



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GUILHERME BARTOLOMEU GONÇALVES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FRAÇÃO F4A OBTIDA  
DE CULTURA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* LV EM  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

---

Londrina  
2020

GUILHERME BARTOLOMEU GONÇALVES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FRAÇÃO F4A OBTIDA  
DE CULTURA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* LV EM  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

G635a    Gonçalves , Guilherme Bartolomeu .  
Atividade antimicrobiana da fração F4A obtida de cultura de Pseudomonas aeruginosa LV em Staphylococcus aureus / Guilherme Bartolomeu Gonçalves . - Londrina, 2020.  
58 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada-Ogatta.  
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. S. aureus - Tese. 2. Fração F4A - Tese. 3. Metabólitos secundários - Tese. 4. CIM/CBM - Tese. I. Yamada-Ogatta, Sueli Fumie. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

GUILHERME BARTOLOMEU GONÇALVES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FRAÇÃO F4A OBTIDA  
DE CULTURA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* LV EM  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr. Miguel Octavio Pérez Navarro  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de maio de 2020.

Dedico este trabalho aos meus pais: pessoas lutadoras, éticas e amorosas que sempre zelaram pela minha educação.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta, pela oportunidade, paciência e pelos preciosos ensinamentos transmitidos, especialmente por me ensinar a confiar mais em mim.

À Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni e ao Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares pelas lições e incentivos relacionados ao ensino de Microbiologia.

A todos os integrantes do NIP 5, especialmente às doutorandas Ana Elisa Belotto Morguette e Patrícia Moraes Lopes Pereira; à Dra. Renata Perugini Biasi Garbin, e às mestres Bruna Terci Fernandes e Gabriella Maria Andriani, por me acolherem no laboratório e também pela amizade, paciência e apoio científico.

À Ms. Jussevânia Santos Rubbo de Sá pela confiança e ajuda valiosa, também pelas risadas, desabafos e conselhos.

Ao Laboratório de Ecologia Microbiana da UEL por ceder a F4A.

Às minhas amigas queridas, Daniela, Giovana, Joyce e Raquel pela amizade, companheirismo e por todos os momentos compartilhados e ao meu amigo Leandro por todo apoio e amizade nos meus primeiros meses em Londrina.

À irmã que o mestrado me concedeu, Caroline Lucio Moreira, obrigado pela paciência, pelo apoio diário durante todo o percurso e por me ouvir em todos os momentos.

Às minhas bússolas da Microbiologia, Profa. Ms. Gracie Luiza da Silva e Prof. Dr. André Pitondo da Silva, a minha eterna gratidão por terem me ensinado tanto, especialmente sobre a vida.

Aos meus pais Lucimara e José Áureo por entenderem minha ausência e apoiarem meus sonhos, projetos e principalmente, apoiarem quem sou; ao meu irmão Gustavo pela nossa amizade e aos meus queridos avós (uma vida de afetos); à minha madrinha Sílvia por ser uma amiga para todas as horas.

Ao meu companheiro, Luan, por ser fonte constante de felicidade em minha vida e por todas as vezes que ficou me esperando terminar experimentos até tarde no laboratório.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro (código financeiro 01).

Ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá, Paraná pela assistência às análises de microscopia eletrônica.

“Acredite em seus sonhos, porque neles  
está escondida a porta da eternidade.”

Khalil Gibran

GONÇALVES, Guilherme Bartolomeu. **Atividade antimicrobiana da fração F4A obtida de cultura de *Pseudomonas aeruginosa* LV em *Staphylococcus aureus***. 2020. 58 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2020.

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* é um patógeno relevante nos âmbitos comunitário e de assistência à saúde, conhecido pela dificuldade terapêutica associada à resistência antimicrobiana e à formação de biofilmes. A partir de 1940, *S. aureus* passou a ter notoriedade global, devido à resistência à penicilina e, em 1961, à meticilina. Como infecções causadas por essa bactéria dificultam a prática clínica, se faz notável a necessidade de pesquisas por novas substâncias antibióticas para tratar os pacientes acometidos. Ao longo da história, produtos naturais, especificamente metabólitos secundários de microrganismos, têm sido usados para combater patógenos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade inibitória da fração F4A, obtida da purificação do sobrenadante de cultura de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV, sobre células planctônicas e sésseis de *S. aureus*, as alterações morfológicas causadas nessas células e sua toxicidade para células de mamíferos. Para isso, foram selecionados 26 isolados clínicos de *S. aureus* da coleção do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os valores de CIM de F4A variaram de 1,56 a 6,25 µg/mL; 19 isolados apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) de 3,13 µg/mL (73,1%), 6 apresentaram CIM de 1,56 µg/mL (23,1%) e 1 isolado apresentou CIM de 6,25 µg/mL (3,8%). Concentração bactericida mínima (CBM) de 3,13 µg/mL foi detectada em 84,6% dos isolados ( $n=21$ ) e 18 apresentaram valores idênticos de CIM e CBM, evidenciando o potencial efeito bactericida da fração. Pela cinética do tempo de morte, observou-se que *S. aureus* reduziu significativamente o número de unidades formadoras de colônias (UFCs) a partir de 4 h de tratamento com a CIM/CBM de F4A. A microscopia eletrônica de transmissão das cepas de referência tratadas com a CIM/CBM de F4A evidenciou alterações ultraestruturais como: diminuição na eletrodensidade citoplasmática, discreto espessamento e diminuição na compactação da parede celular, inibição da formação de septo e descolamento da membrana citoplasmática. O biofilme de todos os isolados apresentou redução significativa na atividade metabólica nas concentrações de 12,5 e 25 µg/mL. A maioria dos isolados apresentou concentração inibitória mínima para 50% das células sésseis (SCIM<sub>50</sub>) de 6,25 µg/mL ( $n=15$ ), seguido de 12,5 µg/mL ( $n=8$ ), 3,13 µg/mL ( $n=2$ ) e 25,0 µg/mL ( $n=1$ ). Para a maior concentração testada (50 µg/mL), a atividade hemolítica foi superior a 3%, enquanto as outras concentrações (25 a 0,1 µg/mL) não ultrapassaram 1% de hemólise; a concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) LLCMK2 de F4A após 24 h foi de 3,44 µg/mL. Como conclusão, a fração F4A apresentou atividade bactericida contra *S. aureus*, incluindo atividade antibiofilme. Embora mais estudos sejam necessários em relação à sua toxicidade para células de mamíferos e ensaios *in vivo*, a fração F4A pode ser promissora para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus*.

**Palavras-chave:** *S. aureus*; fração F4A; produtos naturais; metabólitos secundários; CIM/CBM; citotoxicidade; LLCMK2; MET.

GONÇALVES, Guilherme Bartolomeu. **Antimicrobial activity of F4A fraction obtained from culture of *Pseudomonas aeruginosa* LV against *Staphylococcus aureus***. 2020. 58 p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2020.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is a relevant community and healthcare-associated pathogen, known by its therapeutic difficulty related to antimicrobial resistance and the formation of biofilms. From 1940, *S. aureus* has had global notoriety due to resistance to penicillin and, in 1961, to methicillin. Once infections caused by this bacterium hinder the clinical practice, the need for new antibiotic substances researches is crucial to treat the affected patients. During history, natural products, specifically secondary metabolites from microorganisms, have been used to combat pathogens. Thus, this study aimed to evaluate the inhibitory activity of the F4A fraction, obtained from culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa* LV strain, against planktonic and sessile cells of *S. aureus*, the morphological alterations caused in these cells and its cytotoxicity. To that, 26 clinical isolates were selected from the collection of the Laboratory of Molecular Biology of Microorganisms, at Universidade Estadual de Londrina (UEL). MIC values of F4A fraction ranged from 1.56 to 6.25 µg/mL; 19 isolates showed minimum inhibitory concentration (MIC) of 3.13 µg/mL (73.1%), 6 showed MIC of 1.56 µg/mL (23.1%) and 1 isolate showed MIC of 6.25 µg/mL (3.8%). Minimum bactericidal concentration (MBC) of 3.13 µg/mL was detected in 84.6% of the isolates (n=21) and 18 presented identical MIC and MBC values, highlighting the potential bactericidal effect of the fraction. By the time-kill curve, it was observed that *S. aureus* decreased significantly the colony forming unit (CFU) counts from 4h of treatment with the MIC/MBC of F4A. The transmission electron microscopy of the reference strains treated with the MIC/MBC of F4A showed ultrastructural alterations such as a decrease in the cytoplasmic electron density and slight thickening and loosening of the cell wall. The biofilm of all the isolates reduced significantly their metabolic activity with 12.5 and 25.0 µg/mL of F4A. Most of the isolates showed minimum biofilm inhibitory concentration (bMIC<sub>50</sub>) of 6.25 µg/mL (n=15), followed by 12.5 µg/mL (n=8), 3.13 µg/mL (n=2) and 25.0 µg/mL (n=1). For the highest concentration tested (50 µg/mL), the hemolytic activity was greater than 3%, while the other concentrations (25.0 to 0.1 µg/mL) did not exceed 1% of hemolysis; the cytotoxic concentration for 50% of the cells (CC<sub>50</sub>) LLCMK2 of F4A after 24h was 3.44 µg/mL. In conclusion, F4A fraction showed high antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, including antibiofilm activity, and the bactericidal effect was demonstrated by death kinetics assays. Although further studies are required in relation to its cytotoxicity and *in vivo* assays, F4A fraction can be promising for the treatment of infections caused by *S. aureus*.

**Key words:** *S. aureus*; F4A fraction; natural products; secondary metabolites; MIC/MBC; cytotoxicity; LLCMK2; TEM.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Linha do tempo dos antimicrobianos de origem natural. **Verde:** produtos naturais de actinomicetos; **azul:** produtos naturais de outras bactérias e **roxo:** produtos naturais de fungos ..... 26
- Figura 2** – Curvas de morte de *S. aureus* ATCC 29213 (A), SNA 299 (B), *S. aureus* BEC 9393 (C), PSA 12 (D), PSA 19 (E), PSA 26 (F), PSA 37 (G) e PSA 39 (H). Os microrganismos foram tratados com a CIM e CBM da fração F4A por 24 h à 37°C e a contagem do número de UFC foi realizada em horários específicos. Cores: verde (CIM=CBM); azul (CIM) e vermelho (CBM). \*p-valor<0,05..... 36
- Figura 3** – Microscopia eletrônica de transmissão das cepas de referência *S. aureus* ATCC 29213 sem tratamento (A), *S. aureus* ATCC 29213 após 4h de tratamento com a CIM/CBM (B), *S. aureus* BEC 9393 sem tratamento (C) e *S. aureus* BEC 9393 após tratamento com a CIM (D) e CBM (E). Barras: (A-E) = 100 nm. As setas pretas indicam espessamento e perda da compactação da parede celular e as setas brancas indicam descolamento da membrana citoplasmática ..... 38
- Figura 4** – Atividade antibiofilme da fração F4A contra biofilmes maduros de isolados clínicos MSSA (A e B) e MRSA (C-F) e das cepas de referência *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* BEC 9393. \*p-valor<0,05 ..... 39
- Figura 5** – Percentual de hemólise produzida pela fração F4A em eritrócitos humanos ..... 40
- Figura 6** – Citotoxicidade da fração F4A para células LLC-MK2 ..... 40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> –	Principais fatores de virulência produzidos por <i>S. aureus</i> .....	19
<b>Tabela 2</b> –	Atividade antibacteriana e antibiofilme da fração F4A contra <i>Staphylococcus aureus</i> .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAMHB	<i>Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
DO	Densidade óptica
IND	Indolin-3-ona
MHA	Mueller-Hinton Agar
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> resistente à metecilina)
MSCRAMMS	<i>Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
MSSA	<i>Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> sensível à metecilina)
MTT	3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaCl	Cloreto de sódio
OAC	<i>Organocopper antibiotic compound</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCA	Fenazina-1-ácido carboxílico
PCN	Fenazina-1-carboxamida
PSA	“Projeto <i>Staphylococcus aureus</i> ”
SCC <sub>mec</sub>	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i>
SCIM	Concentração Inibitória Mínima para célula Sésil
SNA	“Swab nasal aureus”
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	16
2.1	OBJETIVO GERAL .....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
3.1	CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i> .....	17
3.2	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> .....	18
3.2.1	Tratamento e Resistência aos Antimicrobianos.....	21
3.3	BIOFILMES DE <i>S. AUREUS</i> .....	24
3.4	ANTIMICROBIANOS DE ORIGEM NATURAL .....	26
3.5	FRAÇÃO F4A OBTIDA DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> CEPA LV .....	28
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1	MICROORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	30
4.2	FRAÇÃO F4A E FLUOPSINA C.....	30
4.3	ATIVIDADE DA FRAÇÃO F4A E FLUOPSINA C SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS .....	30
4.4	CURVA DE MORTE.....	31
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	31
4.6	ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA FRAÇÃO F4A .....	32
4.7	ATIVIDADE HEMOLÍTICA DA FRAÇÃO F4A EM ERITRÓCITOS HUMANOS .....	33
4.8	CITOTOXICIDADE DA FRAÇÃO F4A EM CÉLULAS LLC-MK2.....	33
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	34
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	35
5.1	F4A Inibe o Crescimento de Células Planctônicas de <i>S. Aureus</i> .....	35
5.2	A Atividade Antibacteriana da Fração F4A Pode Estar Relacionada Com a Presença de <i>Fluopsina C</i> .....	35
5.3	F4A Exibe Efeito Bactericida Contra <i>S. Aureus</i> .....	36

5.4	Tratamento com F4A Provoca Alterações Morfológicas e Ultraestruturais em <i>S. Aureus</i> .....	38
5.5	F4A Inibe o Biofilme Maduro de <i>S. Aureus</i> .....	39
5.6	F4A não Apresentou Atividade Hemolítica mas é Tóxica para Células LLC-MK2 .....	40
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é um patógeno oportunista extremamente relevante nos âmbitos comunitário e de assistência à saúde no mundo todo. É conhecido pela dificuldade terapêutica associada à resistência antimicrobiana e à formação de biofilmes, os quais levam à persistência das infecções causadas por esta bactéria (LISTER; HORSWILL, 2014; MEHRAJ *et al.*, 2016). Essas infecções são preocupantes por causarem aumento no tempo de internação, custos associados à saúde, e em muitos casos, mortalidade (ZUNIGA; MANALICH; CORTES, 2016; ORTWINE; BHAVAN, 2018).

De fato, apesar de *S. aureus* fazer parte da microbiota humana, este microrganismo pode se apresentar como um patógeno desafiador devido à sua habilidade de evadir do sistema imune do hospedeiro somado ao seu fenótipo de multirresistência aos antimicrobianos (HIRAMATSU *et al.*, 2014). A mudança no perfil epidemiológico das infecções estafilocócicas é preocupante, já que a presença de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), antes restrita ao ambiente hospitalar, tem sido reportada em pacientes acometidos por infecções comunitárias (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014).

*Staphylococcus aureus* se destaca pela produção de uma gama de fatores de virulência, como toxinas, enzimas, adesinas e proteínas de superfície, que permitirão que o patógeno sobreviva às condições adversas e extremas e se dissemine pelos tecidos do hospedeiro (KONG; NEOH; NATHAN, 2016).

Além disso, a capacidade de *S. aureus* formar biofilmes, tanto no tecido do hospedeiro quanto em dispositivos médicos implantados, tem papel importante na persistência de infecções crônicas. As células do biofilme encontram-se embebidas em uma matriz exopolimérica, o que diminui a eficiência dos antimicrobianos e da resposta imune fazendo com que essas infecções sejam difíceis de erradicar (LISTER; HORSWILL, 2014).

Muitas hipóteses foram elaboradas para explicar a redução da sensibilidade aos antimicrobianos em biofilmes. Mecanismos físicos, mecânicos ou bioquímicos podem limitar o transporte de antimicrobianos no biofilme, de forma que apenas suas camadas superficiais sejam expostas a concentrações letais dos antimicrobianos utilizados (STEWART, 1996). De acordo com essa hipótese, os antimicrobianos devem ser metabolizados, desativados ou adsorvidos por componentes da matriz extracelular. Além disso, a penetração de antimicrobianos através do biofilme é retardada pela resistência difusional (LIU *et al.*, 1998).

Na maioria das vezes, o uso de antimicrobianos convencionais não é capaz de destruir o biofilme (CIOFU *et al.*, 2015), fazendo-se urgente a necessidade de desenvolver novas

medidas para a erradicação dessas comunidades microbianas (RYBTKE *et al.*, 2015). Em vista disso, se faz notável a necessidade de pesquisas por novas substâncias antimicrobianas para tratar de forma eficaz os pacientes acometidos por *S. aureus* (ESPOSITO *et al.*, 2019). Em 2017, a Organização Mundial da Saúde classificou MRSA como alta prioridade em relação ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (WHO, 2017).

No decurso da história, produtos naturais têm sido usados para combater patógenos (WRIGHT, 2017). Especificamente, os metabólitos secundários de origem microbiana, que apresentam inúmeras atividades biológicas, inclusive antimicrobiana, podem ampliar o horizonte terapêutico em relação ao desenvolvimento de novos fármacos (CRANEY; AHMED; NODWELL, 2013), especialmente com atividade antibiofilme (BUOMMINO *et al.*, 2014). Nesse sentido, o gênero *Pseudomonas* destaca-se por seu potencial biotecnológico, produzindo uma gama de metabólitos secundários bioativos, dos quais alguns apresentam atividade antimicrobiana (GROSS; LOPER, 2009). Um desses compostos é a fração F4A obtida do metabolismo de *Pseudomonas aeruginosa* LV (MUNHOZ *et al.*, 2017; PISTORI *et al.*, 2018). Vários estudos vêm reportando a atividade antibacteriana desta fração contra fitopatógenos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; MUNHOZ *et al.*, 2017; PISTORI *et al.*, 2018). No entanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito contra células planctônicas e sésseis de isolados clínicos de *S. aureus*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana da fração F4A obtida de cultura de *Pseudomonas aeruginosa* LV em *Staphylococcus aureus*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) da fração F4A sobre células planctônicas por meio das técnicas de microdiluição em caldo e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), respectivamente;
- Determinar a cinética de crescimento de células planctônicas tratadas com a fração F4A pela técnica de contagem de UFC;
- Analisar alterações ultraestruturais das células planctônicas após tratamento com a fração F4A por microscopia eletrônica de transmissão;
- Determinar a atividade da fração F4A sobre a atividade metabólica das células sésseis por meio do ensaio de redução do MTT;
- Avaliar a atividade hemolítica da fração F4A sobre eritrócitos humanos;
- Avaliar a citotoxicidade da fração F4A sobre células da linhagem LLCMK2 por meio do ensaio de redução do MTT.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*

Estafilococos são microrganismos importantes na saúde humana e animal, podendo ser encontrados em uma ampla variedade de ambientes, de forma patogênica ou não (NAKAMIZO *et al.*, 2014; NAKATSUJI *et al.*, 2017). Estes microrganismos possuem alta capacidade de sobreviver e resistir às variações ambientais; e esta característica faz com que estejam entre os patógenos mais relevantes no âmbito da saúde pública atual, já que elas podem causar uma grande variedade de infecções, muitas das quais se caracterizam pela dificuldade terapêutica (ONYANGO; ALRESHIDI, 2018).

O gênero *Staphylococcus* pertence ao filo *Firmicutes* (GIBBONS; MURRAY, 1978), classe *Bacilli*, ordem *Bacillales* e à família *Staphylococcaceae*; bactérias deste gênero são Gram-positivas, esféricas com diâmetro aproximado de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  (SCHLEIFER; BELL, 2009), não são capazes de formar esporos, são imóveis e se agrupam em pares, cadeias curtas, ou ainda, de forma semelhante a cachos de uva (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012). O arranjo apresentado pelo gênero, fez com que em 1882 Alexander Ogston sugerisse a denominação *Staphylococcus*, diferenciando-os de *Streptococcus* (arranjo em forma de cadeia). Etimologicamente, *Staphylococcus* é composto pelos termos gregos *staphyle*, que significa cacho de uvas; e *kokkos*, que quer dizer grão ou semente (OGSTON, 1882).

*Staphylococcus* spp. são geralmente catalase-positivos e oxidase-negativos; anaeróbios facultativos que apresentam crescimento mais rápido e abundante sob condições aeróbicas, com exceção de *Staphylococcus saccharolyticus* e *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* (EVANS; MATTERN; HALLAM, 1978; DE LA FUENTE; SUAREZ; SCHLEIFER, 1985; SCHLEIFER; BELL, 2015); assim, os estafilococos são capazes de obter energia por meio de respiração aeróbica e por fermentação láctica, principalmente (PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009).

Uma característica relevante do gênero *Staphylococcus* é sua capacidade de crescer em altas concentrações de sal, fenômeno conhecido como halotolerância. Essa característica é crucial já que várias espécies de estafilococos são conhecidas como componentes da microbiota da pele, sendo essa caracterizada pelo seu estado de dessecação e alta concentração salina (CHAIBENJAWONG; FOSTER, 2010).

Até o momento, 58 espécies de *Staphylococcus* foram identificadas (SCHLEIFER; BELL, 2015), podendo ser encontradas em diferentes espécies de hospedeiros e nichos,

conforme as particularidades das espécies. Tradicionalmente estas podem ser classificadas conforme sua capacidade de coagular o plasma sanguíneo (FOSTER, 1996). *Staphylococcus aureus* é a espécie coagulase-positiva clinicamente relevante por conta de seu potencial como patógeno de humanos e animais, além de ser relacionada com casos de intoxicação alimentar (JØRGENSEN *et al.*, 2005; CUNHA, 2009). No entanto, outras seis espécies de estafilococos coagulase-positivas já foram identificadas: *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, *S. delphini* e *S. pseudintermedius* (DEVRIESE, 2005). Em relação aos estafilococos coagulase-negativos, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* são as espécies mais frequentes no ambiente hospitalar (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

### 3.2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

*Staphylococcus aureus* foi isolado pela primeira vez por Alexander Ogston a partir do pus de feridas cirúrgicas (OGSTON, 1881). Em 1884 o médico Anton J. Rosenbach diferenciou e classificou estafilococos isolados de humanos de acordo com as cores de suas colônias. Ele denominou *Staphylococcus aureus* os cocos cujas colônias tinham pigmentação amarela, fazendo alusão ao termo latino *aurum*, que significa ouro (ROSENBACH, 1884). Atualmente é um fato conhecido que a pigmentação tipicamente dourada das colônias de *S. aureus* é atribuída à produção de estafiloxantina, que é um carotenoide triterpenoide capaz de influenciar na permeabilidade da membrana citoplasmática e na sensibilidade ao estresse oxidativo (CLAUDITZ *et al.*, 2006; SEN *et al.*, 2016).

*S. aureus* expressa uma cápsula polissacarídica que tem a função de proteger a superfície bacteriana, e proteínas associadas à essa superfície, contra o reconhecimento de células fagocitárias (WILKINSON; PETERSON; QUIE, 1979; KUIPERS *et al.*, 2016).

*S. aureus* compartilha as mesmas características do gênero, ou seja, apresenta-se como cocos Gram-positivos com arranjo semelhante a cachos de uva (LICITRA, 2013). Esse tipo de arranjo deve-se ao modo de divisão dessas bactérias. Diferente da maioria dos gêneros bacterianos que se divide de forma equatorial, os estafilococos se dividem sequencialmente em três planos ortogonais (TZAGOLOFF; NOVICK, 1977; TURNER *et al.*, 2010; PINHO; KJOS; VEENING, 2013). Notavelmente, o peptidoglicano de *S. aureus* apresenta-se altamente reticulado, já que sua estrutura conta com pontes cruzadas de glicinas, as quais são sintetizadas por proteínas do tipo FemXAB (MONTEIRO *et al.*, 2019).

Bioquimicamente, *S. aureus* é um microrganismo aeróbio facultativo (LIU *et al.*, 2005), apresenta atividade hemolítica em ágar sangue (acrescido de 5% de sangue de carneiro) devido

à produção de quatro tipos de hemolisinas (alfa, beta, gama e delta) (BLAIR, 1958; DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000); além do fato de que quase todos os isolados podem produzir coagulase, a qual é um fator de virulência e é útil também na identificação do microrganismo (BLAIR, 1958; BROWN *et al.*, 2005). *S. aureus* apresenta reação de oxidase negativa e catalase positiva. No entanto, existem relatos acerca do isolamento de *S. aureus* catalase negativa, embora sua incidência seja desconhecida, além do que, nos laboratórios de rotina esses microrganismos acabam sendo identificados como estreptococos (DEZFULIAN *et al.*, 2010). Além disso, *S. aureus* são capazes de fermentar manitol, o que também a distingue das demais espécies do gênero (BELLO; QAHTANI, 2005).

*S. aureus* tem as narinas anteriores como um importante nicho ecológico (HANSEN *et al.*, 2017), ou seja, faz parte da microbiota, colonizando assintomaticamente mais de 30% da população humana, o que é um importante fator de risco para o desenvolvimento de infecções (KLUYTMANS; VAN BELKUM; VERBRUGH, 1997; SAKR *et al.*, 2018). Além disso, os portadores de *S. aureus* podem disseminar o microrganismo entre a população, tanto por contato direto com indivíduos colonizados ou infectados ou por meio de fômites ou superfícies contaminadas (MILLER; DIEP, 2008).

De fato, *S. aureus* é considerado como um dos principais patógenos bacterianos, sendo responsável por causar uma variedade de infecções (TONG *et al.*, 2015), tanto na comunidade como no ambiente hospitalar, incluindo bacteremia, endocardite infecciosa, pneumonia, osteomielite, artrite e doenças de pele (DAYAN *et al.*, 2016).

Além de ser o agente etiológico dessas infecções, no que diz respeito à resistência aos antimicrobianos, *S. aureus* passou a ter notoriedade global a partir da década de 1940, quando a resistência à penicilina foi reportada pela primeira vez (BASSET *et al.*, 2011). Já nas últimas décadas, cepas de *S. aureus* resistentes ao  $\beta$ -lactâmico metilicilina (MRSA) emergiram como um importante patógeno hospitalar e comunitário (IPPOLITO *et al.*, 2010), sendo frequentemente associado à resistência a múltiplos antimicrobianos (HARKINS *et al.*, 2017).

*S. aureus* apresenta uma série de fatores de virulência, regulados por complexos mecanismos, como *quorum-sensing* e proteínas reguladoras, necessários para a sobrevivência no hospedeiro e em ambientes hostis (JENUL; HORSWILL, 2018; TAM; TORRES, 2019). Esses fatores promovem a lise celular, invasão e destruição tissular, além de interferir na resposta inata e adaptativa do hospedeiro culminando na inibição do sistema complemento, alteração no recrutamento e função de neutrófilos e inibição da fagocitose (GUERRA *et al.*, 2016). Os principais fatores de virulência detectados em *S. aureus* estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Principais fatores de virulência produzidos por *S. aureus*.

<b>Cofator/enzima</b>	<b>Gene</b>	<b>Função</b>
CoA (coagulase)	<i>coa</i>	Cofator, ativa protrombina
vWbp	<i>vwb</i>	Cofator, ativa protrombina
Estafiloquinase	<i>sak</i>	Cofator, ativa plasminogênio
Nuc (termonuclease)	<i>nuc</i>	Nuclease
Aureolisina	<i>aur</i>	Metaloprotease
ScpA (V8 protease)	<i>sspA</i>	Serino-protease
SplA a SplF	<i>splA a splF</i>	Serino-proteases
Toxina esfoliativa A	<i>eta</i>	Serino-protease
Toxina esfoliativa B	<i>etb</i>	Serino-protease
Estafilopaína A e B	<i>scpA, sspB</i>	Cisteíno-proteases
Hialuronidase	<i>hysA</i>	Liase
β-Toxina	<i>hly</i>	Esfingomielinase, biofilme
PI-PLC	<i>plc</i>	Fosfolipase
SAL1, SAL2	<i>lip1, lip2</i>	Lipases
FAME	desconhecido	Detoxificação de ácidos graxos
α-Toxina	<i>hla</i>	Toxina formadora de poros
PVL (LukSF-PV)	<i>lukS, lukF</i>	Toxina formadora de poros
PSMα1 a PSMα4	<i>psmA1 a psmA4</i>	Modulinas solúveis em fenol
PSMβ1, PSMβ2	<i>psmβ1, psmβ2</i>	Modulinas solúveis em fenol
δ-Toxina	<i>hld</i>	Modulinas solúveis em fenol
PSM-mec	<i>psm-mec</i>	Modulinas solúveis em fenol
TSST-1	<i>tst</i>	Superantígeno
SpA	<i>spa</i>	Superantígeno

**Fonte:** Adaptado de TAM; TORRES, 2019.

Outra característica relevante em relação a *S. aureus* é sua capacidade de formar biofilmes, o que alguns autores consideram como importante fator de virulência da espécie (DONLAN; COSTERTON, 2002; NAMVAR *et al.*, 2013; HADDAD *et al.*, 2018), ajudando o microrganismo resistir aos antimicrobianos e ao sistema imune do hospedeiro (JONES *et al.*, 2001; YONG; DYKES; CHOO, 2019). Além disso, a presença de biofilmes contribui para a persistência do microrganismo tornando estas infecções crônicas, tais como ocorrem em infecções de feridas, rinosinusites e infecções por dispositivos médicos implantados (ARCHER *et al.*, 2011). Infecções associadas a biofilmes representam 80% das infecções hospitalares – com destaque para osteomielite e endocardite (DEL POZO, 2018) - sendo *S. aureus* a espécie mais prevalente neste cenário (BRYERS, 2008; RÖMLING; BALSALOBRE, 2012). Ademais, essas infecções são onerosas para os sistemas de saúde, aumentam o tempo de internação e, conseqüentemente, a mortalidade dos pacientes acometidos (BHATTACHARYA *et al.*, 2015).

### 3.2.1 TRATAMENTO E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A terapia antimicrobiana possibilitou avanços na saúde humana, com desenvolvimento significativo durante o século XX. Contudo, ela fez com que os microrganismos resistentes aos antimicrobianos fossem selecionados, de modo que o cenário atual seja marcado pela emergência de cepas multirresistentes, poucas opções terapêuticas e dificuldade no desenvolvimento de antimicrobianos eficientes (SAGA; YAMAGUCHI, 2009). Além disso, o uso inadequado desses antimicrobianos e a globalização são fatores que contribuíram para a evolução da resistência antimicrobiana pelos microrganismos (COHEN, 1992; TOMASZ, 1994; SWARTZ, 1997).

Nesse contexto, *S. aureus* é conhecido pela notória capacidade de desenvolver resistência às diferentes classes de antimicrobianos (PANTOSTI; SANCHINI; MONACO, 2007; CHAMBERS; DELEO, 2009).

O tratamento de infecções causadas por *S. aureus* é complexo e, para ser efetivo, é crucial que os exames laboratoriais comprovem que este microrganismo está causando uma infecção clínica relevante, posto que *S. aureus* também faz parte da microbiota humana (DAVID; DAUM, 2017).

Uma vez que a maioria de *S. aureus* isolados de infecções humanas são resistentes à penicilina (CHAMBERS, 2001), seu uso é restrito para o tratamento de infecções causadas por este microrganismo. As infecções não-invasivas causadas por MSSA são tratadas com beta-lactâmicos (LIU *et al.*, 2011), como as cefalosporinas (RAYNER; MUNCKHOF; 2005); e para MRSA, o tratamento é realizado com clindamicina, sulfametoxazol-trimetoprim, doxaciclina (RUHE; MENON, 2007) ou linezolidina (ITANI *et al.*, 2010). No caso das infecções invasivas causadas por MSSA e MRSA, o tratamento de primeira linha consiste no uso de beta-lactâmicos de quarta geração e vancomicina, respectivamente (LIU *et al.*, 2011).

Apesar de seu grande sucesso terapêutico em doenças infecciosas, a penicilina, introduzida nos anos 1940, foi efetiva contra *S. aureus* por um curto período, uma vez que a resistência a este antimicrobiano foi rapidamente descoberta (HARKINS *et al.*, 2017). Em 1959, como alternativa para o tratamento de *S. aureus* resistentes à penicilina, o  $\beta$ -lactâmico semissintético conhecido como meticilina (celbenina) foi introduzido na prática clínica (KNOX, 1960). No entanto, na Inglaterra em 1961, ou seja, pouco tempo depois da introdução desse antimicrobiano, descobriu-se que já existiam isolados de *S. aureus* resistentes ao mesmo (JEVONS, 1961). Devido à sua toxicidade, a meticilina foi substituída por penicilinas similares

como a oxacilina, mas o termo *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) continua sendo utilizado (LEE *et al.*, 2018).

Atualmente, MRSA é classificado como uma séria ameaça à saúde pública pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC); um patógeno com alta capacidade de adaptação, que emergiu primeiramente no ambiente hospitalar, e tornou-se preocupante pela presença na comunidade e até mesmo em animais (LAKHUNDI; ZHANG, 2018). MRSA ainda se enquadra como importante causa de mortalidade em pacientes no mundo todo, principalmente nos casos de endocardite e bacteremia (GAJDÁCS, 2019); na América Latina é o principal causador de infecções hospitalares (CABLOCO *et al.*, 2013).

Geneticamente, a resistência à meticilina em *S. aureus* é mediada por um cassete cromossômico, que pode ser adquirido por transferência horizontal, conhecido como *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*) (KATAYAMA; ITO; HIRAMATSU, 2000). Até o momento, doze tipos de SCC*mec* (I-XII) foram identificados (LEE *et al.*, 2018), os quais contêm o gene *mecA* em todos os tipos ou um homólogo *mecC* encontrado no SCC*mec* tipo XI. O gene *mecA* codifica uma transpeptidase relacionada com a síntese de peptidoglicano denominada proteína de ligação à penicilina (PBP) do tipo 2a (PBP2a) cuja função é efetuar ligações cruzadas no peptidoglicano da parede celular bacteriana. A resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pode ser atribuída ao fato de que a PBP2a possui baixa afinidade por essa classe de antimicrobianos quando comparada com as proteínas PBP de *S. aureus* sensíveis à meticilina (HARTMAN; TOMASZ, 1984; MATTHEWS; TOMASZ, 1990). Além dos genes *mecA* e *mecC*, outro mecanismo de resistência à meticilina ainda não elucidado, foi encontrado e tem relação com um plasmídeo carreador do gene *mecB* (BECKER *et al.*, 2018). É interessante observar, que *mecC* assim como *mecA*, pode ter evoluído em cepas de *S. aureus* adaptadas a animais – o que mostra a importância das cepas de origem animal como reservatório de genes de resistência (PATERSON; HARRISON; HOLMES, 2014). Análogos do gene *mecA* de *S. aureus* foram reportados em *Staphylococcus* spp. isolados de roedores (COUTO *et al.*, 1996), cavalos (SCHNELLMANN *et al.*, 2006), animais de companhia (WALTHER *et al.*, 2012), suínos (TULINSKI *et al.*, 2012), bovinos (GARCÍA-ÁLVAREZ *et al.*, 2011), entre outros. Além disso, a presença de MRSA em animais de consumo está associada com a transmissão deste microrganismo para humanos (PANTOSTI, 2012).

Como o tratamento de infecções severas por MRSA ainda é realizado com a vancomicina, a resistência a este antibiótico é extremamente preocupante (MCGUINESS; MALACHOWA; DELEO, 2017). A vancomicina é um glicopeptídeo que impede o remodelamento do peptidoglicano por meio de transglicosilação e transpeptidação catalisadas

pelas PBP2 e PBP2a (HAMMES; NEUHAUS, 1974; ZENG *et al.*, 2016); foi aprovada para uso clínico em 1958, tornando-se um antibiótico de escolha para o tratamento de infecções causadas por MRSA em 1980 (SORRELL *et al.*, 1982; LEVINE, 2006). Naquele ano, a resistência à vancomicina foi descoberta em enterococos, o que tornou preocupante seu uso posterior como tratamento eficaz para MRSA (MURRAY, 2000). Em 2002, o primeiro isolado *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA, *vancomycin resistant Staphylococcus aureus*) foi reportado nos Estados Unidos (CHANG *et al.*, 2003). No Brasil, o primeiro relato ocorreu em 2001 na cidade de São Paulo, a partir de um estudo com 140 *S. aureus* isolados de pacientes hospitalizados submetidos ao uso de vancomicina (OLIVEIRA; LEVY, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Em relação a outros antimicrobianos para o tratamento de infecções por *S. aureus* na prática clínica, a clindamicina é muito utilizada para MRSA, devido à sua ótima penetração tissular (PATEL *et al.*, 2006; BOTTEGA *et al.*, 2014). No entanto, não deve ser utilizada em infecções causadas por isolados com resistência induzível à clindamicina, o que ressalta a importância da realização do teste-D na rotina hospitalar para diminuir falhas terapêuticas (O'SULLIVAN *et al.*, 2006; LALL; SAHNI, 2014; GHOSH; BANERJEE, 2016). No gênero *Staphylococcus*, a resistência à clindamicina está associada aos genes *erm*, responsáveis pela metilação de um resíduo de adenina presente na subunidade ribossomal 23S, ocasionando também resistência à eritromicina (LECLERCQ, 2002).

Infecções de pele e tecidos moles causadas por MSSA e MRSA estão cada vez mais sendo tratadas por sulfametoxazol- trimetoprim e tetraciclina (doxaciclina) (MOET *et al.*, 2007); a resistência ao sulfametoxazol está relacionada às mutações cromossômicas e a aquisição do gene *dfrA* confere resistência ao trimetoprim (MARANAN *et al.*, 1997). Além disso, a resistência às tetraciclina pode envolver efluxo do antimicrobiano, relacionado com os genes *tetK* e *tetL*, e proteção ribossomal mediada pelos genes *tetM* e *tetO* (RUHE *et al.*, 2005).

A linezolida, uma oxazolidinona com uso clínico aprovado em 2000 para uso em infecções de alta complexidade terapêutica causadas por MRSA (BRICKNER *et al.*, 2008), ainda é eficaz para o tratamento de infecções causadas por cepas Gram-positivas multirresistentes (STEFANI *et al.*, 2010). Apesar da resistência à linezolida ainda ser rara, seus mecanismos já foram reportados envolvendo principalmente o gene *cfr* (TOH *et al.*, 2007). Este codifica uma metiltransferase que catalisa a metilação do RNA ribossomal 23S na posição A2503, conferindo resistência ao cloranfenicol e clindamicina (KEHRENBERG *et al.*, 2005), além da linezolida (TOH *et al.*, 2007).

### 3.3 BIOFILMES DE *S. AUREUS*

Além da resistência aos antimicrobianos, um dos desafios encontrados no tratamento das infecções causadas por *S. aureus*, consiste na capacidade que esse microrganismo possui de formar biofilmes, o que leva ao estabelecimento de infecções crônicas (WARYAH *et al.*, 2017); as quais geralmente requerem, para o seu tratamento, o uso de antimicrobianos em doses mais altas e por períodos prolongados (FEUILLIE *et al.*, 2017).

Biofilmes podem ser definidos como comunidades microbianas aderidas a uma superfície e envoltas por uma matriz extracelular composta por exopolímeros (VERT *et al.*, 2012). O termo biofilme foi concebido em 1981, referindo-se a comunidades microbianas sésseis (MCCOY *et al.*, 1981), e o mecanismo básico pelo qual as bactérias se aderiam a superfícies formando essas comunidades foi inicialmente reportado em 1978 (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978).

O processo de formação dos biofilmes envolve mudanças no metabolismo do microrganismo, que deve passar do estado planctônico para o sésil e iniciar a produção de adesinas e matriz extracelular, as quais são importantes na manutenção da estrutura espacial do biofilme. Essa matriz funciona como um esqueleto que favorece a conexão entre as células, permitindo a adesão e interação com outras células (TOLKER-NIELSEN, 2015); a presença de canais permite que ar, água e nutrientes se distribuam por todo o biofilme (ZHANG; BISHOP; KUPFERLE, 1998).

As bactérias existem na natureza predominantemente em estado sésil, e adotam o estilo de vida planctônico apenas quando se dissociam de um biofilme para formar um novo biofilme em outra localidade (TOLKER-NIELSEN, 2014). Essa forma cooperativa de crescimento oferece muitas vantagens à bactéria em relação ao modo de vida planctônico (JEFFERSON, 2004). Por exemplo, ao se aderirem a uma superfície ou tecido, a remoção das bactérias pelo fluxo de água ou pela corrente sanguínea se torna mais difícil (RASMUSSEN; GIVSKOV, 2006).

Muitos microrganismos são capazes de formar biofilmes aderindo-se tanto às superfícies abióticas quanto bióticas, no intuito de aumentarem sua sobrevivência naquele sítio (COSTERTON; MONTANARO; ARCIOLA, 2005). Bactérias formadoras de biofilmes estão relacionadas a infecções crônicas e difíceis de tratar, incluindo infecções associadas a dispositivos implantados (ARCHER *et al.*, 2011; KIRMUSAOGLU, 2016), como próteses ortopédicas, marcapassos, válvulas cardíacas e cateteres vasculares (MCCONOUGHNEY *et al.*, 2014).

Condições adversas como limitação de nutrientes e condições físicas (fluxo de cisalhamento e pressão osmótica) podem desencadear a formação do biofilme (ARCIOLA *et al.*, 2005; HØIBY *et al.*, 2011), a qual envolve quatro estágios: adesão, formação de microcolônias, maturação e dispersão (ROSENTHAL; MOOTZ; HORSWILL, 2014). Além disso, características físico-químicas do substrato, como rigidez da superfície, estabilidade mecânica, elasticidade, topografia e composição influenciam na formação do biofilme (RENNER; WEIBEL, 2011).

Para que a adesão ocorra, células planctônicas devem ligar-se à uma superfície abiótica ou biótica (como um cateter ou tecido do hospedeiro) por meio de interações hidrofóbicas ou mediadas por proteínas da família de MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), respectivamente (MOORMEIER; BAYLES, 2017). Esta família tem como característica a presença de ao menos dois domínios (IgG-*folded*) na região N-terminal A (FOSTER *et al.*, 2014) e as MSCRAMMs denominadas SdrC e FnBPs estão relacionadas com a formação de biofilme em *S. aureus* (BARBU *et al.*, 2014; HERMAN-BAUSIER *et al.*, 2015). Uma vez aderidas, células de *S. aureus* multiplicam-se formando pequenos agregados, que recebem o nome de microcolônias e caracterizam o segundo estágio de formação do biofilme, que é intermediário à adesão e ao estabelecimento do biofilme maduro (ROSENTHAL; MOOTZ; HORSWILL, 2014).

Durante o processo de maturação, o biofilme se desenvolve a partir de uma fina camada que dá origem a uma estrutura em forma de torre ou cogumelo, de modo que biofilmes espessos podem apresentar mais de cem camadas, nas quais as bactérias se organizam de acordo com seu metabolismo e tolerância ao oxigênio (RABIN *et al.*, 2015). Ainda, esse estágio envolve a divisão celular e a produção da matriz extracelular polimérica, composta por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. No entanto, essa composição é variável entre as cepas de *S. aureus* (CUE *et al.*, 2012; FOSTER *et al.*, 2014). Um polissacarídeo que pode ser encontrado na matriz extracelular dos biofilmes de estafilococos recebe o nome de polissacarídeo de adesão intracelular, também conhecido como poli-N-acetilglicosamina (ARCIOLA *et al.*, 2015). Esse componente da matriz extracelular é produzido e secretado por proteínas codificadas pelo operon *ica* (CRAMTON *et al.*, 1999), importante componente genético para a formação de biofilmes por *S. aureus*, que pode ter sua expressão induzida em condições ambientais adversas como a escassez de nutrientes, baixa oxigenação e pressão osmótica. No entanto, *S. aureus* também pode formar biofilmes de forma independente do operon *ica* (FITZPATRICK; HUMPHREYS; OGARA, 2005).

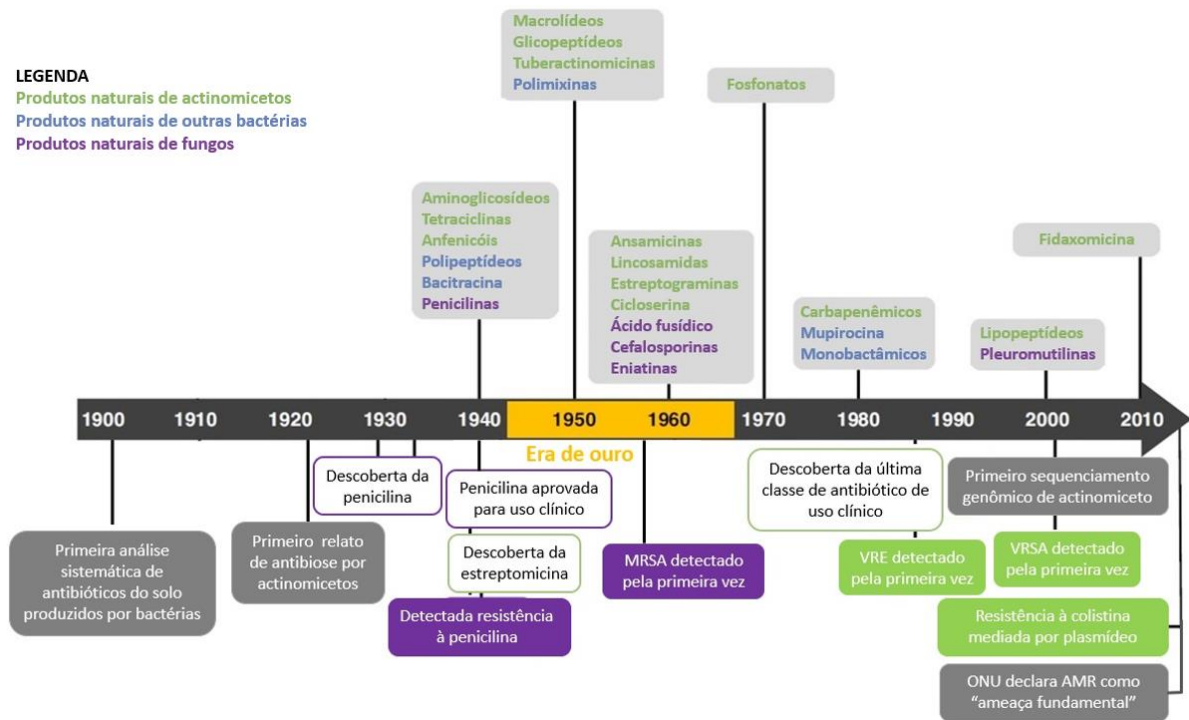
Por fim, a maturação do biofilme culmina na liberação de uma população de células, processo chamado de dispersão e que é influenciado por forças mecânicas, moléculas surfactantes, nucleases e proteases capazes de degradar componentes da matriz. As moléculas efetoras mais importantes no processo de dispersão são as PSMs (*phenol soluble modulins*); reguladas pelo sistema de *quorum sensing* Agr, o qual modula a expressão gênica de acordo com variações na densidade celular (LE *et al.*, 2014). Essas moléculas são produzidas em maiores quantidades, quando o sistema Agr tem sua expressão gênica aumentada (WANG *et al.*, 2007), favorecendo a quebra de interações célula-célula, liberação das bactérias a partir do biofilme, ou seja, estimulam o processo de dispersão, além de controlar a espessura e expansão do biofilme. Além disso, a dispersão é de extrema importância em infecções persistentes devido à presença de biofilmes, uma vez que permite que as bactérias se espalhem pelos fluidos biológicos, como o sangue, e atinjam novos sítios infecciosos (OTTO, 2008; WANG *et al.*, 2011).

#### 3.4 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEM NATURAL

No decurso da história, produtos naturais derivados de animais e plantas têm sido utilizados como fonte de inúmeras preparações médicas. Atualmente, estes compostos continuam sendo estudados, com interesse especial em substâncias com propriedades antioxidante, anticâncer e antimicrobiana (ROSSITER; FLETCHER; WUEST, 2017), sendo caracterizados por sua ampla biodisponibilidade e facilidade de biodegradação (SEOW *et al.*, 2013).

Além dos antimicrobianos naturais de origem vegetal e animal, é importante destacar que os microrganismos podem fornecer uma gama de metabólitos secundários (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2012); os quais são precursores da maioria das classes de antimicrobianos disponíveis, como  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, rifamicinas, glicopeptídeos, estreptograminas e lipopeptídeos (BUTLER; BLASKOVICH; COOPER, 2013). É importante ressaltar que mais de dois terços dos antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções humanas são de origem microbiana, ou derivados semissintéticos dessas moléculas (WALSH, 2003; CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006). Estes antimicrobianos estão representados na Figura 1; com destaque para a penicilina (FLEMING, 1929) e a estreptomicina (SCHATZ; BUGLE; WAKSMAN, 1944), já que estas substâncias deram origem a era de ouro dos antimicrobianos e consolidaram a base da indústria farmacêutica americana (DAVIES, 2006).

**Figura 1** - Linha do tempo para descoberta dos antimicrobianos de origem natural. **Verde:** produtos naturais de actinomicetos; **azul:** produtos naturais de outras bactérias e **roxo:** produtos naturais de fungos. ONU: Organização das Nações Unidas; AMR: Resistência aos antimicrobianos (*Antimicrobial resistance*).



**Fonte:** Adaptado de Hutchings; Truman (2019).

Por muitos anos a penicilina foi um dos achados terapêuticos mais importantes para a humanidade, mas a constante emergência de bactérias resistentes fez com que os pesquisadores continuassem a busca por novos antimicrobianos (LAURSEN; NIELSEN, 2004). Vinte e dois novos antibióticos foram produzidos a partir do ano 2000, dos quais apenas cinco correspondem a novas classes de compostos (BUTLER; BLASKOVICH; COOPER, 2013) e destas novas classes, três tiveram sua origem a partir de produtos naturais e são representadas pelos antibióticos daptomicina, retapamulina e fidaxomicina (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

A ausência de novos antimicrobianos pode ser correlacionada com a falta de novos princípios ativos advindos de produtos de origem natural (KIRST, 2013). Além disso, como os antimicrobianos disponíveis podem ser insuficientes para o tratamento de infecções por microrganismos multirresistentes, é de vital importância a pesquisa por novos e melhores agentes anti-infecciosos (HÖGBERG; HEDDINI; CARS, 2010).

Nesse sentido, uma importante fonte de pesquisa são os metabólitos secundários obtidos a partir de bactérias (MALIK, 1980; LAURSEN; NIELSEN, 2004;); sendo as espécies do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* as principais produtoras (BÉRDY, 2005). Assim, os

metabólitos secundários de *Pseudomonas* spp. têm sido amplamente estudados, identificados e caracterizados como substâncias antimicrobianas; além de apresentarem propriedades antimetabólica e anti-helmíntica, entre outras (BÉRDY, 2005; SPAGO *et al.*, 2014; SHAHID; MALIK; MEHNAZ, 2018)

### 3.5 FRAÇÃO F4A OBTIDA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CEPA LV

O gênero *Pseudomonas* é composto por bactérias Gram-negativas aeróbicas em formato de bacilo e não formadoras de esporos; são ubíquas, e capazes de adotar estilo de vida planctônico e sésil; apresentam notável diversidade metabólica, além de importância médica e biotecnológica (ÖZEN; USSERY, 2011). As bactérias deste gênero são conhecidas pela produção de metabólitos secundários bioativos (BILAL *et al.*, 2017).

Um desses compostos é a fração F4A, escolhida para o presente trabalho, derivada do metabolismo de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV (Patente PI0803350-1 – INPI 12/09/2009) (ANDRADE, 2008). Esta bactéria foi isolada a partir de uma lesão de cancro cítrico em uma laranja (*Citrus sinensis* var. Valencia), na cidade de Astorga, PR (GIONCO *et al.*, 2017). Para a produção de metabólitos com atividade antibiótica, esta cepa deve ser cultivada em caldo nutriente suplementado com cloreto de cobre (0,5% peptona, 0,3% extrato de carne, 0,05%  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; pH 6.8) à temperatura ambiente ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016). Após o cultivo, o sobrenadante obtido, livre de células, é submetido a extração com diclorometano para obtenção dos metabólitos secundários de baixa polaridade. Em seguida, este extrato é submetido à cromatografia líquida a vácuo, na qual a coluna cromatográfica é eluída sequencialmente com vários solventes para obtenção da fração F4A, que finalmente é monitorada por cromatografia de camada delgada e liofilizada (MUNHOZ *et al.*, 2017).

Estudos com a fração F4A têm descrito a atividade antibacteriana em fitopatógenos. Munhoz *et al.* (2017) reportaram uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 7,81  $\mu\text{g/mL}$  para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, bactéria responsável pelo apodrecimento do caule de tomateiros. Pesquisadores do mesmo grupo relataram que a fração F4A foi eficaz para reduzir a população de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, bactéria causadora da doença conhecida como Huanglongbing ou “greening” em *Citrus sinensis* cv. Valencia (PISTORI *et al.*, 2018).

Pistori *et al.* (2018) mostraram que a fração F4A é composta pelas substâncias fenazina-1-ácido carboxílico (PCA), composto antibiótico organocúprico (OAC), fenazina-1-carboxamida (PCN) e indolin-3-ona (IND). O trabalho realizado por de Oliveira *et al.* (2016)

mostrou que a substância OAC apresentou significativa atividade antimicrobiana, sendo a CIM igual a 0,12 µg/mL para o fitopatógeno *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Em relação ao âmbito clínico humano, a fração F3 (fracionada com acetato de etila), também obtida a partir da cepa *P. aeruginosa* LV, e composta principalmente por PCN e OAC, apresentou CIM na faixa de 125 µg/mL frente a MRSA (cepas N315, BEC9393 e Rib1). A fração F3d, mais purificada que a F3, apresentou o mesmo valor de CIM para estas cepas (CARDOZO *et al.*, 2013), bem como atividade antibacteriana contra a cepa de referência *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 e mais sete isolados clínicos da mesma espécie com uma CIM de 62,5 µg/mL. Ainda, verificou-se que após 8 h de tratamento com a CIM da F3d, houve redução significativa no número de unidades formadoras de colônia (UFC) da cepa Kpn-KPC3 (KERBAUY *et al.*, 2016).

A partir do trabalho de Navarro *et al.* (2019), o composto antibiótico organocúprico (OAC), presente na fração F4A, foi identificado como fluopsina C por meio das técnicas de espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear (NMR), espectroscopia de infravermelho e microanálises de raios-X, precedidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A substância apresentou elevada atividade antibacteriana, com valores de CIM e CBM inferiores a 2 µg/mL para *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *Enterococcus faecium*, ou seja, valores muito abaixo da CIM da fração F3d (NAVARRO *et al.*, 2019). Esses dados indicam que a atividade antimicrobiana da fração F3d seja devido a presença de fluopsina C, indicando seu potencial para o desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento de infecções causadas por microrganismos multirresistentes. Assim, novos estudos para caracterização do mecanismo de ação, eficácia *in vivo* e segurança para o homem devem ser realizados.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os vinte e seis isolados clínicos de *S. aureus* foram selecionados a partir da coleção de bactérias do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos do Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os isolados MSSA (n=9) foram isolados a partir de *swab* nasal e os isolados MRSA (n=17), a partir de fragmento de tecido, e sua identificação e perfil de resistência foram descritas previamente por Danelli (2019) e de Oliveira *et al.* (2015) respectivamente (Tabela 2). MSSA ATCC 29213 (isolado de ferida) e MRSA BEC/BMB 9393 (isolado de infecção de corrente sanguínea, AMARAL *et al.*, 2015) foram incluídos nos experimentos. As cepas de referência foram cedidas gentilmente pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade – INCQS-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. Os microrganismos foram estocados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid) contendo 30%, à -80°C. Para a realização dos experimentos, alíquotas foram transferidas do estoque para tubos de vidro esterilizados contendo 3 mL de TSB (*Tryptic Soy Broth*), cultivados por 24 h à 37°C em incubadora com agitação orbital.

### 4.2 FRAÇÃO F4A E FLUOPSINA C

A fração F4A e a fluopsina C foram fornecidas pelo Prof. Dr. Galdino Andrade do Laboratório de Ecologia Microbiana da UEL, onde foram obtidas a partir do sobrenadante de culturas de *Pseudomonas aeruginosa* LV, segundo Munhoz *et al.* (2017) e Navarro *et al.* (2019), respectivamente. Os testes foram realizados a partir de soluções estoque dos produtos (4 mg/mL), previamente preparados em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, USA). DMSO não excedeu 1,25% nos ensaios.

### 4.3 ATIVIDADE DA FRAÇÃO F4A E FLUOPSINA C SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS

A concentração inibitória mínima (CIM) da fração F4A e fluopsina C foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018) – F4A foi testada em todos os microrganismos e fluopsina C apenas nas cepas de referência. Os metabólitos foram diluídos seriadamente, razão 2 (50 - 0,2 µg/mL) em caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado (CAMHB, Becton, Dickinson and Company, USA)

previamente distribuído em placas de microtitulação de poliestireno contendo 96 poços, fundo “U”. Uma suspensão celular preparada em salina esterilizada a partir de culturas bacterianas recentes, de cada isolado testado, foi transferida aos poços para que a densidade celular final fosse de  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Como controle negativo (controle de esterilidade) foram utilizados poços contendo apenas CAMHB e para controle positivo (controle de crescimento) foram utilizados poços sem tratamento – apenas com CAMHB e o inóculo bacteriano –, e ainda, para confirmar que o DMSO não interferiu no teste, poços contendo CAMHB e DMSO na maior concentração utilizada (1,25%) foram utilizados como controle do solvente. Após 24h de incubação em estufa bacteriológica à 37°C, a CIM foi definida a partir do poço com a menor concentração do tratamento capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano visível. Além disso, para determinar a concentração bactericida mínima (CBM), 10 µL de cada poço sem crescimento visível foram inoculados em Mueller-Hinton Agar (MHA). Após incubação por 24h à 37°C a CBM foi definida como a menor concentração que foi capaz de reduzir o número de UFCs a zero, comparando com o controle de crescimento não tratado.

#### 4.4 CURVA DE MORTE

Para a análise da cinética do tempo de morte (CLSI, 1999), células planctônicas ( $5 \times 10^5$  UFC/mL) dos microrganismos escolhidos foram tratadas com as concentrações inibitória e bactericida da fração F4A em CAMHB. O critério de seleção para todos os isolados baseou-se no fenótipo de resistência e, além disso, os isolados MRSA foram selecionados de acordo com os tipos de SCC*mec*. Nos tempos (0, 4, 8, 12 e 24 h), 20 µL de cada tratamento foram diluídos seriadamente (1:10) em salina esterilizada. Para contagem de UFC, uma alíquota de 10 µL de cada diluição foi inoculada em MHA, o qual foi incubado por 24 h à 37 °C. Os testes foram realizados em duplicata e em três ocasiões e um gráfico de log UFC/mL *versus* tempo foi construído com a média dos resultados

#### 4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As cepas de referência *S. aureus* ATCC 29213 e BEC/BMB 9393 foram tratadas com a fração F4A (CIM e CBM) em CAMHB, durante 4h à 37°C. Células com e sem tratamento foram fixadas à temperatura ambiente por 2 h com tampão cacodilato de sódio 0,1 M contendo 2,5% de glutaraldeído, pH 7,4, seguido de pós-fixação em 1% OsO<sub>4</sub> em tampão cacodilato

contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio e  $\text{CaCl}_2$  5mM por 2 h. As células foram desidratadas em acetona e embebidas em resina epóxi por 72 h à 60°C. As seções ultrafinas foram obtidas com um ultramicrotomo Leica e as grades contendo as seções foram coradas com acetato de uranil a 5% e citrato de chumbo para observação em um microscópio eletrônico JEOL JEM-1400 à 80 kV.

#### 4.6 ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA FRAÇÃO F4A

O biofilme de todos os microrganismos foi formado em placas de microtitulação de 96 poços de poliestireno fundo chato segundo metodologia descrita por Stepanović *et al.* (2007), com modificações. *S. aureus* foi cultivado à 37°C por 24 h em TSB e a densidade celular ajustada com auxílio da escala 0.5 McFarland ( $\sim 1 \times 10^8$  células/mL) em solução salina, seguido por uma diluição 1:100 ( $\sim 1 \times 10^6$  células/mL). Para formação do biofilme, uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  da diluição foi adicionada em cada poço contendo 180  $\mu\text{L}$  de TSB suplementado com 1% de glicose de modo que o inóculo teste foi de  $\sim 1 \times 10^5$  células/mL. O sistema foi incubado por 24 h à 37°C. Após esse período, para avaliar a atividade do composto sobre o biofilme formado, o meio de cultura foi retirado e cada poço lavado cuidadosamente com solução salina e 200  $\mu\text{L}$  de CAMHB contendo diferentes concentrações (1,56 a 25,0  $\mu\text{g/mL}$ ) da fração F4A foram adicionadas aos poços contendo os biofilmes e a incubação prosseguiu por mais 24 h. Biofilmes sem tratamento, acrescidos apenas de meio de cultura, e poços com meio de cultura sem biofilme, foram utilizados como controle de crescimento e controle de esterilidade, respectivamente. A atividade metabólica das células sésseis foi quantificada pelo método de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2, 5-difenil-2H-tetrazólio) de acordo com Schillaci *et al.* (2008), com modificações. Após o tempo de incubação de cada teste, o meio de cultura foi retirado e o biofilme foi lavado cuidadosamente duas vezes com solução salina e incubado com 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato-salina (PBS), 1X pH 7,2, contendo MTT (Sigma Aldrich, USA) à 0,5 mg/mL por 2 h (WALECKA *et al.*, 2008) à 37°C em ausência de luz. Após 2 h, os cristais de formazan oriundos da metabolização do MTT, foram incubados sob agitação com solvente recomendado pelo fabricante (10% triton x-100, HCl 0,1N em isopropanol), por 15 minutos (WALECKA *et al.*, 2008). A densidade óptica (DO) foi determinada em 550 nm (SHI *et al.*, 2007) utilizando uma leitora de placas (Synergy<sup>TM</sup> HT, Biotek®). Os testes foram realizados em quintuplicata e em duas ocasiões. Os valores de concentração inibitória mínima sésseis (SCIM) foram determinados por meio da menor

concentração da fração F4A que foi capaz de inibir a atividade metabólica do biofilme pelo menos em 50% (SCIM<sub>50</sub>) e 90% (SCIM<sub>90</sub>) (TEANPAISAN *et al.*, 2017).

#### 4.7 ATIVIDADE HEMOLÍTICA DA FRAÇÃO F4A EM ERITRÓCITOS HUMANOS

A atividade hemolítica da fração F4A foi avaliada sobre eritrócitos humanos coletados de um doador saudável, respeitando os critérios estabelecidos pela Declaração de Helsinque. O sangue foi coletado, desfibrinado e as células lavadas com salina glicosilada (NaCl 0,85% acrescido de 5% de glicose). Uma suspensão de eritrócitos (3%) foi preparada em salina glicosilada e transferida para poços das placas de microtitulação 96 poços fundo “U”. As células foram incubadas com diferentes concentrações da fração F4A (50 a 0,1 µg/mL) e Triton X-100 (1%) foi utilizado como controle positivo (controle de hemólise). Após incubação por 3 h a 37 °C, as microplacas foram centrifugadas (1000 x g por 10 min), os sobrenadantes foram transferidos para novas microplacas e a leitura da DO foi realizada a 550 nm (IZUMI *et al.*, 2012). A porcentagem de hemólise (x) foi calculada através da fórmula  $x = \frac{DOT-DOCN}{DOCP-DOCN} \times 100$ , na qual DOT representa a densidade óptica teste, DOC a densidade óptica controle e DOCN a densidade óptica do controle negativo (ausência de hemólise).

#### 4.8 CITOTOXICIDADE DA FRAÇÃO F4A EM CÉLULAS LLC-MK2

A citotoxicidade da fração F4A foi investigada em células da linhagem LLCMK2, cultivadas em *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Gibco Invitrogen Co., Grand Island, NY) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS, Gibco Invitrogen Co.), 100 IU/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e mantidas em frascos para cultura celular por 72 h à 37°C e atmosfera à 5% de CO<sub>2</sub>. Às células foram adicionadas diferentes concentrações da fração F4A (0,195 a 100 µg/mL). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2, 5-difenil-2H-tetrazólio) a formazan, de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura da DO foi realizada a 570 nm e 690 nm. A viabilidade celular (x) foi expressa em porcentagem segundo a equação:  $x = \frac{DOT-DOB}{DOCN-DOB} \times 100$ , na qual DOT representa a densidade óptica do teste, DOB a densidade óptica do branco (livre de células), DOCN a densidade óptica do controle negativo (não tratado, 100% de viabilidade celular).

#### 4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O *software* GRAPHPAD PRISM versão 8.0.0 (GraphPad Software, San Diego, California USA) foi utilizado para as análises estatísticas. Para a curva de morte e citotoxicidade foi utilizado ANOVA *One-Way* seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunett e, para o teste da fração F4A sobre o biofilme formado, os valores médios foram testados por ANOVA *Two-Way* seguido também pelo teste de comparações múltiplas de Dunett. P-valores menores que 0,05 foram considerados significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 F4A INIBE O CRESCIMENTO DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS DE *S. AUREUS*

Neste trabalho, um total de vinte e seis isolados clínicos de *S. aureus* previamente caracterizados como MSSA (DANELLI, 2019) e MRSA (DE OLIVEIRA et al., 2015), bem como as cepas de referência *S. aureus* ATCC 29213 e BEC 9393 foram utilizados para determinar os valores de CIM e CBM da fração F4A. Entre os isolados MRSA, todos foram classificados como multirresistentes de acordo com Magiorakos et al. (2012), e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Em relação aos isolados clínicos, 19 (73,1%) apresentaram CIM de 3,13 µg/mL, 6 (23,1%) apresentaram CIM de 1,56 µg/mL e 1 (isolado 3,8%) apresentou CIM de 6,25 µg/mL; não houve diferença entre os valores de CIM para os isolados MSSA (1,56 a 6,25 µg/mL) e MRSA (1,56 a 3,13 µg/mL). Quanto à CBM, os isolados MSSA apresentaram valores de 3,13 a 12,5 µg/mL e os MRSA de 1,56 a 3,13 µg/mL. Dezoito isolados (69,2%) apresentaram os mesmos valores de CIM e CBM. Notavelmente, a CBM de 3,13 µg/mL foi detectada em 84,6% dos isolados de *S. aureus* estudados. PSA 39 apresentou os valores de CIM e CBM mais baixos (ambos 1,56 µg/mL), enquanto o isolado SNA 200 apresentou os valores mais altos (6,25 µg/mL e 12,5 µg/mL), respectivamente.

### 5.2 A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA FRAÇÃO F4A PODE ESTAR RELACIONADA COM A PRESENÇA DE FLUOPSINA C

A composição da fração F4A foi determinada previamente, e quatro compostos foram identificados: composto antibiótico organocúprico (OAC), fenazina-1-carboxamida (PCN), fenazina-1-ácido carboxílico (PCA) e indolin-3-ona (Pistori et al., 2018). Para determinar o componente ativo da fração F4A, a CIM e CBM de cada componente foram determinadas para as cepas de referência de *S. aureus*. Somente a fluopsina C exibiu efeito inibitório nas células planctônicas, com valores de CIM e CBM de 1,56 µg/mL e 3,13 µg/mL para ambas as cepas, respectivamente. Estes valores não diferiram daqueles obtidos para a fração F4A (Tabela 2), indicando que a fluopsina C é o componente antimicrobiano ativo.

**Tabela 2** – Atividade antibacteriana e antibiofilme da fração F4A contra *Staphylococcus aureus*.

Microrganismo	SCCmec <sup>1</sup>	Perfil de resistência aos antimicrobianos <sup>2</sup>	Fração F4A			
			CIM (µg/mL) <sup>a</sup>	CBM (µg/mL) <sup>b</sup>	SCIM <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>c</sup>	SCIM <sub>90</sub> (µg/mL) <sup>d</sup>
MSSA <sup>e</sup> (n=9)						
SNA 66	-	PEN, CLI, ERI	3,13	6,25	6,25	12,5
SNA 115	-	PEN, CLI, ERI	3,13	3,13	12,5	>25
SNA 136	-	PEN, CLI, ERI	3,13	3,13	12,5	25
SNA 148	-	PEN, ERI	3,13	3,13	12,5	>25
SNA 161	-	PEN	3,13	3,13	12,5	>25
SNA 200	-	PEN, SXT	6,25	12,5	6,25	25
SNA 284	-	PEN, ERI, SXT	3,13	3,13	12,5	>25
SNA 299	-	PEN	3,13	3,13	12,5	>25
SNA 317	-	PEN	3,13	6,25	6,25	25
<b>ATCC 29213</b>	-	-	<b>1,56</b>	<b>1,56</b>	<b>12,5</b>	<b>25</b>
MRSA <sup>f</sup> (n= 17)						
PSA 1	II	FOX, OXA, PEN, CLI, ERI, CIP	1,56	3,13	6,25	12,5
PSA 12	I	FOX, OXA, PEN, GEN, CLI, ERI, CIP	1,56	3,13	12,5	25
PSA 19	NT	FOX, OXA, PEN, GEN, CLI, ERI, TET, CIP, SXT	3,13	3,13	6,25	12,5
PSA 24	NT	FOX, OXA, PEN, GEN, CLI, ERI, TET, CIP, SXT	3,13	3,13	6,25	12,5
PSA 26	II	FOX, OXA, PEN, CLI, ERI, CIP, RIF	1,56	3,13	3,13	12,5
PSA 27	NT	FOX, OXA, PEN, GEN, CLI, ERI, CIP, SXT	3,13	3,13	6,25	12,5
PSA 32	II	FOX, OXA, PEN, CLI, ERI, CIP, RIF	3,13	3,13	6,25	12,5
PSA 37	III	FOX, OXA, PEN, GEN, CLI, ERI, TET, CIP, SXT, RIF	1,56	3,13	6,25	12,5
PSA 39	IV	FOX, OXA, PEN, GEN, CLI, ERI, CIP	1,56	1,56	25	>25
PSA 41	II	FOX, OXA, PEN, CLI, ERI, CIP	3,13	3,13	3,13	12,5
PSA 42	I	FOX, OXA, PEN, GEN, CLI, ERI, CIP	1,56	3,13	6,25	>25
PSA 48	I	FOX, OXA, PEN, GEN, CLI, ERI, CIP	3,13	3,13	6,25	25
PSA 94	II	FOX, OXA, PEN, CLI, ERI, CIP	3,13	3,13	6,25	12,5
PSA 104	II	FOX, OXA, PEN, CLI, ERI, CIP	3,13	3,13	6,25	12,5
PSA 124	II	FOX, OXA, PEN, CLI, ERI, CIP	3,13	3,13	6,25	25
PSA 127	NT	FOX, OXA, PEN, GEN, CLI, ERI, TET, CIP, SXT	3,13	3,13	6,25	>25
PSA 130	NT	FOX, OXA, PEN, GEN, CLI, ERI, TET, CIP, SXT	3,13	3,13	12,5	>25
<b>BEC 9393</b>	<b>III</b>	-	<b>1,56</b>	<b>6,25</b>	<b>12,5</b>	<b>25</b>

\*FOX: cefoxitina; OXA: oxacilina; PEN: penicilina; GEN: gentamicina; CLI: clindamicina; ERI: eritromicina; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol.

<sup>1</sup>A tipagem do SCCmec foi realizada previamente por de Oliveira *et al.* (2015).<sup>2</sup>Perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados MSSA e MRSA previamente descrito por Danelli (2019) e de Oliveira *et al.* (2015), respectivamente.

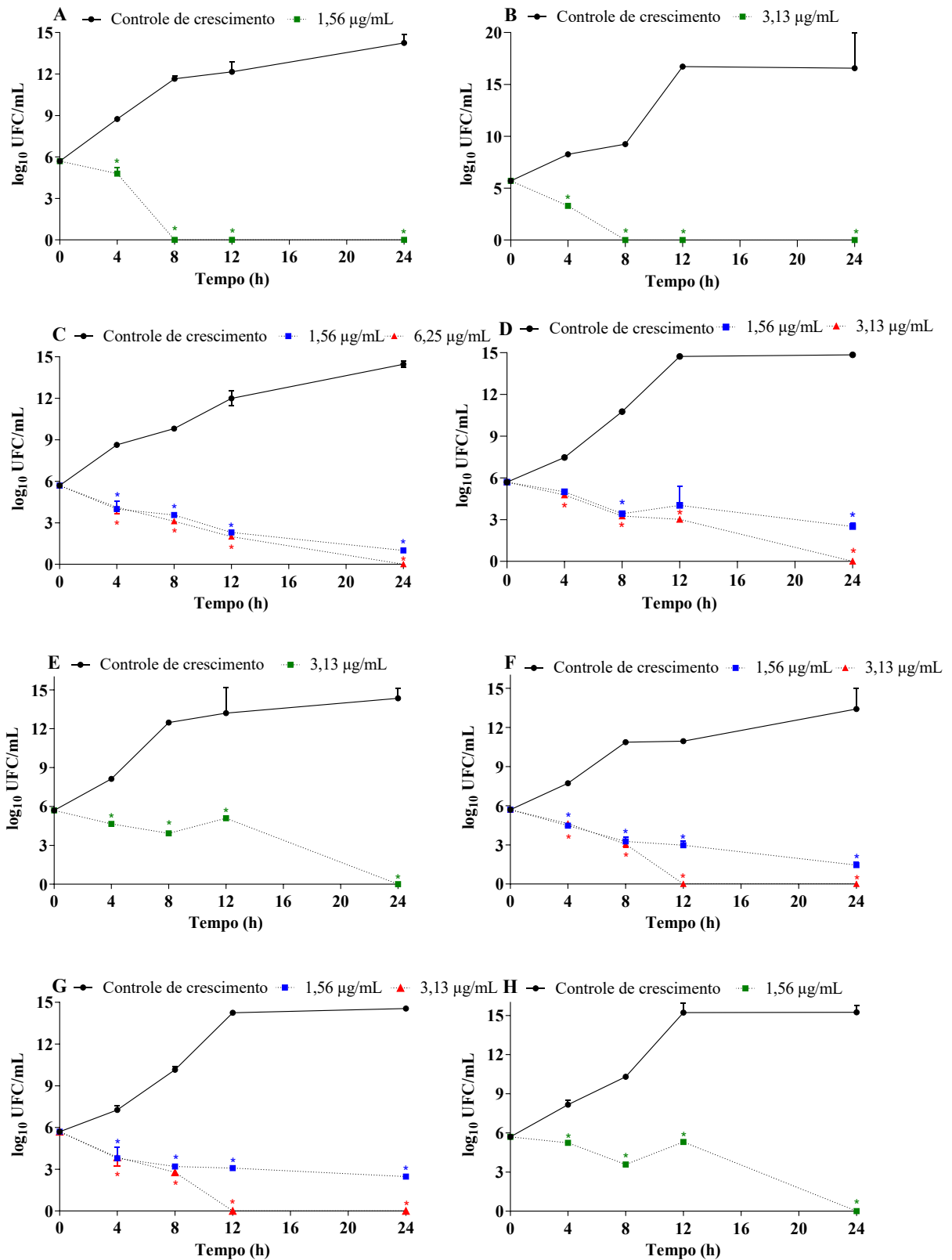
<sup>a</sup>Concentração inibitória mínima (CIM) da fração F4A determinada pelo método de microdiluição preconizado pelo CLSI.

<sup>b</sup>Concentração bactericida mínima (CBM) determinada pela contagem de UFC em *Trypticase soy agar* (TSA). <sup>c,d</sup>Concentração inibitória mínima séssil (SCIM) 50 e 90. <sup>e</sup>MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina. <sup>f</sup>MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

### 5.3 F4A EXIBE EFEITO BACTERICIDA CONTRA *S. AUREUS*

A cinética de crescimento de *S. aureus* na presença da fração F4A foi analisada durante 24 h à 37°C. As cepas de referência e os isolados clínicos SNA 299, PSA 12, PSA 19, PSA 26, PSA 37 e PSA 39 foram selecionados para esta análise (Figura 2). Todos os isolados apresentaram diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) na contagem de UFC quando comparados com o inóculo inicial.

**Figura 2** – Curvas de morte de *S. aureus* ATCC 29213 (A), SNA 299 (B), *S. aureus* BEC 9393 (C), PSA 12 (D), PSA 19 (E), PSA 26 (F), PSA 37 (G) e PSA 39 (H). Os microrganismos foram tratados com a CIM e CBM da fração F4A por 24 h à 37°C e a contagem do número de UFC foi realizada em horários específicos. Cores: verde (CIM=CBM); azul (CIM) e vermelho (CBM). \*p-valor<0,05.



Com exceção de PSA 12, uma redução significativa no número de UFC de todas as cepas foi observada após 4 h de incubação na presença da F4A nos valores de CIM e CBM.

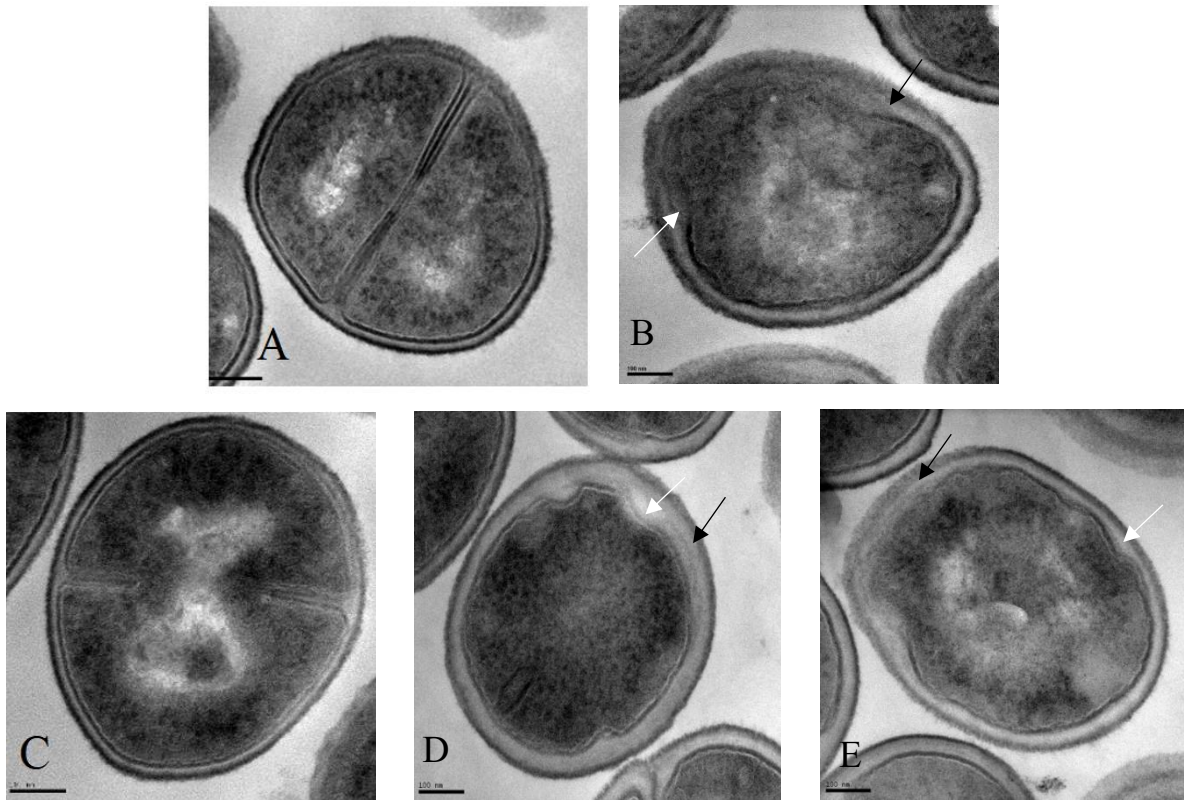
De todos os microrganismos analisados quanto à cinética do tempo de morte, *S. aureus* ATCC 29213 e SNA 299 foram os que levaram menos tempo (8 h) para terem suas UFC reduzidas a zero, sendo interessante observar que esses dois microrganismos são sensíveis à meticilina. Por outro lado, para *S. aureus* BEC 9393 (Figura 2C) e os isolados PSA 12 (Figura 2D), PSA 19 (Figura 2E) e PSA 39 (Figura 2H), todos MRSA, 24 h de tratamento com a CBM foram necessárias para reduzir a zero o número de UFC.

A atividade bactericida é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que tanto inibe o crescimento ou reduz 99,9% do inóculo inicial (redução  $\geq 3 \log_{10}$  no número de UFC) (CLSI, 1999; PANKEY; SABATH, 2004; ZADRAZILOVA *et al.*, 2015). Nesse sentido, em relação a cinética de morte, um decréscimo  $\geq 3\text{-log}_{10}$  foi observado após o tratamento com a CBM da fração F4A para todos os isolados testados: 24 h para PSA 12, PSA 19 e PSA 38; 12 h para BEC 9393, PSA 26 e PSA 37; e para os isolados MSSA apenas 8 h de tratamento foram necessárias para que houvesse uma redução igual ou superior a  $3\text{-log}_{10}$  no número de UFC.

#### 5.4 TRATAMENTO COM F4A PROVOCA ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS EM *S. AUREUS*

As alterações ultraestruturais causadas nas cepas de referência após 4 h de tratamento com a fração F4A nas concentrações inibitória e bactericida foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 3). As células sem tratamento, *S. aureus* ATCC 29213 (Figura 3A) e *S. aureus* BEC 9393 (Figura 3C), apresentaram eletrodensidade citoplasmática e morfologia normais, bem como parede celular compacta. No entanto, quando submetidas aos tratamentos com a CIM e CBM (Figuras 3B, 3D e 3E), as cepas apresentaram diminuição na eletrodensidade citoplasmática, um discreto espessamento e diminuição na compactação da parede celular, ausência de septos de divisão e descolamento da membrana citoplasmática.

**Figura 3** – Microscopia eletrônica de transmissão das cepas de referência *S. aureus* ATCC 29213 sem tratamento (A), *S. aureus* ATCC 29213 após 4h de tratamento com a CIM/CBM (B), *S. aureus* BEC 9393 sem tratamento (C) e *S. aureus* BEC 9393 após tratamento com a CIM (D) e CBM (E). Barras: (A-E) = 100 nm. As setas pretas indicam espessamento e perda da compactação da parede celular e as setas brancas indicam descolamento da membrana citoplasmática.



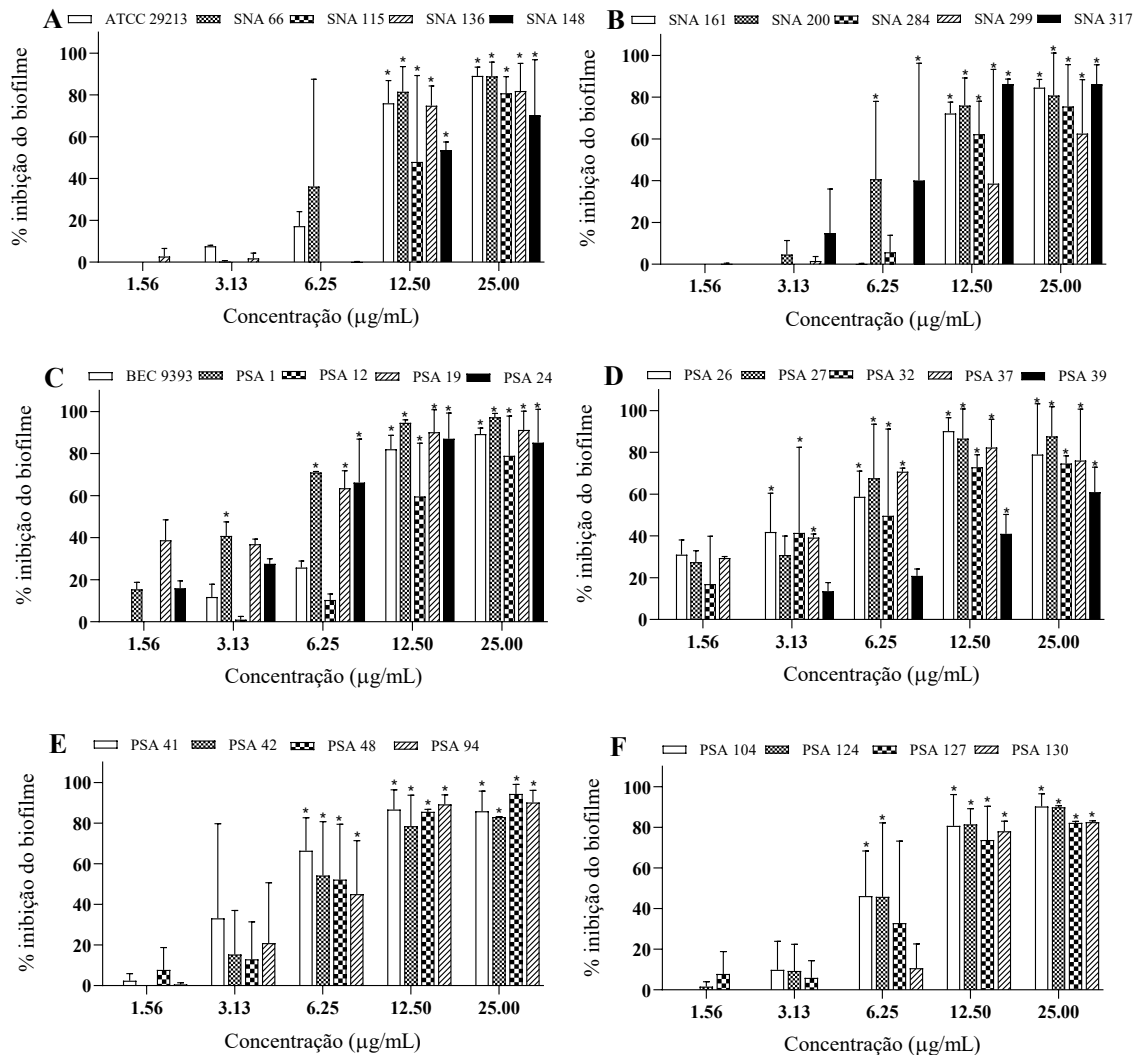
### 5.5 F4A INIBE O BIOFILME MADURO DE *S. AUREUS*

O efeito da fração F4A na atividade metabólica dos biofilmes maduros de *S. aureus* está representada na Figura 4. O biofilme de todos isolados foram significativamente ( $P < 0,05$ ) inibidos pela fração F4A à 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e 25,0  $\mu\text{g/mL}$ . A maioria dos isolados apresentou  $\text{SCIM}_{50}$  de 6,25  $\mu\text{g/mL}$  ( $n=15$ ), seguido por 12,5  $\mu\text{g/mL}$  ( $n=8$ ), 3,13  $\mu\text{g/mL}$  ( $n=2$ ) e 25,0  $\mu\text{g/mL}$  ( $n=1$ ). Além disso, 11 isolados apresentaram  $\text{SCIM}_{90}$  de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , seguido por 25,0  $\mu\text{g/mL}$  ( $n=6$ ) e 9 isolados apresentaram  $\text{SCIM}_{90}$  superior a 25,0  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 2). As cepas de referência apresentaram os mesmos valores de SCIM:  $\text{SMIC}_{50}$  de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e  $\text{SCIM}_{90}$  de 25,0.

Quando comparados com os resultados obtidos para células planctônicas (Tabela 2), os valores de  $\text{SCIM}_{50}$  foram ligeiramente superiores a CIM, exceto para PSA 41 e SNA 200, as quais apresentaram CIM igual a  $\text{SCIM}_{50}$  – 3,13  $\mu\text{g/mL}$  e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Os isolados PSA 26, PSA 41, SNA 66 e SNA 317 apresentaram CBM e  $\text{SCIM}_{50}$  idênticas, enquanto

os outros isolados apresentaram SCIM<sub>50</sub> superior a CBM, com exceção de SNA 200, que apresentou SCIM<sub>50</sub> inferior a CBM. Os valores de SCIM 90 para todos isolados foram maiores que seus respectivos valores de CIM e CBM.

**Figura 4** – Atividade antibiofilme da fração F4A contra biofilmes maduros de isolados clínicos MSSA (A e B) e MRSA (C-F) e das cepas de referência *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* BEC 9393. \*p-valor<0,05



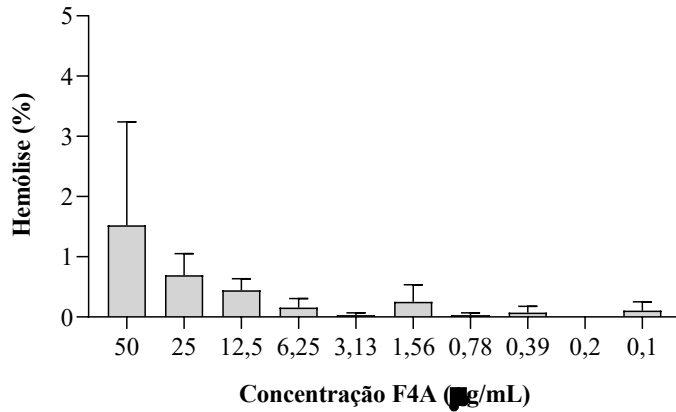
### 5.6 F4A NÃO APRESENTOU ATIVIDADE HEMOLÍTICA MAS É TÓXICA PARA CÉLULAS LLC-MK2

A viabilidade dos eritrócitos humanos e das células LLC-MK2 foi avaliada após 3 h de incubação na presença de diferentes concentrações da fração F4A. A concentração mais alta testada (50 µg/mL) causou 1,52% de hemólise, enquanto para as outras concentrações (25 a 0,1 µg/mL) o percentual de hemólise foi inferior a 1% (Figura 5).

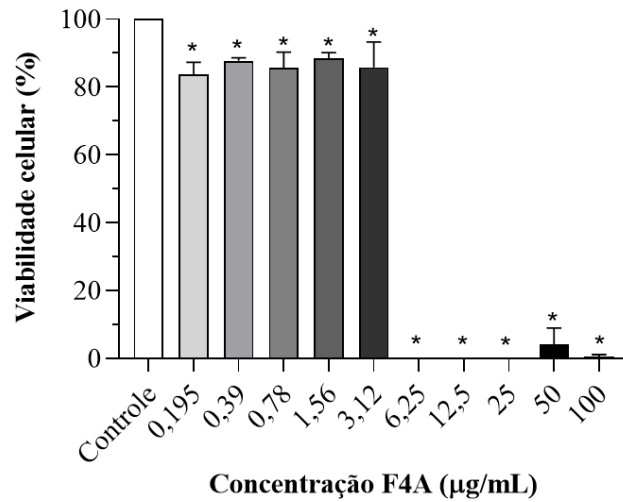
Por meio do ensaio de redução do MTT, o CC50 (índice citotóxico para 50% das células) calculado foi de 3,44 µg/mL. Em concentrações iguais ou superiores a 6,25 µg/mL é possível

observar que a fração F4A foi tóxica para aproximadamente 100% do número de células testadas.

**Figura 5** – Percentual de hemólise produzida pela fração F4A em eritrócitos humanos.



**Figura 6** – Citotoxicidade da fração F4A para células LLC-MK2.



## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, reportou-se o efeito antibacteriano da fração F4A obtida do sobrenadante de cultura de *P. aeruginosa* LV contra células planctônicas e sésseis de *S. aureus*. A atividade antibacteriana desta fração foi descrita previamente contra fitopatógenos, com valores de CIM variando de 0,12 a 7,81 µg/m (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; MUNHOZ *et al.*, 2017; PISTORI *et al.*, 2018). No entanto, este é o primeiro trabalho a testar a fração F4A contra isolados humanos.

Cardozo *et al.* (2013) testaram a fração F3D, também obtida de *P. aeruginosa* LV, contra *S. aureus*, e relataram uma CIM de 125 µg/mL para as cepas de referência MRSA N315 e BEC/BMB 9393, ou seja, uma concentração quase quarenta vezes superior à CIM mais frequente da F4A (3,13 µg/mL) determinada em nosso estudo.

Para investigar qual componente é responsável pela atividade antibacteriana da fração F4A para *S. aureus*, cada composto foi testado separadamente em células planctônicas das cepas de referência (ATCC 29213 e BEC/BMB 9393). Apenas a fluopsina C inibiu o crescimento de ambas as cepas nas concentrações testadas. De forma semelhante, de acordo com Oliveira *et al.* (2016), fenazina-1-carboxamida não foi capaz de inibir o crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, sendo a fluopsina C o composto antibacteriano ativo. Esse resultado corrobora com nosso estudo, no qual a CIM da fluopsina C foi de 1,56 µg/mL para ambas as cepas de referência e não diferiu dos valores de CIM da F4A. Navarro *et al.* (2019) reportaram valores de CIM e CBM inferiores a 2 µg/mL de fluopsina C para *S. aureus*, semelhante aos resultados obtidos para a fração F4A. Assim, é possível inferir que o composto responsável pela atividade antibacteriana entre os componentes da fração F4A é a fluopsina C.

Além disso, dezoito isolados (69,2%) apresentaram valores de CIM e CBM idênticos, evidenciando o potencial bactericida da fração F4A, o qual foi confirmado pelos resultados das curvas de morte. Cardozo *et al.* (2013) mostraram que após 24 h de tratamento a 200 µg/mL, F3d foi capaz de reduzir a zero o número de UFC de *S. aureus* (cepa N315) – uma concentração elevada quando comparada aos valores de CBM da F4A (1,56 a 12,5 µg/mL).

Após 4 h de tratamento com a CIM e CBM da F4A, foi possível observar alterações ultraestruturais nas células de *S. aureus* tratadas, afetando a membrana citoplasmática, parede celular e formação de septos. Por meio de microscopia eletrônica de varredura, Cardozo *et al.* (2013) mostraram que as células planctônicas de *S. aureus* N315 apresentaram morfologia alterada após 4 h de tratamento com F3d a 100 µg/mL. No estudo de Navarro *et al.* (2019), *S. aureus* N315 foi tratado com fluopsina C por 1 h, e as alterações ultraestruturais reveladas pela

microscopia eletrônica de transmissão envolveram danos ao interior das células, como alterações citoplasmáticas e vacuolização. Estes pesquisadores sugeriram que o mecanismo de ação da fluopsina C está associado ao rompimento da membrana citoplasmática.

Em relação à atividade antibiofilme, F4A inibiu os biofilmes maduros de todos *S. aureus* testados. A fração F3d apresentou atividade em biofilmes de *Klebsiella pneumoniae*, mas em uma concentração mais alta (62,5 µg/mL) (KERBAUY *et al.*, 2016). Atualmente, como o tratamento de infecções associadas aos biofilmes é um desafio na prática clínica, novas estratégias antimicrobianas são vitais para a solução deste problema, bem como a resistência aos antimicrobianos em doenças infecciosas (LU *et al.*, 2019).

Apesar de sua atividade antibacteriana, a fração F4A apresentou uma citotoxicidade considerável para as células LLC-MK2 (CC<sub>50</sub>= 3,44 µg/mL). No entanto, é importante ressaltar que a CIM mais frequente foi de 3,13 µg/mL – uma concentração ligeiramente inferior à CC<sub>50</sub>.

## 7 CONCLUSÃO

Como conclusão, a fração F4A apresentou um potente efeito bactericida contra *S. aureus* e apesar de ser citotóxica para células LLC-MK2, esta fração pode ser promissora para o tratamento de infecções causadas por esse patógeno. Estudos posteriores podem ser realizados na tentativa de reduzir a citotoxicidade da F4A para células de mamíferos.

## 8 REFERÊNCIAS

- AMARAL, M. M. *et al.* The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. **The Journal of infectious diseases**, v. 192, n. 5, p. 801-810, 2005.
- ANDRADE, G. (2008). Production and purification process of substances with antibiotic activity on the control of disease caused by bacteria on plant. BR patent. #PI0803350-1 A2. Retrieved from <http://www.inpi.gov.br>
- ARCHER, N. K. *et al.* *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445-459, 2011.
- ARCIOLA, C. R. *et al.* Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopedic implant infections. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6530-6535, 2005.
- ARCIOLA, C. R. *et al.* Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 5, p. 7, 2015.
- BARBU, E. M. *et al.* SdrC induces staphylococcal biofilm formation through a homophilic interaction. **Molecular microbiology**, v. 94, n. 1, p. 172-185, 2014.
- BASSET, P. *et al.* The Evolution and Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Genetics and Evolution of Infectious Disease**, p.669-688, 2011.
- BECKER, K. *et al.* Plasmid-encoded transferable mecB-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Emerging infectious diseases**, v. 24, n. 2, p. 242, 2018.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-Negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p.870-926, 2014.
- BELLO, C. S. S.; QAHTANI, A. Pitfalls in the routine diagnosis of *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 83-86, 2005.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.
- BHATTACHARYA, M. *et al.* Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 13, n. 12, p. 1499-1516, 2015.
- BILAL, M. *et al.* Engineering *Pseudomonas* for phenazine biosynthesis, regulation, and biotechnological applications: a review. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 191, 2017.
- BLAIR, J. E. Factors determining the pathogenicity of staphylococci. **Annual review of microbiology**, v. 12, n. 1, p. 491-506, 1958.

- BOTTEGA, A. *et al.* Evaluation of constitutive and inducible resistance to clindamycin in clinical samples of *Staphylococcus aureus* from a tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 5, p. 589-592, 2014.
- BRICKNER, S. J. *et al.* Linezolid (ZYVOX), the first member of a completely new class of antibacterial agents for treatment of serious gram-positive infections. **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1981-1990, 2008.
- BROWN, D. F. J. *et al.* Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p.1000-1018, 2005.
- BRYERS, J. D. Medical biofilms. **Biotechnology and bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 1-18, 2008.
- BUOMMINO, E. *et al.* Recent advances in natural product-based anti-biofilm approaches to control infections. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 14, n. 14, p. 1169-1182, 2014.
- BUTLER, M. S.; BLASKOVICH, M. A.; COOPER, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. **The Journal of antibiotics**, v. 66, n. 10, p. 571, 2013.
- CABOCLO, R. M. F. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. **American journal of infection control**, v. 41, n. 3, p. e21-e26, 2013.
- CARDOZO, V. F. *et al.* Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 12, n. 1, p. 12, 2013.
- CHAIBENJAWONG, P.; FOSTER, S. J. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 2, p.125-135, 2010.
- CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 2, p. 178, 2001.
- CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629-641, 2009.
- CHANG, S. *et al.* Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 14, p. 1342-1347, 2003.
- CIOFU, O. *et al.* Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 85, p.7-23, 2015.
- CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1541-1550, 2006.

CLAUDITZ, A. *et al.* Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. **Infection and immunity**, v. 74, n. 8, p. 4950-4953, 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline. Document M26-A, **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 1999.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—10th ed. M07-A11. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2018.

COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post—antimicrobial era. **Science**, v. 257, n. 5073, p. 1050-1055, 1992.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. How Bacteria Stick. **Scientific American**, v. 238, n. 1, p.86-95, 1978.

COSTERTON, J. W.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. Biofilm in implant infections: its production and regulation. **The International journal of artificial organs**, v. 28, n. 11, p. 1062-1068, 2005.

COUTO, I. *et al.* Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. **Microbial Drug Resistance**, v. 2, n. 4, p. 377-391, 1996.

CRAMTON, S. E. *et al.* The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and immunity**, v. 67, n. 10, p. 5427-5433, 1999.

CRANEY, A.; AHMED, S.; NODWELL, J. Towards a new science of secondary metabolism. **The Journal of antibiotics**, v. 66, n. 7, p. 387-400, 2013.

CUE, D. R.; LEI, M. G.; LEE, C. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 38, 2012.

CUNHA, M. *Staphylococcus aureus* and bovine mastitis: a public health problem. **Cross Infections: Types, Causes and Prevention**, eds J. Dong and X. Liang (New York, NY: Nova Science Publishers), p. 117-128, 2009.

DANELLI, T. **Caracterização de *Staphylococcus aureus* isolados da mucosa nasal de profissionais e estudantes de um hospital universitário**. 2019. 77 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019.

DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Treatment of *Staphylococcus aureus* infections. In: ***Staphylococcus aureus***. Springer, Cham, 2017. p. 325-383.

DAVIES, J. Where have all the antibiotics gone? **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 287-290, 2006.

DAYAN, G. H. *et al.* *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. **Expert Review of Vaccines**, v. 15, n. 11, p.1373-1392, 2016.

DE LA FUENTE, R.; SUAREZ, G.; SCHLEIFER, K. H. *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. nov., the causal agent of abscess disease of sheep. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 99-102, 1985.

de OLIVEIRA, A. G. *et al.* Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 113, 2016.

de OLIVEIRA, C. F. *et al.* Molecular and phenotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 07, p. 743-751, 2015.

DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 16, n. 1, p. 51-65, 2018.

DEVRIESE, L. A. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1569-1573, 2005.

DEZFULIAN, A. *et al.* Catalase-negative *Staphylococcus aureus* isolated from a diabetic foot ulcer. **Iranian journal of microbiology**, v. 2, n. 3, p. 165, 2010.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

ESPOSITO, E. *et al.* Nanomedicines to Treat Skin Pathologies with Natural Molecules. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 21, p.2323-2337, 2019.

EVANS, C. A.; MATTERN, K. L.; HALLAM, S. L. Isolation and identification of *Peptococcus saccharolyticus* from human skin. **Journal of clinical microbiology**, v. 7, n. 3, p. 261-264, 1978.

FEUILLIE, C. *et al.* Molecular interactions and inhibition of the staphylococcal biofilm-forming protein SdrC. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 14, p. 3738-3743, 2017.

FIGUEIREDO, A. M. S.; FERREIRA, F. A. The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 265-278, 2014.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. The genetics of staphylococcal biofilm formation - will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 12, p. 967-973, 2005.

- FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British journal of experimental pathology**, v. 10, n. 3, p. 226, 1929.
- FOSTER, T. J. *et al.* Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49, 2014.
- FOSTER, T. *Staphylococcus*. In: **Medical Microbiology. 4th edition**. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- GAJDÁCS, M. The continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p. 52, 2019.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, L. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **The Lancet infectious diseases**, v. 11, n. 8, p. 595-603, 2011.
- GHOSH, S.; BANERJEE, M. Methicillin resistance & inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Indian journal of medical research**, v. 143, n. 3, p. 362, 2016.
- GIBBONS, N. E.; MURRAY, R. G. E. Proposals concerning the higher taxa of bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 1-6, 1978.
- GIONCO, B. *et al.* New insights about antibiotic production by *Pseudomonas aeruginosa*: a gene expression analysis. **Frontiers in chemistry**, v. 5, p. 66, 2017.
- GROSS, H.; LOPER, J. E. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. **Natural product reports**, v. 26, n. 11, p. 1408-1446, 2009.
- GUERRA, F. E. *et al.* *Staphylococcus aureus* SaeR/S-regulated factors reduce human neutrophil reactive oxygen species production. **Journal of leukocyte biology**, v. 100, n. 5, p. 1005-1010, 2016.
- HADDAD, O. *et al.* Comparative study of virulence factors among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **BMC Infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 560, 2018.
- HAMMES, W. P.; NEUHAUS, Francis C. On the mechanism of action of vancomycin: inhibition of peptidoglycan synthesis in *Gaffkya homari*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 6, n. 6, p. 722-728, 1974.
- HANSSSEN, A. M. *et al.* Localization of *Staphylococcus aureus* in tissue from the nasal vestibule in healthy carriers. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 89, 2017.
- HARKINS, C. P. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome biology**, v. 18, n. 1, p. 130, 2017.
- HARTMAN, B. J.; TOMASZ, A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 158, n. 2, p. 513-516, 1984.

- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature reviews drug discovery**, v. 14, n. 2, p. 111, 2015.
- HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.
- HERMAN-BAUSIER, P. *et al.* *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A mediates cell-cell adhesion through low-affinity homophilic bonds. **MBio**, v. 6, n. 3, p. e00413-15, 2015.
- HIRAMATSU, K. *et al.* Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 10, p. 593-601, 2014.
- HÖGBERG, L. D.; HEDDINI, A.; CARS, O. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. **Trends in pharmacological sciences**, v. 31, n. 11, p. 509-515, 2010.
- HØIBY, N. *et al.* The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 3, n. 2, p.55-65, 2011.
- HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current opinion in microbiology**, v. 51, p. 72-80, 2019.
- IPPOLITO, G. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug. **International journal of infectious diseases**, v. 14, p. S7-S11, 2010.
- ITANI, K. MF *et al.* Efficacy and safety of linezolid versus vancomycin for the treatment of complicated skin and soft-tissue infections proven to be caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The American journal of surgery**, v. 199, n. 6, p. 804-816, 2010.
- IZUMI, E. *et al.* Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2994-3001, 2012.
- JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS microbiology letters**, v. 236, n. 2, p. 163-173, 2004.
- JENUL, C.; HORSWILL, A. R. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. **Microbiology spectrum**, v. 6, n. 1, 2018.
- JEVONS, M. P. "Celbenin"-resistant staphylococci. **British medical journal**, v. 1, n. 5219, p. 124, 1961.
- JONES, S. M. *et al.* Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. **The Lancet**, v. 357, n. 9249, p. 40-41, 2001.
- JØRGENSEN, H. J. *et al.* Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 12, p. 8352-8361, 2005.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1549-1555, 2000.

KEHRENBURG, C. *et al.* A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. **Molecular microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1064-1073, 2005.

KERBAUY, G. *et al.* Effect of a Metalloantibiotic Produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 389-397, 2016.

KIRMUSAOĞLU, S. Staphylococcal biofilms: Pathogenicity, mechanism and regulation of biofilm formation by quorum sensing system and antibiotic resistance mechanisms of biofilm embedded microorganisms. **Microbial Biofilms-Importance and Applications**. Dhanasekaran D, Thajuddin N, editors. **Intech, Croatia**, p. 189-209, 2016.

KIRST, H. A. Developing new antibacterials through natural product research. **Expert opinion on drug discovery**, v. 8, n. 5, p. 479-493, 2013.

KLUYTMANS, J.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 3, p. 505-520, 1997.

KNOX, R. A new penicillin (BRL 1241) active against penicillin-resistant staphylococci. **British medical journal**, v. 2, n. 5200, p. 690, 1960.

KONG, C.; NEOH, H. M.; NATHAN, S. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: a potential form of anti-virulence therapy. **Toxins**, v. 8, n. 3, p. 72, 2016.

KUIPERS, A. *et al.* The *Staphylococcus aureus* polysaccharide capsule and Efb-dependent fibrinogen shield act in concert to protect against phagocytosis. **Microbiology**, v. 162, n. 7, p. 1185, 2016.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. e00020-18, 2018.

LALL, M.; SAHNI, A. K. Prevalence of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 70, n. 1, p. 43-47, 2014.

LAURSEN, J. B.; NIELSEN, J. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. **Chemical reviews**, v. 104, n. 3, p. 1663-1686, 2004.

LE, K. Y. *et al.* Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p.167, 2014.

- LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 482-492, 2002.
- LEE, A. S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p.1-23, 2018.
- LEVINE, D. P. Vancomycin: a history. **Clinical infectious diseases**, v. 42, n. Supplement\_1, p. S5-S12, 2006.
- LICITRA, G. Etymologia: *Staphylococcus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 9, p.1-1, 2013.
- LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, p. 178, 2014.
- LIU, C. *et al.* Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. **Clinical infectious diseases**, v. 52, n. 3, p. e18-e55, 2011.
- LIU, G. Y. *et al.* *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 2, p.209-215, 2005.
- LIU, X. *et al.* Resistance of biofilms to the catalase inhibitor 3-amino-1, 2, 4-triazole. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n. 2, p. 156-162, 1998.
- LU, L. *et al.* Developing natural products as potential anti-biofilm agents. **Chinese medicine**, v. 14, n. 1, p. 11, 2019.
- MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.
- MALIK, V. S. Microbial secondary metabolism. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 68-72, 1980.
- MARANAN, M. C. *et al.* Antimicrobial resistance in staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical relevance. **Infectious disease clinics of North America**, v. 11, n. 4, p. 813-849, 1997.
- MATTHEWS, P.; TOMASZ, A. Insertional inactivation of the *mec* gene in a transposon mutant of a methicillin-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 9, p. 1777-1779, 1990.
- MCCONOUGHHEY, S. J. *et al.* Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. **Future microbiology**, v. 9, n. 8, p. 987-1007, 2014.
- MCCOY, W. F. *et al.* Observations of fouling biofilm formation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 27, n. 9, p. 910-917, 1981.

MCGUINNESS, W. A.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Focus: infectious diseases: vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 90, n. 2, p. 269, 2017.

MEHRAJ, J. *et al.* Epidemiology of *Staphylococcus aureus* nasal carriage patterns in the community. In: **How to Overcome the Antibiotic Crisis**. Springer Cham, p. 55-87, 2016.

MILLER, L. G.; DIEP, B. A. Colonization, fomites, and virulence: rethinking the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 5, p. 752-760, 2008.

MOET, G. J. *et al.* Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2004). **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 57, n. 1, p. 7-13, 2007.

MONTEIRO, J. M. *et al.* The pentaglycine bridges of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan are essential for cell integrity. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p.1-1, 2019.

MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 3, p.365-376, 2017.

MUNHOZ, L. D. *et al.* Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Cogent Food & Agriculture**, v. 3, n. 1, p. 1282592, 2017.

MURRAY, B. E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 10, p. 710-721, 2000.

NAKAMIZO, S. *et al.* Commensal bacteria and cutaneous immunity. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 1, p.73-80, 2014.

NAKATSUJI, T. *et al.* Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 378, p.1-1, 2017.

NAMVAR, A. E. *et al.* Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **GMS hygiene and infection control**, v. 8, n. 1, 2013.

NAVARRO, M. O. *et al.* Fluopsin C for Treating Multidrug-Resistant Infections: In vitro Activity Against Clinically Important Strains and in vivo Efficacy Against Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2431, 2019.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OGSTON, A. Micrococcus poisoning. **Journal of anatomy and physiology**, v. 16, n. 4, p. 526, 1882.

OGSTON, A. Report upon micro-organisms in surgical diseases. **British medical journal**, v. 1, n. 1054, p. 369. b2, 1881.

- OLIVEIRA, G. A. *et al.* Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 22, n. 7, p. 443-448, 2001.
- OLIVEIRA, G. A.; LEVY, C. E. *Staphylococcus aureus* apresentando resistência intermediária à vancomicina: mecanismos de resistência, detecção laboratorial e perspectivas de emergência no Brasil. **J. bras. patol**, v. 36, n. 2, p. 96-102, 2000.
- ONYANGO, L. A.; ALRESHIDI, M. M. Adaptive Metabolism in Staphylococci: Survival and Persistence in Environmental and Clinical Settings. **Journal of Pathogens**, v. 2018, p.1-11, 2018.
- ORTWINE, J. K.; BHAVAN, K. Morbidity, mortality, and management of methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia in the USA: update on antibacterial choices and understanding. **Hospital practice**, v. 46, n. 2, p. 64-72, 2018.
- O'SULLIVAN, M. V. N. *et al.* Influence of disk separation distance on accuracy of the disk approximation test for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 11, p. 4072-4076, 2006.
- OTTO, M. Staphylococcal biofilms. In: **Bacterial biofilms**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p. 207-228.
- ÖZEN, A. I.; USSERY, D. W. Defining the *Pseudomonas* Genus: Where Do We Draw the Line with *Azotobacter*? **Microbial Ecology**, v. 63, n. 2, p.239-248, 2011.
- PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Clinical infectious diseases**, v. 38, n. 6, p. 864-870, 2004.
- PANTOSTI, A.; SANCHINI, A.; MONACO, M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. 2007.
- PANTOSTI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 127, 2012.
- PATEL, M. *et al.* Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-and hospital-associated *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2481-2484, 2006.
- PATERSON, G. K.; HARRISON, E. M.; HOLMES, M. A. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 1, p. 42-47, 2014.
- PINHO, M. G.; KJOS, M.; VEENING, J. W. How to get (a) round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. **Nature reviews microbiology**, v. 11, n. 9, p. 601-614, 2013.

- PISTORI, J. F. *et al.* Low-molecular-weight metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* as an alternative to control Huanglongbing in *Citrus sinensis* cv. *Valencia*. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 4, p. 289-296, 2018.
- PLATA, K.; ROSATO, A. E.; WEGRZYN, G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 4, p. 597, 2009.
- RABIN, N. *et al.* Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future medicinal chemistry**, v. 7, n. 4, p. 493-512, 2015.
- RASMUSSEN, T.B.; GIVSKOV, M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 296, n. 2-3, p.149-161, 2006.
- RAYNER, C.; MUNCKHOF, W. J. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. **Internal medicine journal**, v. 35, p. S3-16, 2005.
- RENNER, L. D.; WEIBEL, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **MRS bulletin**, v. 36, n. 5, p. 347-355, 2011.
- RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of internal medicine**, v. 272, n. 6, p. 541-561, 2012.
- ROSENBAACH, A. J. F. Mikro-organismen bei den Wund-infections-krankheiten des Menschen. JF Bergmann, 1884.
- ROSENTHAL, C. B.; MOOTZ, J. M.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilm formation and inhibition. In: **Antibiofilm Agents**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014. p. 233-255.
- ROSSITER, S. E.; FLETCHER, M. H.; WUEST, W. M. Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance. **Chemical reviews**, v. 117, n. 19, p. 12415-12474, 2017.
- RUHE, J. J. *et al.* Use of long-acting tetracyclines for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: case series and review of the literature. **Clinical infectious diseases**, v. 40, n. 10, p. 1429-1434, 2005.
- RUHE, J. J.; MENON, A. Tetracyclines as an oral treatment option for patients with community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft-tissue infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2007.
- RYBTKE, M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. **Journal of molecular biology**, v. 427, n. 23, p. 3628-3645, 2015.
- SAGA, T.; YAMAGUCHI, K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. **JMAJ**, v. 52, n. 2, p. 103-108, 2009.

- SAKR, A. *et al.* *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: an Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors and Subsequent Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2419, 2018.
- SCHATZ, A.; BUGLE, E.; WAKSMAN, S. A. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.\*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 55, n. 1, p. 66-69, 1944.
- SCHILLACI, D. *et al.* In vitro anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. oleogum resin essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 433-438, 2008.
- SCHLEIFER, K. H. *et al.* Family VIII. Staphylococcaceae fam. nov. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 3, p. 392, 2009.
- SCHLEIFER, K. H.; BELL, J. A. *Staphylococcus*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p.1-43, 14 set. 2015.
- SCHNELLMANN, C. *et al.* Presence of new *mecA* and *mph* (C) variants conferring antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from the skin of horses before and after clinic admission. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4444-4454, 2006.
- SEN, S. *et al.* Growth-Environment Dependent Modulation of *Staphylococcus aureus* Branched-Chain to Straight-Chain Fatty Acid Ratio and Incorporation of Unsaturated Fatty Acids. **Plos One**, v. 11, n. 10, p.1-1, 2016.
- SEOW, Y. X. *et al.* Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 5, p.625-644, 2013.
- SHAHID, I.; MALIK, K. A.; MEHNAZ, S. A decade of understanding secondary metabolism in *Pseudomonas* spp. for sustainable agriculture and pharmaceutical applications. **Environmental Sustainability**, v. 1, n. 1, p. 3-17, 2018.
- SHI, L. *et al.* Synthesis and antimicrobial activities of Schiff bases derived from 5-chloro-salicylaldehyde. **European journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 4, p. 558-564, 2007.
- SORRELL, T. C. *et al.* Vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Annals of Internal Medicine**, v. 97, n. 3, p. 344-350, 1982.
- SPAGO, F. R. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. **Crop Protection**, v. 62, p. 46-54, 2014.
- STEFANI, S. *et al.* Linezolid resistance in staphylococci. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 7, p. 1988-2006, 2010.
- STEPANOVIĆ, S. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

- STEWART, P. S. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2517-2522, 1996.
- SWARTZ, M. N. Use of antimicrobial agents and drug resistance. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 491-492, 1997.
- TAM, K.; TORRES, V. J. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. **Gram-Positive Pathogens**, p. 640-668, 2019.
- TEANPAISAN, R. *et al.* Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 7, n. 2, p. 172-177, 2017.
- TOH, S. M. *et al.* Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. **Molecular microbiology**, v. 64, n. 6, p. 1506-1514, 2007.
- TOLKER-NIELSEN, T. Biofilm Development. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, p.1-12, 2015.
- TOLKER-NIELSEN, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. **Apmis**, v. 122, p. 1-51, 2014.
- TOMASZ, A. Multiple-Antibiotic-Resistant Pathogenic Bacteria--A Report on the Rockefeller University Workshop. **New England journal of medicine**, v. 330, n. 17, p. 1247-1251, 1994.
- TONG, S. Y. C. *et al.* *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p.603-661, 2015.
- TULINSKI, P. *et al.* Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci on pig farms as a reservoir of heterogeneous staphylococcal cassette chromosome mec elements. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 2, p. 299-304, 2012.
- TURNER, R. D. *et al.* Peptidoglycan architecture can specify division planes in *Staphylococcus aureus*. **Nature Communications**, v. 1, n. 1, p.1-1, 2010.
- TZAGOLOFF, H.; NOVICK, R. Geometry of cell division in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 129, n. 1, p. 343-350, 1977.
- VERT, M. *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p.377-410, 2012.
- WALECKA, E. *et al.* The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. **Folia microbiologica**, v. 53, n. 1, p. 61, 2008.
- WALSH, C. Antibiotics: actions, origins, resistance. **American Society for Microbiology (ASM)**, 2003.

WALTHER, B. *et al.* MRSA variant in companion animals. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 12, p. 2017, 2012.

WANG, R. *et al.* Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. **Nature medicine**, v. 13, n. 12, p. 1510, 2007.

WANG, R. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 1, p. 238-248, 2011.

WARYAH, C. B. *et al.* In vitro antimicrobial efficacy of tobramycin against *Staphylococcus aureus* biofilms in combination with or without DNase I and/or dispersin B: a preliminary investigation. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 3, p. 384-390, 2017.

WILKINSON, B. J.; PETERSON, P. K.; QUIE, P. G. Cryptic peptidoglycan and the antiphagocytic effect of the *Staphylococcus aureus* capsule: model for the antiphagocytic effect of bacterial cell surface polymers. **Infection and immunity**, v. 23, n. 2, p. 502-508, 1979.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis.** World Health Organization, 2017.

WRIGHT, G. D. Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. **Natural product reports**, v. 34, n. 7, p. 694-701, 2017.

YONG, Y. Y.; DYKES, G. A.; CHOO, W. S. Biofilm formation by staphylococci in health-related environments and recent reports on their control using natural compounds. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 45, n. 2, p.201-222, 2019.

ZADRAZILOVA, I. *et al.* In vitro bactericidal activity of 4-and 5-chloro-2-hydroxy-N-[1-oxo-1-(phenylamino) alkan-2-yl] benzamides against MRSA. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

ZENG, D. *et al.* Approved glycopeptide antibacterial drugs: mechanism of action and resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 12, p. a026989, 2016.

ZHANG, X.; BISHOP, P. L.; KUPFERLE, M. J. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. **Water science and technology**, v. 37, n. 4-5, p. 345-348, 1998.

ZUNIGA, A.; MANALICH, J.; CORTES, R. Stethoscope or staphyloscope? Potential vector in nosocomial infections. **Revista chilena de infectologia: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia**, v. 33, n. 1, p. 19-25, 2016.