (2010). Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *10*, 47. doi:10.1186/1472-6882-10-47
- Sillankorva, S., Neubauer, P., & Azeredo, J. (2008). *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiBB-PF7A. *BMC Biotechnology*, *8*, 79. doi:10.1186/1472-6750-8-79
- Silva, L. R., Videira, R., Monteiro, A. P., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2009). Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal*, *93*(1), 73–77. doi:10.1016/j.microc.2009.05.005
- Slopek, S., Durlakowa, I., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M., & Kucharewicz-Krukowska, A. (1984). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. III. Detailed evaluation of the results obtained in further 150 cases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *32*(3), 317–335.
- Slopek, S., Durlakowa, I., Weber-Dabrowska, B., Kucharewicz-Krukowska, A., Dabrowski, M., & Bisikiewicz, R. (1983a). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. I. General evaluation of the results. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *31*(3), 267–291.
- Slopek, S., Durlakowa, I., Weber-Dabrowska, B., Kucharewicz-Krukowska, A., Dabrowski, M., & Bisikiewicz, R. (1983b). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. II. Detailed evaluation of the results. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *31*(3), 293–327.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, *150*(1), 76–85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7
- Snow, M. J., & Manley-Harris, M. (2004). On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey. *Food Chemistry*, *84*(1), 145–147. doi:10.1016/S0308-8146(03)00258-9
- Stephens, J. M., Schlothauer, R. C., Morris, B. D., Yang, D., Fearnley, L., Greenwood, D. R., & Loomes, K. M. (2010). Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. *Food Chemistry*, *120*(1), 78–86. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.074
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. doi:10.1128/AAC.45.3.649-659.2001
- Tenover, F. C., & Hughes, J. M. (1996). The challenges of emerging infectious diseases. Development and spread

- of multiply-resistant bacterial pathogens. *JAMA*, 275(4), 300–304.
- Tonks, a. J., Cooper, R. a., Jones, K. P., Blair, S., Parton, J., & Tonks, a. (2003). Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine*, 21(5), 242–247. doi:10.1016/S1043-4666(03)00092-9
- United States Department of Agriculture. (1985). United States Standards for Grades of Extracted Honey. *Federal Register*, 50FR15861, 12.
- Van Voorthuizen, E. M., Ashbolt, N. J., & Schafer, A. I. (2001). Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes. *Journal of Membrane Science*, 194(1), 69–79. doi:10.1016/S0376-7388(01)00522-1
- Vilas Boas, D., Almeida, C., Sillankorva, S., Nicolau, A., Azeredo, J., & Azevedo, N. F. (2016). Discrimination of bacteriophage infected cells using locked nucleic acid fluorescent in situ hybridization (LNA-FISH). *Biofouling*, 32(2), 179–90. doi:10.1080/08927014.2015.1131821
- White, J. W. (1979). Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 62(3), 509–514.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(12), 6578–6583. doi:10.1073/pnas.95.12.6578
- Wiechelman, K. J., Braun, R. D., & Fitzpatrick, J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, 175(1), 231–237. doi:10.1016/0003-2697(88)90383-1
- Yan, J., Mao, J., & Xie, J. (2014). Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications. *BioDrugs*, 28(3), 265–274. doi:10.1007/s40259-013-0081-y
- Zappalà, M., Fallico, B., Arena, E., & Verzera, A. (2005). Methods for the determination of HMF in honey: A comparison. *Food Control*, 16(3), 273–277. doi:10.1016/j.foodcont.2004.03.006

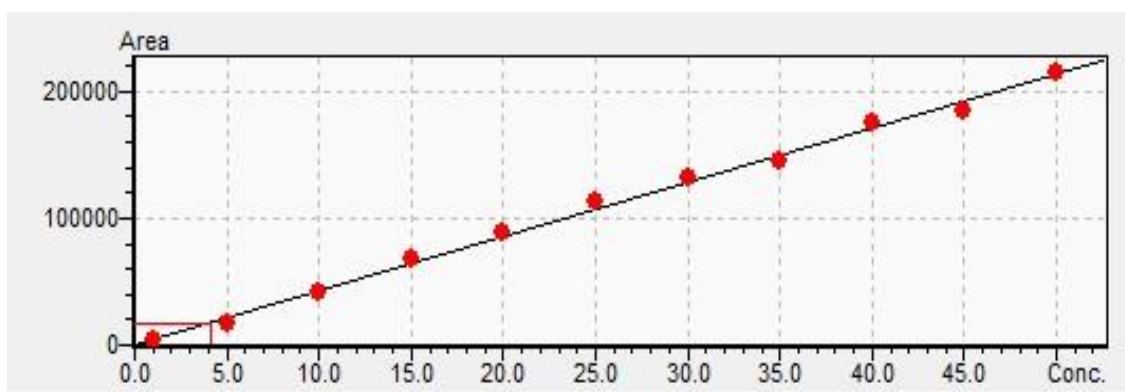


## ANEXO I – RETA DE CALIBRAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO



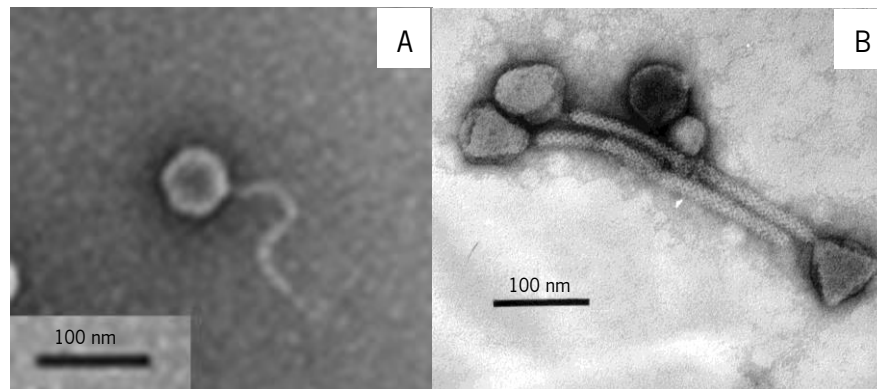
**Figura 19:** Retas de calibração do conteúdo proteico. A equação da reta obtida foi: Abs (562 nm) = 1.30 (± 0.09) [Proteína (mg.mL<sup>-1</sup>)] + 0.17 (± 0.08), com uma correlação R<sup>2</sup>=0.9977.

## ANEXO II – RETA DE CALIBRAÇÃO DO CONTEÚDO MGO



**Figura 20:** Retas de calibração do padrão MGO 35-45%. A equação da reta obtida foi: Área = 4268.4 [MGO (mg.kg<sup>-1</sup>)] + 346.6, com uma correlação R<sup>2</sup>= 0.9966.

### ANEXO III – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÓNICA DOS FAGOS EC3A E P1



**Figura 21:** Imagem de microscopia eletrónica da coleção do grupo BBiG: **a)** fago EC3a; **b)** fago P1



