



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**LIVIA PONTES FARIAS**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEORRESINAS  
EXTRAÍDAS DE DUAS ESPÉCIES DE COPAÍBA CONTRA *Staphylococcus aureus* E  
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE**

**FORTALEZA**

**2024**

LIVIA PONTES FARIAS

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEORRESINAS  
EXTRAÍDAS DE DUAS ESPÉCIES DE COPAÍBA CONTRA *Staphylococcus aureus* E  
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Dissertação apresentado à Banca de Qualificação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito parcial do processo de seleção para o nível Mestrado do referido Programa.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira  
Co-orientador: Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos

FORTALEZA

2024

LIVIA PONTES FARIAS

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEORRESINAS  
EXTRAÍDAS DE DUAS ESPÉCIES DE COPAÍBA CONTRA *Staphylococcus aureus* E  
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira  
Co-orientador: Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa (Membro)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira (Membro)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha família e aos meus amigos

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me deram a oportunidade e o apoio incondicional para continuar estudando e conquistando as pequenas e grandes vitórias da vida acadêmica.

À minha família, como um todo que também esteve presente em toda a minha trajetória e torcendo por mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edson Holanda Texeira, que me viu evoluir como pesquisadora e me acreditou em mim desde o princípio, transmitindo conhecimentos inestimáveis.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos, que instigou ainda mais a minha paixão pela microbiologia e pelos ensinamentos, os quais me fez amadurecer como cientista.

À minha segunda família, o Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS), que me acolheu desde o começo da minha graduação como bolsista de iniciação acadêmica.

Ao prof. Dr. Alexandre Lopes Andrade, que me viu evoluir ao longo dos anos dentro do LIBS, repassando ensinamentos que guardo comigo até hoje.

Aos pós-graduandos, Aryane, Ellen, Gabriel, Isa e Kelva, que se sempre se mostraram disponíveis e solícitos para me auxiliar e que não tenho como agradecer de forma justa.

Aos bolsistas de iniciação científica, Caio, Erlândia, Lívian, Paula, Sofia e Tati que estiveram comigo na rotina de laboratório, me auxiliando na medida do possível e do impossível para fazer esse projeto se tornar real.

Aos meus amigos, que me ouviram e me apoiaram até o fim dessa jornada, aos que cultivei ao longo dos anos e aos que cresceram comigo dentro e fora da graduação. Em especial ao Cristian e ao Matheus que estiveram desde o começo comigo, mesmo antes de sequer pensar em terminar uma graduação. E principalmente a Gabrieli, minha melhor amiga, que eu não tenho como descrever em palavras a importância dela na minha vida e o quanto ela me apoiou desde sempre. E não posso me esquecer deles: Alan, Bitu, Cassia, Cezar, David, Gabriel, Karine, Kevin, Laís, Sefra e Saulo que me ajudaram demais e que eles não têm noção do quanto.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, pelos ensinamentos valiosos e, certamente, esse conhecimento, de valor e qualidade imensuráveis, levarei por toda minha vida profissional.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro desde a minha graduação, quando tinha bolsa de iniciação científica, até a realização desse projeto.

À Universidade Federal do Ceará, por oferecer os aparatos possíveis para a execução desse projeto, pela formação de excelentes profissionais e por proporcionar diversas oportunidades.

*“Nascidos numa cidade construída na boca do inferno*

*Nós vencemos,*

*Porque nos fizemos irreduzíveis”*

— Vitor Brauer

## RESUMO

Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) acometem pacientes sob cuidados médicos durante ou após o momento de admissão no hospital, sendo associadas a vários óbitos anualmente, afetando diretamente a saúde pública mundial. Esse problema se agrava mais quando há estirpes que apresentam resistência antimicrobiana, podendo levar à ineficiência de antibioticoterapias utilizadas. Nesse cenário, *Staphylococcus aureus* é um patógeno de grande importância por estar frequentemente associado a IRAS. O gênero *Copaifera*, utilizado na medicina popular devido às suas propriedades biológicas, se destaca pela produção da óleo-resina, com diversos efeitos farmacológicos relatados na literatura. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo analisar a atividade antimicrobiana e antibiofilme das óleo-resinas extraídas de *C. arenicola* (OCa) e *C. langsdorffii* (OCl) contra estirpes de *S. aureus*, como também avaliar a toxicidade contra linhagens celulares (L929 e HaCaT) e *Artemia salina*. Em relação aos resultados, ambas óleo-resinas apresentaram Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), com resultados entre 125 e 500 µg/mL. Para as frações não-voláteis de ambas espécies os valores foram de 31,25 a 62,5 µg/mL para CIM e para CBM de 31,25 a 125 µg/mL. Para os compostos majoritários, as concentrações variaram de 15,625 a 125 µg/mL para CIM e CBM. As óleo-resinas também inibiram significativamente a formação do biofilme, com reduções de células viáveis variando entre 1 a 8,33 logs, com diminuição da biomassa entre 84,6 a 100% e decréscimo da atividade metabólica entre 67,80 a 100%. Em biofilmes pré-formados, as reduções foram de 0,71 a 2,71 logs de células viáveis; diminuições entre 56,77 a 86,58% de biomassa total; e de 17,77 a 92,62% para atividade metabólica. No que é tocante a Microscopia Eletrônica de Varredura, foi observado decréscimo da quantidade celular e da matriz extracelular, além da alteração da morfologia após o tratamento com as óleo-resinas na CIM. No ensaio de viabilidade celular, para ambas linhagens celulares, as óleo-resinas apresentaram citotoxicidade a partir da concentração de 250 µg/mL. Relativo a *A. salina*, a OCa teve efeito tóxico a partir da concentração de 125 µg/mL e a partir de 250 µg/mL para a OCl. Diante do exposto, ambas óleo-resinas apresentaram atividade antibacteriana e antibiofilme contra as estirpes de *S. aureus* testadas, como também não apresentaram toxicidade, em sua maioria, em concentrações menores que 250 µg/mL para as linhagens celulares e *A. salina*. Assim, ambas as óleo-resinas possuem potencial promissor contra infecções e formação de biofilmes associadas a *S. aureus*.

**Palavras-chave:** Biofilmes; *S. aureus*; *Copaifera*; *C. arenicola*; *C. langsdorffii*; Óleo-resina.

## ABSTRACT

Healthcare-associated infections (HAIs) affect patients under medical care during or after hospital admission, and are associated with numerous deaths annually, directly impacting global public health. This problem is exacerbated by the presence of strains exhibiting antimicrobial resistance, potentially leading to the ineffectiveness of antibiotic therapies. In this context, *Staphylococcus aureus* is a pathogen of great importance due to its frequent association with HAIs. The genus *Copaifera*, used in folk medicine due to its biological properties, stands out for its oleoresin production, with various pharmacological effects reported in the literature. Therefore, this study aimed to analyze the antimicrobial and antibiofilm activity of oleoresins extracted from *C. arenicola* (OCa) and *C. langsdorffii* (OCl) against *S. aureus* strains, as well as to evaluate their toxicity against cell lines (L929 and HaCaT) and *Artemia salina*. Regarding the results, both oleoresins showed Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values between 125 and 500 µg/mL. For the non-volatile fractions of both species, the values were 31.25 to 62.5 µg/mL for MIC and 31.25 to 125 µg/mL for MBC. For the major compounds, the concentrations ranged from 15.625 to 125 µg/mL for both MIC and MBC. The oleoresins also significantly inhibited biofilm formation, with reductions in viable cells ranging from 1 to 8.33 logs, a decline in biomass between 84.6 and 100%, and a decrease in metabolic activity between 67.80 and 100%. In pre-formed biofilms, reductions ranged from 0.71 to 2.71 logs of viable cells; decreases between 56.77% and 86.58% in total biomass; and from 17.77% to 92.62% in metabolic activity. Regarding Scanning Electron Microscopy, a reduction in cell quantity and extracellular matrix was observed, in addition to altered morphology after treatment with oleoresins in the CIM. In the cell viability assay, for both cell lines, the oleoresins showed cytotoxicity starting at a concentration of 250 µg/mL. Regarding *A. salina*, OCa showed a toxic effect starting at a concentration of 125 µg/mL, and OCl at 250 µg/mL. In light of the above, both oleoresins showed antibacterial and antibiofilm activity against the tested *S. aureus* strains, and most did not exhibit toxicity at concentrations lower than 250 µg/mL for the cell lines and *A. salina*. Thus, both oleoresins have promising potential against infections and biofilm formation associated with *S. aureus*.

**Keywords:** Biofilms; *S. aureus*; *Copaifera*; *C. arenicola*; *C. langsdorffii*; Oleoresin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Principais mecanismos de ação dos antibióticos .....	28
<b>Figura 2</b> - Linha do tempo de descoberta das classes de antibióticos e a primeira resistência relatada .....	32
<b>Figura 3</b> - Mecanismos de resistência bacteriana .....	35
<b>Figura 4</b> - Ciclo de formação do biofilme .....	40
<b>Figura 5</b> - Mecanismos de resistência dos biofilmes aos antimicrobianos .....	45
<b>Figura 6</b> - Representação esquemática das infecções relacionadas aos biofilmes .....	49
<b>Figura 7</b> - Representação da estrutura tridimensional do peptidoglicano estafilocócico .....	54
<b>Figura 8</b> - Formação e estrutura do biofilme de <i>S. aureus</i> .....	58
<b>Figura 9</b> - Fatores de virulência de <i>S. aureus</i> .....	61
<b>Figura 10</b> - Imagens da espécie <i>Copaifera arenicola</i> .....	74
<b>Figura 11</b> - Imagens da espécie <i>Copaifera langsdorffii</i> .....	75
<b>Figura 12</b> - Organograma das metodologias do presente estudo .....	78
<b>Figura 13</b> - Atividade antibiofilme das óleorresinas de <i>C. arenicola</i> e <i>C. langsdorffii</i> na formação de biofilmes de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 .....	92
<b>Figura 14</b> - Atividade antibiofilme das óleorresinas de <i>C. arenicola</i> e <i>C. langsdorffii</i> na formação de biofilmes de <i>S. aureus</i> ATCC 700698 .....	94
<b>Figura 15</b> - Atividade antibiofilme das óleorresinas de <i>C. arenicola</i> e <i>C. langsdorffii</i> na formação de biofilmes de <i>S. aureus</i> JKD 6008 .....	96
<b>Figura 16</b> - Atividade antibiofilme das óleorresinas de <i>C. arenicola</i> e <i>C. langsdorffii</i> em biofilmes pré-formados de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 .....	98
<b>Figura 17</b> - Atividade antibiofilme das óleorresinas de <i>C. arenicola</i> e <i>C. langsdorffii</i> em biofilmes pré-formados de <i>S. aureus</i> ATCC 700698 .....	100
<b>Figura 18</b> - Atividade antibiofilme das óleorresinas de <i>C. arenicola</i> e <i>C. langsdorffii</i> em biofilmes pré-formados de <i>S. aureus</i> JKD 6008 .....	102
<b>Figura 19</b> - Eletromicrografias da atividade antibiofilme das óleorresinas extraídas de <i>C. arenicola</i> e <i>C. langsdorffii</i> sobre biofilmes em formação de <i>S. aureus</i> ATCC 700698 .....	104
<b>Figura 20</b> - Ação das óleorresinas de <i>C. arenicola</i> e <i>C. langsdorffii</i> sobre a viabilidade celular das linhagens celulares L929 e HaCaT .....	106
<b>Figura 21</b> - Micrografias da óleorresina extraída de <i>C. arenicola</i> sobre a linhagem celular L929 .....	107

<b>Figura 22</b> - Fotomicrografias da óleorresina extraída de <i>C. arenicola</i> sobre a linhagem celular HaCaT .....	<b>107</b>
<b>Figura 23</b> - Fotomicrografias da óleorresina extraída de <i>C. langsdorffii</i> sobre a linhagem celular L929 .....	<b>108</b>
<b>Figura 24</b> - Fotomicrografias da óleorresina extraída de <i>C. langsdorffii</i> sobre a linhagem celular HaCaT .....	<b>108</b>
<b>Figura 25</b> - Ação das óleorresinas de <i>C. arenicola</i> e <i>C. langsdorffii</i> sobre <i>A. salina</i> .....	<b>109</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Efeito antibacteriano das óleoresinas, da frações não-voláteis, frações voláteis e compostos majoritários presentes nas frações não-voláteis das espécies <i>C. arenicola</i> e <i>C. langsdorffii</i> e dos antibióticos ampicilina e tetraciclina sobre diferentes estirpes de <i>S. aureus</i> .....	<b>90</b>
--	-----------

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Funções dos fatores de virulência de <i>S. aureus</i> .....	<b>62</b>
<b>Quadro 2</b> - Características das estirpes de <i>S. aureus</i> utilizadas no presente estudo .....	<b>80</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Acetil-CoA</b>	Acetilcoenzima A
<b><i>agr</i></b>	Gene acessório regulador
<b>AIP</b>	Adesina Intercelular Polissacarídica
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>APC</b>	Proteínas de ancoragem a parede celular
<b>AT</b>	Ácido teicóico
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>Bap</b>	Proteína associada ao biofilme
<b>cAMP</b>	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>c-di-GMP</b>	Monofosfato de guanosina dimérico bis-(3'-5')-cíclico
<b>CDC</b>	Centro de Controle de Prevenção de Doenças
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CIMB<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória mínima de 50% da biomassa
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CN</b>	Controle Negativo
<b>Cna</b>	Proteína de ligação ao colágeno
<b>CP5</b>	Polissacarídeo capsular 5
<b>CP8</b>	Polissacarídeo capsular 8
<b>DMEM</b>	Eagle Dulbecco Modificado Caldo
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>D.O</b>	Densidade Óptica
<b>ECN</b>	Estafilococos coagulase negativo
<b>ECP</b>	Estafilococos coagulase positivo
<b>eDNA</b>	DNA extracelular
<b>ERM</b>	Extensamente Resistente a Medicamentos
<b>ERV</b>	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina
<b>ESKAPE</b>	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , e <i>Enterobacter</i> sp.
<b>Fab</b>	Fragmento de ligação do antígeno

<b>Fc</b>	Fragmento cristalizável
<b>Gro-P</b>	Fosfato de glicerol
<b>HlgA</b>	Hemolisina gama A
<b>HlgB</b>	Hemolisina gama B
<b>HlgC</b>	Hemolisina gama C
<b>hSAIV</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> com heterorresistência intermediária a vancomicina
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória mínima de 50% da viabilidade celular
<b>ica</b>	Adesão Intercelular
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IRAS</b>	Infecções Relacionadas À Assistência À Saúde
<b>LPV</b>	Leucocidina Panton-Valentine
<b>LTA</b>	Ácido lipoteicóico
<b>LukF-PV</b>	Componente F da leucocidina Panton-Valentine
<b>LukS-PV</b>	Componente S da leucocidina Panton-Valentine
<b>MDR</b>	Multirresistente a medicamentos
<b>MHA</b>	Mueller Hinton Ágar
<b>MHB</b>	Mueller Hinton Caldo
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>MSCRAMMs</b>	Componentes da Superfície Microbiana que Reconhecem Moléculas da Matriz Adesiva
<b>MTT</b>	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
<b>NAG</b>	N-acetilglicosamina
<b>NAM</b>	N-acetilmurâmico
<b>OCa</b>	Óleoresina extraída de <i>C. arenicola</i>
<b>OCI</b>	Óleoresina extraída de <i>C. langsdorffii</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PABA</b>	Ácido Paraminobenzóico
<b>PBP</b>	Proteína de Ligação à Penicilina
<b>PBP2a</b>	PBP mutante
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PDR</b>	Pan-resistência a Medicamentos
<b>PAMPs</b>	Padrões Moleculares Associados a Patógenos

<b>Ppm</b>	Partes por milhão
<b>PSMs</b>	Modulinas solúveis em fenol
<b>QS</b>	<i>Quorum sensing</i>
<b>RAM</b>	Resistência Antimicrobiana
<b>rbf</b>	Regulador da família do retinoblastoma
<b>Rbo-P</b>	Fosfato de ribitol
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>SAIV</b>	<i>S. aureus</i> intermediário-resistente à vancomicina
<b>SARM</b>	<i>S. aureus</i> Resistente à Meticilina
<b>SARV</b>	<i>S. aureus</i> resistente a vancomicina
<b>SasG</b>	Proteína G de superfície de <i>S. aureus</i>
<b>SASM</b>	<i>S. aureus</i> sensível a metilina
<b>SCT</b>	Síndrome do choque tóxico
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SigB</b>	Fator sigma B
<b>SPE</b>	Substância Polimérica Extracelular
<b>SPÉE</b>	Síndrome da pele escaldada estafilocócica
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TA</b>	Toxina-antitoxina
<b>TH17</b>	Células T auxiliares 17
<b>TSA</b>	Triptona de Soja Ágar
<b>TSB</b>	Triptona de Soja Caldo
<b>TSCT-1</b>	Toxina-1 da síndrome do choque toxico
<b>UDP</b>	Difosfato de uridina
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>VC</b>	Violeta Cristal
<b>VMNC</b>	Estado viável, mas não cultivável
<b>WTA</b>	Ácidos teicóicos da parede

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
°C	Graus Celsius
a.C.	Antes de Cristo
cm	Centímetro
g	Gramas
kDa	Kilodalton
Log	Logaritmo
Mb	Megabase
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
p/v	Peso/volume
pH	Potencial hidrogeniônico
S	Unidades de Svedberg
™	Marca Registrada
U/mL	Unidades por mililitro
v/v	Volume/volume
β	Beta
ε	Épsilon
μg	Microgramas
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS)</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1.1 Definições e impacto econômico</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1.2 Prevenção e controle de IRAS</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2 Antibióticos</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.1 Histórico</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.2 Mecanismos de ação</b> .....	<b>28</b>
<i>2.2.2.1 Inibição da síntese da parede celular</i> .....	<b>29</b>
<i>2.2.2.2 Inibição da síntese proteica</i> .....	<b>29</b>
<i>2.2.2.3 Inibição da síntese de ácidos nucleicos</i> .....	<b>30</b>
<i>2.2.2.4 Danos a membrana plasmática</i> .....	<b>30</b>
<i>2.2.2.5 Inibição da síntese de metabolitos essenciais</i> .....	<b>31</b>
<b>2.3 Retorno da era pré-antibiótica</b> .....	<b>31</b>
<b>2.4 Resistência antimicrobiana (RAM)</b> .....	<b>33</b>
<b>2.4.1 Resistência adquirida e adaptativa</b> .....	<b>34</b>
<b>2.4.2 Mecanismos de resistência</b> .....	<b>35</b>
<i>2.4.2.1 Bloqueio de entrada</i> .....	<b>35</b>
<i>2.4.2.2 Inativação por enzimas</i> .....	<b>36</b>
<i>2.4.2.3 Alteração da molécula-alvo</i> .....	<b>37</b>
<i>2.4.2.4 Efluxo de antibiótico</i> .....	<b>37</b>
<b>2.5 Biofilmes bacterianos</b> .....	<b>37</b>
<b>2.5.1 Histórico</b> .....	<b>37</b>
<b>2.5.2 Conceitos básicos</b> .....	<b>39</b>
<b>2.5.3 Estágios de formação do biofilme</b> .....	<b>39</b>
<i>2.5.3.1 Adesão reversível</i> .....	<b>40</b>
<i>2.5.3.2 Adesão irreversível</i> .....	<b>41</b>
<i>2.5.3.3 Crescimento e formação de microcolônias</i> .....	<b>41</b>
<i>2.5.3.4 Maturação</i> .....	<b>42</b>
<i>2.5.3.4 Dispersão</i> .....	<b>43</b>
<b>2.5.4 Matriz do biofilme</b> .....	<b>44</b>
<b>2.5.5 Resistência dos biofilmes</b> .....	<b>45</b>

2.5.6	Importância clínica .....	48
2.6	<i>Staphylococcus</i> .....	49
2.6.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	50
2.6.1.1	Importância da <i>S. aureus</i> como patógeno .....	51
2.6.1.1.1	Importância da <i>S. aureus</i> resistente a meticilina (SARM).....	52
2.6.1.2	Componentes.....	53
2.6.1.2.1	Parede celular .....	53
2.6.1.2.2	Genoma.....	55
2.6.1.2.3	Cápsula .....	56
2.6.1.2.4	Biofilme.....	57
2.6.1.3	Fatores de virulência.....	61
2.6.1.3.1	Componentes estruturais .....	62
2.6.1.3.2	Toxinas.....	64
2.6.1.3.3	Enzimas.....	66
2.7	Plantas medicinais.....	67
2.7.1	Histórico.....	67
2.7.2	Importância .....	70
2.7.2.1	Óleos vegetais .....	71
2.7.3	<i>Copaifera</i> sp. ....	72
2.7.3.1	<i>Copaifera arenicola</i> .....	74
2.7.3.1	<i>Copaifera langsdorffii</i> .....	75
3.	HIPÓTESES .....	76
4.	OBJETIVOS .....	77
4.1	Objetivo geral.....	77
4.2	Objetivos específicos .....	77
5.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	78
5.1	Local de estudo.....	78
5.2	Obtenção das óleorresinas.....	78
5.2.1	Coleta das óleorresinas.....	79
5.3	Bactérias e condições de cultivo.....	79
5.4	Atividade antibacteriana sobre células planctônicas.....	80
5.4.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	80
5.4.2	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	81
5.5	Atividade das óleorresinas sobre a formação do biofilme.....	82

5.5.1 Enumeração de células viáveis .....	82
5.5.2 Quantificação da biomassa .....	83
5.5.3 Determinação da atividade metabólica dos biofilmes .....	83
5.6 Atividade das óleorresinas sobre biofilmes pré-formados .....	84
5.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	85
5.8 Ensaio de Citotoxicidade .....	85
5.8.1 Linhagens celulares e condições de cultivo.....	85
5.8.2 Ensaio de viabilidade celular .....	86
5.9 Ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i> .....	87
5.9.1 Condições de cultivo de <i>Artemia salina</i> .....	87
5.9.2 Ensaio de toxicidade .....	87
5.10 Análise estatística .....	88
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>89</b>
6.1 Atividade antibacteriana .....	89
6.2 Atividade antibiofilme .....	91
6.2.1 Atividade antibiofilme das óleorresinas sobre biofilmes em formação .....	91
6.2.2 Atividade antibiofilme das óleorresinas sobre biofilmes pré-formados .....	97
6.2.3 Microscopia eletrônica de varredura em biofilmes em formação.....	103
6.3 Ensaio de citotoxicidade .....	105
6.4 Ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i> .....	109
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>110</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>122</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>123</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) afetam a saúde pública mundial, causando um aumento da morbidade e mortalidade anualmente entre os pacientes sob cuidados médicos. Ademais, as IRAS podem prolongar a permanência dos pacientes no hospital, além de poder ser causa de incapacidade a longo prazo e aumentar a chance do surgimento de resistência antimicrobiana (Khan; Baig; Mehboob, 2017).

As IRAS acometem pacientes durante ou posteriormente à submissão do indivíduo a um procedimento de assistência à saúde ou internação, ocorrendo a partir de 48 horas após a admissão hospitalar ou 30 dias depois de alta do paciente (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021; Revelas, 2012). Os fatores de risco associados a essas infecções incluem: problemas respiratórios, idade, feridas crônicas, problemas de pele, diabetes mellitus, dentre outros (Despotovic *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2017). Dentre as IRAS mais comuns estão aquelas relacionadas aos dispositivos médicos, como infecções da corrente sanguínea relacionadas ao cateter, infecções do trato urinário associadas ao cateter e pneumonia associada à ventilação mecânica, por ordem de incidência (Singhai *et al.*, 2012).

Em relação a taxa de acometimento, na Europa, estima-se que entre 3,1 e 4,6 milhões de pessoas adquirem IRAS anualmente e os custos ficam em torno de 7 bilhões de euros (European Centre for Disease Prevention and Control, 2009; Suetens *et al.*, 2018). Ademais, dados reunidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Centro de Controle de Prevenção de Doenças (CDC) demonstraram que um terço dos pacientes em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) são afetados por uma IRAS, pelo menos (O'Neill, 2016). Estudos mais recentes apontam que a cada 100 pacientes em hospitais de cuidados intensivos, 7 pacientes em países de alta renda e 15 pacientes em países de baixa e média renda adquirirão pelo menos uma IRAS durante a internação hospitalar (World Health Organization, 2011, 2022).

No Brasil, entre 2011 e 2013, a prevalência de IRAS foi de 10,8% nas macrorregiões (Fortaleza *et al.*, 2017). Além disso, dados coletados de todos os estados brasileiros pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dos anos de 2012 a 2022 demonstraram que houve um aumento na taxa de incidência de infecções em sítios cirúrgicos entre os anos de 2021 e 2022 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2022). Todos esses estudos evidenciam a importância e impacto das IRAS no âmbito clínico.

No que diz respeito a pandemia da COVID-19, Grasselli *et al.* (2021) demonstraram que indivíduos infectados com o vírus SARS-CoV-2, com sintomas severos, apresentam um fator de risco alto para a ocorrência de IRAS. Os dados revelam que 46% dos pacientes com

COVID-19 em estado grave também tiveram IRAS, havendo uma correlação entre essas duas problemáticas (Grasselli *et al.*, 2021).

Essa situação se torna ainda mais grave quando se trata de resistência antimicrobiana (RAM), visto que 25% das IRAS em ambientes de cuidados intensivos a longo prazo são causadas por bactérias resistentes a antibióticos (O'Neill, 2016). Assim, a RAM é um fator determinante que contribui no aumento de óbitos por IRAS, estando entre os principais fatores que influenciam a morte de pacientes sob cuidados médicos (Liu; Dickter, 2020; Prestinaci; Pezzotti; Pantosti, 2015). O trabalho de Murray *et al.* (2022) mostrou que 4,95 milhões de mortes em 2019 foram relacionadas a RAM. Além disso, esse estudo revelou que o sul da América Latina ocupou o sétimo lugar entre vinte e uma regiões em todo o mundo em número de mortes relacionadas à RAM (Murray *et al.*, 2022). Em 2050, de acordo com a OMS, 10 milhões de óbitos terão como causa a RAM, o que a tornará a principal causa de morte anual (O'Neill, 2014). Seguindo essa previsão, a RAM ultrapassará doenças líderes em mortalidade, como o câncer, sendo uma ameaça crescente e preocupante (O'Neill, 2014, 2016).

Os microrganismos que fazem parte do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp.) são os principais patógenos causadores das IRAS e que comumente apresentam RAM, dificultando a erradicação dessas infecções (Abban *et al.*, 2023; Rice, 2008; Santajit; Indrawattana, 2016). A RAM se dá, dentre várias causas, pelo uso indiscriminado de antibióticos, além da sua prescrição incorreta; uso extensivo na agricultura e falta de desenvolvimento de novos antimicrobianos (Ventola, 2015).

Além dos mecanismos associados à RAM, os microrganismos possuem a capacidade de formar biofilmes, dificultando ainda mais a erradicação de IRAS. As terapias antimicrobianas utilizadas nesse contexto acabam, por vezes, perdendo a eficácia e essas infecções podem tornar-se recorrentes (Høiby *et al.*, 2015; Lebeaux; Ghigo; Beloin, 2014). Alguns exemplos de IRAS relacionadas a presença de biofilmes são: infecções em dispositivos médicos (infecções do trato urinário associadas ao cateter, pneumonia associada à ventilação mecânica, entre outros) e infecções do sítio cirúrgico (ferida cirúrgica, infecções relacionadas à prótese, entre outros) (Guggenbichler *et al.*, 2011; Percival *et al.*, 2015). Dentro desses dois tipos de IRAS, estão alguns microrganismos frequentemente isolados e que são formadores de biofilmes, como alguns patógenos pertencentes ao grupo ESKAPE (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Escherichia coli*), além de outras espécies, como: *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans* (Høiby *et al.*, 2010; Rice, 2008; Santajit; Indrawattana, 2016; Weiland-Bräuer; Malek; Schmitz, 2019).

Biofilmes são microcomunidades nas quais as células inseridas nesse ambiente podem se tornar mais resistentes a antibióticos quando comparada a células de vida livre (Ceri *et al.*, 1999). Isso acontece porque os biofilmes atuam como uma barreira física, impedindo o contato direto do microrganismo com o agente antimicrobiano (Ceri *et al.*, 1999; Yan; Bassler, 2019). Além da resistência intrínseca própria da conformação dessas comunidades, os biofilmes apresentam diversos mecanismos que contribuem para a sobrevivência dos microrganismos inseridos nesse microambiente, como o estabelecimento de *quorum sensing*, dormência de células, diferentes expressões de genes (incluindo genes determinantes de resistência a antibióticos), maior síntese de bombas de efluxo e de DNA extracelular (eDNA) (Alav; Sutton; Rahman, 2018; Mah, 2012; Montanaro *et al.*, 2011; Olsen, 2015; Webber, 2003).

Nesse sentido, com a recorrência da resistência bacteriana às terapias antimicrobianas, são necessárias novas opções medicamentosas que possam combater a RAM e também biofilmes formados por esses microrganismos resistentes, visto que as terapias convencionais não são efetivas contra essas bactérias. Com isso, plantas utilizadas na medicina popular têm aplicações diversas, com eficácia comprovada na literatura, e podem ser alvos interessantes para a projeção de novos antibióticos.

Na medicina popular, o gênero *Copaifera* é utilizado no tratamento de várias enfermidades utilizando-se extratos de caule, folha, flor, fruta e casca, mas principalmente através do uso da óleoresina (Lameira *et al.*, 2022; Santana *et al.*, 2014; Junior; Pinto, 2002). Esta última, obtida diretamente do caule da planta, tem sido utilizada no tratamento de infecções em geral, ferimentos, diarreia, dor de cabeça, alergia e gripe (Farias; Borges; Pereira, 2015; Montes *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2019).

Na literatura já foram reportadas diversas atividades biológicas comprovadas da óleoresina extraída da copaíba, tais como ação antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antileishmania, antioxidante, antinociceptiva, entre outras (Ghizoni *et al.*, 2017; Dalenogare *et al.*, 2019; Fampa *et al.*, 2021; Nóbrega *et al.*, 2019; Barbosa *et al.*, 2019). Nesse contexto, dada as diferentes aplicações de espécies de *Copaifera*, as plantas desse gênero são objetos de estudo interessantes para verificar a atividade contra bactérias que apresentam RAM envolvidas em IRAS, como também o biofilme produzido por elas.

Dessa forma, o objetivo do estudo foi verificar a atividade antimicrobiana e antibiofilme da óleoresina extraída de diferentes espécies de *Copaifera* (*C. arenicola* e *C. langsdorffii*) contra *S. aureus*, bem como avaliar sua toxicidade.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS)

#### 2.1.1 Definições e impacto econômico

Anteriormente, infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) eram referidas como infecções nosocomiais ou hospitalares (Limaye *et al.*, 2008; Silva; Padoveze, 2012; Szabó *et al.*, 2022). Entretanto, IRAS vem substituindo esse sinônimo nos últimos anos, uma vez que é um termo guarda-chuva para as infecções adquiridas nos locais em que são oferecidos cuidados médicos (Silva; Padoveze, 2012; Szabó *et al.*, 2022). Para além do hospital, o risco de adquirir IRAS pode existir em espaços como casas de repouso para idosos, clínicas odontológicas, assistência domiciliar e instituições para doentes crônicos (Silva; Padoveze, 2012). Entre os grupos de risco para o desenvolvimento de IRAS estão os indivíduos internados em UTIs, transplantados, idosos e neonatos (Abban *et al.*, 2023; Silva; Padoveze, 2012).

Os custos do tratamento relacionados a pacientes com IRAS podem ser de 2 a 4 vezes maiores em comparação àqueles indivíduos que não são acometidos por essas infecções (Leal; Freitas-Vilela, 2021; Nangino *et al.*, 2012). O total estimado dos gastos das cinco principais IRAS (infecções da corrente sanguínea, infecções do sítio cirúrgico, infecções por *Clostridium difficile*, infecções do trato urinário associadas ao cateter e pneumonia associada à ventilação mecânica) no sistema de saúde dos Estados Unidos é de US\$ 9,8 bilhões (Zimlichman *et al.*, 2013). Na Europa, esses custos ficam aproximadamente entre € 7 bilhões anualmente (World Health Organization, 2011). Já no continente africano, as perdas econômicas relacionadas a IRAS em 2022 totalizaram US\$ 13 bilhões por ano (Hutton *et al.*, 2024). Todos esses dados demonstram que essas infecções afetam diretamente os gastos relacionados a saúde pública global.

No Brasil, as IRAS também afetam a saúde pública nacional, em que segundo a Associação Médica Brasileira, mais de 45 mil brasileiros morrem anualmente devido a infecções hospitalares (Brasil, 2024). No estudo de Osme *et al.*, 2022, estima-se que a despesa anual das IRAS seja de US\$ 112.924.421,00 para 26,64 pacientes em 50 hospitais universitários. Já o trabalho de Leal e Freitas-Vilela (2021) aponta que, em média, o gasto para a internação hospitalar de pacientes com IRAS foi de R\$ 16.132,21 em comparação a pacientes que não apresentaram IRAS (R\$ 4.014,26), em uma UTI de um hospital público de médio porte de Goiás. Nesse sentido, outro estudo realizado com dados de 11 hospitais brasileiros de grande

porte, estimou-se que o custo diário do paciente com IRAS foi 55% maior em comparação a um paciente sem IRAS (Kiffer *et al.*, 2015).

É importante destacar que a maior parte das IRAS são evitáveis (Bearman *et al.*, 2019; Umscheid *et al.*, 2011; World Health Organization, 2022). No entanto, a elevação das taxas de incidências das IRAS pode acontecer como consequência da falta de suplementos para prevenção e controle de infecções, além da aplicação insuficiente de boas práticas de higiene (World Health Organization, 2022).

### **2.1.2 Prevenção e controle de IRAS**

A taxa de incidência de IRAS como também a qualidade dos serviços de saúde está diretamente ligada a medidas de controle e prevenção dessas infecções (World Health Organization, 2022). Nesse sentido, o primeiro achado histórico que relaciona as boas práticas de higiene com a prevalência de IRAS foi através da constatação do obstetra húngaro Ignaz Semmelweis, em 1847 (Pearson, 2009; Stewardson *et al.*, 2011). Esse médico observou que a insalubridade dentro dos locais de assistência à saúde poderia causar malefícios aos pacientes e contribuir para o desenvolvimento de IRAS (Oliveira; Silva; Lacerda, 2016; Pearson, 2009; Stewardson *et al.*, 2011). Nesse estudo, foi apresentada pela primeira vez a descrição de IRAS e a forma de evitar sua transmissão, pois esse obstetra demonstrou que a febre puerperal era transmitida de pessoa para pessoa através dos profissionais de saúde que não realizavam a higienização adequada das mãos (Haque *et al.*, 2018; Larson, 1989; Stewardson *et al.*, 2011; Sydnor; Perl, 2011). Assim, através do trabalho de Semmelweis e também de outros profissionais da saúde, como Nightingale e Lister, ao utilizarem outros meios de sanitização desses ambientes e de práticas de antisepsia, foram evidenciadas novas formas de boas práticas de higiene para evitar a propagação de IRAS (Larson, 1989). Posterior e progressivamente, cirurgiões adotaram medidas técnicas para prevenir a contaminação por patógenos, visando reduzir as chances de infecções pós-operatórias em ambientes hospitalares (Dixon, 2011).

Em meados de 1950, a frequência de infecções por *S. aureus* resistente à penicilina fez com que a comunidade científica enxergasse a importância de se implementar técnicas de prevenção (Finland, 1976; Wise; Ossman; Littlefield, 1989). Dessa forma, gradativamente, criou-se uma noção coletiva de que os hospitais, como também o corpo profissional que compõe esse ambiente, deveriam executar essas ideias de boas práticas de higiene, já que era possível evitar e prevenir as IRAS (Dixon, 2011). Assim, no final da década de 1950 e no início década

de 1960, alguns hospitais começaram a implementar projetos para tentar controlar e compreender essas infecções (Dixon, 2011).

Nesse contexto, a OMS e a ANVISA destacam que a higiene das mãos e a higiene ambiental em instalações de saúde são as intervenções que mais economizam custos e diminuem as complicações de longo prazo associadas às IRAS, além de reduzir a incidência dessas infecções (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2009; World Health Organization, 2022). Em adição, a melhora da higiene das mãos em ambientes hospitalares pode economizar cerca de US\$ 16,5 em gastos com saúde para cada dólar americano investido (World Health Organization, 2022). Ademais, estudos apontam que infecções causadas por microrganismos resistentes a antibióticos podem ser reduzidas de 50 a 70% com a higienização adequada das mãos (Derde *et al.*, 2014).

Contudo, a implementação de medidas de prevenção e controle de IRAS ainda é um desafio (World Health Organization, 2020, 2022). De acordo com dados da OMS, em 2019, cerca de 33% das unidades de saúde não tinham o necessário para higiene das mãos (World Health Organization, 2022). Em adição, 25% das unidades não tinham serviços básicos de água e 10% não tinham serviço de saneamento (World Health Organization; United Nations Children's Fund, 2020). Tudo isso, somado a baixa adesão dos profissionais de saúde às boas práticas de higiene, leva ao aumento da incidência de IRAS, como também a disseminação de microrganismos resistentes a antibióticos (Oliveira; Silva; Lacerda, 2016).

No Brasil, as primeiras comissões de controle de infecção hospitalar surgiram em meados de 1960 (Padoveze; Fortaleza, 2014). Entretanto, as ações governamentais nesse viés só foram realizadas na década de 1980, em que foram publicados guias técnicos nacionais, com o enfoque na avaliação sanitária (Fernandes *et al.*, 2002; Padoveze; Fortaleza, 2014). Atualmente, as legislações vigentes sob essa ótica de controle e prevenção de IRAS são: a Lei nº 9.431, de 6 de janeiro de 1997; a Portaria nº 2616, de 12 de maio de 1998; e a RDC nº 48, de 2 de junho de 2000 (Padoveze; Fortaleza, 2014). Essas legislações objetivam a obrigatoriedade e a manutenção de programas para o controle de IRAS e, assim, aplicar medidas de vigilância e prevenção visando o desenvolvimento de técnicas que aumentem a qualidade da assistência à saúde (Padoveze; Fortaleza, 2014; Silva; Padoveze, 2012).

Ademais, existem outros desafios relacionados a dificuldade de implementação de boas práticas de higiene no Brasil, como o grande território nacional, em que há regiões de difícil acesso; grande número de instituições de saúde; grande número de hospitais de pequeno porte; heterogeneidade dos serviços de saúde e o número insuficiente de UTIs (Padoveze; Fortaleza, 2014). Apesar disso, a prevenção e controle de IRAS requer um compromisso entre

todas as instituições governamentais e de saúde como também os profissionais de saúde para estabelecer boas práticas de higiene e manter os ambientes hospitalares seguros (Oliveira; Silva; Lacerda, 2016; Silva; Padoveze, 2012).

## 2.2 Antibióticos

### 2.2.1 Histórico

Antes da descoberta dos antibióticos e da produção em larga escala, além da falta de conhecimento sobre prevenção e formas de contaminação, as infecções bacterianas, por anos, levaram a morbidade e a morte de milhares de indivíduos através de epidemias e pandemias, como tuberculose, pneumonia, sífilis, entre outros (Aminov, 2010; Jayachandran, 2018; Mohr, 2016). Um dos exemplos é a peste bubônica, causada pela bactéria *Yersinia pestis* (Mohr, 2016). Essa doença foi responsável por pelo menos três pandemias no decorrer da história da humanidade, sendo elas: peste justiniana (período do reinado do imperador Justiniano I), peste negra (período da idade média) e o surto que ocorreu entre os anos de 1895 e 1930, atingindo principalmente a Índia (Kool, 2005; Zietz; Dunkelberg, 2004).

Em relação ao impacto dos antibióticos, no início do século XX a expectativa de vida era, em média, de 47 anos, havendo uma alta taxa de mortalidade (Adedeji, 2016; Rugină, 2018). Após a introdução desses antimicrobianos, a expectativa foi estendida, em média, 23 anos, aumentando a qualidade de vida humana (Hutchings; Truman; Wilkinson, 2019). Em adição, a fatalidade de casos de pneumonia era de 30 a 35% em adultos na década de 1930 (Heffron, 1939). E com o advento dos antibióticos, a taxa diminuiu para 5 a 8% após a introdução da penicilina no tratamento dessa infecção (Austrian, 1999; Heffron, 1939).

A palavra antibiótico surgiu através da palavra antibiose, que é a reação de inibição que colônias de microrganismos conseguem realizar em detrimento de outras espécies, fazendo com que estas não consigam crescer (Tortora; Funke; Case, 2017; Vuillemin, 1889). Assim, o termo antibiótico significa uma substância produzida por microrganismos que conseguem inibir o crescimento de outros e até mesmo ter ação microbicida (Tortora; Funke; Case, 2017; Waksman, 1947).

O primeiro antibiótico natural descrito, ácido micofenólico (MPA), foi descoberto em 1893 pelo microbiologista italiano Bartolomeo Gosio (Gosio, 1893, 1896; Mohr, 2016; Nicolaou; Rigol, 2018). Esse composto foi isolado do fungo *Penicillium glaucum* e inibia o crescimento da bactéria *Bacillus anthracis*, causadora da doença antraz (Gosio, 1893, 1896;

Mohr, 2016). Posteriormente, foi descartada a sua utilização como antibiótico por sua toxicidade e a partir dessa molécula foi desenvolvido o mofetil micofenolato, utilizado como imunossupressor em transplante de órgãos como rim, coração e fígado (Bentley, 2000; Karwehl; Stadler, 2016). Isso demonstra que a pesquisa moderna está explorando produtos naturais como fonte de novos antibióticos, além do uso desses agentes para outras finalidades, pois podem exibir diversas propriedades biológicas relevantes (Karwehl; Stadler, 2016). Nesse viés, a descoberta do MPA, considerada o marco da era inicial dos antibióticos, também criou oportunidades para o desenvolvimento de antibióticos sintéticos análogos a moléculas orgânicas ativas (Bentley, 2000; Karwehl; Stadler, 2016; Nicolaou; Rigol, 2018).

Em 1928, Alexander Fleming observou a inibição do crescimento da bactéria *S. aureus* através do crescimento do fungo *Penicillium notatum* em meio ágar, e o isolamento do composto ativo desse microrganismo nomeado penicilina (Tortora; Funke; Case, 2017). Porém, a produção em larga escala foi possível somente em 1939, com os primeiros ensaios com este antimicrobiano tendo sido executados em 1940 (Mohr, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017). Nesse mesmo período, com a Segunda Guerra Mundial, havia a busca por agentes antimicrobianos que conseguissem controlar as infecções bacterianas (Tortora; Funke; Case, 2017). Na época, eram utilizados outros agentes terapêuticos, como o vermelho de prontossil, que era um composto contendo sulfanilamida (Mohr, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017). Entretanto, essas drogas tinham menor eficácia e maiores efeitos adversos em comparação com a penicilina, e, por isso, foi considerada uma "droga milagrosa" (Luepke *et al.*, 2017; Tortora; Funke; Case, 2017). Em razão disso, a descoberta de Flemming é considerada como o início da era de ouro dos antibióticos, uma vez que a penicilina foi o primeiro antibiótico a ser utilizado na Segunda Guerra Mundial capaz de matar bactérias Gram-positivas responsáveis por infecções importantes na época, como sífilis e gonorreia, com menos efeitos colaterais (Christaki; Marcou; Tofarides, 2020; Luepke *et al.*, 2017; Mohr, 2016).

Dessa forma, a introdução dos antibióticos, especialmente a penicilina, levou ao aumento da expectativa e da qualidade de vida, além da diminuição das taxas de morbidade e mortalidade (Massell *et al.*, 1988; Smith; Bradshaw, 2008). Antes do uso da penicilina, as mortes por bacteremia causadas por *S. aureus* chegavam a 80%, em média (Skinner, 1941). Massell *et al.* (1988) relataram que após a introdução da penicilina, no início no ano de 1946, as taxas de óbitos por cardite reumática reduziram para zero em um hospital dos Estados Unidos (House of Good Samaritan, Boston). Ademais, a taxa de mortalidade por doenças infecciosas nos Estados Unidos entre 1938 e 1952 mostrou um declínio anual de 8,2%, atribuído ao uso crescente de diversos antimicrobianos ao longo desses anos (Armstrong, 1999). Assim, o índice

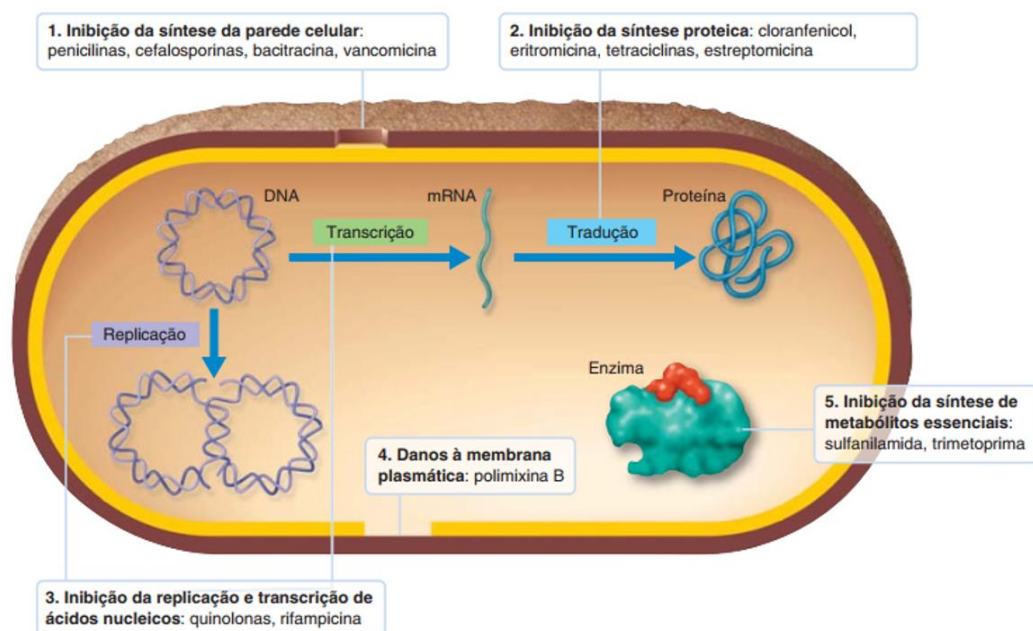
de doenças com maiores taxas de óbito naquele período teve uma redução significativa, como pneumonia, difteria e tuberculose (Armstrong, 1999; Madigan *et al.*, 2016).

Atualmente, os antibióticos ainda são utilizados amplamente na rotina clínica e existe uma grande variedade desses agentes para tratar as mais diversas infecções bacterianas. Em sua maioria, esses antimicrobianos apresentam toxicidade seletiva, ou seja, não apresentam efeitos adversos ao hospedeiro, atingindo somente o patógeno (Madigan *et al.*, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017). Esses fármacos são classificados de acordo com a forma de ação sobre a bactéria alvo, que será comentado no próximo tópico (Madigan *et al.*, 2016; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tortora; Funke; Case, 2017).

### 2.2.2 Mecanismos de ação

Existem cinco mecanismos de ação em que os antibióticos são classificados, sendo eles: inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese proteica, inibição da síntese de ácidos nucleicos, danos a membrana plasmática e inibição da síntese de metabólitos essenciais (Figura 1) (Madigan *et al.*, 2016; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tortora; Funke; Case, 2017). A ação dos antibióticos pode ser bacteriostática, em que o crescimento e a reprodução do microrganismo são impedidos durante o tratamento com o antimicrobiano, ou bactericida, em que os antibióticos destroem diretamente os microrganismos (Tortora; Funke; Case, 2017).

**Figura 1.** Principais mecanismos de ação dos antibióticos.



Fonte: Tortora; Funke; Case, 2017.

### 2.2.2.1 Inibição da síntese da parede celular

Os antimicrobianos dessa classe têm como mecanismo a interferência da síntese da parede celular bacteriana (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). O alvo desses antibióticos é relacionado com a síntese do peptidoglicano, sendo específico para bactérias (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tortora; Funke; Case, 2017). A maioria dos antibióticos que compõem essa classe são classificados como  $\beta$ -lactâmicos, por compartilharem uma estrutura em comum denominada anel  $\beta$ -lactâmico (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). O principal representante é a penicilina (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Esses antimicrobianos se ligam à proteína ligante de penicilina (PBP; do inglês *Penicillin-Binding Protein*) presente na parede celular, inibindo a formação da cadeia do peptidoglicano, e, assim, resultando na ação bactericida (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tortora; Funke; Case, 2017). Além dos  $\beta$ -lactâmicos, os glicopeptídeos também fazem parte dessa classe, como a vancomicina, que interage com a porção terminal D-alanina-D-alanina das cadeias laterais, interferindo na formação das pontes entre as cadeias de peptidoglicano (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Esse antibiótico é utilizado em infecções causadas por bactérias Gram-positivas resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tortora; Funke; Case, 2017). Entretanto, a vancomicina não é utilizada contra bactérias Gram-negativas por ser uma molécula muito grande para atravessar a membrana externa e conseguir atingir o peptidoglicano (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

### 2.2.2.2 Inibição da síntese proteica

O mecanismo de ação dos agentes dessa classe consiste em atingir os ribossomos de procariontes, que são 70S, se ligando as subunidades ribossomais 30S ou 50S (Tortora; Funke; Case, 2017). Eles têm especificidade aos procariotos, já que os ribossomos de eucariotos são 80S (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tortora; Funke; Case, 2017). Entretanto, as mitocôndrias também contêm ribossomo 70S, podendo trazer efeitos indesejados as células do hospedeiro (Tortora; Funke; Case, 2017). A letra S corresponde às unidades de Svedberg, que indica a velocidade de sedimentação durante a centrifugação (Madigan *et al.*, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017).

Vários grupos de antibióticos fazem parte dessa classe, sendo eles: aminoglicosídeos, aminociclitol, tetraciclina, gliciliclinas, oxazolidinona, macrolídeos, cetolídeos, lincosamida e estreptograminas (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Os aminoglicosídeos se ligam a subunidade 30S ribossomal de forma irreversível (Tortora; Funke;

Case, 2017). Essa ligação pode resultar na produção de proteínas defeituosas, através da leitura errada do RNA mensageiro (RNAm), ou na interrupção da síntese proteica, por liberar de forma prematura o RNAm (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tortora; Funke; Case, 2017). Dessa forma, os aminoglicosídeos são bactericidas, já que se ligam de forma irreversível aos ribossomos (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). As tetraciclinas bloqueiam a ligação do RNA transportador ao complexo RNAm-ribossomo 30S se ligando de forma reversível a subunidade 30S, inibindo a síntese proteica, tendo ação bacteriostática (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Parker *et al.*, 2016). Os macrolídeos se ligam de forma reversível a subunidade 23S da subunidade 50S ribossomal, bloqueando a elongação do polipeptídeo, também havendo atividade bacteriostática (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

#### 2.2.2.3 Inibição da síntese de ácidos nucleicos

Os antibacterianos dessa classe interferem na síntese de DNA ou de RNAm (Tortora; Funke; Case, 2017). Os representantes são as rifamicinas, quinolonas e fluoroquinolonas. A rifampicina se liga a RNA polimerase DNA-dependente, inibindo a síntese de RNAm, e como essa RNA polimerase é específica para bactérias, sua toxicidade é seletiva (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Parker *et al.*, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017). As quinolonas inibem a DNA topoisomerase do tipo II ou do tipo IV, dessa forma, com a inibição dessas proteínas, a replicação, a recombinação e a reparação do DNA são prejudicadas (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Parker *et al.*, 2016). A topoisomerase do tipo II é o alvo dos antimicrobianos desse grupo em bactérias Gram-negativas e a do tipo IV é o alvo em Gram-positivas (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Por inibir a síntese de ácidos nucleicos, esses fármacos têm ação bactericida (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Parker *et al.*, 2016).

#### 2.2.2.4 Danos a membrana plasmática

A ação dos antibióticos que compõem essa classe está associada a mudanças na membrana plasmática, podendo alterar sua permeabilidade ou danificá-la (Tortora; Funke; Case, 2017). Essa classe inclui um grupo mais restrito de agentes antimicrobianos, representado pelas polimixinas B e E, que têm como alvo as bactérias Gram-negativas, e pela daptomicina, único antibiótico do grupo de lipopeptídeos, que tem como alvo as bactérias Gram-positivas (Parker *et al.*, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017). As polimixinas têm ação semelhante aos detergentes, interagindo com a porção lipopolissacarídica da membrana externa bacteriana

(Parker *et al.*, 2016). A daptomicina tem mecanismo de ação similar, entretanto, é eficaz apenas em bactérias Gram-positivas (Parker *et al.*, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017). Por atingirem a membrana plasmática, esses fármacos têm ação bactericida (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Parker *et al.*, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017). Em adição, esses antimicrobianos também podem causar efeitos adversos por não ter ação direcionada somente às bactérias, já que também atingem as membranas celulares das células do hospedeiro (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Parker *et al.*, 2016). Quando essas drogas são aplicadas sistematicamente, podem atingir as membranas plasmáticas das células do rim e do sistema nervoso (Parker *et al.*, 2016).

#### 2.2.2.5 Inibição da síntese de metabolitos essenciais

Nessa classe, os antimicrobianos atuam como antimetabólitos, inibindo as enzimas metabólicas bacterianas, se assemelhando ao substrato da enzima e competindo pelo sítio de ligação (Parker *et al.*, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017). Os representantes dessa classe são as sulfonamidas, as quais são estruturalmente análogas ao ácido paraminobenzóico (PABA), precursor do ácido fólico (Parker *et al.*, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017). A enzima diidropteroato sintase se liga ao PABA, transformando-o em um precursor essencial para sintetizar o ácido fólico (Tortora; Funke; Case, 2017). Uma vez que esses fármacos se ligam competitivamente a enzima em questão, a produção de ácido fólico será impedida, inibindo o crescimento bacteriano (Parker *et al.*, 2016). Assim, esses antimicrobianos apresentam atividade bacteriostática (Tortora; Funke; Case, 2017). As sulfonamidas não causam efeitos adversos, pois como os humanos não utilizam o PABA para a produção de ácido fólico, a sua toxicidade é seletiva para bactérias (Parker *et al.*, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017).

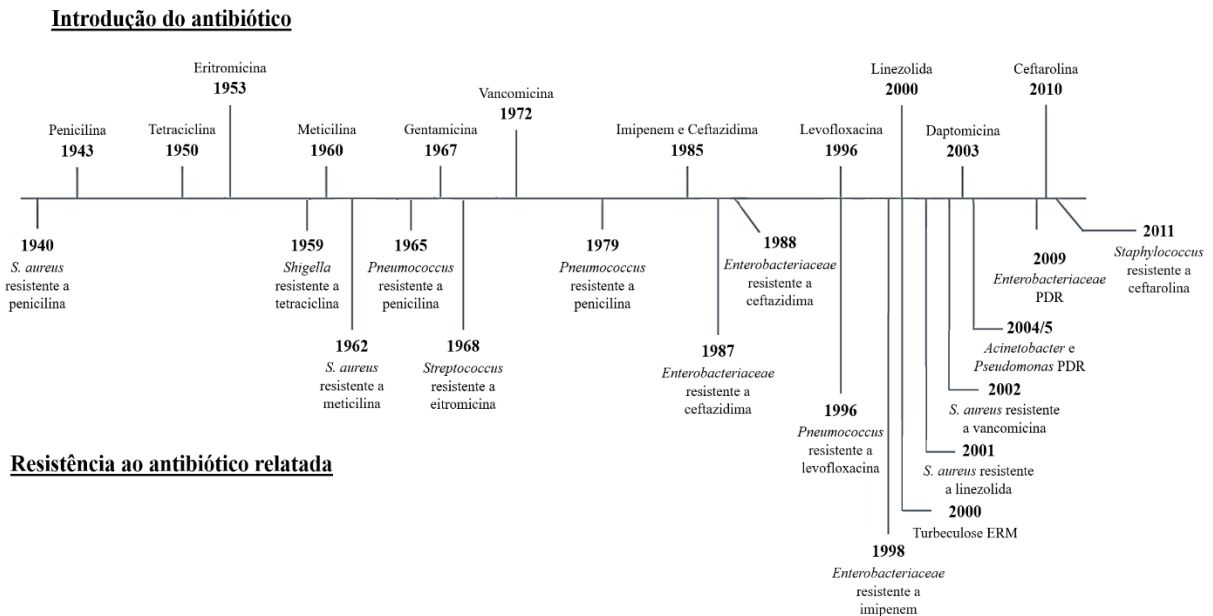
### 2.3 Retorno da era pré-antibiótica

Com o uso amplo e muitas vezes inadequado dos antibióticos, os patógenos conseguiram desenvolver diversos mecanismos para sobreviver à ação dos antimicrobianos e, dessa forma, se tornaram resistentes (Madigan *et al.*, 2016). Nesse contexto, mesmo antes do uso em larga escala da penicilina, o primeiro isolado de *S. aureus* resistente a esse antimicrobiano surgiu em 1940 (Christaki; Marcou; Tofarides, 2020). Em 1959, para driblar a resistência da *S. aureus* ao tratamento utilizado naquele período, a meticilina foi introduzida no tratamento de infecções causadas por essa espécie (Ippolito *et al.*, 2010). Todavia, um ano depois, a estirpe *S. aureus* resistente à meticilina (SARM) foi reportada (Sengupta;

Chattopadhyay; Grossart, 2013). Dessa forma, a recorrência de patógenos resistentes tornou necessária a procura por novos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Coates; Halls; Hu, 2011; Sengupta; Chattopadhyay; Grossart, 2013). No entanto, de forma concomitante, estirpes resistentes a esses novos fármacos também surgiram (Sengupta; Chattopadhyay; Grossart, 2013).

Entre 1940 e 1980, houve a descoberta de diversos antibióticos (Coates; Halls; Hu, 2011; Sengupta; Chattopadhyay; Grossart, 2013). Já em décadas posteriores, isso não pôde ser visto, pois apenas três novas classes de antibióticos foram identificadas a partir dos anos 2000 (Figura 2) (Coates; Halls; Hu, 2011). Desde então, apenas novas variantes de classes já existentes foram introduzidas no âmbito clínico (Coates; Halls; Hu, 2011).

**Figura 2.** Linha do tempo de descoberta das classes de antibióticos e a primeira resistência relatada.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2013), adaptado pelo autor. Extensamente resistente a medicamentos (ERM). Pan-resistência a medicamentos (PDR).

O desenvolvimento de novos antimicrobianos é um processo longo, podendo levar de 10 a 25 anos até que seja seguro o seu uso clínico, justificando a falta de novas classes de antibióticos (Madigan *et al.*, 2016). Esse período de tempo, desde os estudos iniciais de desenvolvimento do antibiótico até as etapas finais, existe porque os potenciais fármacos necessitam passar por testes para comprovar sua atividade, eficácia e baixa toxicidade (Coates; Halls; Hu, 2011; Madigan *et al.*, 2016). Os testes *in vivo* são feitos inicialmente em animais, para depois serem feitos os ensaios em humanos e só então, após todo esse processo, serem liberados para o uso (Madigan *et al.*, 2016). Além disso, o investimento inicial necessário para o desenvolvimento até a aprovação de antimicrobianos para uso em humanos chega a cerca de

500 milhões de dólares, de acordo com a Sociedade de Doenças Infecciosas da América, sem contar a chance de falha (Madigan *et al.*, 2016; Talbot *et al.*, 2019). Diante disso, a indústria farmacêutica opta por desenvolver análogos dos antibióticos já existentes, por ser financeiramente menos dispendioso (Coates; Halls; Hu, 2011; Madigan *et al.*, 2016). Ademais, quando se compara a introdução de uma nova classe com um análogo de um antibiótico já existente, o primeiro tem um risco maior por ter seu potencial tóxico desconhecido, além da possibilidade de possuir características físico-químicas inadequadas para a formulação de um medicamento (Coates; Halls; Hu, 2011).

Diante desse panorama, considerando as dificuldades da descoberta de novos antibióticos, somado ao fato de que na literatura já foi apontada diversas vezes a existência de bactérias multirresistentes, torna-se urgente a busca por novos antimicrobianos que consigam ter algum efeito sobre esses microrganismos (Sengupta; Chattopadhyay; Grossart, 2013; Tortora; Funke; Case, 2017). Com o surgimento e a recorrência de resistência antimicrobiana a vários ou a todos os medicamentos utilizados na clínica, há uma certa apreensão generalizada do retorno da era pré-antibiótica (Baker, 2015; Rugină, 2018; Sengupta; Chattopadhyay; Grossart, 2013). Desse modo, há a possibilidade de surgimento de epidemias causadas por esses microrganismos, além de pôr em risco terapias que são dependentes de fármacos antimicrobianos de suporte, como o transplante e a quimioterapia imunossupressiva (Baker, 2015; Rugină, 2018). Portanto, ao falar do retorno a era pré-antibiótica, evidencia-se essa carência de novas classes de antibióticos que possam combater os microrganismos multirresistentes (Baker, 2015; Sengupta; Chattopadhyay; Grossart, 2013).

#### **2.4 Resistência antimicrobiana (RAM)**

A resistência antimicrobiana é uma ameaça global que se tornou um dos principais problemas de saúde pública do século XXI. Com o surgimento de microrganismos resistentes, o tratamento de infecções tornou-se mais desafiador, aumentando o risco de propagação de populações bacterianas multirresistentes e contribuindo para maior morbidade e mortalidade (Corrêa *et al.*, 2022; Murray *et al.*, 2022; O'Neill, 2014; United Nations Environment Programme, 2023). Segundo Murray *et al.* (2022), estima-se que 4,95 milhões de mortes no mundo estavam associadas à RAM bacteriana em 2019. Os principais patógenos resistentes associados a mortes foram *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *P. aeruginosa*, sendo estas espécies responsáveis por 3,57 milhões de óbitos associados à RAM globalmente (Murray *et al.*, 2022).

Do ponto de vista microbiológico, a resistência é definida como um fenótipo em que o microrganismo se torna menos suscetível a alguma condição em comparação a outros indivíduos da mesma espécie, independentemente do nível de resistência àquela condição ou estímulo (Sengupta; Chattopadhyay; Grossart, 2013). Já do ponto de vista clínico, a resistência acontece quando há interferência na farmacoterapia causada pela bactéria (Madigan *et al.*, 2016; Sengupta; Chattopadhyay; Grossart, 2013). Logo, a RAM pode ser definida como a capacidade de um microrganismo adquirir resistência aos efeitos de um antimicrobiano ao qual ele é, normalmente, sensível (Madigan *et al.*, 2016). Em adição, é importante ressaltar que apesar da RAM ser um fenômeno natural, o uso inadequado e indiscriminado de antibióticos acarreta na pressão seletiva de fenótipos bacterianos resistentes (Tello; Austin; Telfer, 2012).

#### **2.4.1 Resistência adquirida e adaptativa**

A RAM pode se apresentar de forma intrínseca, adquirida e adaptativa. A resistência intrínseca faz parte da constituição daquele microrganismo, sendo uma característica natural, ou seja, genética (Abrantes; Nogueira, 2022; Miranda, 2013; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). A resistência adquirida acontece quando o microrganismo recebe informações genéticas externas ou mutações, apresentando um fenótipo resistente (Abrantes; Nogueira, 2022; Miranda, 2013). A resistência adaptativa é um estado transitório de resistência em há desenvolvimento de maior tolerância a um antibiótico (Silva, 2022b).

A resistência adquirida pode se originar através de mutações aleatórias ou de transferência horizontal de genes (Madigan *et al.*, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017). Quando uma mutação ocorre, há a produção de alterações genéticas que podem ser responsáveis pela sobrevivência daquele indivíduo (Habboush; Guzman, 2023; Tortora; Funke; Case, 2017). Nesse cenário, uma pressão de seleção pode acontecer quando é administrada, por algum motivo, uma dose subletal de antibiótico (Tortora; Funke; Case, 2017). Assim, quando a população bacteriana entra em contato com essa dose subinibitória, o indivíduo com a mutação genética favorável, ou seja, resistente àquele antimicrobiano, sobrevive e perpetua a progênie (Madigan *et al.*, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017). A transferência horizontal de genes pode acontecer de três formas: conjugação, transformação e transdução (Tortora; Funke; Case, 2017). Na conjugação, o plasmídeo R é responsável pela transmissão, contendo genes de RAM, os quais são repassados entre as células; na transformação, os genes são transferidos como DNA “nu” entre as bactérias; e na transdução, o DNA bacteriano é transferido para a célula receptora

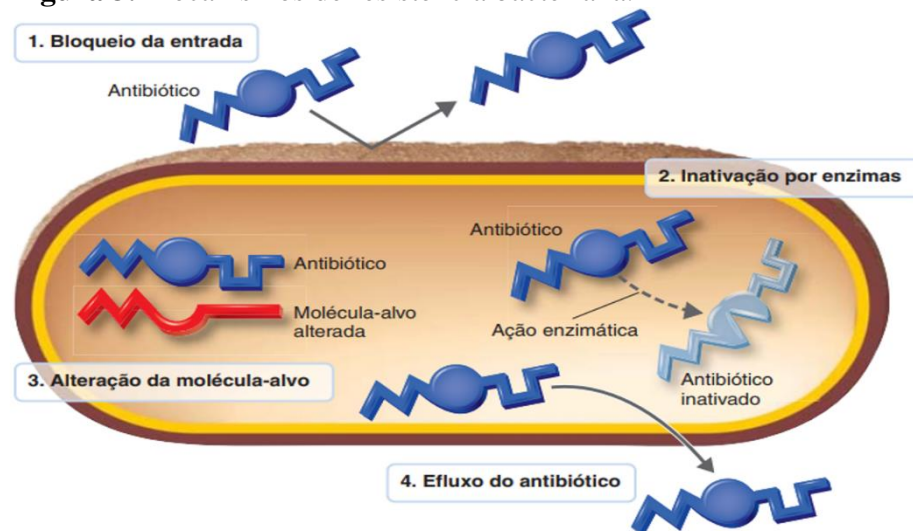
através de um bacteriófago que contém, dentro do seu capsídeo, o material genético da célula doadora (Madigan *et al.*, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017).

A resistência adaptativa ocorre devido a condições ambientais que levam a expressão de um fenótipo diferente, através de mecanismos fisiológicos e regulatórios, não dependendo, necessariamente, de uma nova informação genética (Silva, 2022b). Isso pode ser observado através da tolerância bacteriana a um determinado antibiótico dependendo do seu estado metabólico (Martínez; Rojo, 2011; Sengupta; Chattopadhyay; Grossart, 2013). Esse fenômeno acontece quando o microrganismo tem uma maior susceptibilidade ao antimicrobiano na fase de crescimento, mas quando há a transição para a fase estacionária, se torna resistente ao antibiótico (Levin; Rozen, 2006; Sengupta; Chattopadhyay; Grossart, 2013).

### 2.4.2 Mecanismos de resistência

A resistência à ação dos antibióticos se dá através de diferentes mecanismos. Dentre eles estão: bloqueio de entrada do fármaco, inativação enzimática, alteração da molécula-alvo e efluxo do antibiótico (Figura 3).

**Figura 3.** Mecanismos de resistência bacteriana.



Fonte: Tortora; Funke; Case, 2017.

#### 2.4.2.1 Bloqueio de entrada

Bactérias Gram-negativas são mais resistentes em comparação as bactérias Gram-positivas devido a composição de suas paredes celulares, em que as primeiras apresentam uma membrana externa que restringe a absorção de moléculas (Nikaido, 1998; Tortora; Funke; Case,

2017). Isso ocorre devido à presença e funcionalidade das porinas, que são proteínas presentes nessa membrana (Tortora; Funke; Case, 2017). A regulação negativa de porinas resulta na redução da permeabilidade, limitando a entrada de moléculas, como os antibióticos (Blair *et al.*, 2015; Tortora; Funke; Case, 2017).

#### 2.4.2.2 Inativação por enzimas

Nesse mecanismo, o microrganismo sintetiza enzimas modificadoras que destroem de forma seletiva o antibiótico (Wright, 2005). Dessa forma, ao se ligar a molécula alvo, a enzima catalisa a modificação química do antimicrobiano (De Pascale; Wright, 2010). As estratégias enzimáticas de inativação dos antibióticos são hidrólise, transferência de grupo e outros mecanismos, os quais utilizam enzimas redox e liases (De Pascale; Wright, 2010; Wright, 2005).

Na hidrólise, as enzimas atingem ligações hidroliticamente vulneráveis dos antibióticos, como ésteres e amidas (De Pascale; Wright, 2010; Tortora; Funke; Case, 2017; Wright, 2005). Essas enzimas requerem água como co-substrato, então, muitas vezes, podem ser secretadas pelas bactérias, indo de encontro aos antimicrobianos antes que estes entrem em contato com as células (Wright, 2005; Zhu; Chen; Wei, 2019). Um exemplo são as  $\beta$ -lactamases produzidas por esses microrganismos, que hidrolisam de forma seletiva o anel  $\beta$ -lactâmico presente em antibióticos desta classe (Tortora; Funke; Case, 2017; Wright, 2005).

Já na transferência de grupo, as enzimas se ligam aos antimicrobianos, causando modificações covalentes que resultam em alterações na estrutura dos antibióticos e, assim, prejudicando a interação destes fármacos com o alvo (De Pascale; Wright, 2010; Wright, 2005). As estratégias de mudança estrutural incluem O-fosforilação, O-nucleotidilação, O-ribosilação, O-glicosilação O- e N-acilação e transferência de tiol (De Pascale; Wright, 2010; Wright, 2005). Para essas modificações covalentes serem realizadas, é requerido um co-substrato como adenosina trifosfato (ATP), acetilcoenzima A, dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD<sup>+</sup>), difosfato de uridina (UDP) glicose ou UDP glutationa (Wright, 2005).

As enzimas redox têm ação de oxidação ou redução dos antibióticos, apesar de não serem tão bem exploradas por bactérias patogênicas (Wright, 2005). Já as liases utilizam rotas não-hidrolíticas ou não-oxidativas para clivar ligações carbono-carbono, carbono-oxigênio, carbono-nitrogênio e carbono-enxofre (Kermasha; Eskin, 2021; McDonald; Tipton, 2023; Wright, 2005). Essas reações podem resultar na formação de ligações duplas ou no fechamento do anel do antimicrobiano (McDonald; Tipton, 2023; Wright, 2005).

### 2.4.2.3 Alteração da molécula-alvo

Os antibióticos, em sua maioria, têm elevada afinidade aos seus alvos na bactéria (Blair *et al.*, 2015; Tortora; Funke; Case, 2017). A neutralização da ação desses antimicrobianos se dá através de pequenas modificações na estrutura em que ele se liga, dessa forma, a molécula alvo ainda consegue ter a sua função normal dentro da célula (Blair *et al.*, 2015). Essas mutações pontuais no gene que codifica a estrutura a qual o antibiótico vai se ligar faz com que populações microbianas consigam sobreviver ao tratamento e proliferem (Blair *et al.*, 2015; Madigan *et al.*, 2016). Assim, esses indivíduos repassam o gene de resistência, em que, na maioria das bactérias resistentes, estão localizados nos plasmídeos R, os quais são transmitidos horizontalmente (Blair *et al.*, 2015). Por exemplo, o principal mecanismo de resistência da SARM não se dá pela produção de  $\beta$ -lactamase, mas sim através da modificação no sítio alvo dos  $\beta$ -lactâmicos, a PBP, que está envolvida na síntese da parede celular (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tortora; Funke; Case, 2017). Essa alteração resulta na proteína mutante, PBP2a, codificada através do gene *mecA*, que se liga fracamente ao antibiótico, dessa forma, permitindo a síntese normal da parede celular (Blair *et al.*, 2015; Madigan *et al.*, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017).

### 2.4.2.4 Efluxo de antibiótico

As bombas de efluxo ejetam rapidamente o antibiótico para fora da célula, assim, o fármaco não consegue atingir uma concentração efetiva para ter alguma atividade sobre a bactéria (Blair *et al.*, 2015; Tortora; Funke; Case, 2017). Essas bombas podem ter especificidade para o substrato ou não; quando conseguem transportar uma ampla variedade de substratos diferentes estruturalmente, são denominadas de bomba de efluxo multirresistente a medicamentos (MDR) (Blair *et al.*, 2015).

## 2.5 Biofilmes bacterianos

### 2.5.1 Histórico

Antony van Leeuwenhoek (1632-1723) fez a primeira observação e descrição de biofilme, em que examinou no seu microscópio rudimentar a “escama” de seus dentes e as “partículas” raspadas de sua língua (Dobell, 1960; Høiby, 2014). Estavam presentes nesse material o que ele denominou de “animáculos”, que eram os microrganismos que faziam parte

da microbiota bucal normal e do desenvolvimento do que é intitulado placa bacteriana (Dobell, 1960). Louis Pasteur (1822-1895), posteriormente, observou a formação de agregados de bactérias, que ele descreveu como uma "membrana", formados por *Mycoderma aceti*, espécie causadora da acetificação do vinho (Pasteur, 1864).

A partir do século seguinte, os biofilmes e os microrganismos produtores de biofilme não foram objetos de estudo visados pelos pesquisadores, já que a investigação de microrganismos era focada em espécies planctônicas patogênicas, principalmente no âmbito clínico (Høiby, 2014, 2017). O termo “filme” para se referir a adesão, agregação e multiplicação bacteriana em superfícies, foi utilizado inicialmente na microbiologia marinha nos trabalhos de Henrici (1933) e de Zobell e Allen (1935) para distinguir bactérias sésseis de bactérias planctônicas (Høiby, 2014). O primeiro estudo verificou a bioincrustação dos microrganismos através de microscopia direta (Henrici, 1933; Høiby, 2014, 2017). Já o segundo trabalho investigou o desenvolvimento do biofilme e que essa “película” poderia promover a fixação dos microrganismos (Høiby, 2014, 2017; Zobell; Allen, 1935).

Ron Gibbons, entre os anos de 1960 e 1990, estudou os biofilmes que constituem a placa dental, como também a agregação desses microrganismos e como isso afeta a colonização da microbiota bucal (Ellen; Loesche; Bratthall, 2005; Gibbons, 1996; Gibbons *et al.*, 1990). Nesse intervalo de tempo, Jones, Roth e Sanders (1969), através de microscopia eletrônica de varredura, analisaram biofilmes presentes em filtros de uma estação de tratamento de águas residuais. No mesmo trabalho, foi possível ver que esses agregados celulares são formados por diversos microrganismos e a matriz do biofilme é constituída, principalmente, por polissacarídeos (Jones; Roth; Sanders, 1969). Além disso, entre 1970 e 1972, em estudos realizados por Høiby, foi observada a ligação entre agregado bacteriano e infecção persistente através de microscopia de rotina em pacientes com infecção crônica do pulmão causada por *P. aeruginosa* (Høiby, 1974; Høiby *et al.*, 1977; Høiby; Axelsen, 1973).

A palavra “biofilme” foi citada pela primeira vez no trabalho de Mack, Mack e Ackerson (1975), em um contexto de microbiologia ambiental. Nesse estudo, foi relatada a presença do biofilme em filtros biológicos, os quais são utilizados para remover matéria orgânica de águas residuais (Høiby, 2014, 2017; Mack; Mack; Ackerson, 1975). No entanto, a primeira vez que esse termo foi utilizado em um relatório médico foi em 1981 (Jendresen *et al.*, 1981; Jendresen; Glantz, 1981). Gradualmente, a palavra “biofilme” foi sendo utilizada como o termo mais adequado para designar o crescimento sésil *in vivo* (Høiby, 2014, 2017). Esse avanço foi impulsionado, principalmente, pelas contribuições do pesquisador Bill Costerton, cujas pesquisas abriram novos caminhos para a compreensão sobre infecções por biofilme,

enfatizando a importância da presença dessas microcomunidades e sua relação com infecções recorrentes (Costerton; Geesey; Cheng, 1978; Høiby, 2014, 2017).

### 2.5.2 Conceitos básicos

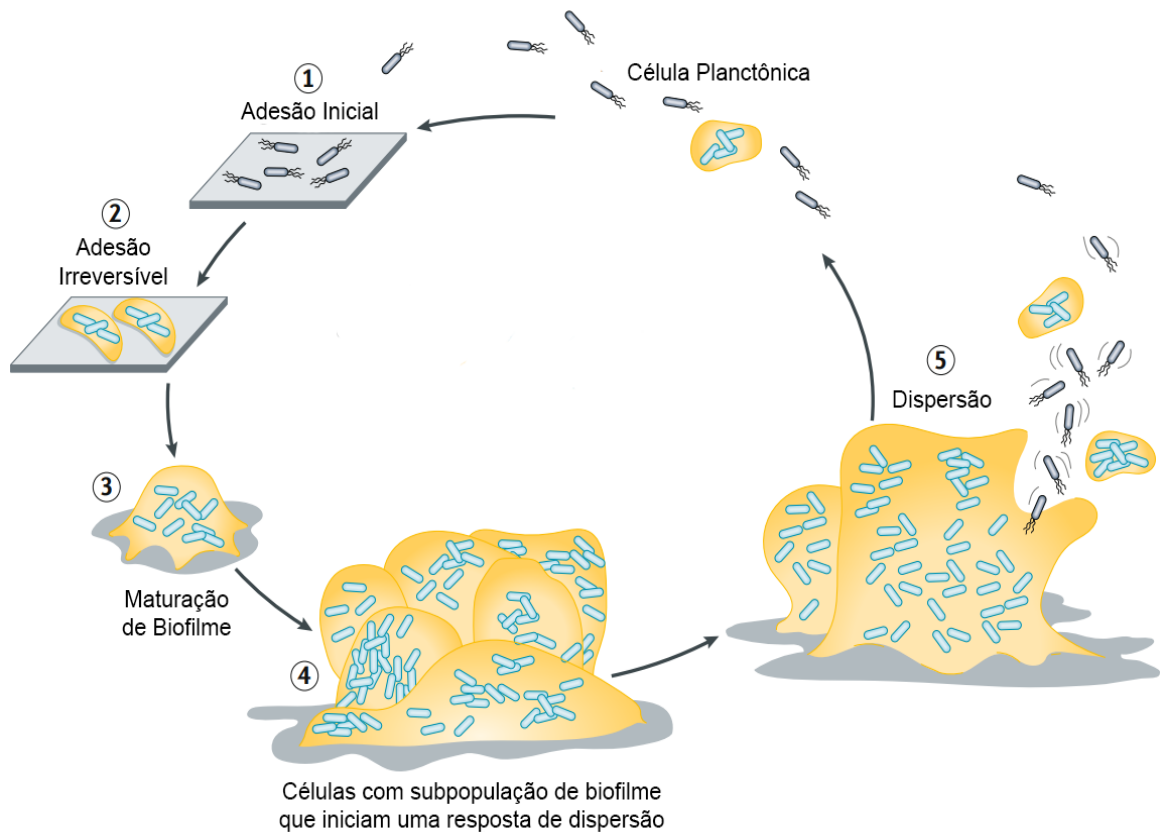
Biofilmes podem ser definidos como comunidades de células ligadas entre si e/ou agregados a uma superfície biótica ou abiótica, as quais estão inseridas em uma matriz constituída de substância polimérica extracelular (SPE) autoproduzida (Vert *et al.*, 2012). Os biofilmes podem ter formato plano ou de cogumelo, dependendo da disposição de nutrientes no ambiente em que estão estabelecidos (Klausen *et al.*, 2003). A presença do biofilme permite, aos microrganismos inseridos nele, um estilo de vida diferente das células de vida livre (Ceri *et al.*, 1999; Flemming; Wingender, 2010; Rumbaugh; Sauer, 2020). Isso acontece porque a presença da SPE oferece vantagens em comparação às células planctônicas, como maior tolerância a estresse, oxidação, ressecamento, escassez de nutrientes e resistência à antimicrobianos (Flemming; Wingender, 2010; Rumbaugh; Sauer, 2020). Essa resistência aos antibióticos pode ser de cem a mil vezes maior em comparação as células planctônicas (Ceri *et al.*, 1999). Ademais, os genes de resistência das células contidas no biofilme podem exibir diferentes padrões de expressão dependendo do ambiente em que aquela microcomunidade está inserida, como também do estresse ao qual são submetidas (Bagge *et al.*, 2004; Davey; O'toole, 2000; Floyd *et al.*, 2015; Hadjifrangiskou *et al.*, 2012; Lenz *et al.*, 2008).

A matriz polimérica pode chegar a constituir 90% da massa seca do biofilme, enquanto os microrganismos representam menos de 10% (Flemming; Wingender, 2010). Além disso, o biofilme permite a proximidade entre os microrganismos, sendo possível o estabelecimento de uma comunicação célula-célula, através da produção de moléculas sinalizadoras (Hall-Stoodley; Stoodley, 2009; Rumbaugh; Sauer, 2020; Waters; Bassler, 2005). Essa comunicação intercelular é definida como *quorum sensing* (QS), que depende diretamente da densidade celular (Hall-Stoodley; Stoodley, 2009; Rumbaugh; Sauer, 2020).

### 2.5.3 Estágios de formação do biofilme

A formação do biofilme ocorre em cinco estágios, ilustrados na Figura 4, sendo eles: fase planctônica; adesão reversível; adesão irreversível; crescimento e formação de microcolônias; maturação e dispersão (Magana *et al.*, 2018).

**Figura 4.** Ciclo de formação do biofilme.



Fonte: Rumbaugh; Sauer (2020), adaptado pelo autor.

### 2.5.3.1 Adesão reversível

Nessa etapa, bactérias móveis e não-móveis utilizam diferentes estratégias para colonizar a superfície, porém, ambas utilizam apêndices, como flagelo ou fimbria/pili, e moléculas da superfície celular, como adesinas, para o reconhecimento e a adesão inicial a superfície (Dwivedi; Sehgal, 2022; Kierek-Pearson; Karatan, 2005). Essa ligação reversível é mediada pela força de van der Waals (Dwivedi; Sehgal, 2022). Nesse primeiro contato da célula com a superfície, as bactérias são fracamente aderidas, podendo retornar ao estilo de vida planctônico (Petrova; Sauer, 2012).

As bactérias desenvolveram o mecanismo de motilidade ativa juntamente com o movimento passivo, que é governado pelo movimento browniano e pelas forças gravitacionais (Beloin; Roux; Ghigo, 2008; Marshall; Stout; Mitchell, 1971). Esses mecanismos permitem que as bactérias superem as forças repulsivas eletrostáticas e hidrodinâmicas presentes na superfície, aumentando a chance de interação com o local onde estão presentes (Beloin; Roux; Ghigo, 2008; Donlan, 2002; Marshall; Stout; Mitchell, 1971). As forças hidrodinâmicas também podem influenciar esse processo, atrapalhando ou auxiliando a fixação, o que

dependerá também da superfície onde o microrganismo está aderido (Donlan, 2002). Se as forças repulsivas forem predominantes, ou seja, mais fortes, do que as forças de atração, a bactéria irá se desprender da superfície (Garrett; Bhakoo; Zhang, 2008).

#### 2.5.3.2 Adesão irreversível

A presença de apêndices e proteínas de adesão permite que a bactéria supere a camada hidrodinâmica limite, atingida por forças de atrito, e a força repulsiva da superfície em contato com as células (Donlan, 2002; Garrett; Bhakoo; Zhang, 2008; Jones; Isaacson, 1982; Pratt; Kolter, 1999). Isso possibilita uma fixação mais permanente à superfície, fazendo com que as células passem do estágio reversível para o irreversível (Donlan, 2002; Garrett; Bhakoo; Zhang, 2008; Jones; Isaacson, 1982). Várias forças de curto alcance estão envolvidas nesse estágio, como interações dipolo-dipolo e hidrofóbicas; ligações de hidrogênio, iônicas e covalentes; além da força de van der Waals (Dwivedi; Sehgal, 2022; Kumar; Anand, 1998). Nesse estágio, as células deixam de ter o movimento browniano (Marshall; Stout; Mitchell, 1971). A associação irreversível com a superfície também se torna possível através da ponte de fibrilas poliméricas formada entre a bactéria e o substrato (Kumar; Anand, 1998).

A expressão de genes relacionados à produção de polissacarídeos é induzida e também é um indicador do início da adesão irreversível (Donlan, 2002; Petrova; Sauer, 2012). Nesta etapa, há redução do comportamento de enxame associado à superfície (Petrova; Sauer, 2012). No processo de transição, o monofosfato de guanosina dimérico bis-(3'-5')-cíclico (c-di-GMP), que é um segundo mensageiro intracelular, está envolvido na regulação da síntese e produção de SPE, podendo aumentar a formação de biofilme e/ou promover a transição do estado móvel para o estado sésil (Toyofuku *et al.*, 2016). Outro segundo mensageiro, a adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP), também está envolvido neste processo, regulando a adesão à superfície celular e alterando a hidrofobicidade da superfície celular (Fahmi *et al.*, 2019; Ono *et al.*, 2014).

#### 2.5.3.3 Crescimento e formação de microcolônias

Esse estágio envolve fatores de autoagregação e de agregação celular, com a formação e crescimento de microcolônias (Hall-Stoodley; Costerton; Stoodley, 2004; Reisner *et al.*, 2003). Após as microcolônias se aderirem de forma irreversível a uma superfície, tornam-se mais espessas, superior a 10 µm, e com várias camadas de profundidade, contendo,

geralmente, de três a cinco (Aparna; Yadav, 2008; Davey; O'toole, 2000). Essa etapa também é chamada de maturação I, enquanto a fase tardia do biofilme maduro é nomeada de maturação II (Aparna; Yadav, 2008). Entretanto, para a formação das microcolônias é necessário, além da interação estável com a superfície, interações intercelulares estáveis e crescimento clonal, o qual é controlado pela presença de nutrientes no ambiente (Reisner *et al.*, 2003; Stanley; Lazazzera, 2004). Esses substratos estão presentes no filme condicionador, que é a base em que o biofilme cresce, podendo ser composto de muitas partículas orgânicas ou inorgânicas e no próprio ambiente fluído dessas células (Garrett; Bhakoo; Zhang, 2008; Kumar; Anand, 1998). Durante essa etapa, há a produção de SPE, cuja função é de ancorar as células à superfície em que elas estão inseridas, evitando que a colônia sofra pelas flutuações do ambiente e, dessa forma, estabilizando-as (Characklis; Marshall, 1990).

As microcolônias podem ser compostas por somente uma ou várias espécies (Davey; O'toole, 2000; Donlan, 2002; O'Toole; Kaplan; Kolter, 2000). No caso de biofilmes multiespécies, geralmente, ocorre uma associação benéfica para todas as partes envolvidas naquele microambiente (Davey; O'toole, 2000; Elias; Banin, 2012; Peyyala; Ebersole, 2013). Os organismos podem cooperar metabolicamente entre si, já que essa proximidade entre as células facilita a troca de substratos e a distribuição ou remoção de produtos metabólicos tóxicos, favorecendo o crescimento dessas bactérias (Davey; O'toole, 2000; Elias; Banin, 2012). Nessa etapa de formação de microcolônias, se estabelece o QS (comunicação intercelular), que consiste na produção de autoindutores, os quais são utilizados para estimular ou controlar a expressão de genes dentro da comunidade de acordo com o aumento da densidade populacional celular (Solano; Echeverz; Lasa, 2014; Stanley; Lazazzera, 2004; Waters; Bassler, 2005). Isso acontece porque a microcomunidade atinge uma densidade celular propícia para que os autoindutores alcancem níveis suficientes para ativar a maturação e, conseqüentemente, a dispersão do biofilme (Solano; Echeverz; Lasa, 2014; Waters; Bassler, 2005).

#### 2.5.3.4 Maturação

Desde o início do processo de adesão para a formação do biofilme até a etapa de maturação, as bactérias presentes nessa transição passam por mudanças significativas (Kierck-Pearson; Karatan, 2005; O'Toole; Kaplan; Kolter, 2000). Nessa fase, também chamada de maturação II, o biofilme desenvolve uma estrutura mais complexa, geralmente com uma arquitetura tridimensional em formato de cogumelo (Aparna; Yadav, 2008; Donlan, 2002; Kierck-Pearson; Karatan, 2005; Rumbaugh; Sauer, 2020). No entanto, também pode apresentar

outras formas, como estruturas planas, semelhantes a pilares, ou até mesmo sem uma estrutura definida (Aparna; Yadav, 2008; Donlan, 2002; Kierek-Pearson; Karatan, 2005; Rumbaugh; Sauer, 2020). Adicionalmente, também ocorre a formação de poros e de canais de água, além da formação de um microambiente heterogêneo (Donlan, 2002; Kierek-Pearson; Karatan, 2005; Rumbaugh; Sauer, 2020). Nos canais de água, há um fluxo de líquido que permite a difusão de nutrientes, oxigênio e até mesmo de agentes antimicrobianos (Donlan, 2002).

Muitos parâmetros podem influenciar a estrutura e a arquitetura dos biofilmes, principalmente a disponibilidade de nutrientes no ambiente em que estão presentes (Kierek-Pearson; Karatan, 2005). Nesse ponto, o aglomerado e as microcolônias atingem a sua espessura máxima, geralmente, sendo superior a 100  $\mu\text{m}$  (Aparna; Yadav, 2008; Rumbaugh; Sauer, 2020). O biofilme maduro é composto por três camadas, sendo elas: a camada externa, que é a parte do lado externo do biofilme, em que as bactérias planctônicas ficam e cuja grande parte do filme superficial é composta de SPE; a camada intermediária, que é o filme base onde ficam um conjunto compacto de células, as quais secretam e mantêm o filme de ligação; a camada interna, onde fica o filme de ligação, que é responsável por ligar todo o biofilme a superfície em que está inserido, sendo composto por glicoproteínas e exopolissacarídeos secretados pelas bactérias presentes nesse microambiente (Silverstein; Donatucci, 2003; Zhao *et al.*, 2017).

#### 2.5.3.5 Dispersão

Com o passar do tempo, o biofilme envelhece e os recursos acabam se tornando insuficientes para manter todas as células naquela microcomunidade (Donlan, 2002; Kierek-Pearson; Karatan, 2005; Preda; Săndulescu, 2019). Nesse ponto, a biomassa atinge uma quantidade crítica e o equilíbrio dinâmico é alcançado (Donlan, 2002; Kierek-Pearson; Karatan, 2005; Kumar; Anand, 1998; Preda; Săndulescu, 2019). Então, em situações como essa, acontece a dispersão, em que bactérias inseridas no biofilme saem em busca de nutrientes e de um novo ambiente para se estabelecerem (Donlan, 2002; Kierek-Pearson; Karatan, 2005; Kumar; Anand, 1998). Isso acontece porque no biofilme existe um gradiente de disponibilidade de nutrientes e oxigênio, em que essa biomassa se torna mais anaeróbica no seu interior e há uma menor disponibilidade de substrato; além do acúmulo de metabólitos secundários (Donlan, 2002; Preda; Săndulescu, 2019; Serra; Hengge, 2014; Stewart; Franklin, 2008).

O biofilme pode se desprender de três formas: por enxameação/semeadura, na qual células individuais são liberadas da microcolônia no ambiente circundante; por liberação de aglomerados, em que agregados celulares são eliminados; e por dispersão superficial, em que

estruturas do biofilme se movem através da superfície (Hall-Stoodley; Costerton; Stoodley, 2004). A degradação de c-di-GMP resulta na dispersão, visto que níveis baixos dessa molécula sinalizadora contribui para fenótipos associados ao estilo de vida planctônico, promovendo a motilidade celular (Ha; O'Toole, 2015; McDougald *et al.*, 2012; Rumbaugh; Sauer, 2020).

Genes que estão relacionados a regulação da motilidade celular e degradação da SPE estão regulados positivamente (McDougald *et al.*, 2012; Rumbaugh; Sauer, 2020). Já os genes relacionados a adesão, como pili e produção de SPE, estão regulados negativamente (McDougald *et al.*, 2012; Rumbaugh; Sauer, 2020; Zhang *et al.*, 2019). Portanto, nessa etapa, as microcolônias produzem diferentes enzimas que quebram os polissacarídeos estabilizadores do biofilme, liberando as bactérias do topo da microcomunidade para dar continuidade ao ciclo de formação do biofilme, colonizando novas superfícies (Dwivedi; Sehgal, 2022). Os microrganismos que se desprendem, retornam a forma planctônica e regulam positivamente a expressão de genes relacionados ao flagelo e proteínas relacionadas a quimiotaxia, tornando possível a translocação da célula (Dwivedi; Sehgal, 2022; McDougald *et al.*, 2012).

#### **2.5.4 Matriz do biofilme**

A matriz consiste na SPE, embebendo as células presentes nesse microambiente, conferindo ao biofilme uma aparência de hidrogel (Donlan, 2002; Flemming; Wingender, 2010; Hall-Stoodley; Costerton; Stoodley, 2004). A matriz contém uma variedade de moléculas, incluindo: proteínas, metabólitos secundários, DNA extracelular (eDNA), enzimas, água, lipídios, exopolissacarídeos, produtos de lise celular, entre outros (Flemming; Wingender, 2010; Sutherland, 2001). Além disso, a matriz, em geral, não é uniforme e simples, há a presença de canais de água e poros que permeiam o biofilme (Costerton; Stewart, 2001; Flemming; Wingender, 2010; Kierek-Pearson; Karatan, 2005; Rumbaugh; Sauer, 2020; Sutherland, 2001). Esses canais atuam auxiliando no transporte de líquidos, metabólitos, enzimas, entre outras moléculas; e impedindo a acumulação de produtos residuais, além de terem o papel de fornecer nutrientes para o biofilme (Costerton; Stewart, 2001; Flemming; Wingender, 2010; Sutherland, 2001).

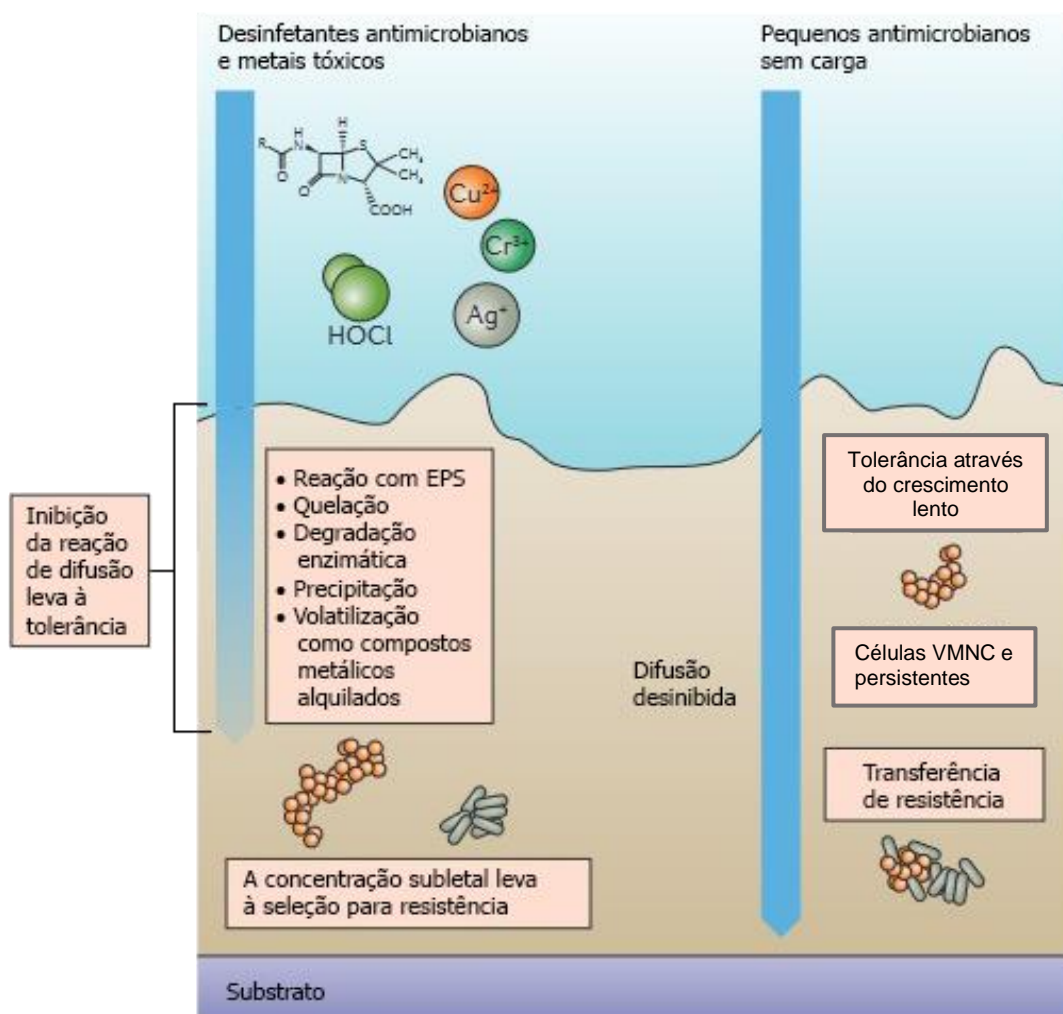
Dentre as várias funções que a SPE pode exercer, estão: adesão, agregação de células bacterianas, coesão de biofilmes, retenção de água, barreira de proteção, sorção de compostos orgânicos e de íons inorgânicos, atividade enzimática, fonte de nutrientes, troca de informação genética, exportação de componentes celulares e ligação de enzimas (Allison, 2003; Flemming; Wingender, 2010; Sutherland, 2001). Em adição, a matriz atua como um sistema

digestivo, devido a presença de enzimas, que transformam biopolímeros em produtos de baixa massa molecular para serem utilizados como fonte de energia e carbono (Flemming *et al.*, 2016; Flemming; Wingender, 2010). Ademais, essas enzimas podem estar envolvidas no processo de degradação da SPE para promover a dispersão das células do biofilme ou atuar como fatores de virulência (Flemming *et al.*, 2016; Flemming; Wingender, 2010; Wang *et al.*, 2023).

### 2.5.5 Resistência dos biofilmes

Os biofilmes são mais resistentes à ação de antimicrobianos em comparação às células planctônicas (Ceri *et al.*, 1999). Isso se dá pelas várias propriedades dessas comunidades (Ceri *et al.*, 1999; Flemming *et al.*, 2016). Essas características estão apontadas na Figura 6 e serão comentadas abaixo.

**Figura 5.** Mecanismos de resistência dos biofilmes aos antimicrobianos.



Fonte: Flemming *et al.* (2016), adaptado pelo autor. Bactérias em estado viável, mas não cultivável (VMNC).

A primeira propriedade é a própria matriz do biofilme. A SPE atua diluindo ou se ligando a agentes antimicrobianos e moléculas reativas ou carregadas, neutralizando-os (Flemming *et al.*, 2016; Hall-Stoodley; Costerton; Stoodley, 2004). Dessa forma, as concentrações desses compostos tornam-se subletais antes de atingirem as células dentro do biofilme, permitindo que as bactérias sejam expostas a uma concentração subinibitória do antibiótico (Donlan, 2000; Flemming *et al.*, 2016; Flemming; Wingender, 2010; Hall-Stoodley; Costerton; Stoodley, 2004). A SPE também pode extinguir a atividade de substâncias antimicrobianas por inibição da reação de difusão, que pode ocorrer através formação de complexos por meio de quelação de compostos; degradação e conversão enzimática; precipitação química ou por meio de um agente biológico; e alquilação de compostos metálicos, levando a volatilização dessas moléculas (Flemming *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2021; Yadav; Chandra, 2020). A exposição em concentrações subletais pode aumentar a probabilidade de seleção de bactérias com perfil de RAM, visto que as células em contato com concentrações subinibitórias podem sobreviver ao estresse antimicrobiano (Flemming *et al.*, 2016).

A segunda propriedade é a heterogeneidade do biofilme, que evita a morte de todas as células inseridas neste microambiente (Luo *et al.*, 2021; Mah; O'Toole, 2001). A não homogeneidade da matriz protege as células do biofilme de agentes antimicrobianos, além de ser um gradiente de fatores de sinalização, produtos residuais, nutrientes e oxigênio (Flemming *et al.*, 2016; Mah; O'Toole, 2001; Singh *et al.*, 2017). Dessa forma, de acordo com a disponibilidade de recursos, as células inseridas nesse microconsórcio experimentam ambientes ligeiramente diferentes entre si dentro do mesmo biofilme (Singh *et al.*, 2017). Como resultado, essas bactérias crescem em taxas metabólicas diferentes, em que a tolerância aos antimicrobianos aumenta de acordo com a profundidade do biofilme, reforçando a ideia de heterogeneidade dentro na matriz (Mah; O'Toole, 2001; Singh *et al.*, 2017).

A terceira propriedade é a presença de bactérias em estado viável, mas não cultivável (VMNC), que também são chamadas de células dormentes (Li *et al.*, 2014). Esses indivíduos têm uma baixa taxa metabólica, portanto, antimicrobianos que têm como alvo a atividade ou os componentes celulares de microrganismos metabolicamente ativos, acabam sendo menos eficazes contra essas células (Hall-Stoodley; Costerton; Stoodley, 2004; Li *et al.*, 2014). Essas bactérias ficam em zonas denominadas de bolsas de células de dormência de fase estacionária (Flemming *et al.*, 2016; Hall-Stoodley; Costerton; Stoodley, 2004).

A quarta propriedade é a presença de células persistentes que fazem parte de uma pequena porção do biofilme e podem apresentar maior tolerância aos antimicrobianos (Conlon; Rowe; Lewis, 2015). Essas bactérias fazem parte de subpopulações multirresistentes a

antibióticos e apresentam fenótipos distintos, em vez de mutações genéticas, ou seja, suas variações fenotípicas são não-hereditárias (Ayrapetyan; Williams; Oliver, 2015; Helaine; Kugelberg, 2014). Quando o tratamento antibiótico é interrompido ou retirado, essas células persistentes escondidas na matriz podem repovoar o biofilme, voltando a crescer, e, assim, dando continuidade à infecção, tornando-a recorrente (Ayrapetyan; Williams; Oliver, 2015; Helaine; Kugelberg, 2014; Lewis, 2005, 2007).

A quinta propriedade é a presença de enzimas extracelulares inativadoras ou modificadoras de antibióticos na matriz do biofilme (Mah; O'Toole, 2001; Ray; Nag; Lahiri, 2021; Stewart, 2002). Essas enzimas podem ser  $\beta$ -lactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos ou cloranfenicol acetiltransferase (Stewart, 2002). A fonte de  $\beta$ -lactamases nos biofilmes foram consideradas vindas de camadas de bactérias lisadas que foram expostas ao  $\beta$ -lactâmico e que lançaram essas enzimas de defesa no espaço extracelular (Høiby *et al.*, 2010). Além disso, outras enzimas podem ser utilizadas na degradação da SPE para a dispersão dessas microcomunidades e a continuação do ciclo de formação do biofilme (Flemming; Wingender, 2010).

A sexta propriedade é a morte celular programada, que é uma resposta ao estresse ambiental (Allocati *et al.*, 2015; Tanouchi *et al.*, 2013). A microcomunidade pode induzir a morte de uma parte das bactérias inseridas no biofilme para favorecer a sobrevivência da colônia em diversas condições, que incluem: estresse oxidativo, exposição a radiação, escassez de nutrientes, infecções, entre outros (Allocati *et al.*, 2015; Pandey, 2005). Na maior parte das situações, a morte acontece por um sistema chamado toxina-antitoxina (TA), que em condições normais de crescimento, toxinas e antitoxinas formam um complexo estável que inibe a atividade das toxinas (Allocati *et al.*, 2015). Entretanto, em casos de estresse, a antitoxina é degradada do complexo, permitindo a atividade da toxina (Allocati *et al.*, 2015; Pandey, 2005). Quando ocorre a lise dessas células, o conteúdo celular é liberado na matriz do biofilme, contribuindo para produção de fatores de virulência; estabilidade, adesão e desenvolvimento do biofilme; além de ser fonte de nutrientes para os indivíduos inseridos no biofilme (Allocati *et al.*, 2015; Bayles, 2007; Lewis, 2000; Pandey, 2005; Tanouchi *et al.*, 2013).

A sétima propriedade é a presença de eDNA na matriz do biofilme, sendo um dos principais componentes (Ray; Nag; Lahiri, 2021). A acumulação do eDNA resulta na alteração do ambiente extracelular, formando resistência através do quelamento de cátions, contribuindo no gradiente dessas moléculas e acidificando o meio (Mulcahy; Charron-Mazenod; Lewenza, 2008; Wilton *et al.*, 2016). Dessa forma, há a indução de vias de sinalização que auxiliam no desenvolvimento de RAM (Wilton *et al.*, 2016). Além disso, tratamentos com doses subletais

de antibióticos desencadeiam o lançamento desse componente da matriz do biofilme (Lahiri *et al.*, 2021). Ademais, o eDNA pode ter outras funções, como fonte de carbono; auxílio no QS, no reparo do DNA e na transferência de genes; além de modular a interação com componentes da SPE (Dutta *et al.*, 2021; Ratha; Lahiri; Ray, 2021). O eDNA também tem papel fundamental na integridade da matriz, através da estabilização de cargas, pois fornece uma rigidez estrutural e protege a matriz da resposta imune do hospedeiro, além de contribuir para adesão intercelular, sinalização celular e influenciar na hidrofobicidade da superfície bacteriana (Dutta *et al.*, 2021; Panlilio; Rice, 2021). Entretanto, a origem do eDNA difere entre espécies, podendo decorrer da lise celular ou da liberação de vesículas extracelulares, por exemplo (Flemming; Wingender, 2010; Ibáñez de Aldecoa; Zafra; González-Pastor, 2017; Puca *et al.*, 2019).

A oitava propriedade é o estabelecimento do QS, que depende diretamente da produção de autoindutores, os quais podem modular o comportamento dentro do biofilme (Luo *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2017; Zhao; Yu; Ding, 2020). O QS está relacionado a fatores de virulência, RAM, resposta a fatores de estresse e defesa bacteriana; além de influenciar a formação do biofilme, como também a heterogeneidade desse microambiente, através da regulação da síntese de enzimas de degradação (Deng *et al.*, 2020; Zhao; Yu; Ding, 2020).

### **2.5.6 Importância clínica**

Ao longo dos anos, a humanidade tem sido continuamente afetada com infecções relacionadas a formação de biofilmes bacterianos, as quais são um grande desafio, visto que afetam diretamente a qualidade de vida dos pacientes, além de aumentar as taxas de morbidade e mortalidade (Darouiche, 2004; Del Pozo, 2018). Infecções causadas por biofilmes em tecidos ou dispositivos médicos pode levar a ineficácia de terapias utilizadas nos tratamentos clínicos, por conta da resistência intrínseca dessas microcomunidades (Bryers, 2008; Sharma; Misba; Khan, 2019). No contexto clínico, os biofilmes estão associados a 60% de todas as infecções bacterianas, sendo responsáveis por aproximadamente 80% das infecções microbianas crônicas e recorrentes (Lewis, 2001; Sharma; Misba; Khan, 2019). Infecções relacionadas aos biofilmes estão apontadas na Figura 6.

Os dispositivos médicos que estão comumente associados com infecções por biofilmes são: cateter venoso central, cateter uretral, válvulas cardíacas mecânicas, dispositivos de assistência ventricular, *stents* coronários, derivações ventriculares neurocirúrgicas, cateter de diálise peritoneal, próteses ortopédicas, dispositivos de fixação de fraturas, tubos endotraqueais, implantes penianos infláveis, implantes mamários e implantes cocleares (Lynch;

Robertson, 2008). Estudos realizados entre 2001 e 2020 revelaram que entre 59 e 100% dos isolados clínicos, de espécies de bactérias e fungos, provenientes de cateteres, dispositivos médicos e sítios cirúrgicos eram capazes de formar biofilme (Cangui-Panchi *et al.*, 2022). Dentre os principais microrganismos associados a infecções relacionadas a biofilmes estão: *S. mutans*, *E. faecalis*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Haemophilus influenza*, *Burkholderia cepacia* e *Mycobacterium tuberculosis* (Sharma; Misba; Khan, 2019).

**Figura 6.** Representação esquemática das infecções relacionadas aos biofilmes.



Fonte: Mihai *et al.* (2015), adaptado pelo autor.

## 2.6 *Staphylococcus*

*Staphylococcus* é um gênero heterogêneo composto por várias espécies colonizadoras comensais de pele e mucosas, encontradas tanto em seres humanos quanto em outros animais de sangue quente (Lee; Yang, 2021; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Władyska; Bonar, 2018). “*Staphylo*” vem do grego “*Staphylê*”, que significa cacho de uvas, e “*coccus*” vem também do grego “*κόκκος*”, que por sua vez significa “grão”, “semente”, “baga” (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tortora; Funke; Case, 2017). Dessa forma, as bactérias desse gênero

são cocos Gram-positivos, ou seja, apresentam forma esférica e cor roxa ou violeta na coloração de Gram; além disso, se agrupam em forma de cachos e não apresentam endósporos (Madigan *et al.*, 2016; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tortora; Funke; Case, 2017). A maioria das espécies tem 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, é imóvel e pode crescer em condições diversas, como ambientes aeróbios e anaeróbios (facultativos), elevadas concentrações de sal e temperaturas, variando entre 18 e 40 °C (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

Os *Staphylococcus* são catalase positivos e se dividem em dois subgrupos: estafilococos coagulase positivo (ECP) e estafilococos coagulase negativo (ECN) (Lee; Yang, 2021; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Władyka; Bonar, 2018). Algumas espécies pertencentes ao primeiro grupo são: *S. aureus* e *S. pseudintermedius* (González-Martín *et al.*, 2020; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). As demais espécies fazem parte do segundo, sendo alguns exemplos: *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus* (González-Martín *et al.*, 2020). A coagulase atua como um fator de virulência que ativa a protrombina, desencadeando a polimerização da fibrina, resultando na coagulação sanguínea no hospedeiro (Bonar; Międzobrodzki; Władyka, 2018; Cheng *et al.*, 2010; McAdow; Missiakas; Schneewind, 2012). Consequentemente, isso culmina na reticulação de bactérias no coágulo, permitindo a evasão dos microrganismos da resposta do sistema imunológico do hospedeiro (Bonar; Międzobrodzki; Władyka, 2018; Cheng *et al.*, 2010). Ademais, a coagulase também é essencial para a formação e persistência de abscessos (Cheng *et al.*, 2010; McAdow; Missiakas; Schneewind, 2012). As espécies que estão frequentemente associadas a doenças em humanos são: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus* (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

### 2.6.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria comensal encontrada na microbiota humana saudável, colonizando pele e mucosas, sendo comumente encontrada na região nasofaríngea (Lynch; Robertson, 2008). Essa espécie é uma ECP e é a mais conhecida do gênero, além de ser o membro mais virulento (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Nobre *et al.*, 2021; Tong *et al.*, 2015). Apesar de ser um colonizador frequente de humanos, *S. aureus* também é um microrganismo patogênico, sendo uma das principais causas de infecções de pele e tecidos moles; bacteremia; endocardite e osteomielite (Turner *et al.*, 2019; Venkataraman *et al.*, 2023). Ademais, devido à sua frequente associação com IRAS, esta bactéria possui grande importância clínica (Turner *et al.*, 2019).

Em 1880, o cirurgião escocês Alexander Ogston observou pus de abscessos cirúrgicos, e nomeou o grupo de micrococcos observados de *Staphylococcus* (Cheng *et al.*, 2011; Götz; Bannerman; Schleifer, 2006; Newsom, 2008; Parastan *et al.*, 2020). Posteriormente, esse material clínico foi inoculado em ovos, para obtenção de cultura pura, e injetado em animais, resultando no desenvolvimento de abscessos, representando a primeira notificação de isolamento de *S. aureus* (Götz; Bannerman; Schleifer, 2006; Newsom, 2008). A origem da palavra “*aureus*” vem do latim e significa “dourado” ou “ouro”, remetendo a característica das suas colônias (Bhunja, 2018; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tortora; Funke; Case, 2017). As doenças causadas por essa bactéria podem ser cutâneas, piogênicas, mediadas por toxina ou outras infecções sistêmicas (exemplos: bacteremia, endocardite e pneumonia); podendo causar infecções simples (celulites, espinhas e furúnculos) até graves (meningite, síndrome do choque tóxico, entre outras) (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Santos *et al.*, 2007).

#### 2.6.1.1 Importância da *S. aureus* como patógeno

*Staphylococcus aureus* se tornou um patógeno importante por impactar diretamente a saúde pública global e a economia, visto que essa espécie está associada a taxas consideráveis de mortalidade e morbidade (Lowy, 1998; O’Riordan; Lee, 2004; Tigabu; Getaneh, 2021; Visansirikul; Kolodziej; Demchenko, 2020). Essa bactéria está frequentemente presente em IRAS que envolvem biofilmes, sendo listada pela OMS como um patógeno prioritário para orientar novos estudos e desenvolvimento de antibióticos (Tacconelli *et al.*, 2018; World Health Organization, 2017, 2024). *S. aureus* resistente a meticilina e a vancomicina está classificada como alta prioridade nessa lista (World Health Organization, 2017, 2024).

Além disso, *S. aureus* é uma espécie produtora de biofilme, e a presença desse microconsócio em infecções acaba causando resistência a antibióticos, como também evasão à resposta imune do hospedeiro, além de aumentar a probabilidade de desenvolvimento de infecções agudas, persistentes e crônicas (Howden *et al.*, 2023; Otto, 2008). Em adição, *S. aureus* está comumente associada a infecções relacionada a biofilmes em dispositivos médicos, que, para além da resistência antimicrobiana, também acabam por se tornar reservatórios de disseminação dessa espécie para outros locais do corpo humano (Otto, 2008; Suresh; Biswas; Biswas, 2019). Diante o exposto, fica evidente a importância clínica de *S. aureus* e a urgência de se conhecer os fatores de virulência produzidos por essa bactéria, entender os seus mecanismos de evasão imunológica, como também os processos e moléculas envolvidas na formação de biofilme.

### 2.6.1.1.1 Importância da *S. aureus* resistente à meticilina (SARM)

Em 1959, a meticilina foi introduzida no tratamento de infecções por *S. aureus* resistente a penicilina (Enright *et al.*, 2002; Tortora; Funke; Case, 2017). Posteriormente, em 1961, foi reportada a primeira SARM (Jevons, 1961; Tortora; Funke; Case, 2017). Então, houve uma maior incidência de infecções por SARM, especialmente na década de 1980, tornando-se um problema endêmico e recorrente em vários países (Cookson, 2011; Enright *et al.*, 2002; Tortora; Funke; Case, 2017). Para contornar esse problema, a vancomicina começou a ser utilizada no tratamento de infecções por SARM, levando ao aumento do uso deste antibiótico (Tortora; Funke; Case, 2017). Porém, no final da década de 1990, a sensibilidade à vancomicina se mostrava menor em algumas infecções por *S. aureus*, e essas estirpes foram denominadas de *S. aureus* intermediário-resistente à vancomicina (SAIV) (Howden *et al.*, 2010b; Tortora; Funke; Case, 2017). Em 2002, foi relatada a primeira infecção por *S. aureus* resistente à vancomicina (SARV) nos Estados Unidos (Quirk, 2002; Tortora; Funke; Case, 2017).

A importância clínica de estirpes SARM se dá pelo fato de que a resistência a meticilina confere, também, resistência a todas as penicilinas e cefalosporinas que são penicilinas-resistentes (Lowy, 1998). Essa resistência está relacionada a uma modificação na PBP, que fica na membrana celular bacteriana interna (Tortora; Funke; Case, 2017). Em relação ao impacto dela como uma estirpe importante no contexto clínico, o estudo de Leung (2014) aponta que infecções por SARM têm o dobro de mortalidade em um período de 30 dias em comparação às infecções por *S. aureus* sensível à meticilina (SASM). Nesse mesmo trabalho, é estimado que a SARM seja responsável por cerca de 171.200 IRAS na Europa todos os anos, sendo associada a 5.400 mortes adicionais atribuíveis (Leung, 2014).

Em relação as estirpes SAIV e SARV, os isolados resistentes à vancomicina possuem mecanismo de disseminação diferente e potencial de infecção mais eficiente do que as estirpes sensíveis a este antibiótico (Schito, 2006). As estirpes SAIV ocorrem em subpopulações heterogêneas na presença de vancomicina, exercendo uma pressão seletiva e, assim, favorecendo o desenvolvimento de estirpes raras e resistentes a esse antibiótico (Tarai; Das; Kumar, 2013). Dessa forma, bactérias com o fenótipo favorável à sobrevivência a esse antimicrobiano leva ao surgimento de estirpes de *S. aureus* com heterorresistência intermediária a vancomicina (hSAIV) (Liu; Chambers, 2003; Tarai; Das; Kumar, 2013). Com a exposição contínua e a seleção desses fenótipos, eventualmente essa população se torna SAIV (Tarai; Das; Kumar, 2013). Essa característica de resistência de estirpes SAIV ocorre devido à síntese de maiores quantidades de peptidoglicano com resíduos expostos de D-alanil-D-alanina, que se

ligam e capturam a vancomicina (Schito, 2006). Ademais, essas estirpes possuem parede celular mais espessa em comparação àquelas não-SAIV, a qual retém a molécula de vancomicina e atua como uma barreira física para outras moléculas desse antibiótico (Cosgrove; Carroll; Perl, 2004; Schito, 2006). Bactérias que apresentam essa resistência estão associadas com infecções persistentes, hospitalização, tratamento prolongado, administração incorreta de vancomicina ou falha terapêutica à antibioticoterapia (McGuinness; Malachowa; DeLeo, 2017).

As estirpes SARV, além de apresentarem os mecanismos de resistência que as estirpes SAIV têm, também podem inibir a incorporação de N-acetilglicosamina (NAG) e N-acetilmurâmico (NAM) na cadeia crescente de peptidoglicano, reagindo com D-alanil-D-alanina (Schito, 2006; Thati; Shivannavar; Gaddad, 2011). Assim, há o bloqueio da liberação da D-alanina terminal, fazendo com que a formação da ligação intracadeia ocorra normalmente (Thati; Shivannavar; Gaddad, 2011). Ou então, essa resistência pode acontecer pela alteração do peptídeo terminal da parede celular D-alanil-D-alanina em D-alanil-D-lactato, impedindo que aconteça a inibição da síntese da parede pela vancomicina (Schito, 2006; Tarai; Das; Kumar, 2013; Thati; Shivannavar; Gaddad, 2011). Em adição, acredita-se que a resistência das estirpes SARV tenha sido adquirida pela transferência conjugal de plasmídeos de *E. faecalis* contendo o operon *vanA*, que dá a característica de resistência a vancomicina (Schito, 2006; Thati; Shivannavar; Gaddad, 2011).

Pacientes que apresentam infecções por SARV, geralmente, tiveram diversas doenças precursoras (incluindo diabetes, ferida gangrenosa ou cirúrgica, insuficiência renal) em que havia co-infecção e co-colonização de *Enterococcus* resistente à vancomicina (ERV) e SARM (Cong; Yang; Rao, 2020; Weigel *et al.*, 2007). Esse ambiente se torna favorável para o desenvolvimento de SARV, principalmente quando a infecção tem a presença de biofilme multiespécie, facilitando a transferência do operon *vanA*, em que a estirpe de ERV doa o gene de resistência à estirpe SARM através da transferência horizontal de plasmídeo (Cong; Yang; Rao, 2020; Weigel *et al.*, 2007; Woodford; Livermore, 2009).

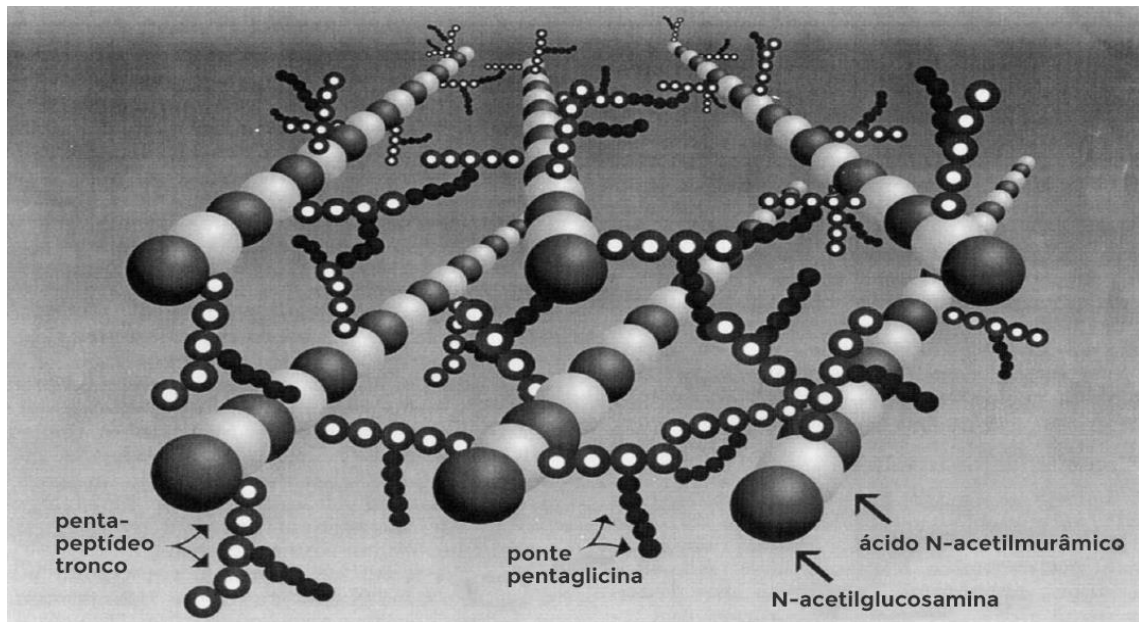
### 2.6.1.2 Componentes

#### 2.6.1.2.1 Parede celular

A parede celular de *S. aureus* é típica de bactérias Gram-positivas, que é composta, principalmente, por peptidoglicano, atuando como uma barreira de proteção (Sharif *et al.*, 2009; Silhavy; Kahne; Walker, 2010). Além disso, essa molécula serve como estrutura de fixação

para matriz extracelular e proteínas de superfície, que são necessárias para a patogênese, morfogênese e divisão celular (Giesbrecht *et al.*, 1998; Sharif *et al.*, 2009; Silhavy; Kahne; Walker, 2010). A parede celular dessa espécie apresenta espessura entre 20 e 40 nm, e a sua estrutura tridimensional está indicada na Figura 7 (Giesbrecht *et al.*, 1998).

**Figura 7.** Representação da estrutura tridimensional do peptidoglicano estafilocócico.



Fonte: Sobral; Tomasz (2019), adaptado pelo autor.

O peptidoglicano, também chamado de mureína, é um heteropolímero, composto por uma estrutura de dissacarídeo alternado de NAG e NAM, em que este último representa o terminal redutor da cadeia (Dmitriev *et al.*, 2004; Giesbrecht *et al.*, 1998). O tronco da estrutura é um pentapeptídeo composto de L-alanina-D-iso-glutamina-L-lisina-D-alanina-D-alanina, em que o grupo carboxila de cada resíduo NAM é amidado por esse pentapeptídeo (Dmitriev *et al.*, 2004; Giesbrecht *et al.*, 1998; Sharif *et al.*, 2009; Sobral; Tomasz, 2019). E a ponte é formada por um segmento de pentaglicina, em que este conecta o grupo  $\epsilon$ -amino do componente lisina de um muopeptídeo à penúltima D-alanina de outro (Sobral; Tomasz, 2019; Strominger; Ghuysen, 1967). Dessa forma, cada peptídeo ligado a um resíduo de NAM é um decapeptídeo ramificado com um grupo amino na glicina e um grupo carboxila no terminal D-alanina (Dmitriev *et al.*, 2004; Sobral; Tomasz, 2019). Os braços das laterais do peptídeo interagem entre si, fornecendo um alto grau de reticulação da mureína (Dmitriev *et al.*, 2004).

Ademais, a proteína A estafilocócica é ancorada covalentemente ao peptidoglicano na parede celular através da sortase A, que por sua vez é uma enzima que catalisa a ligação de proteínas à parede celular (Becker *et al.*, 2014; Bhat *et al.*, 2021; Bhunia, 2018; Marraffini;

DeDent; Schneewind, 2006). Esse mecanismo de ancoragem ocorre através do reconhecimento do motivo LPXTG na região C-terminal das proteínas da parede, em que essa região é clivada na treonina, resultando em uma ligação covalente entre a treonina e as pontes cruzadas de peptidoglicano, no caso as pentaglicinas (Becker *et al.*, 2014; Bhat *et al.*, 2021; Mao *et al.*, 2004; Marraffini; DeDent; Schneewind, 2006; Michel; Allain, 2015). A proteína A está relacionada a evasão de *S. aureus* a resposta imune do hospedeiro (Nikolic; Mudgil, 2023).

Em adição, a parede celular dessa espécie tem a presença de ácidos teicóicos (ATs), que são compostos de subunidades repetitivas de polioli fosfato, como fosfato de ribitol (Rbo-P) ou fosfato de glicerol (Gro-P) (Endl *et al.*, 1983; Madigan *et al.*, 2016; Sanderson; Strominger; Nathenson, 1962; Xia; Kohler; Peschel, 2010). Em geral, os ATs têm a função de regular o movimento de cátions, além de assumirem papel na divisão celular e no crescimento bacteriano, impedindo a ruptura da parede e lise celular (Madigan *et al.*, 2016; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Santa Maria *et al.*, 2014).

Os ATs que são ligados ao peptidoglicano são intitulados ácidos teicóicos da parede (WTA; do inglês *Wall Teichoic Acids*) e os que estão ligados a membrana plasmática são nomeados de ácidos lipoteicóicos (LTA; do inglês *Lipoteichoic Acid*) (Xia; Kohler; Peschel, 2010). Os WTA são compostos, em sua maioria, por Rbo-P, com até 40 unidades de repetição, e os LTA são constituídos por Gro-P, com até 50 unidades de repetição (Endl *et al.*, 1983; Sanderson; Strominger; Nathenson, 1962; Xia; Kohler; Peschel, 2010). O WTA está ligado de forma covalente a parede celular através de uma ligação fosfodiéster entre uma NAG no WTA e uma porção de NAM do peptidoglicano (Joo; Otto, 2015). O LTA está ligado a parede através de uma ancoragem glicolípídica, ligando-se a porção glicerol do diacilglicerol da parte externa da membrana celular; esse AT atravessa a camada de peptidoglicano e se liga a membrana plasmática (Joo; Otto, 2015; Kiriukhin *et al.*, 2001; Percy; Gründling, 2014; Tortora; Funke; Case, 2017). Os LTAs são reconhecidos como antígenos, os quais são utilizados para distinguir os sorotipos bacterianos (Tortora; Funke; Case, 2017). Além disso, esses ATs promovem a fixação entre bactérias e também medeiam a adesão bacteriana à célula mamífera (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Esses polímeros são liberados no meio e no próprio hospedeiro, induzindo resposta imune inata (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Weidenmaier *et al.*, 2005).

#### 2.6.1.2.2 Genoma

O genoma dessa espécie é composto por um único DNA circular de tamanho de 2,8-2,9 Mb, que contém por volta de 2600 genes (Foster; Geoghegan, 2015). O genoma central

de *S. aureus*, em que estão os genes presentes em todas as estirpes, compreende aproximadamente 75% do total do genoma da espécie, com o nível de identidade entre pares de genes ortólogos entre 97,7 e 99,8% (Foster; Geoghegan, 2015; Lindsay; Holden, 2006). A maior parte dessa divergência se dá pelo polimorfismo de nucleotídeo único (Lindsay; Holden, 2006). No genoma central estão os genes de funções essenciais para o crescimento e sobrevivência da espécie, incluindo, também, genes de fatores de virulência, toxinas e enzimas (Foster; Geoghegan, 2015). Mais de 15% do genoma é composto por elementos genéticos móveis, os quais incluem bacteriófagos, transposons, ilhas de patogenicidade e plasmídeos conjugativos (Bitrus *et al.*, 2018; Chua; Stinear; Howden, 2013). A aquisição desses genes contribui para a virulência, sobrevivência e também é associada, por vezes, com a adaptação hospedeiro-específica, apesar de não necessariamente ser regra, visto que nem todos os genes hospedeiro-específicos são adaptativos ao hospedeiro, pois dependerá do ambiente em que a bactéria está inserida (Chua; Stinear; Howden, 2013; Matuszewska *et al.*, 2020).

#### 2.6.1.2.3 Cápsula

A cápsula polissacarídica é um componente extracelular que envolve a parede celular de *S. aureus* e pode se estender por centenas de microns da superfície bacteriana (O’Riordan; Lee, 2004; Visansirikul; Kolodziej; Demchenko, 2020). Esse componente é um fator de virulência que contribui para *S. aureus* evadir a resposta imune do hospedeiro, evitando a fagocitose através do mascaramento das proteínas da superfície bacteriana (O’Riordan; Lee, 2004; Visansirikul; Kolodziej; Demchenko, 2020). A cápsula está presente somente em algumas estirpes de *S. aureus*, sendo encontrado em até 75% dos isolados clínicos dessa espécie (de Jong; van Kessel; van Strijp, 2019). Dentre esses isolados, a maioria que apresentavam esse fenótipo continha o polissacarídeo capsular 5 (CP5) ou polissacarídeo capsular 8 (CP8) (de Jong; van Kessel; van Strijp, 2019; O’Riordan; Lee, 2004).

A cápsula é composta por três açúcares acoplados a nucleotídeos, sendo eles: UDP-N-acetil-D-fucosamina, ácido UDP-N-acetil-L-fucosamina e UDP-N-acetil-D-manosaminurônico (Rausch *et al.*, 2019). Todos são derivados do mesmo substrato universal do envelope celular que é o UDP-N-acetilglucosamina, em que este é utilizado por glicosiltransferases para a síntese desse fator de virulência (Rausch *et al.*, 2019; Rodríguez-Díaz; Rubio-del-Campo; Yebra, 2012).

Na produção da cápsula é requerida uma quantidade considerável de energia, visto que tipicamente é codificada por pelo menos 15 glicosiltransferases grandes, e como estas têm

um tamanho médio entre 200 e 300 kDa, são responsáveis por 3 a 4% de todo o genoma de *S. aureus* (de Jong; van Kessel; van Strijp, 2019). Em comparação, as proteínas responsáveis pela evasão da resposta imune do hospedeiro têm tamanho entre 10 e 30 kDa e a codificação de 40 delas é responsável por menos de 1% do genoma total dessa espécie (de Jong; van Kessel; van Strijp, 2019). Portanto, a produção dessas proteínas é menos dispendiosa em comparação a cápsula, o que pode explicar a presença desse componente em algumas estirpes de *S. aureus* e a ausência em outras (de Jong; van Kessel; van Strijp, 2019).

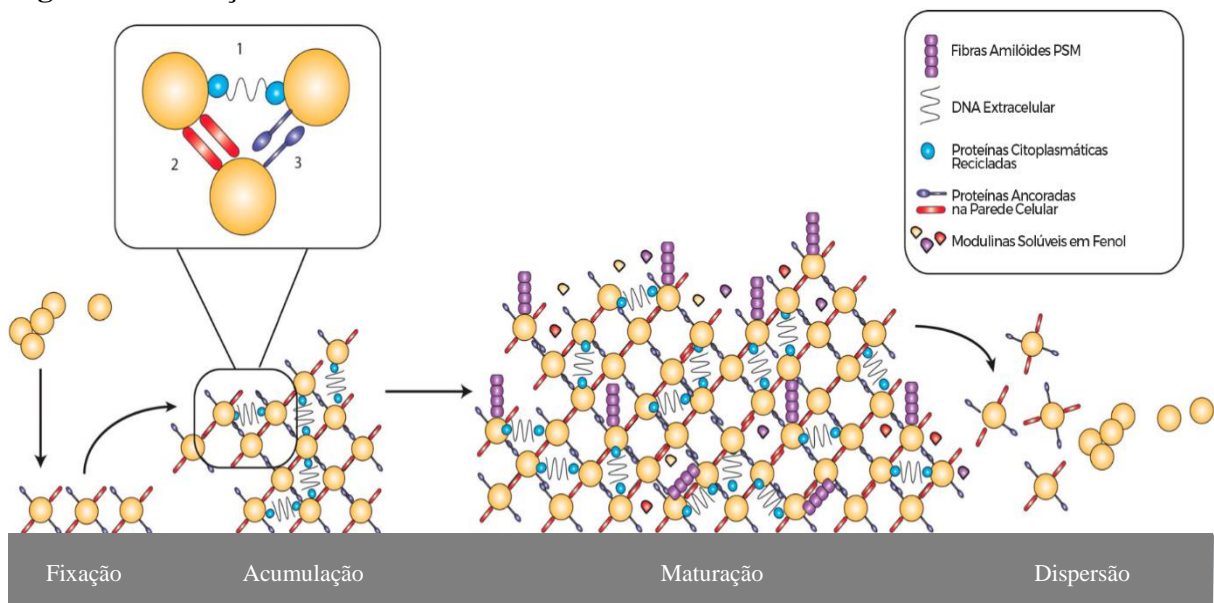
#### 2.6.1.2.4 Biofilme

Nas etapas iniciais do desenvolvimento do biofilme, ou seja, na fase reversível de fixação à superfície, a Adesina Intercelular Polissacarídica (AIP) participa desse processo de adesão celular inicial entre as células e na superfície em que a bactéria está inserida (Cramton *et al.*, 1999; Gerke *et al.*, 1998). O locus *ica* (Adesão Intercelular; do inglês *intercellular adhesion*) é responsável pela produção desse polissacarídeo e sua deleção resulta na perda da capacidade de formar biofilmes e produzir AIP (Cramton *et al.*, 1999; Gerke *et al.*, 1998; Heilmann *et al.*, 1996; Møretrø *et al.*, 2003). Essa adesina está presente na maior parte de espécies do gênero *Staphylococcus*, e é responsável por formar a maior parte da SPE estafilocócica, juntamente com outros polímeros e proteínas (Otto, 2008).

A adesão à superfície também é mediada pelas proteínas de ancoragem a parede celular (APC), dentre as principais estão àquelas denominadas como os Componentes da Superfície Microbiana que Reconhecem Moléculas da Matriz Adesiva (MSCRAMMs; do inglês *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) (Foster, 2019; Foster *et al.*, 2014; Geoghegan; Foster, 2015; Heilmann; Götz, 2009). Essas moléculas estão envolvidas nesse processo de estabelecimento inicial do biofilme, pois têm papel importante na adesão (Foster *et al.*, 2014; Foster, 2019; Heilmann; Götz, 2009; Patti *et al.*, 1994). Além disso, são fatores de virulência envolvidos na invasão e colonização do tecido do hospedeiro (Foster, 2019; Foster; Geoghegan, 2015; Patti *et al.*, 1994). Ainda sobre os MSCRAMMs, estes estão presentes na superfície da célula bacteriana e reconhecem ligantes macromoleculares, como colágeno, fibronectina, fibrogênio, elastina e laminina, os quais podem estar presentes nas células do hospedeiro (Foster, 2019; Foster *et al.*, 2014; Heilmann; Götz, 2009; Patti *et al.*, 1994). Essas proteínas de reconhecimento tem um padrão de organização caracterizada por pelo menos dois subdomínios adjacentes dobrados separadamente na região A N-terminal que compreende estruturas chamadas de dobras semelhantes a Imunoglobulina G (IgG)

(Deivanayagam, 2002; Foster *et al.*, 2014; Madani; Garakani; Mofrad, 2017). Em seguida, há uma região de quantidade variável de repetições de B (Deivanayagam, 2002; Madani; Garakani; Mofrad, 2017). A região C-terminal é responsável pela ancoragem a parede celular, que contém um motivo LPXTG, seguido por um domínio hidrofóbico que abrange a membrana e resíduos carregados positivamente no extremo C-terminal (Deivanayagam, 2002; Foster *et al.*, 2014; Heilmann; Götz, 2009). Por exemplo, a proteína Cna (proteína de ligação ao colágeno; do inglês *Collagen-adhesin*) é uma MSCRAMMs, a qual contribui para a adesão celular ao hospedeiro, permitindo que a célula se fixe firmemente ao tecido através da ligação ao colágeno tipo I (Foster, 2019; Herman-Bausier *et al.*, 2016; Madani; Garakani; Mofrad, 2017). Outra proteína APC importante nessa etapa é a Bap (proteína associada ao biofilme; do inglês *Biofilm-associated protein*), a qual participa da adesão primária à superfície biótica e superfícies intracelulares (Cucarella *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2004). Na Figura 8 ilustra o processo de formação do biofilme, como também a composição da matriz de *S. aureus*.

**Figura 8.** Formação e estrutura do biofilme de *S. aureus*.



Fonte: Hobley *et al.* (2015), adaptado pelo autor.

Na etapa inicial da formação do biofilme, a proteína G de superfície de *S. aureus* (SasG; do inglês, *S. aureus surface protein G*) faz a mediação da agregação celular na fase de acumulação (Formosa-Dague *et al.*, 2016). Outras moléculas presentes nessa fase são a Bap e o fator sigma B (SigB; do inglês, *Sigma factor B*), que contribuem no aumento da produção do biofilme (Cucarella *et al.*, 2001; Mitchell *et al.*, 2013; Tuchscher *et al.*, 2015). Essa última proteína está relacionada à produção de fatores de virulência e promoção da persistência

intracelular (Mitchell *et al.*, 2013; Tuchscherer *et al.*, 2015). O gene *rbf* (regulador da família do retinoblastoma; do inglês *retinoblastoma family regulator*) atua na regulação do biofilme, afetando a sua formação (Cue *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2004; Luong; Lei; Lee, 2009; Sousa *et al.*, 2024). A expressão desse gene é modulada pelo locus *ica*, através da repressão do regulador negativo do locus, o *icaR* (Cue *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2004; Luong; Lei; Lee, 2009). Além disso, o eDNA tem um papel importante na formação inicial da matriz, fornecendo suporte estrutural do biofilme, atuando na estabilização dessa microcomunidade (Figura 8) (Archer *et al.*, 2011; Campoccia; Montanaro; Arciola, 2021). O eDNA também auxilia a agregação celular, agindo como uma rede de conexão intercelular por meio de interações eletrostáticas com as células carregadas positivamente na matriz em um pH baixo (Archer *et al.*, 2011; Campoccia; Montanaro; Arciola, 2021; Dengler *et al.*, 2015). Ademais, Foulston *et al.* (2014) postularam que nessa etapa também há a presença de proteínas citoplasmáticas recicladas durante a formação do biofilme na matriz de *S. aureus* (Figura 8). A formação de matriz é desencadeada através da redução do pH durante a fase pós-exponencial e logo que essa estrutura é estabelecida, há a indução da adesão intercelular (Foulston *et al.*, 2014).

No que é tocante ao biofilme maduro, ele apresenta estrutura semelhante a um cogumelo, também apresentando canais de água e poros que entregam nutrientes e difundem diversas moléculas para as células nas camadas mais profundas desse microambiente (Otto, 2008; Reffuveille *et al.*, 2017). Além disso, no biofilme estafilocócico, também pode haver a presença de células dormentes e persistentes, as quais são mais resistentes a tratamentos com antibióticos em comparação as demais células inseridas nessa microcomunidade (Lechner; Lewis; Bertram, 2012; Reffuveille *et al.*, 2017; Stojowska-Swędryńska; Kuczyńska-Wiśnik; Laskowska, 2023). As modulinas solúveis em fenol (PSMs; do inglês, Phenol-Soluble Modulins) também estão presentes e têm uma grande importância no desenvolvimento e estabilização dos biofilmes formados por *S. aureus* (Hobley *et al.*, 2015; Periasamy *et al.*, 2012a). Esses peptídeos estão envolvidos na estruturação do biofilme, visto que a PSM $\beta$  causa o desprendimento de aglomerados celulares, levando a formação de canais nos biofilmes iniciais, estruturando-os (Hobley *et al.*, 2015; Otto, 2008; Periasamy *et al.*, 2012a). As PSMs podem se agregar em fibras amilóides (Figura 8), modulando a atividade biológica desses peptídeos como também o papel deles nos biofilmes (Salinas *et al.*, 2018; Schwartz *et al.*, 2012). Foi proposto por Salinas *et al.* (2018) e Schwartz *et al.* (2012) que a formação de fibrilas acontece com o intuito de armazenar essas moléculas até que seja necessário o uso delas, por exemplo, como fatores de virulência, além de contribuir para a plasticidade estrutural do biofilme. Ademais, esses peptídeos atuam em outros aspectos envolvendo as características

patogênicas desta bactéria, estimulando uma resposta pró-inflamatória, através da produção de citocinas e da lise de neutrófilos humanos (Cheung *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2007). Dentre os vários PSMs, o PSM $\alpha$ 3, em particular, é o mais citolítico nesta espécie, o que facilita também sua função de citotoxicidade e, conseqüentemente, a morte de células do hospedeiro (Berube *et al.*, 2014; Cheung *et al.*, 2014; Nakagawa *et al.*, 2017).

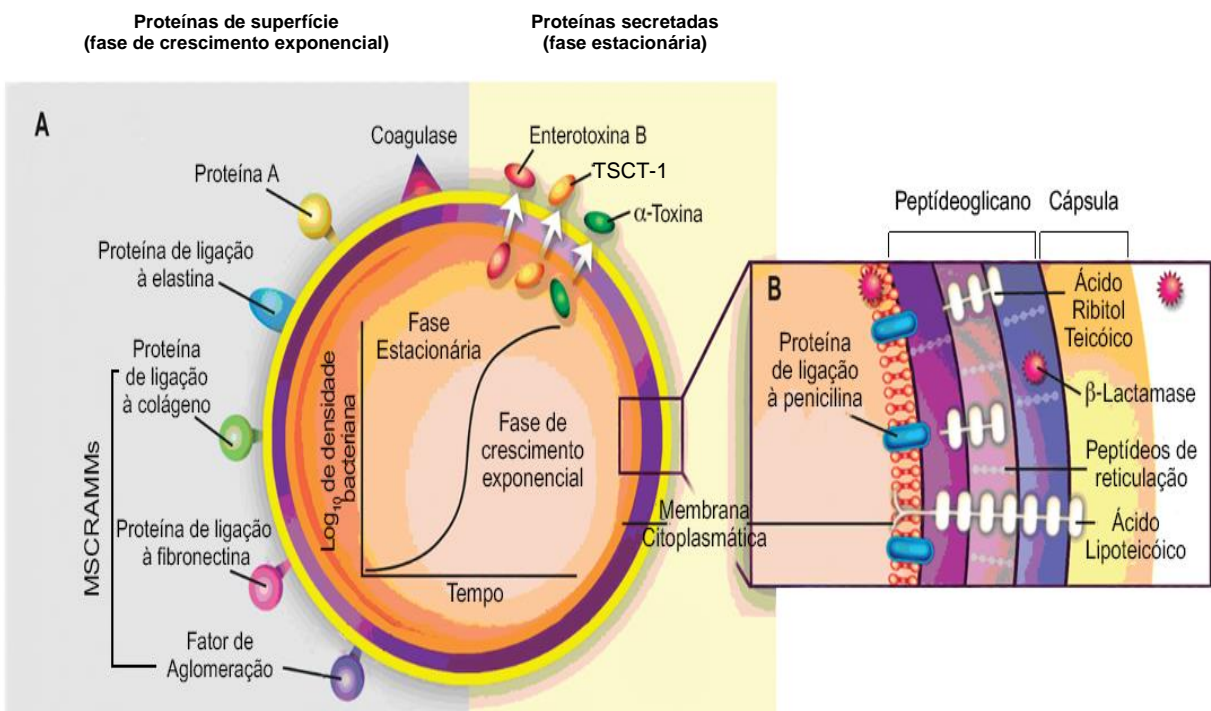
Em relação ao QS, *S. aureus* utiliza, principalmente, a via reguladora de gene acessório (*agr*; do inglês, *accessory gene regulator*), apesar de existirem outros sistemas de comunicação entre células nesta espécie (Queck *et al.*, 2008; Recsei *et al.*, 1986; Reffuveille *et al.*, 2017). O sistema *agr* é composto por dois promotores, P2 e P3 (Novick, 2003; Novick *et al.*, 1995; Reffuveille *et al.*, 2017). O primeiro é o operon que codifica o sistema de dois componentes e seus ligantes autoindutores, ativando os dois promotores desse sistema (Novick, 2003; Novick *et al.*, 1995). O último codifica RNAlIII, que é o efetor da resposta dessa via, sendo responsável pela regulação intracelular do gene alvo e ativação desse sistema (Novick *et al.*, 1995; Reffuveille *et al.*, 2017). Esse QS está relacionado a expressão de genes de exoproteínas, fatores de virulência e proteínas APC (Queck *et al.*, 2008; Recsei *et al.*, 1986; Reffuveille *et al.*, 2017). Em adição, o sistema *agr* é reprimido na formação do biofilme e ativado na fase de dispersão, tendo um papel importante na regulação entre os estilos de vida planctônico e sésil (Boles; Horswill, 2008). Além disso, essa via também é requerida na estabilização da estrutura tridimensional do biofilme através do desprendimento de células, por meio da regulação das PSMs (Boles; Horswill, 2008; Reffuveille *et al.*, 2017). Ademais, um segundo QS está presente em *S. aureus*, o sistema LuxS/AI-2, o qual é encontrado em várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo uma linguagem universal de comunicação entre diferentes espécies (Kong; Vuong; Otto, 2006; Ma *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2004; Xavier; Bassler, 2003). Em *S. aureus*, esse sistema regula a formação do biofilme pela repressão de *rbf*, através do locus *ica*, tendo um papel na dispersão (Guo *et al.*, 2023; Ma *et al.*, 2017).

No que se refere a etapa de dispersão, *S. aureus* produz diversas moléculas que degradam a matriz do biofilme, como exoenzimas e surfactantes, a depender da sua composição (Lister; Horswill, 2014). Como supracitado, nessa fase, o sistema *agr* e as PSMs também participam do processo de desprendimento do biofilme (Boles; Horswill, 2008; Periasamy *et al.*, 2012a, 2012b). Isso acontece porque a expressão desses peptídeos é regulada pela variação da atividade desse QS, o qual está envolvido no crescimento dos níveis de produção de proteases extracelulares (Periasamy *et al.*, 2012a, 2012b). Dessa forma, o sistema *agr* induz a produção de PSMs e proteases que atuam como surfactantes para que aconteça a dispersão das células do biofilme (Boles; Horswill, 2008; Periasamy *et al.*, 2012a, 2012b).

### 2.6.1.3 Fatores de virulência

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria bem adaptada aos hospedeiros mamíferos, sendo uma espécie comensal (Balasubramanian *et al.*, 2017; Haag; Fitzgerald; Penadés, 2019). Em condições normais, *S. aureus* não traz prejuízos ao hospedeiro (Balasubramanian *et al.*, 2017; Haag; Fitzgerald; Penadés, 2019; Lung *et al.*, 2022). Entretanto, essa espécie pode ser capaz de ultrapassar as barreiras imunológicas, violando a defesa inata, atingindo tecidos mais profundos e, dessa forma, causando infecções desde as mais superficiais até as mais invasivas (Buchan; Foster; Renshaw, 2019; Lung *et al.*, 2022). Isso ocorre porque *S. aureus* co-evoluiu durante milênios com seus hospedeiros mamíferos, produzindo diversos mecanismos para evadir a resposta imune do hospedeiro (Balasubramanian *et al.*, 2017; Lung *et al.*, 2022). Os fatores de virulência, apontados na Figura 9, são divididos em componentes estruturais, toxinas e enzimas (Howden *et al.*, 2023; Lowy, 1998; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Além disso, na Figura 9 também é demonstrada que a síntese de proteínas de virulência depende da fase em que a bactéria se encontra na curva de crescimento (Lowy, 1998). As funções dos fatores de virulência estão evidenciadas no Quadro 1.

**Figura 9.** Fatores de virulência de *S. aureus*.



Fonte: Lowy (1998), adaptado pelo autor. **a)** proteínas patogênicas secretadas nas fases exponencial e estacionária. **b)** cortes transversais do envelope celular evidenciando os fatores de virulência. Componentes da Superfície Microbiana que Reconhecem Moléculas da Matriz Adesiva (MSCRAMMs; do inglês *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*). Toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSCT-1).

**Quadro 1.** Funções dos fatores de virulência de *S. aureus*.

Fatores de virulência	Funções
<b>Componentes estruturais</b>	
Cápsula	Inibição da quimiotaxia, fagocitose e proliferação de células mononucleares
Biofilme	Facilita a aderência a superfícies; inibição da fagocitose
Peptidoglicano	Estabilidade osmótica da bactéria; estimulação da produção de pirogênio endógeno; quimiotático para leucócitos; inibição da fagocitose
Proteína A	Inibição da eliminação mediada por anticorpos, por se ligar aos receptores Fc; quimiotático para leucócitos; anticomplementar
Ácido teicóico	Adesão as células epiteliais e endoteliais; resposta pró-inflamatória
MSCRAMMs	Adesão específica aos componentes da parede extracelular do hospedeiro
<b>Toxinas</b>	
Citotoxinas	Toxicidade para várias células, incluindo eritrócitos leucócitos e macrófagos
Toxinas esfoliativas	Serina proteases que clivam as pontes intercelulares no estrato granuloso da epiderme
Enterotoxinas	Superantígenos; estimulação da liberação de mediadores inflamatórios em mastócitos; aumento do peristaltismo intestinal
TSCT-1	Superantígeno; determina o extravasamento de líquidos ou destruição de células endoteliais
<b>Enzimas</b>	
Coagulase	Converte o fibrogênio em fibrina
Hialuronidase	Hidrolisa o ácido hialurônico no tecido conjuntivo, disseminando os estafilococos nos tecidos
Fibrinoliosina	Dissolve os coágulos de fibrina
Lipase	Hidrolise de lipídios
Nuclease	Hidrolise de DNA

Fonte: Murray; Rosenthal; Pfaller (2014), adaptado pelo autor. Fragmento cristalizável (Fc).

### 2.6.1.3.1 Componentes estruturais

Os componentes estruturais atuam protegendo a bactéria da ação da imunidade inata do hospedeiro, como a fagocitose e a opsonização, além de facilitar a adesão aos tecidos do hospedeiro (Lowy, 1998; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

A cápsula protege a bactéria da fagocitose mediada por leucócitos polimorfonucleares, mascarando a superfície celular de *S. aureus* (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Watts *et al.*, 2005). Dos 11 sorotipos de polissacarídeo microcapsular, os tipos 5 e 8 são os mais frequentes nessa espécie (Lee; Lee, 2014; Watts *et al.*, 2005). Além disso, estudos mostraram evidências de que as estirpes encapsuladas são mais virulentas em comparação as estirpes não-encapsuladas (Lee; Lee, 2014; Lowy, 1998; Sutter *et al.*, 2011; Watts *et al.*, 2005).

O biofilme também interfere no processo de fagocitose de *S. aureus*, através da SPE, agindo como barreira física, além de possibilitar a ligação da bactéria a diversas superfícies, como tecidos e dispositivos médicos (Götz, 2002; Humphreys, 2012). A presença de fibrinas na matriz impede o reconhecimento imunológico dos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), além da expressão de proteínas de evasão imune (Berry *et al.*, 2022; de Vor; Rooijackers; van Strijp, 2020). O estudo de Brady *et al.* (2018) demonstrou que infecção por biofilme pode estimular uma resposta precoce de células T auxiliares 17 (TH17), promovendo um ambiente pró-inflamatório, e, ao mesmo tempo, a regulação negativa de quimiocinas importantes no direcionamento de células T para o local de infecção.

O peptidoglicano tem atividade semelhante a endotoxina, pois estimula a produção de pirogênio endógeno e de interleucina 1 (IL-1) pelos monócitos; a ativação do sistema complemento e o processo de formação de abscesso; além de ativar o receptor do tipo Toll 2 (Dziarski; Gupta, 2005; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). A parede celular dessa bactéria consegue resistir a ação de lisozimas dos macrófagos através da O-acetilação do peptidoglicano, em que a enzima O-acetiltransferase desempenha esse papel, assim, *S. aureus* consegue driblar a atividade muramidase da lisozima (Bera *et al.*, 2005; Shimada *et al.*, 2010).

A proteína A se liga a IgG, na região do fragmento cristalizável (Fc), prevenindo a remoção da bactéria através do impedimento da fagocitose e da fixação do complemento da via clássica (Atkins *et al.*, 2008). Essa proteína atua como um superantígeno de células B, prejudicando a geração eficaz de anticorpos e modificando as respostas funcionais destes linfócitos contra *S. aureus* por meio de interações com a parte variável da cadeia pesada dos fragmentos de ligação do antígeno (Fab) (Atkins *et al.*, 2008; Bear *et al.*, 2023; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Assim, as imunoglobulinas são sequestradas e formam imunocomplexos insolúveis (Atkins *et al.*, 2008; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Ademais, essa proteína tem a capacidade de interferir na memória imunológica de longo prazo, visto que ela consegue diminuir o número de células plasmáticas de vida longa (Keener *et al.*, 2017).

O ácido teicóico contribui para a adesão de *S. aureus* às células endoteliais e epiteliais, além de induzir respostas pró-inflamatórias (Baur *et al.*, 2014; Brauweiler; Goleva; Leung, 2019; van Dalen *et al.*, 2019; Weidenmaier *et al.*, 2005, 2008). Esse componente estrutural está diretamente relacionado à colonização nasal, modulando-a, através da ligação ao receptor Scavenger, o qual faz a mediação da adesão do AT da parede celular bacteriana com células epiteliais nasais (Baur *et al.*, 2014; Weidenmaier *et al.*, 2008). Ademais, o AT é um fator importante em infecção endovascular por *S. aureus*, visto que a interação entre células endoteliais e esse componente resulta na adesão da bactéria às células do hospedeiro, na indução

e progressão dessa doença (Weidenmaier *et al.*, 2005). O AT induz a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-17) e quimiocinas, que têm o papel de atrair neutrófilos (CXCL1 e CXCL2) (Brauweiler; Goleva; Leung, 2019; van Dalen *et al.*, 2019).

#### 2.6.1.3.2 Toxinas

As toxinas são agrupadas de acordo com os seus mecanismos de ação, dentre as quais incluem: toxinas citotóxicas (alfa, beta, delta, gama e leucocidina Panton-Valentine), toxinas esfoliativas (A e B), enterotoxinas (no total sendo 18, de A a R) e toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSCT-1) (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

As citotoxinas podem causar danos na membrana celular, induzir resposta pró-inflamatória e lise em diversas células do hospedeiro; sendo tóxicas para vários tipos, como: eritrócitos, leucócitos, hepatócitos, plaquetas, fibroblastos, macrófagos (Costa *et al.*, 2013; Lowy, 1998; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). A toxina alfa, também conhecida como  $\alpha$ -hemolisina, rompe a musculatura lisa dos vasos sanguíneos, além de ser tóxica para diversos tipos celulares, como: eritrócitos, leucócitos, hepatócitos e plaquetas (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tam; Torres, 2019). Essa toxina se liga a membrana celular do hospedeiro, causando a formação de complexos de poros, levando a lise celular (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; von Hoven *et al.*, 2019). Em adição, acredita-se que a toxina alfa seja um mediador de dano tecidual importante na doença estafilocócica (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

A toxina beta, também conhecida como esfingomielinase C, tem especificidade para esfingomielina e lisofosfatidilcolina, além de ser tóxica para variados tipos celulares, os quais incluem: eritrócitos, fibroblastos, leucócitos e macrófagos (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Essa toxina ainda não foi associada a uma doença específica, então a sua contribuição na infecção ainda não é clara (Astley *et al.*, 2019; Tam; Torres, 2019). Entretanto, em células suscetíveis, ela atua catalisando hidrólise de fosfolípidios de membrana, com a lise celular proporcional a concentração de esfingomielina exposta na superfície da célula (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

A toxina delta faz parte de uma família de peptídeos anfipáticos PSM com amplo espectro de atividade citolítica (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Yoshida, 1963). A toxicidade desse peptídeo para membranas é relativamente não específica, provavelmente atua como surfactante, rompendo a membrana celular de forma similar à ação de um detergente (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). As toxinas gama e leucocidina Panton-Valentine (LPV) têm a presença de duas cadeias polipeptídicas: os componentes S e F (proteínas de eluição lenta e

rápida, respectivamente, em coluna cromatográfica de troca iônica) (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Woodin, 1960). Nas estirpes que contêm ambas citotoxinas estão disponíveis três componentes S: HlgA (hemolisina gama A), HlgC (hemolisina gama C) e LukS-PV (componente S da leucocidina Panton-Valentine); e dois componentes F: HlgB (hemolisina gama B) e LukF-PV (componente F da leucocidina Panton-Valentine) (Dinges; Orwin; Schlievert, 2000; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). As bactérias produtoras de toxina gama e LPV têm a capacidade de codificar todas as proteínas citadas acima, tendo o potencial de produzir seis toxinas distintas, em que todas elas podem lisar neutrófilos e macrófagos (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). A maior atividade hemolítica está associada as toxinas HlgA/HlgB, HlgC/HlgB e HlgA/LukF-PV, em que a primeira apresenta maior atividade dentre as demais (Dinges; Orwin; Schlievert, 2000; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Já a toxina LukS-PV/LukF-PV tem atividade leucotóxica e não apresenta atividade hemolítica (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). A ação de lise celular dessas toxinas acontece através da formação de poros, aumentando a permeabilidade de cátions e a instabilidade osmótica (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

A toxina esfoliativa A, as enterotoxinas e a TSCT-1 são denominadas superantígenos (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). São classificadas dessa maneira porque se ligam ao complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) dos macrófagos e, simultaneamente, aos receptores específicos dos linfócitos T (Costa *et al.*, 2013; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Petersson; Forsberg; Walse, 2004). Então, há a ativação e proliferação de células T e liberação intensa de citocinas tanto por esse linfócito quanto por macrófagos (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Petersson; Forsberg; Walse, 2004).

As toxinas esfoliativas, também conhecidas como toxinas epidermolíticas, são mediadoras da síndrome da pele escaldada estafilocócica (SPEE) (Ladhani *et al.*, 1999; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tam; Torres, 2019). Essas toxinas são serina proteases que atuam quebrando a desmogleína-1 (necessária para a adesão célula-célula do desmossomo, mantendo a integridade da pele), levando a interrupção da adesão intercelular, e resultando no surgimento de bolhas e descamação da pele (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tam; Torres, 2019).

As enterotoxinas estão envolvidas em intoxicação alimentar, as quais conseguem resistir ao aquecimento (sendo termolábeis a 100 °C por 30 minutos), variação de pH (4-9,6 pH), e digestão proteolítica (resistindo a hidrólise das enzimas gástricas e do jejuno) (Bhunja, 2018; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Dessa forma, essas toxinas são estruturalmente ideais para causar doenças através dos alimentos com a presença de *S. aureus* produtora de enterotoxina, que representa cerca de 30 a 50% de todas as estirpes dessa bactéria (Bhunja,

2018; Gajewska *et al.*, 2023; Grispoldi *et al.*, 2021; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Ademais, quando um alimento é contaminado por essas toxinas, o reaquecimento brando e os ácidos gástricos não conseguem proteger o hospedeiro da infecção (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). A ingestão de enterotoxinas causa vômito e diarreia (Hu *et al.*, 2018; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tam; Torres, 2019). A atividade emética está relacionada a presença de uma alça dissulfeto de 9 a 19 aminoácidos na proteína enterotóxica (Tam; Torres, 2019).

A TSCT-1 causa a síndrome do choque tóxico (SCT), sendo classificado como menstrual e não-menstrual (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tam; Torres, 2019). É estimado que 90% das estirpes de *S. aureus* estejam associadas a SCT menstrual, em que cerca de 50% sejam responsáveis por outras manifestações de SCT sejam produtoras de TSCT-1, as demais estirpes produzem enterotoxina B ou C (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Schlievert, 1986; Tam; Torres, 2019). A SCT se caracteriza pela erupção cutânea, descamação, febre e hipotensão (Tam; Torres, 2019). A morte dos pacientes acometidos por essa doença é causada por choque hipovolêmico, levando a falência múltipla dos órgãos (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). A TSCT-1 atua estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, em baixas concentrações, que causam o escape de células endoteliais levando ao efeito citotóxico, em altas concentrações, para as células (Bhunja, 2018; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

#### 2.6.1.3.3 Enzimas

As enzimas produzidas por *S. aureus* apresentam grande diversidade, as quais podem auxiliar na propagação da infecção pela degradação de componentes do tecido (Lowy, 1998; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tam; Torres, 2019). Dessa forma, atuam facilitando o alcance de tecidos adjacentes ou conferem alguma resistência, contribuindo para sobrevivência e disseminação da espécie (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tam; Torres, 2019).

Essa espécie tem duas formas de coagulase: ligada e livre (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). A primeira está aderida a parede celular, em que pode, diretamente, converter fibrinogênio em fibrina insolúvel, assim, causando a agregação estafilocócica (Lowy, 1998; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). A segunda consegue ter o mesmo resultado quando reage com um fator globulina do plasma, formando estafilotrombina, em que este complexo enzimático converte fibrinogênio em fibrina solúvel (Kawabata *et al.*, 1985; Kawabata; Iwanaga, 1994; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Com isso, *S. aureus* sequestra o sistema de coagulação do hospedeiro e promove a formação de coágulos fibrinosos (Tam; Torres, 2019). Em um abscesso, essa espécie é protegida por um escudo de fibrina formado pelas coagulases,

impedindo fagocitose pelas células de defesa do hospedeiro (Javid *et al.*, 2018; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tam; Torres, 2019).

Outras enzimas produzidas por *S. aureus* que hidrolisam componentes dos tecidos são: hialuronidase, fibrinolisinase, nuclease e lipases (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). A primeira hidrolisa ácidos hialurônicos, encontrados tipicamente nos tecidos conjuntivos, decompondo-os da matriz celular, e, assim, facilitando a disseminação da bactéria (Fraser; Laurent; Laurent, 1997; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). A segunda, também denominada estafiloquinase, tem a ação de dissolver coágulos de fibrina através da ativação do plasminogênio e conversão em plasmina (Kotb, 2014; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Rooijackers *et al.*, 2005; Vakili *et al.*, 2018). Dessa forma, *S. aureus* consegue quebrar os coágulos de fibrina, promovendo a disseminação e inibindo a fagocitose através da remoção de IgG e C3b, em que esse último é resultado da clivagem do componente do complemento 3, que atua na opsonização de microrganismos (Rooijackers *et al.*, 2005). A nuclease estafilocócica é termoestável e funciona como endo e exonuclease, clivando tanto DNA quanto RNA na ligação 5'-fosforil éster (Cuatrecasas; Fuchs; Anfinsen, 1967; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). As lipases estafilocócicas são diversas, as quais hidrolisam lipídios do hospedeiro, garantindo a sobrevivência dessa espécie nas regiões sebáceas do corpo (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014).

Após a exposição dos componentes, estrutura e formação de biofilmes, fatores de virulência de *S. aureus*, é possível compreender que essa espécie conseguiu refinar seus mecanismos ao longo do tempo para estabelecer infecções e evadir a resposta imune do hospedeiro humano (Balasubramanian *et al.*, 2017; Lung *et al.*, 2022). Portanto, faz-se necessária a busca por novos compostos bioativos que consigam combater tanto *S. aureus* resistente ao tratamento antibiótico como também o biofilme formado por essa bactéria.

## **2.7 Plantas medicinais**

### **2.7.1 Histórico**

O uso e a pluralidade de aplicações das plantas medicinais foram e são repassados ao longo do tempo através da herança do conhecimento ancestral humano. A origem dessa parceria entre humanos e a natureza se confunde dentro da própria história da humanidade (Almeida, 2011). Os registros mais antigos que destacam a importância cultural dessas plantas são datados de 60.000 anos a.C. (Rocha *et al.*, 2015). Em diversos povos antigos, como Egípcios, Gregos, Hindus, Persas e povos da América Pré-colombiana, eram utilizados os

conhecimentos acerca do uso de plantas medicinais na prática terapêutica (Almeida, 2011; Rocha *et al.*, 2015). Essa sabedoria passada ao longo do tempo contribuiu para a construção dos sistemas da medicina tradicional (Rocha *et al.*, 2015). As primeiras descrições sobre plantas na cura de várias enfermidades foram as de Pen Ts'ao, de 2800 a.C., as quais foram escritas pelo herborista chinês Shen-Numg, e os papiros de Erbs, pertencentes à época da XVIII Dinastia (Almeida, 2011; Argenta *et al.*, 2011; Braga, 2011; Vilela, 1977). Esses relatos evidenciam as mais diferentes espécies medicinais e o uso destas plantas no tratamento de uma diversidade de doenças (Argenta *et al.*, 2011; Viegas Jr; Bolzani; Barreiro, 2006; Vilela, 1977).

No Brasil, antes da chegada dos colonizadores, os povos indígenas já tinham o conhecimento da biodiversidade disponível e utilizavam plantas medicinais para o tratamento de enfermidades (Bragança, 1996; Silva, 2016). Nesse sentido, os pajés utilizavam as espécies vegetais nas práticas de rituais de cura, as quais eram repassadas oralmente para as gerações seguintes (Bragança, 1996; Oliveira, 2017; Silva, 2016). E, ao longo do tempo, conhecimentos vindos da cultura africana e da cultura europeia foram acrescentados ao repertório já existente do uso de plantas medicinais (Braga, 2011; Bragança, 1996; Silva, 2016).

Com a colonização, também vieram com os portugueses as enfermidades da Europa, em que os nativos não sabiam como enfrentar essas doenças, causando morte e dizimação de muitos povos indígenas (Bragança, 1996). Assim, dos séculos XVII e XVIII, os missionários jesuítas, membros da Companhia de Jesus, se apropriaram do conhecimento da medicina indígena, utilizando plantas medicinais (Fleck, 2014; Silva, 2016). Além disso, também construíram novos aprendizados e tratamentos, contribuindo para o conhecimento médico e farmacêutico da época (Fleck, 2014). Concomitantemente, esses missionários foram substituindo os pajés no tratamento de enfermidades que acometiam indígenas catequizados (Bragança, 1996). Como o número de médicos era muito reduzido, já que a quantidade de profissionais oficialmente habilitados era pequena, os jesuítas assumiram esse papel, sendo, por muitas décadas, a única assistência disponível para a maior parte da população (Bragança, 1996; Viotti, 2019). Ao mesmo tempo, nos prédios da Companhia de Jesus haviam enfermarias e boticas (Bragança, 1996). Estas últimas eram onde os medicamentos eram produzidos e vendidos, em que os remédios eram despachados e, dessa forma, dando início, no Brasil, a assistência hospitalar (Bragança, 1996; Leite, 2020; Viotti, 2019).

Até o século XVIII, a medicina no Brasil sofria forte influência do continente europeu, em que os médicos, através do uso dos conceitos de Hipócrates e Galeno, acreditavam que doenças se originavam por conta de desarmonias e desequilíbrios de humores (Bragança, 1996). Então, eram feitas sangrias na tentativa de restaurar o equilíbrio humoral e tratar doenças

(Bragança, 1996; Viotti, 2019). Nesse período, o ensino da medicina era ministrado, principalmente, nas universidades de Coimbra, Montpellier e Edimburgo (Bragança, 1996). Os médicos recém-formados nessas instituições faziam uso de plantas medicinais nativas do Brasil, pois as drogas utilizadas na Península Ibérica não estavam disponíveis (Bragança, 1996). Também é importante destacar que no período do século XVIII os estudos sobre plantas medicinais, no geral, foram retomados, já que, anteriormente, por conta do controle da igreja sobre o desenvolvimento científico, essas pesquisas foram esquecidas (Braga, 2011; Bragança, 1996). Então, com o renascimento científico, a atitude tomada era experimentar as drogas indígenas, entendendo o conhecimento da natureza e mantendo a referência às drogas clássicas oficiais utilizadas na época (Bragança, 1996; Silva, 2016). Somente a partir do final do século XVIII, através do isolamento e estudo de metabólitos especiais, foi possível obter uma proposta científica concreta para o uso de fitofármacos (Almeida, 2011).

No século XIX, com a vinda da corte portuguesa, vieram as primeiras expedições científicas que tinham como objetivo fornecer conhecimento aos europeus sobre a biodiversidade da fauna e flora brasileira (Silva, 2016). Nesse mesmo período, eram inauguradas duas escolas de cirurgia e as academias passaram a ser faculdades de medicina (Bragança, 1996). Simultaneamente, diversas substâncias bioativas foram isoladas e, através do desenvolvimento da farmacologia experimental, o estudo de espécies vegetais medicinais teve uma nova perspectiva (Almeida, 2011). E com as contribuições dos estudos científicos de Louis Pasteur e Robert Koch, foi possível entender a existência da relação entre microrganismos e doenças (Bragança, 1996; Carvalheiro; Marques; Mota, 2013).

Dessa forma, o conceito de desequilíbrio de humores foi deixado para trás com o surgimento do conceito anatômico e as autopsias que revelavam lesões orgânicas, além do desenvolvimento da fisiologia e da farmacologia experimental no mundo (Almeida, 2011; Bragança, 1996). Assim, foi possível haver a transição para a ideia de que as doenças se davam em órgãos do próprio corpo humano, além da observação dos sintomas que se manifestam (Bragança, 1996). Então, a medicina como é conhecida nos dias atuais nasceu no século passado e sofreu profundas modificações com o conhecimento e descobertas adquiridos com o passar dos anos (Bragança, 1996; Silva, 2016).

Nesse ponto, apesar da ciência e os produtos naturais terem caminhado lado a lado desde o início do século XIX, o desenvolvimento científico enveredou para uma especialização utilizando-se de substâncias químicas, não necessariamente de origem vegetal, para o tratamento de enfermidades (Almeida, 2011; Bragança, 1996). Apesar disso, atualmente, os cientistas buscam, de forma racional, princípios bioativos para novas terapias (Almeida, 2011).

Nesse contexto, com a tendência global pela busca do potencial da biodiversidade, como também a preocupação com a sustentabilidade, a ideia do uso de plantas medicinais ressurgiu como uma alternativa de tratamento (Almeida, 2011; Braga, 2011).

### 2.7.2 Importância

A crescente preocupação global com a valorização da biodiversidade e com o desenvolvimento de hábitos sustentáveis vem despertando interesse na busca e no uso de plantas medicinais (Braga, 2011). Em adição, a incidência da nocividade de novas drogas sintéticas, tanto ao meio ambiente quanto ao ser humano, reforça essa ideia de encontrar outras fontes para produção de medicamentos (Chandra, 2014). As vantagens relacionadas ao uso de plantas medicinais para essa finalidade são: disponibilidade (por ser um recurso mais facilmente obtido, o que torna mais viável economicamente), baixo risco de uso, reprodutibilidade e constância da qualidade da droga obtida (Bonil; Bueno, 2017; Chandra, 2014). Entretanto, é importante ressaltar que nem sempre essas vantagens são regras, visto que a qualidade pode ser afetada pela influência do ambiente em que a planta está inserida e, também, por fatores genéticos (Argenta *et al.*, 2011). Em relação a eficácia, esta dependerá diretamente da qualidade, da identificação correta da espécie e da dose adequada (Argenta *et al.*, 2011; Chandra, 2014; Veiga Junior; Pinto; Maciel, 2005). Ademais, algumas plantas utilizadas na medicina popular podem ter substâncias potencialmente tóxicas ao ser humano (Argenta *et al.*, 2011). Portanto, faz-se necessário um estudo científico apurado para a comprovação dos efeitos farmacológicos, qualificando o uso das plantas medicinais para a população em geral (Argenta *et al.*, 2011; Colet *et al.*, 2015).

A maior parte da diversidade química que se tem conhecimento e registro na literatura vem do reino vegetal (Silva, 2016; Viegas Jr; Bolzani; Barreiro, 2006). Essa variedade e complexidade de micromoléculas orgânicas produzidas por plantas ainda é inviável de ser reproduzida por métodos laboratoriais (Viegas Jr; Bolzani; Barreiro, 2006). Apesar da medicina moderna ser acessível para maior parte do mundo, uma porção considerável da população dos países em desenvolvimento utiliza a medicina tradicional, em que se inclui a utilização de plantas medicinais nos cuidados básicos; e, coincidentemente, esses países têm uma rica biodiversidade (Dias, 2000; Oliveira, 2017). Nesse contexto, o Brasil se destaca por ter ampla variedade de fauna e flora, sendo considerado o país da megadiversidade, visto que abriga a maior biodiversidade do planeta (Abranches, 2020; Dias, 2000; Oliveira, 2017). Tudo isso, somado ao aprendizado adquirido por diferentes culturas ao longo dos anos, favoreceu a criação

do conhecimento tradicional da utilização de espécies vegetais em tratamentos únicos para várias doenças (Dias, 2000; Oliveira, 2017; Rocha *et al.*, 2015). Assim, o Brasil se apresenta como um país com grande potencial a ser estudado para o desenvolvimento de novas tecnologias e tratamentos utilizando esses recursos naturais (Ministério da Saúde, 2006).

Apesar de haver o desenvolvimento de fármacos sintéticos e a busca por novas substâncias, apenas uma pequena parte desses novos compostos passam pelas etapas pré-clínicas e clínicas até a comercialização (Silva, 2016; Viegas Jr; Bolzani; Barreiro, 2006). Por isso, o investimento tanto financeiro quanto na pesquisa científica da indústria farmacêutica na busca de novos fármacos não necessariamente corresponde a descoberta e/ou a comercialização de drogas inovadoras (Madigan *et al.*, 2016; Silva, 2016; Viegas Jr; Bolzani; Barreiro, 2006). Então, as plantas medicinais têm recuperado a sua importância, que havia sido reduzida devido ao enfoque dado a produção de compostos sintéticos (Viegas Jr; Bolzani; Barreiro, 2006). Atualmente, sua vasta utilização é retomada, seja como inspiração para produzir fármacos mimetizando as atividades de bioativos vegetais, através do uso da própria espécie vegetal ou do metabólito produzido por essas espécies (Viegas Jr; Bolzani; Barreiro, 2006). Nesse sentido, a Organização Mundial da Saúde (OMS), no período de 2002 a 2005, reiterou esse compromisso em estimular o uso da medicina tradicional e complementar (Argenta *et al.*, 2011). No Brasil, em 2005, foi incluída como opção terapêutica no Sistema Único de Saúde (SUS) o uso de plantas medicinais e fitoterapia, mostrando a retomada da visibilidade e enfatizando a importância do uso de plantas medicinais no tratamento de diversas doenças (Argenta *et al.*, 2011; Brasil, 1988).

#### 2.7.2.1 Óleos vegetais

Com a possível retomada do uso de plantas medicinais e a crescente preocupação global com a valorização e preservação da biodiversidade, os óleos vegetais se destacam como um dos principais produtos extraídos de plantas (Food Ingredients Brasil, 2014; Santos *et al.*, 2022a). Aproximadamente 2/3 desses óleos são utilizados em produtos alimentícios (Food Ingredients Brasil, 2014). Essa fonte de matéria-prima também é empregada na produção de biocombustíveis e lubrificantes, além de serem aplicados na indústria farmacêutica e de cosméticos (Food Ingredients Brasil, 2014; Santos *et al.*, 2022a; Sartori *et al.*, 2009). Uma das razões do uso de óleo vegetal ser amplamente utilizado se dá pela composição química diversa, aumentando a variedade de aplicações em diferentes setores industriais (Santos *et al.*, 2022a; Silva, 2022a).

O óleo vegetal é uma substância hidrofóbica, formado principalmente por ésteres de triacilgliceróis, possuindo consistência de líquido para sólido em temperatura ambiente (Food Ingredients Brasil, 2014; Reda; Carneiro, 2007). Os óleos possuem, na cadeia carbônica, de uma a quatro insaturações e como possuem um número maior de ligações duplas, têm menor ponto de fusão (Food Ingredients Brasil, 2014). Os principais óleos vegetais utilizados são os óleos de soja, palma, girassol, milho, amendoim, algodão e coco (Food Ingredients Brasil, 2014; Santos *et al.*, 2022a). Além desses, a óleorresina de copaíba tem ganhado espaço no conhecimento geral, apesar de ser um integrante antigo na medicina popular, utilizada em diversos tratamentos para infecções, inflamações e feridas (Garcia; Yamaguchi, 2012).

### 2.7.3 *Copaifera* sp.

O gênero *Copaifera* se destaca por ter um importante valor comercial pela produção da óleorresina, também chamada de bálsamo de copaíba, que, além de ser amplamente difundida na medicina popular, é utilizada para diversas finalidades a nível comercial e industrial (Maciel *et al.*, 2002; Martins-da-Silva; Pereira; Lima, 2008; Pieri; Mussi; Moreira, 2009; Rigamonte-Azevedo; Wadt; Wadt, 2004). Esse gênero pertence à família *Leguminosae* Juss. e subfamília *Caesalpinoideae* Kunth., sendo encontrado comumente na África Ocidental e na América Latina (Garcia; Yamaguchi, 2012; Gomes, 2018; Junior; Pinto, 2002). A origem do nome copaíba parece ter origem na língua tupi da palavra *cupa-yba*, que significa árvore de depósito (Ramos, 2006; Sampaio, 1987). Dessa forma, esse termo faz alusão a capacidade do tronco dessa árvore de guardar no seu interior a óleorresina (Garcia; Yamaguchi, 2012; Ramos, 2006; Sampaio, 1987). As árvores desse gênero são de crescimento lento, alcançando entre 25 a 40 metros de altura, com o tronco medindo entre 0,4 a 4 metros de diâmetro (Junior; Pinto, 2002; Martins-da-Silva; Pereira; Lima, 2008). As copaibeiras têm folhas alternadas, pecioladas e penuladas; seus frutos contêm uma semente ovóide e flores sésseis (Martins-da-Silva; Pereira; Lima, 2008; Rigamonte-Azevedo; Wadt; Wadt, 2004).

Dos troncos das árvores da copaíba é extraída a óleorresina (Garcia; Yamaguchi, 2012). O bálsamo se encontra em canais axiais do tipo esquizógenos, os quais são secretores da óleorresina e estão localizados por toda a planta (Alencar, 1982; Costa, 2022; Junior; Pinto, 2002; Ramos, 2006). Em relação ao aspecto biológico, a óleorresina faz parte metabolismo secundário, sendo um produto de excreção ou desintoxicação, atuando na defesa contra animais e microrganismos (Alencar, 1982). A extração do bálsamo pode ser feita de três formas: extração tradicional, total e racional (Garcia; Yamaguchi, 2012; Gomes, 2018; Heck; Viana;

Vicentini, 2012). O primeiro método é feito através de uma grande abertura do tronco da planta, resultando na inutilização da árvore, além de haver a perda de grandes quantidades de óleorresina (Garcia; Yamaguchi, 2012; Gomes, 2018). O segundo é por meio da extração total do bálsamo de árvores derrubadas e abertas (Garcia; Yamaguchi, 2012; Gomes, 2018; Junior; Pinto, 2002). No último método, de extração racional, é feita uma abertura pequena no tronco da árvore, em que se insere um cano de diâmetro pequeno, através do qual é conduzida a óleorresina para o exterior da planta (Gomes, 2018; Junior; Pinto, 2002; Pieri; Mussi; Moreira, 2009). A vedação do furo após o processo facilita novas extrações, além de, também, ter a função de proteger a árvore da ação de cupins e fungos (Gomes, 2018; Junior; Pinto, 2002).

As principais diferenças entre o óleo vegetal e a óleorresina de copaíba são relativas à obtenção e composição. O óleo vegetal é extraído e sintetizado de diversas partes da planta e é formado, majoritariamente, por ésteres de triacilgliceróis e ácidos graxos (Food Ingredients Brasil, 2014; Shahidi, 2005). Já a óleorresina é secretada por estruturas especializadas do vegetal, sendo um óleo essencial constituído por, principalmente, uma mistura de terpenos (sesquiterpenos e diterpenos), em que os sesquiterpenos constituem a maior parte dessa composição, podendo chegar a 90% (Garcia; Yamaguchi, 2012; Leandro *et al.*, 2012).

Os terpenos são uma classe de compostos químicos presente nas plantas, definidos como metabólitos secundários, os quais têm diversas funções, como: antioxidantes, componentes de sistemas de transferência de elétrons, determinantes de fluidez de membrana, hormônios, entre outros (Bellavia *et al.*, 2021; Pichersky; Raguso, 2018). Em adição, os terpenos também estão relacionados a defesa da planta (Pichersky; Raguso, 2018). A estrutura básica do terpeno é constituída por unidades de isoprenos, os quais são compostos por 5 carbonos (C5) (Bhavaniramya *et al.*, 2019; Pichersky; Raguso, 2018). Os subgrupos são baseados no número de isoprenos, por exemplo: os sesquiterpenos têm 3 moléculas de isopreno (C15), já os diterpenos têm 4 moléculas de isopreno (C20) (Bhavaniramya *et al.*, 2019). Os principais sesquiterpenos encontrados na composição da óleorresina são:  $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ - e  $\beta$ -selineno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -elemeno,  $\delta$ -cadineno, óxido de cariofileno e trans- $\alpha$ -bergamoteno (Leandro *et al.*, 2012). Já os diterpenos majoritariamente observados são os ácidos: copálico, hardwickiico, poliáltico, caurenóico e ent-caurenóico, juntamente com seus derivados 3-hidroxi-copálico, 3-acetoxi-copálico e ent-agático (Junior; Pinto, 2002; Leandro *et al.*, 2012). Tanto aos sesquiterpenos quanto aos diterpenos são atribuídas as atividades farmacológicas da óleorresina (Leandro *et al.*, 2012).

As aplicações do bálsamo de copaíba são extensas na medicina popular, como para o tratamento de bronquite, pneumonia, psoríase, dermatite, infecções na garganta e ferimentos;

além de ser utilizado como antiasmático, antiblenorrágico, anti-inflamatório, antitetânico, antitumoral, entre outros (Alencar, 1982; Garcia; Yamaguchi, 2012; Santos *et al.*, 2008a). Ademais, a óleorresina é utilizada como combustível caseiro, também sendo usada em motores de barcos e na indústria de cosméticos; de plásticos e aditivos (para resina); e de tintas e vernizes (Carvalho, 2003). As atividades farmacológicas comprovadas na literatura são diversas, dentre elas: antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, antileishmania, antitumoral, antineoplásica, antinociceptiva, larvicida; tratamento de periodondite, úlceras e feridas (crônicas ou não) (Deus; Alves; Arruda, 2011; Ghizoni *et al.*, 2017; Gomes *et al.*, 2008, 2007; Leite *et al.*, 2023; Paiva *et al.*, 1998; Perfecto *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2008a; Santos *et al.*, 2008b; Santos *et al.*, 2022b; Silva *et al.*, 2007; Svetlichny *et al.*, 2017; Trindade *et al.*, 2013).

### 2.7.3.1 *Copaifera arenicola*

A espécie *Copaifera arenicola* (Ducke) J. Costa & L.P. Queiroz é nativa e endêmica do Brasil, presente na Caatinga (*stricto sensu*), ocorrendo no Nordeste (Costa, 2020; Queiroz, 2009). É confirmada a presença dessa copaibeira nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte (Costa, 2020). Essa espécie é conhecida popularmente como “miroró”, “pau-preto”, “pau d’olinho”, “podói”, “jacuretá” e “pau-óleo” (Gama; Júnior, 2019; Silva, 2020; Sirqueira *et al.*, 2023). De acordo com Costa (2020), a árvore pode ter entre 3 e 10 metros de altura, com tronco ereto, apresentando folhas com 2-3 pares de folíolos simétricos, com lâminas ovais e glabras; panículas laxas com tamanho igual até uma vez maior que as folha(s) adjacente(s); sementes com arilo laranja (Figura 10). Essa copaíba é utilizada para fins alimentícios; já a madeira, para lenha e construção de móveis, além de ser usada como adubo (Gama; Júnior, 2019; Silva, 2020). Entretanto, *C. arenicola* é pouco relatada na literatura, sendo uma espécie interessante para explorar suas possíveis atividades farmacológicas.

**Figura 10.** Imagens da espécie *Copaifera arenicola*.



Fonte: Costa (2020).

### 2.7.3.2 *Copaifera langsdorffii*

A espécie *Copaifera langsdorffii* Desf. apesar de ser nativa, não é endêmica do Brasil, estando presente nos domínios fitogeográficos: Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica e ocorre em todas as regiões do país (Costa, 2020). Essa copaibeira é utilizada para fins medicinais através do uso da óleoresina e é conhecida popularmente como “copaíba”, “pau de óleo” e “pau d’óleo” (Pasa; David; Sánchez, 2012; Pasa; Soares; Guarim Neto, 2005). De acordo com Costa (2020), a árvore pode ter entre 3 e 15 metros de altura, apresentando folhas com 3-5 pares de folíolos, com lâmina elípticas/ovais; panículas laxas menores ou de tamanho igual as folhas adjacentes, raramente uma vez maior; semente com arilo laranja ou vermelho (Figura 11). Essa espécie é bastante relatada na literatura, apresentado várias atividades biológicas comprovadas, como antibacteriana, antifúngica, antiúlcera, cicatrizante, entre outros (Abrão *et al.*, 2015; Paiva *et al.*, 1998). Nesse contexto, *C. langsdorffii* é um objeto de estudo interessante para investigar atividades biológicas contra diferentes microrganismos, visto que foi comprovado anteriormente ter atividade antimicrobiana e antibiofilme.

**Figura 11.** Imagens da espécie *Copaifera langsdorffii*.



Fonte: Costa (2020).

### 3 HIPÓTESES

1. As óleorresinas extraídas das espécies *C. arenicola* e *C. langsdorffii* apresentam ação antibacteriana sobre células planctônicas de *S. aureus*, exibindo tanto atividade bacteriostática quanto bactericida;
2. As óleorresinas extraídas das espécies *C. arenicola* e *C. langsdorffii* possuem efeito antibiofilme formação de biofilmes e reduzem biofilmes pré-formados bacterianos, através da diminuição de biomassa, do número de células viáveis e de atividade metabólica;
3. As óleorresinas extraídas das espécies *C. arenicola* e *C. langsdorffii* causam danos na parede celular de *S. aureus*;
4. As óleorresinas extraídas das espécies *C. arenicola* e *C. langsdorffii* não apresentam citotoxicidade sobre as linhagens celulares L929 (fibroblastos murino) e HaCaT (queratinócitos humanos);
5. As óleorresinas extraídas das espécies *C. arenicola* e *C. langsdorffii* não apresentam toxicidade sobre *Artemia salina*.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme das óleorresinas extraídas de *C. arenicola* e *C. langsdorffii* sobre diferentes estirpes de *S. aureus*, como também avaliar a toxicidade sobre diferentes linhagens celulares e *Artemia salina*.

### 4.2 Objetivos específicos

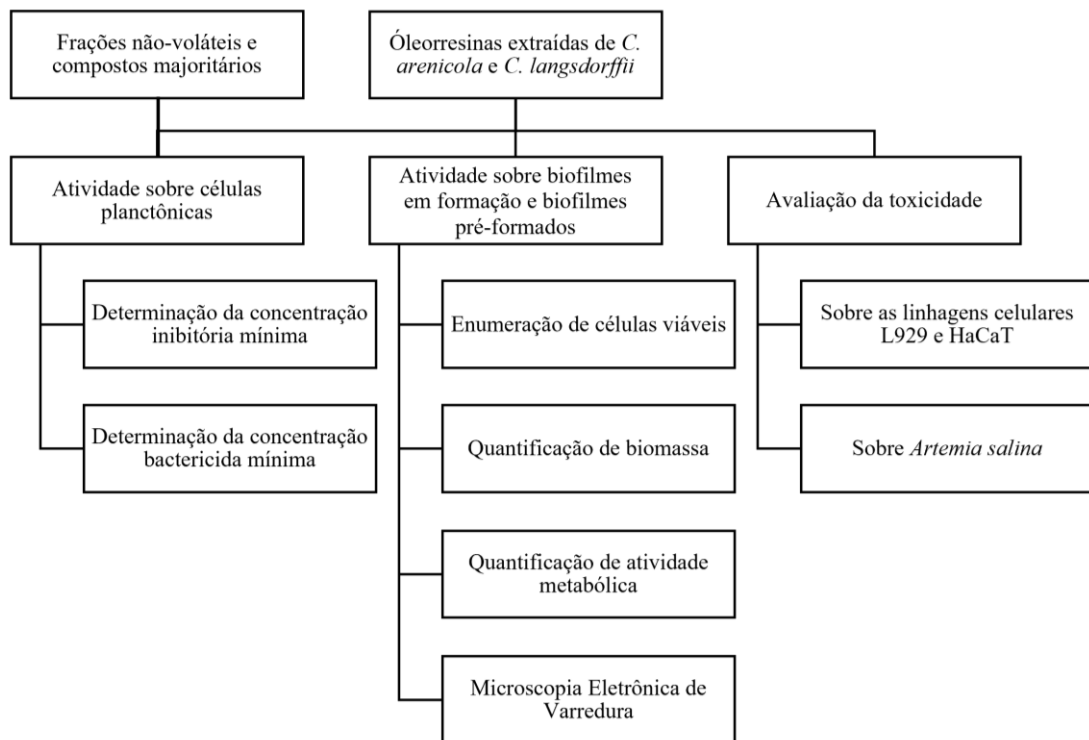
1. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) das óleorresinas extraídas das espécies *C. arenicola* e *C. langsdorffii*, como também as frações voláteis e não-voláteis e componentes majoritários isolados das frações não-voláteis extraídas das óleorresinas sobre as estirpes de *S. aureus*;
2. Avaliar o efeito das óleorresinas extraídas das espécies *C. arenicola* e *C. langsdorffii* sobre a biomassa, a atividade metabólica e o número de células viáveis tanto na formação de biofilmes quanto em biofilmes pré-formados de *S. aureus*;
3. Avaliar, através de Microscopia Eletrônica de Varredura, modificações morfológicas dos biofilmes em formação de *S. aureus* após tratamento com as óleorresinas extraídas de *C. arenicola* e *C. langsdorffii*;
4. Avaliar a citotoxicidade das óleorresinas extraídas das espécies *C. arenicola* e *C. langsdorffii* sobre as linhagens celulares L929 (fibroblastos murino) e HaCaT (queratinócitos humano);
5. Avaliar a toxicidade das óleorresinas extraídas das espécies *C. arenicola* e *C. langsdorffii* sobre *Artemia salina*.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Local de estudo

As análises antibacteriana, antibiofilme e de toxicidade foram executadas no Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS), que fica na Universidade Federal do Ceará (UFC). A Figura 12 mostra o fluxo de atividades realizadas no presente estudo.

**Figura 12.** Organograma das metodologias executadas do presente estudo.



Fonte: próprio autor. Imagem feita na plataforma Power Point® para Windows®.

### 5.2 Obtenção das óleorresinas

As óleorresinas, bem como as frações voláteis e não-voláteis e os componentes majoritários isolados das frações não-voláteis, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Edilberto Rocha Silveira, responsável pelo Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais I (LAFIPLAM I - UFC) e Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN - UFC). Em que os ácidos hardwickiico + ácido colavênico foram isolados da fração não-volátil da óleorresina da espécie *C. arenicola* e o ácido poliáltico foi isolado da fração não-volátil da óleorresina da espécie *C. langsdorffii*.

### 5.2.1 Coleta das óleorresinas

A óleorresina extraída de *C. langsdorffii* foi coletada em Crato - CE no período da manhã, em 13 de dezembro de 2019 nas seguintes coordenadas: S 07° 21977' e W 39° 25167'. A outra óleorresina, extraída de *C. arenicola*, foi coletada, também, no período da manhã em Icapuí - CE, em 25 de janeiro de 2020, nas seguintes coordenadas: S 04° 38228' e W 37° 30716'. Para a obtenção das óleorresinas, foi utilizado o método de extração racional. Dessa forma, procedeu-se à abertura de um furo no tronco da copaíba com um trado. Em sequência, um cano PVC foi posicionado na fenda para escoamento da óleorresina, após isso, esse cano foi vedado, para depois ser possível realizar uma nova extração, caso necessário.

### 5.3 Bactérias e condições de cultivo

No presente estudo foram utilizadas duas estirpes-padrão obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), além da estirpe *Staphylococcus aureus* JKD 6008, em que suas características estão contidas no Quadro 2. Inicialmente, as bactérias foram preservadas em meio de cultura Triptona de Soja Caldo (TSB; HiMedia®) enriquecido com glicerol (Sigma-Aldrich®) a 20% v/v em tubos criogênicos e mantidos em um freezer de temperatura ultrabaixa de -80 °C (CryoCube F570 ULT; Eppendorf®).

Para cultivo e crescimento bacteriano, tubos criogênicos de cada estirpe foram retirados do freezer para descongelamento até que atingissem a temperatura ambiente de, aproximadamente, 25 °C. Depois, uma alíquota de 10 µL do conteúdo do microtubo foi adicionada em uma placa de Petri contendo meio de cultura Mueller Hinton Ágar (MHA; Kasvi®), para as metodologias com células planctônicas, e meio de cultura Triptona de Soja Ágar (TSA; Kasvi®), para as metodologias com biofilmes. E então, a inoculação em meio ágar foi realizada através da metodologia de esgotamento por estrias múltiplas, utilizando uma alça bacteriológica, para isolamento e visualização da morfologia das colônias bacterianas. Após a inoculação, as placas de Petri foram incubadas em estufa para cultura bacteriológica (CO<sub>2</sub> Incubator KM-CC17RU1; Panasonic®) a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, colônias visualmente semelhantes e isoladas no meio ágar foram retiradas com o auxílio de uma alça bacteriológica e semeadas em 5 mL de meio caldo (MHB ou TSB, a depender do ensaio) em tubos de ensaio. Os inóculos foram incubados a 37 °C por 18-24 horas para a aplicação das metodologias que serão descritas a seguir.

**Quadro 2.** Características das estirpes de *S. aureus* utilizadas no presente estudo.

Estirpe	Origem	Perfil de sensibilidade
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Isolado clínico (sítio não informado); Seattle (EUA), 1945	SASM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 700698	Isolado clínico do escarro de um câncer de pulmão; Japão (1996)	SARM; hSAIV
<i>Staphylococcus aureus</i> JKD 6008	Isolado clínico da cultura de corrente sanguínea; Nova Zelândia (2003)	SARM; SAIV

Fonte: ATCC (c2023), Howden *et al.* (2006, 2010), adaptado pelo autor. *American Type Culture Collection* (ATCC). *S. aureus* sensível a meticilina (SASM). *S. aureus* heterorresistente intermediário a vancomicina (hSAIV). *S. aureus* resistente a vancomicina (SAIV). *S. aureus* resistente a meticilina (SARM).

## 5.4 Atividade antibacteriana sobre células planctônicas

### 5.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O ensaio de CIM foi realizado de acordo com a metodologia proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2015), contida no documento intitulado: “*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition*” (M07-A10). Essa metodologia teve como objetivo avaliar a ação bacteriostática das óleorresinas extraídas de *C. arenicola* e *C. langsdorffii*, como também das suas respectivas frações (volátil e não-volátil) e dos compostos majoritários isolados das frações não-voláteis. Nesse ensaio, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, utilizando placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços de fundo “U”, em triplicata. Primeiramente, foi feita uma solução-mãe com a concentração de 2000 µg/mL, em que as óleorresinas, como também as frações voláteis e não-voláteis e os compostos majoritários das frações não-voláteis foram solubilizados em meio de cultura Mueller Hinton Caldo (MHB; HiMedia®) contendo dimetilsulfóxido (DMSO) a 8%.

A execução da metodologia de CIM consistiu em adicionar 200 µL da solução-mãe dos compostos nos poços na primeira linha da placa de 96 poços. Nos demais poços das linhas subsequentes foram acrescentados 100 µL de MHB. A partir da concentração de 2000 µg/mL foi realizada a diluição seriada, em que foram retirados 100 µL dos poços da primeira linha e acrescentado esse mesmo volume nos poços da linha seguinte. Dessa forma, os compostos foram diluídos em todos os poços (A a G), com exceção dos poços da última linha (H), em que nenhum tratamento foi acrescentado, somente 100 µL de meio, os quais foram designados como o controle negativo do ensaio. Assim, após a diluição, obtiveram-se diferentes concentrações

dos compostos, as quais variaram entre 32,25 a 2000 µg/mL na placa, onde todos os poços apresentavam o volume de 100 µL. Posteriormente, foram adicionados mais 100 µL de MHB em todas as colunas pares (4, 8 e 12) da placa de microtitulação, as quais foram designadas como o branco analítico do ensaio, contendo apenas o meio de cultura utilizado e os compostos diluídos seriadamente. Dessa forma, cada poço obteve o volume final de 200 µL.

Após o período de cultivo bacteriano, como descrito na sessão anterior, o inóculo foi transferido para tubos de centrifugação tipo *falcon* e centrifugado a 9000 rpm a 5 °C por 4 minutos (Centrifuge 5810 R; Eppendorf®). Com a formação de *pellet*, o sobrenadante foi descartado e a cultura bacteriana foi ressuspensa em 5 mL de MHB estéril. A concentração dos inóculos foi ajustada com o auxílio do espectrofotômetro (Ultrospec™ 2100 pro; Amersham Biosciences Corp®) em que foi medida a densidade óptica (D.O.) no comprimento de onda de 620 nm, para obter a concentração final de  $2 \times 10^6$  células/mL. Após o ajuste, 100 µL do inóculo bacteriano foram acrescentados nos poços das colunas ímpares (1-3, 5-7 e 9-11), as quais foram designadas como os tratamentos do ensaio. Dessa forma, a concentração bacteriana final foi de  $1 \times 10^6$  células/mL e a concentração dos tratamentos variaram entre de 15,625 a 1000 µg/mL, em ordem decrescente, das linhas A a G, de modo que todos os poços obtiveram o volume final de 200 µL. Depois, a placa foi incubada por 24 horas a 37 °C. Foi considerada CIM a menor concentração dos compostos que não apresentou turbidez nos poços através da leitura visual das placas.

#### **5.4.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

A partir do resultado de CIM, foram determinados os valores de CBM de acordo com a metodologia proposta por Das *et al.* (2016). Nesse teste, as bactérias são adicionadas em meio ágar estéril para analisar se tiveram o crescimento somente inibido pelo tratamento aplicado ou se este foi capaz de eliminá-las e em qual concentração houve a ação bactericida. Primeiramente, alíquotas 10 µL foram retiradas das suspensões dos poços em que não houve crescimento visível no meio caldo. Então, esses volumes retirados da placa de microtitulação foram semeados em placas de Petri com MHA, as quais foram divididas em quadrantes (cada um designado a uma concentração do composto), de modo que cada alíquota fosse referente a um poço da triplicata dos tratamentos. Após isso, as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Foi considerada CBM a menor concentração dos compostos em que não foi observado crescimento de colônias na superfície do ágar.

## 5.5 Atividade das óleorresinas sobre a formação do biofilme

As metodologias executadas a partir deste tópico foram realizadas somente com as óleorresinas extraídas de *C. arenicola* e *C. langsdorffii*. Em vista disso, para verificar a atividade antibiofilme das óleorresinas, as placas foram montadas, inicialmente, de forma similar a metodologia de determinação de CIM (seção 5.4.1). Entretanto, os meios utilizados foram TSB e TSA; e as placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços utilizadas foram as de fundo plano. Após a montagem, as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Decorrido esse período, foram realizadas as metodologias descritas abaixo, em que foram aplicadas em biofilmes tratados e não tratados com as óleorresinas.

### 5.5.1 Enumeração de células viáveis

O ensaio de contagem de células viáveis foi executado de acordo com a metodologia descrita por Vasconcelos *et al.* (2014), com modificações. Posteriormente a montagem da placa e ao período de incubação, os poços foram lavados três vezes com água destilada autoclavada para retirar as células fracamente aderidas. Na terceira lavagem a água foi mantida. Logo após, a placa foi selada com um filme para vedação de microplacas e levado para o banho ultrassônico (Cuba de Ultrassom Cristófoli; Cristófoli®) por 480 segundos, para desprender o biofilme incrustado no fundo dos poços. Então, o conteúdo dos poços da triplicata de todas as concentrações testadas foi reunido em microtubos correspondentes para cada tratamento. Depois, em uma placa de fundo “U”, foram acrescentados 180 µL de água destilada autoclavada nos poços, verticalmente, até a metade da placa. Subsequentemente, nos poços da primeira coluna foi acrescentada uma alíquota de 20 µL das soluções dos microtubos, de maneira que cada linha correspondesse a um tratamento e a última linha, ao controle negativo. Assim, a diluição decimal foi realizada verticalmente retirando 20 µL dos poços da primeira coluna e acrescentando nas seguintes até sexta coluna, fazendo com que a concentração de Unidade Formadora de Colônia (UFC) caísse na base 10 de log até a diluição -6. Imediatamente, em placas de Petri com TSA, dividida em seis quadrantes correspondentes as diluições realizadas, foram inoculadas três alíquotas de 10 µL de cada poço em cada quadrante, de forma que cada placa correspondesse a uma concentração das óleorresinas. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Decorrido esse período, houve a contagem de UFCs das placas de Petri e a quantificação foi expressa em Log<sub>10</sub>UFC/mL.

### 5.5.2 Quantificação da biomassa

A quantificação da biomassa foi determinada através do método de coloração com Violeta Cristal. Esse teste foi realizado de acordo com a metodologia de Stepanović *et al.* (2000), com modificações. Esse ensaio teve como objetivo quantificar a biomassa dos biofilmes de *S. aureus* com e sem tratamento com as óleorresinas na inibição da formação de biofilme. Logo após a montagem e a incubação das placas, todos os poços foram lavados três vezes com água destilada autoclavada para retirar as células fracamente aderidas. Então, as placas foram mantidas em temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de álcool metílico P.A. (Neon®) nas placas por 5 minutos para desidratar e fixar os biofilmes no fundo dos poços. Em seguida, o reagente foi removido e foram adicionados 200 µL de Violeta Cristal (VC; Neon®) diluído a 1% p/v por 5 minutos. Depois, o corante foi removido e as placas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso. Subsequentemente, foram acrescentados 200 µL de ácido acético (Neon®) diluído a 33% v/v nos poços para remover o VC remanescente fixado nos biofilmes para a leitura da absorbância do conteúdo dos poços. Por fim, o corante foi quantificado com o auxílio de um leitor de microplacas (SpectraMax i3 Multi-Mode Microplate Reader; Molecular Devices®), por meio da D.O. no comprimento de onda de 590 nm. A D.O. dos brancos analíticos foi subtraída dos tratamentos aplicados.

### 5.5.3 Determinação da atividade metabólica dos biofilmes

Para quantificar a atividade metabólica das bactérias inseridas nos biofilmes, foi realizado o ensaio colorimétrico utilizando resazurina. Esse corante, com propriedade redox, serve como indicador para monitorar a viabilidade celular, pois células metabolicamente ativas reduzem a resazurina (coloração azul) em resorufina, exibindo coloração rosa (Costa *et al.*, 2021; Dai *et al.*, 2021; Riss *et al.*, 2004). Para a execução do ensaio, foi preparada uma solução estoque de resazurina (Sigma-Aldrich®) a 0,025% p/v (2,5 mg em 10 mL) em tampão fosfato salino (PBS; do inglês *Phosphate-Buffered Saline*; fosfato 10 mM; NaCl 150 mM; KCl 2,7 mM; pH 7,2-7,4), a qual foi estocada a 4 °C na ausência de luz, visto que a resazurina é um composto fotossensível (Bandeira *et al.*, 2013; Castelo-Branco *et al.*, 2016; Dalecki; Crawford; Wolschendorf, 2016; Toté *et al.*, 2007). Posteriormente incubação da placa, o conteúdo dos poços foi retirado e então foram lavados duas vezes com PBS para retirar as células fracamente aderidas. Em seguida, foram adicionados mais 200 µL de PBS e, então, acrescentadas alíquotas de 20 µL da solução estoque de resazurina em todos os poços. Logo depois, as placas foram

incubadas a 37 °C durante uma hora na ausência de luz. Decorrido esse período, as placas foram levadas ao leitor de microplacas (SpectraMax i3 Multi-Mode Microplate Reader; Molecular Devices®), em que foi realizada a leitura da D.O. nos comprimentos de onda de 540 nm (estado reduzido; cor rosa) e 630 nm (estado oxidado; cor azul) (Castelo-Branco *et al.*, 2016). Após a leitura, os valores dos poços do branco analítico do ensaio foram subtraídos dos demais poços nos quais foram aplicados os tratamentos, de acordo com cada leitura (Yu *et al.*, 2003). Por último, os valores apresentados na absorbância em 630 nm foram subtraídos dos valores em 540 nm para obtenção da absorbância corrigida e, assim, ser calculada a porcentagem da viabilidade celular através da equação (Castelo-Branco *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2003):

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Absorbância corrigida do tratamento}}{\text{Absorbância corrigida do controle negativo}} \times 100\%$$

## 5.6 Atividade das óleorresinas sobre biofilmes pré-formados

Para a avaliação das óleorresinas sobre biofilmes pré-formados, também foram utilizadas placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços de fundo plano. Entretanto, a montagem inicial do ensaio diferiu das metodologias para biofilmes em formação. Primeiramente, foram acrescentados 100 µL de TSB e 100 µL de suspensão bacteriana previamente ajustada em todos os poços referentes aos tratamentos e ao controle negativo, ambos em triplicata. Em sequência, a placa foi incubada por 24 horas a 37 °C. Decorrido esse período, o sobrenadante de todos os poços foi retirado e, então, os poços foram lavados duas vezes com PBS com alíquotas de 200 µL. Logo depois, foram acrescentados 100 µL de TSB, em todos os poços, incluindo aqueles designados ao branco analítico do ensaio. No controle negativo foram aliquoteados 200 µL de TSB. Posteriormente, em placas de fundo “U”, foi realizada a diluição seriada das óleorresinas, na qual foram acrescentados 150 µL de TSB nos poços da linha B a G e 300 µL nos poços da linha A de solução-mãe das óleorresinas na concentração de 2000 µg/mL com DMSO a 8%. Dessa forma, a diluição foi executada retirando 150 µL dos poços da primeira linha e acrescentando esse mesmo volume nos poços da linha seguinte, caindo a concentração pela metade da óleorresina de poço para poço, resultando nas concentrações que variaram de 31,25 a 2000 µg/mL. Subsequentemente, foram retirados 100 µL de todas as linhas (A a G) da placa de fundo “U” e transferidos para a placa de fundo plano, totalizando o volume final de 200 µL em todos os poços, em que as concentrações resultantes das óleorresinas variaram de 15,625 a 1000 µg/mL. Finalmente, a placa foi incubada por 24

horas a 37 °C. Após isso, as metodologias descritas anteriormente para biofilmes em formação foram realizadas para avaliar a ação das óleorresinas sobre biofilmes pré-formados.

## 5.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O ensaio de MEV foi executado de acordo com metodologia proposta por Andrade *et al.* (2020). Foram utilizadas placas de poliestireno de 12 poços de fundo plano. Inicialmente, foram adicionadas lamínulas redondas de vidro Thermanox™ (Thermo Fisher Scientific®) autoclavadas nos poços. A diluição seriada das óleorresinas foi executada previamente em tubos de centrifugação tipo *falcon* de 15 mL. Para a avaliação das óleorresinas na inibição do biofilme, foram acrescentados 500 µL de bactéria com concentração ajustada e 500 µL das óleorresinas no dobro da concentração de CIM correspondente para cada óleorresina. Subsequentemente, a placa foi incubada por 24 horas a 37 °C. Para a avaliação dos biofilmes pré-formados, foram aliquotados 500 µL de TSB e esse mesmo volume de inóculo bacteriano com concentração previamente ajustada e a placa foi incubada por 24 horas a 37 °C. Decorrido o tempo de incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS e depois foram acrescentados 500 µL de TSB e 500 µL do dobro da concentração de CIM correspondente para cada óleorresina para que a concentração final ficasse igual a CIM na placa. Após esse período, tanto para o ensaio de avaliação da inibição de biofilme em formação quanto de biofilme pré-formado, os poços foram lavados três vezes com PBS e, então, os biofilmes incrustados nas lamínulas de vidro foram desidratados três vezes com etanol em diferentes concentrações. Primeiro foi acrescentado 1 mL de etanol a 70%, que após dez minutos foi retirado e adicionado 1 mL de etanol a 90%. Depois, foi retirado e acrescentado etanol a 99,5% por 20 minutos. Em seguida, foi retirado o conteúdo de todos os poços e as placas foram embaladas em Parafilm® M (Bemis Company, Inc.®) e levadas para o dessecador até o momento da visualização. Posteriormente, as lamínulas foram metalizadas com ouro e visualizadas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG (Central Analítica da UFC, Brasil).

## 5.8 Ensaio de Citotoxicidade

### 5.8.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

Foram utilizadas as linhagens de células L929 (fibroblastos murino) e HaCaT (queratinócitos humano) pertencentes a ATCC, através do Banco de Células do Rio de Janeiro.

As condições de cultivo e o ensaio de citotoxicidade foram executados de acordo com a metodologia de Vale *et al.* (2019). As células foram cultivadas em frascos T-25 (Kasvi®) para cultivo celular contendo meio de cultura Eagle Dulbecco Modificado Caldo (DMEM; Sigma®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB; Bio Nutrientes®), 100 U/mL de penicilina e de estreptomicina (Cytiva®). A cultura foi mantida a 37 °C, em uma atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> em estufa para cultivo de células (CO<sub>2</sub> Incubator MCO-19AIC(UV); Sanyo Scientific®). O meio foi trocado a cada três dias e ao atingir 80% de confluência as células foram tripsinizadas (0,025% tripsina/0,1% EDTA) para desprende-las do frasco de cultura e, assim, prosseguir com o ensaio de viabilidade celular.

### 5.8.2 Ensaio de viabilidade celular

Após a etapa de tripsinização, foi realizado o ajuste do número de células através da contagem na câmara de Neubauer para obter a concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço. Em seguida, foram adicionados 200 µL das células ajustadas em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços de fundo plano, as quais foram incubadas por 24 horas a 37 °C, em uma atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Decorrido esse período, as óleorresinas foram solubilizadas em DMSO em microtubos de 2 mL e submetidas ao vórtex (Vortex Mixer KMC-1300V; Vision Scientific®). Depois, essa solução foi passada para um tubo para centrifugação tipo *falcon* de 15 mL e acrescentado meio DMEM suplementado de forma que a solução-mãe obtivesse a concentração de 1000 µg/mL e DMSO a 1%. Subsequentemente, foi realizada uma diluição seriada com essa solução em tubos para centrifugação tipo *falcon* de 15 mL, resultando em concentrações variando entre 15,625 e 1000 µg/mL. Então, o sobrenadante dos poços da placa foi retirado e acrescentados 200 µL, em ordem decrescente, das concentrações das óleorresinas nas linhas A a G. Os poços da linha H foram designados para o controle negativo, em que foram acrescentados 200 µL de meio DMEM com DMSO a 1%. Por fim, a placa foi incubada nas mesmas condições e tempo citados anteriormente.

Posteriormente ao período de incubação, foi realizado o teste de viabilidade celular, através do ensaio de redução do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). É um método colorimétrico em que o processo de mudança de cor do meio é realizado por enzimas mitocondriais, refletindo diretamente a atividade celular, sendo medida pela absorvância. Primeiramente, foi observada a morfologia das células com e sem o tratamento com as óleorresinas. Também foram tiradas fotomicrografias utilizando um microscópio invertido acoplado com câmera e tela para visualização dos poços (Microscópio Biológico

Invertido Trinocular TS100F, Nikon DS-Qi1Mc Microscope Camera e Digital Sight DS-L2 Controller; Nikon®). Em seguida, foi preparada uma solução de MTT na concentração de 0,5 mg/mL, utilizando 10 mL de DMEM não suplementado e 1 mL de MTT na concentração de 5 mg/mL. Depois do tempo de exposição às óleorresinas, o conteúdo dos poços foi retirado e substituído por 100 µL da solução de meio DMEM e MTT. As placas foram incubadas por 4 horas na ausência de luz, em uma atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Por fim, as placas foram levadas ao leitor de microplacas (SpectraMax i3 Multi-Mode Microplate Reader) para mensurar a D.O. no comprimento de onda de 570 nm. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada através da equação de Vale *et al.* (2019).

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{\overline{Abs}_{570\ nm}(molécula\ teste)}{\overline{Abs}_{570\ nm}(controle)} \times 100\%$$

## 5.9 Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*

### 5.9.1 Condições de cultivo de *Artemia salina*

Foram adicionados 100 mg de cistos de *A. salina* em um aquário, os quais foram mantidos com salinidade ajustada para 1020 g/cm<sup>3</sup>, em temperatura ambiente (24-25 °C), com aeração constante e expostos sob uma fonte de luz contínua até o momento da eclosão, em que o tempo pode variar entre 24 e 48 horas. Decorrido esse período, os cistos recém eclodidos foram transferidos para uma placa de poliestireno de 6 poços de fundo plano com o auxílio de uma pipeta de vidro de ponta alongada e acrescentados de 10 a 15 mL de náuplios em solução salina no primeiro poço. Nos demais, foram repassados de 3 a 4 mL de cistos, com exceção de um dos poços em que foi adicionado somente solução salina na concentração de 1020 g/cm<sup>3</sup>, a qual foi utilizada posteriormente para ajustar o volume dos poços nas placas do ensaio de toxicidade propriamente dito.

### 5.9.2 Ensaio de toxicidade

Em uma placa de poliestireno de 24 poços de fundo plano, foram distribuídos 10 náuplios por poço dos que foram separados na placa de 6 poços com a ajuda de uma pipeta de vidro de bico alongado e utilizando uma fonte de luz para auxiliar na contagem de náuplios. Depois da distribuição ter sido realizada, o volume dos poços foi ajustado para 200 µL com a

solução salina separada anteriormente, na placa de 6 poços, utilizando uma pipeta de vidro graduada de 1 mL. Para a preparação da solução-mãe com as óleorresinas, primeiramente foi utilizado DMSO a 2% para solubilização dos compostos. Posteriormente, foi adicionada a solução salina na concentração de 1020 g/cm<sup>3</sup> até o ajuste para a concentração de 2000 µg/mL. A partir dessa solução, foi realizada a diluição seriada em tubos para centrifugação tipo *falcon* de 15 mL, resultando nas concentrações de 32,25 a 2000 µg/mL. A placa de 24 poços foi dividida ao meio, de forma todos os sete diferentes tratamentos da mesma óleorresina fossem realizados em triplicata e o controle negativo sendo designado para os últimos poços, também feito em triplicata. Após o acréscimo das óleorresinas na placa, as concentrações finais variaram entre 15,625 a 1000 µg/mL, visto que nos poços já tinham 200 µL de solução salina acrescentados anteriormente com os náuplios, fazendo com que a concentração de cada tratamento caísse pela metade. Após a montagem, as placas foram mantidas no escuro em temperatura ambiente (24-25 °C) por 24 horas. Por fim, a contagem dos náuplios foi executada em microscópio óptico convencional (Microscópio PrimoStar 3; ZEISS®), em que as artêmias foram transferidas para uma lâmina de vidro e foram observados os movimentos externos (movimentação padrão de nado, pequenos espasmos) e internos (circulação, trato digestivo) por 10 segundos e caso não houvesse a constatação de nenhum destes movimentos, seriam consideradas mortas e contabilizadas. A porcentagem de mortalidade foi calculada de acordo com a equação proposta por Braguini, Alves, Pires (2019):

$$Mortalidade (\%) = \frac{(total\ de\ náuplios - náuplios\ vivos)}{total\ de\ náuplios} \times 100\%$$

### 5.10 Análise estatística

As triplicatas dos testes foram realizadas em dias alternados e a diferença das médias entre elas foi verificada através do teste One-way ANOVA com pós-teste Bonferroni (para ensaios de microbiologia) e Turkey (para os testes de toxicidade). Procedeu-se à execução das análises estatísticas utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0 para Windows®. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Atividade antibacteriana

De modo geral, ambas óleorresinas extraídas das espécies *C. arenicola* e *C. langsdorffii*, como também suas frações não-voláteis e seus respectivos compostos majoritários tiveram ação tanto bacteriostática (CIM) quanto bactericida (CBM) para todas as estirpes de *S. aureus* testadas, conforme mostrado na Tabela 1. Entretanto, as frações voláteis das óleorresinas não tiveram atividade antibacteriana sobre nenhuma das estirpes de *S. aureus*.

Em relação aos resultados da espécie *C. arenicola*, os valores da óleorresina para CIM variaram entre 125 e 500 µg/mL, já para CBM os valores foram de 500 µg/mL. Para a fração não-volátil os valores de CIM e CBM foram de 31,25 µg/mL. Já a fração volátil não teve atividade antibacteriana contra nenhuma estirpe testada. Por fim, os valores de CIM e CBM para os compostos majoritários ácido hardwickiico + ácido colavênico variaram entre 15,625 e 31,25 µg/mL. No geral, as cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 700698 se mostraram mais sensíveis aos compostos majoritários dessa copaíba em comparação a óleorresina e a sua fração não-volátil, em que a mistura de ácido hardwickiico + ácido colavênico apresentou efeito bacteriostático e bactericida na concentração de 15,625 µg/mL para ambas as estirpes. Já para *S. aureus* JKD 6008, os valores para CIM e CBM dos compostos majoritários foram de 31,25 µg/mL, sendo uma concentração maior em comparação as duas outras estirpes.

No que se refere aos resultados da espécie *C. langsdorffii*, os valores da óleorresina para CIM foram de 125 µg/mL, já para CBM, os valores variaram entre 125 e 500 µg/mL. Para a fração não-volátil, os valores de CIM variaram entre 31,25 e 62,5 µg/mL e de CBM, entre 62,5 a 125 µg/mL. A fração volátil também não teve atividade antibacteriana contra nenhuma estirpe de *S. aureus* testada. Para o ácido poliáltico os valores de CIM e CBM foram de 125 µg/mL. Todas as estirpes foram mais sensíveis a fração não-volátil, em comparação ao composto majoritário e a óleorresina, em que *S. aureus* ATCC 25923 e JKD 6008 apresentaram os mesmos valores para CIM e CBM (31,25 e 62,5 µg/mL, respectivamente); já para *S. aureus* ATCC 700698 a CIM e a CBM foram de 62,5 e 125 µg/mL, respectivamente.

No que diz respeito aos resultados dos antibióticos (Tabela 1), para ampicilina, os valores para CIM e CBM variaram entre 0,05 e 0,5 µg/mL; em que a estirpe mais sensível foi *S. aureus* JKD 6008, com valor de 0,05 µg/mL para CIM e CBM. Para tetraciclina, os valores de CIM e CBM variaram entre 0,25 e 100 µg/mL, em que *S. aureus* ATCC 25923 se mostrou mais sensível, com valor de 0,25 µg/mL para CIM e CBM.

**Tabela 1.** Efeito antibacteriano das óleorresinas, da frações não-voláteis, frações voláteis e compostos majoritários presentes nas frações não-voláteis das espécies *C. arenicola* e *C. langsdorffii* e os antibióticos ampicilina e tetraciclina sobre diferentes estirpes de *S. aureus*.

Compostos	Bactérias					
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>S. aureus</i> ATCC 700698		<i>S. aureus</i> JKD 6008	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<b><i>Copaifera arenicola</i> (µg/mL)</b>						
Óleorresina	125	500	125	500	500	500
Fração não-volátil	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25
Fração volátil	-	-	-	-	-	-
Ácido hardwickiico + ácido colavênico	15,625	15,625	15,625	15,625	31,25	31,25
<b><i>Copaifera langsdorffii</i> (µg/mL)</b>						
Óleorresina	125	250	125	500	125	125
Fração não-volátil	31,25	62,5	62,5	125	31,25	62,5
Fração volátil	-	-	-	-	-	-
Ácido poliáltico	125	125	125	125	125	125
<b>Antibióticos (µg/mL)</b>						
Ampicilina	0,25	0,5	0,25	0,25	0,05	0,05
Tetraciclina	0,25	0,25	100	100	0,8	0,8

Fonte: elaborado pelo autor. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

## 7.2 Atividade antibiofilme

### 7.2.1 Atividade antibiofilme das óleorresinas sobre biofilmes em formação

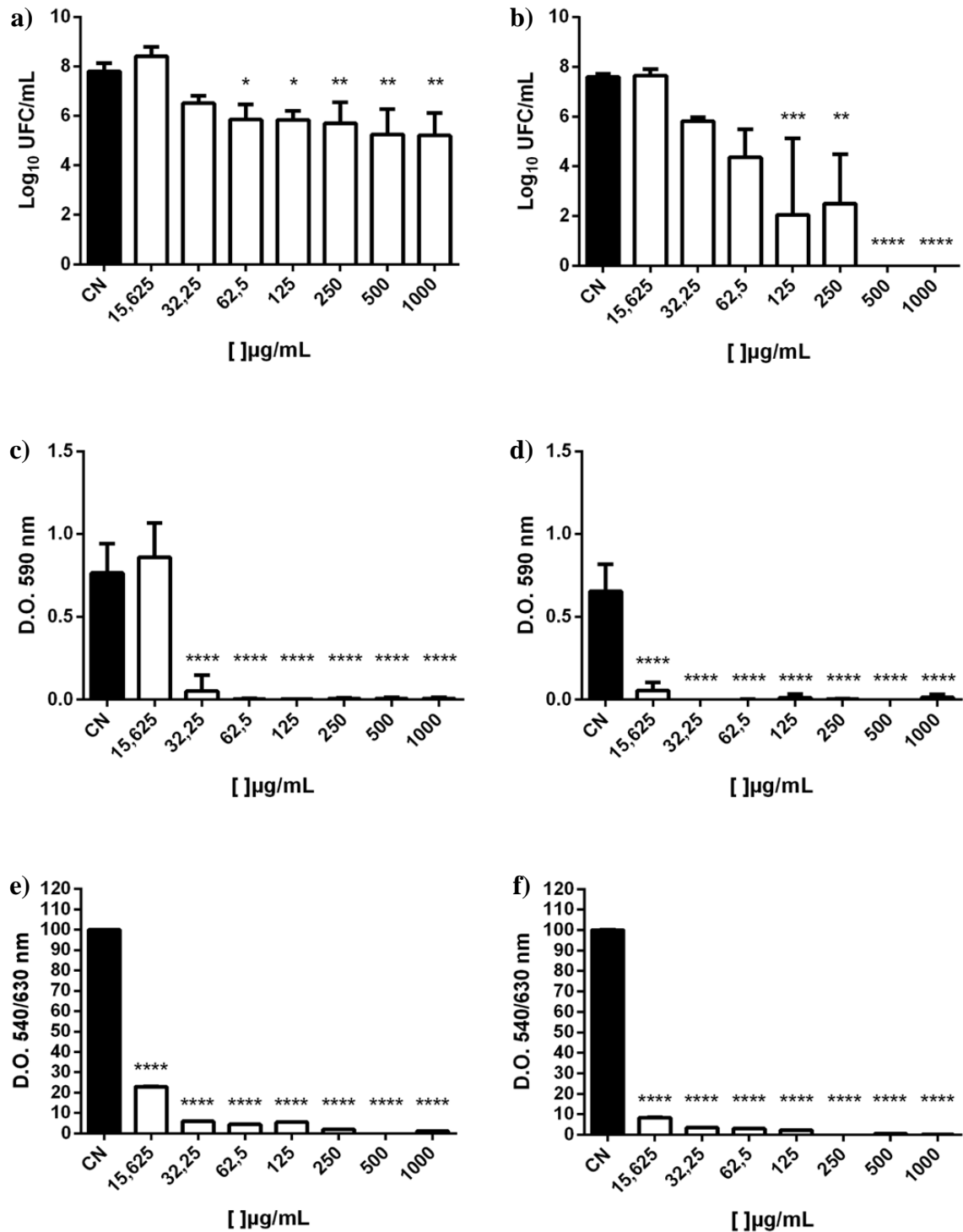
As Figuras 13, 14 e 15 indicam as atividades antibiofilme das óleorresinas extraídas de *C. arenicola* (OCa) e de *C. langsdorffii* (OCl) sobre biofilmes em formação das estirpes *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 e *S. aureus* JKD 6008, em que ambas óleorresinas reduziram de maneira significativa o número de células viáveis, a biomassa total dos biofilmes e a atividade metabólica.

Relativo ao efeito das óleorresinas sobre a estirpe *S. aureus* ATCC 25923, ambas diminuíram a quantidade de UFCs, a porcentagem de biomassa e de atividade metabólica (Figura 13). No que diz respeito a enumeração de células viáveis, as reduções de UFCs foram de 1,29 a 2,58 logs após o tratamento com a OCa (Figura 13 a), em que nas menores concentrações (15,625 e 32,25 µg/mL) não houve decréscimo significativo de UFCs, somente a partir da concentração de 62,5 µg/mL. Para o tratamento com a OCl, as diminuições variaram entre 0,80 e 7,60 logs (Figura 13 b), em que foi observada redução significativa de UFCs a partir da concentração de 125 µg/mL, com diminuição total do número de células viáveis nas maiores concentrações (500 e 1000 µg/mL).

Sobre a quantificação de biomassa, para o tratamento com a OCa, as porcentagens de reduções variaram entre 93,25 e 99,74%. Entretanto, na menor concentração, de 15,625 µg/mL, *S. aureus* ATCC 25923 apresentou um acréscimo na produção de biomassa, com um aumento de 18% na porcentagem de formação em relação ao controle para essa óleorresina (Figura 13 c). Com relação a OCl, em todos os tratamentos aplicados houve decréscimo da biomassa, em que as porcentagens de diminuição variaram entre 86,48 a 100% (Figura 13 d).

Para os resultados relativos à quantificação da atividade metabólica, a redução após o tratamento com a OCa variou entre 94,05 e 100% nas concentrações entre 32,625 e 1000 µg/mL, e na menor concentração (15,625 µg/mL) a diminuição da porcentagem de atividade metabólica foi de 77,00% (Figura 13 e). Os resultados para a OCl foram de decréscimos que variaram entre 91,63 e 99,97% (Figura 13 f).

**Figura 13.** Atividade antibiofilme das óleorresinas extraídas de *C. arenicola* e de *C. langsdorffii* na formação de biofilmes de *S. aureus* ATCC 25923.



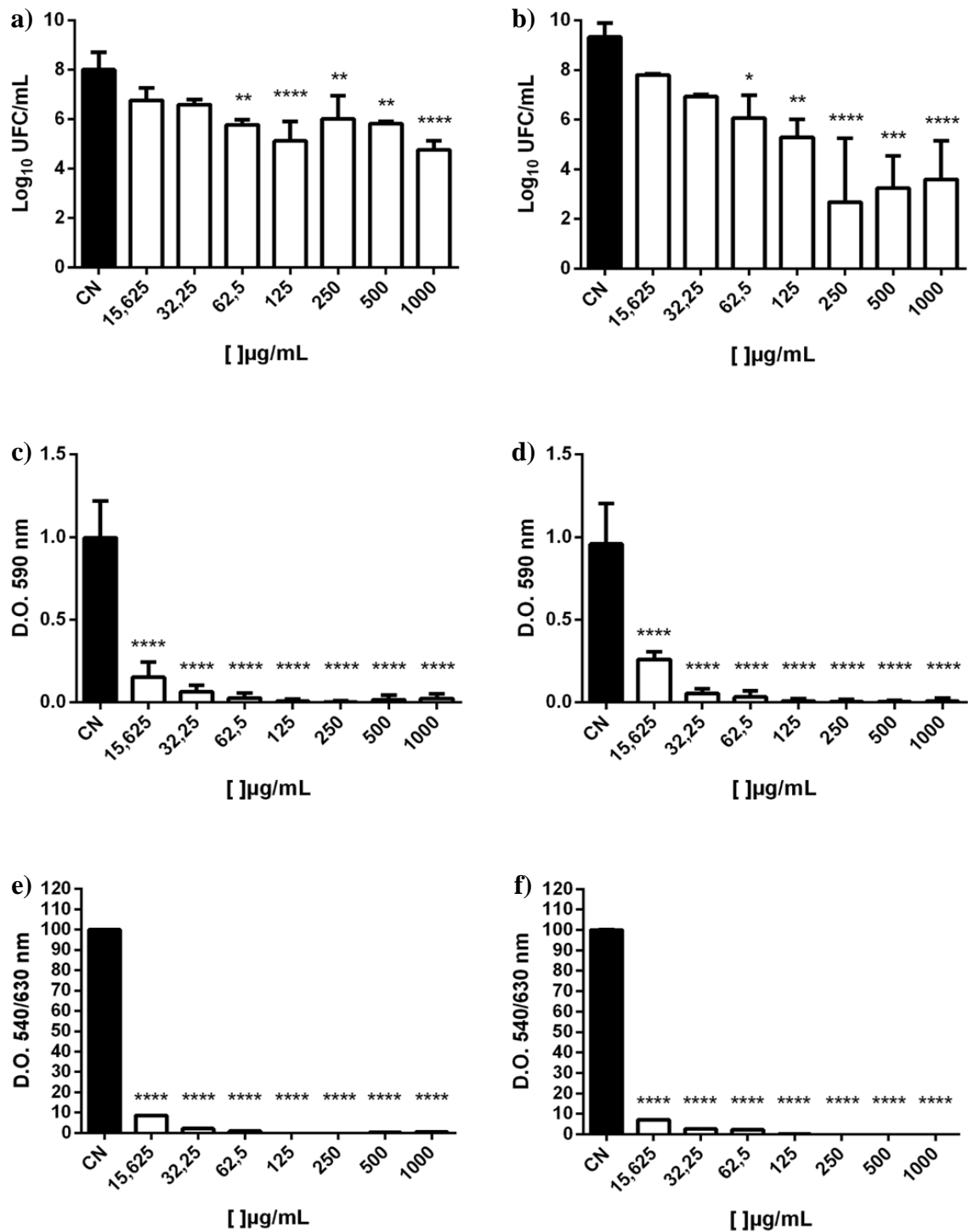
Fonte: próprio autor. Barras escuras são referentes ao controle negativo (CN). Barras brancas são referentes aos tratamentos com as óleorresinas. Gráficos a), c) e e) são referentes ao tratamento com a óleorresina extraída da espécie *C. arenicola*. Gráficos b), d) e f) são referentes ao tratamento com a óleorresina extraída da espécie *C. langsdorffii*. Contagem de células viáveis (a, b). Quantificação de biomassa (c, d). Atividade metabólica (e, f). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001 representam diferença estatística em relação ao controle.

Para a estirpe *S. aureus* ATCC 700698, ambos tratamentos com a OCa e a OCl tiveram atividade sobre biofilme em formação, reduzindo o número de células viáveis, porcentagem de biomassa total e de atividade metabólica (Figura 14). Para ambas óleorresinas, a quantidade de células viáveis teve decréscimo a partir da concentração de 62,5 µg/mL, em que para a OCa as diminuições variaram de 1,92 a 3,16 logs (Figura 14 a) e para a OCl, de 3,26 a 6,65 logs (Figura 14 b).

No ensaio de quantificação de biomassa, para todas as concentrações de ambas óleorresinas houve redução da biomassa total, em que para a OCa, as porcentagens de diminuição foram de 84,60 a 99,51% em relação ao controle (Figura 14 c). No entanto, para a OCl, o decréscimo de biomassa variou de 72,78 a 99,44% (Figura 14 d).

Na quantificação da atividade metabólica, também houve diminuição para todas as concentrações testadas de ambas óleorresinas. Para a OCa, o decréscimo variou entre 91,36 e 100% (Figura 14 e). Para a OCl, as reduções foram de 92,88 a 100% (Figura 14 f).

**Figura 14.** Atividade antibiofilme das óleorresinas de extraídas *C. arenicola* e de *C. langsdorffii* na formação de biofilmes de *S. aureus* ATCC 700698.



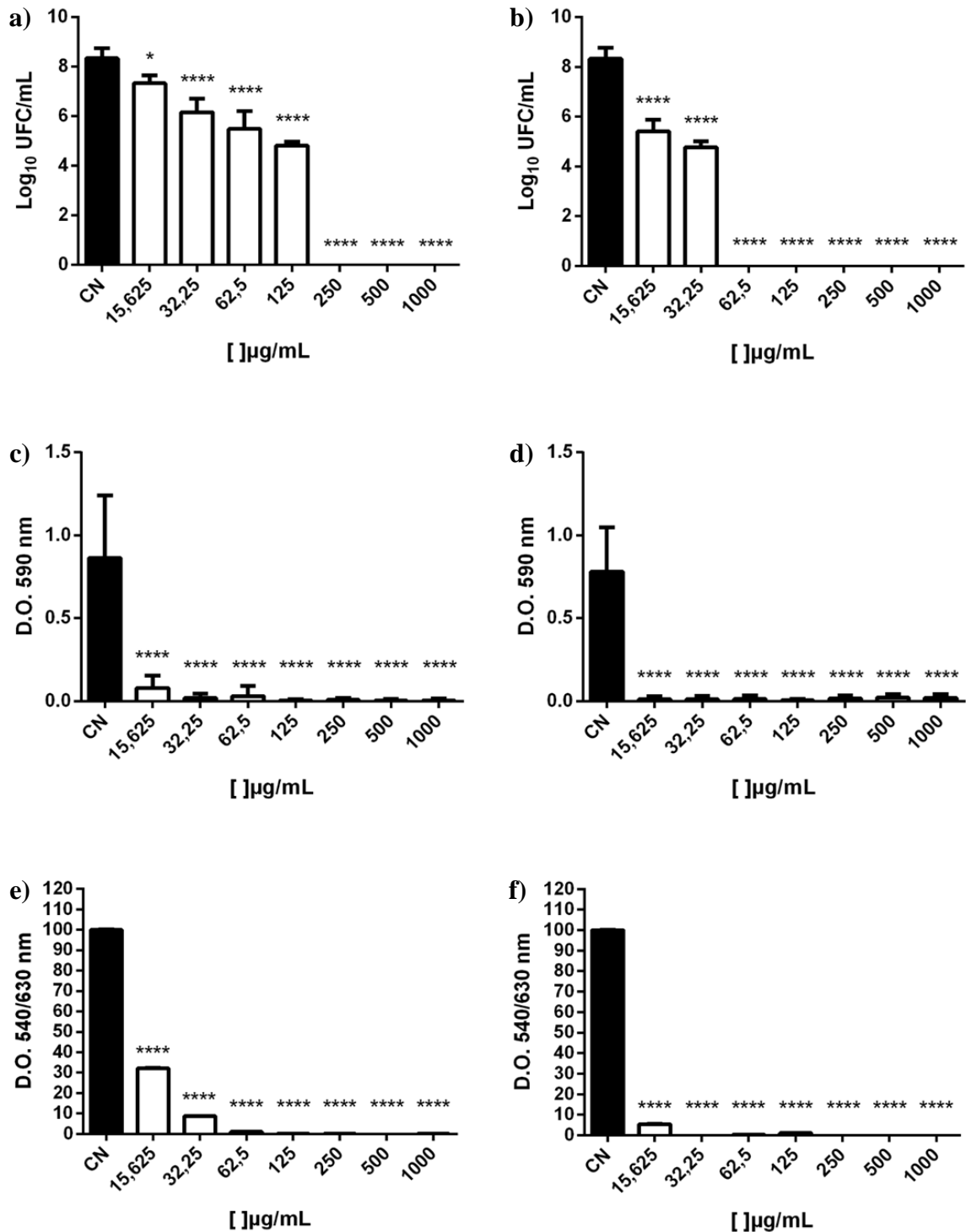
Fonte: próprio autor. Barras escuras são referentes ao controle negativo (CN). Barras brancas são referentes aos tratamentos com as óleorresinas. Gráficos a), c) e e) são referentes ao tratamento com a óleorresina extraída da espécie *C. arenicola*. Gráficos b), d) e f) são referentes ao tratamento com a óleorresina extraída da espécie *C. langsdorffii*. Contagem de células viáveis (a, b). Quantificação de biomassa (c, d). Atividade metabólica (e, f). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  representam diferença estatística em relação ao controle.

Sobre a estirpe *S. aureus* JKD 6008, ambas óleorresinas também diminuíram a quantidade de UFCs, a porcentagem de biomassa total do biofilme e a atividade metabólica (Figura 15). Relativo à enumeração de células viáveis, ambas óleorresinas conseguiram reduzir a quantidade de UFCs em todos os tratamentos, em que nas maiores concentrações não houve crescimento de UFCs (Figura 15 a, b). Para o tratamento com a OCa, o decréscimo variou entre 1,00 a 3,51 logs nas concentrações de 15,625 a 125 µg/mL. Entretanto, nas concentrações de 250 a 1000 µg/mL para essa óleorresina, a diminuição de UFCs foi total, ou seja, de 8,33 logs (Figura 15 a). Para a OCl, as reduções foram de 2,92 e 3,56 logs para as concentrações 15,625 e 32,25 µg/mL, respectivamente, e a partir da concentração de 62,5 µg/mL houve diminuição total, de 8,33 logs, de UFCs (Figura 15 b).

No que diz respeito a quantificação de biomassa, para ambas óleorresinas houve redução da biomassa em todas as concentrações avaliadas (Figura 15 c, d). Para a OCa, as porcentagens de diminuição variaram entre 90,75 e 99,60% (Figura 15 c). Para a OCl, essas porcentagens de decréscimo foram de 97,12 a 99,30% (Figura 15 d).

Em relação a quantificação da atividade metabólica, houve redução em todas as concentrações testadas para ambas óleorresinas (Figura 15 e, f). Para a OCa, as porcentagens de diminuição da atividade metabólica variaram entre 91,24 a 99,91% nas concentrações de 31,25 a 1000 µg/mL, porém, na concentração de 15,625 µg/mL, o decréscimo foi de 67,80% (Figura 15 e). Para a OCl, as reduções variaram entre 94,53 e 100% (Figura 15 f).

**Figura 15.** Atividade antibiofilme das óleorresinas extraídas de *C. arenicola* e de *C. langsdorffii* na formação de biofilmes de *S. aureus* JKD 6008.



Fonte: próprio autor. Barras escuras são referentes ao controle negativo (CN). Barras brancas são referentes aos tratamentos com as óleorresinas. Gráficos a), c) e e) são referentes ao tratamento com a óleorresina extraída da espécie *C. arenicola*. Gráficos b), d) e f) são referentes ao tratamento com a óleorresina extraída da espécie *C. langsdorffii*. Contagem de células viáveis (a, b). Quantificação de biomassa (c, d). Atividade metabólica (e, f). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001 representam diferença estatística em relação ao controle.

### 6.2.2 Atividade antibiofilme das óleorresinas sobre biofilmes pré-formados

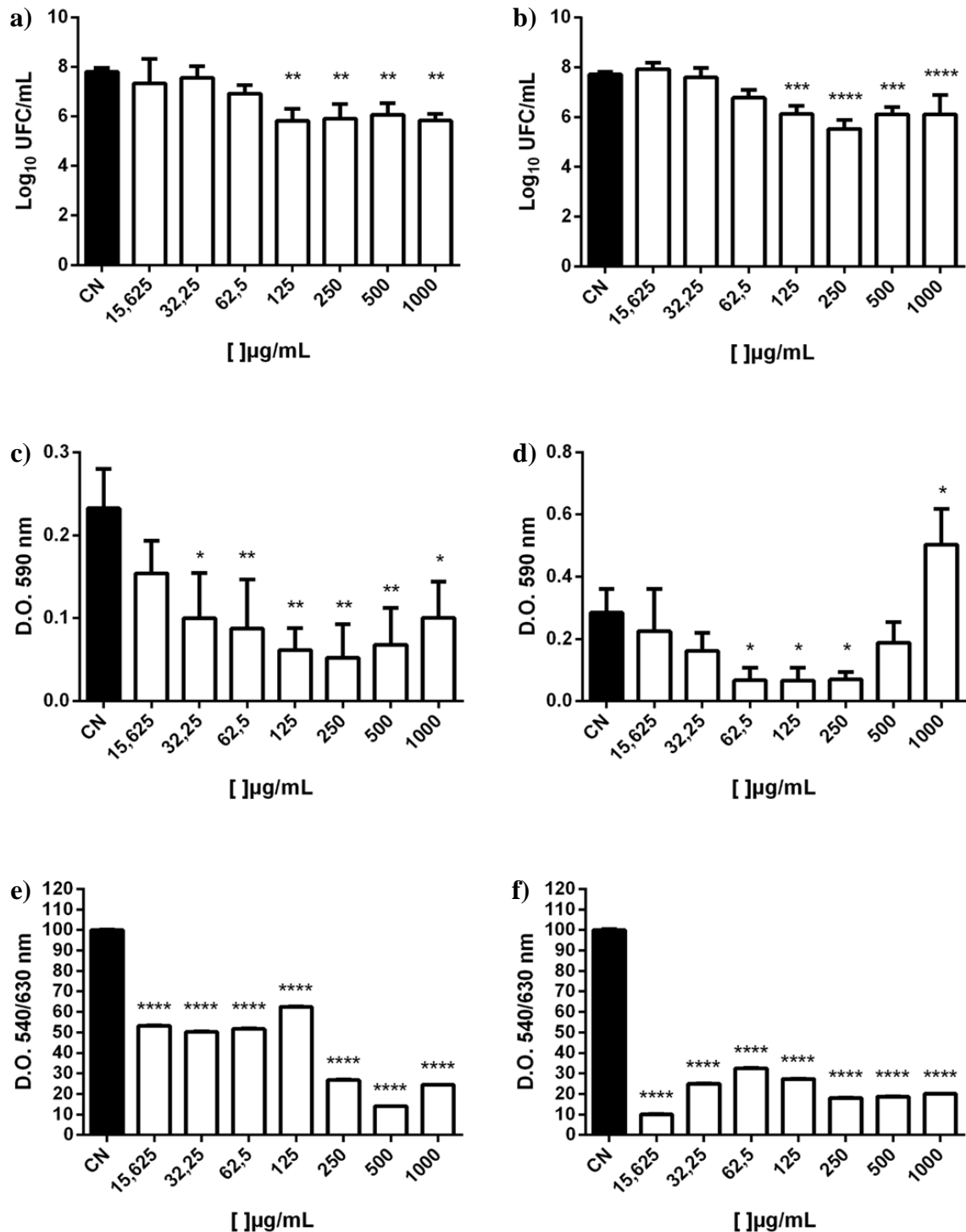
As figuras 16, 17 e 18 indicam a atividade antibiofilme das óleorresinas extraídas de *C. arenicola* e *C. langsdorffii* contra biofilmes pré-formados de *S. aureus* ATCC 25923, ATCC 700698 e JKD 6008. Em geral, ambas óleorresinas reduziram de maneira significativa as células viáveis e a biomassa nos biofilmes pré-formados nas maiores concentrações testadas além de diminuir, em todos os tratamentos aplicados, a atividade metabólica.

No que se refere aos resultados da atividade das óleorresinas sobre os biofilmes pré-formados de *S. aureus* ATCC 25923, ambas conseguiram reduzir o número de UFCs, quantificação de biomassa e de atividade metabólica (Figura 16). No ensaio de enumeração de células viáveis, houve decréscimo da quantidade de UFCs nas quatro maiores concentrações (125 a 1000 µg/mL) para ambos tratamentos com as óleorresinas, em que para a OCa, os valores variaram entre 0,99 a 1,93 logs (Figura 16 a) e para a OCl, de 1,24 a 2,00 logs (Figura 16 b). Nas demais concentrações não houve diminuição significativa em relação ao controle.

Sobre a quantificação de biomassa, os tratamentos com as óleorresinas conseguiram reduzir de forma significativa, em algumas concentrações, a biomassa total em relação ao controle negativo (Figura 16 c, d). Para a OCa houve decréscimo da biomassa total em todas as concentrações avaliadas, exceto para 15,625 µg/mL, em que as porcentagens variaram entre 56,77 e 77,44% (Figura 16 c). Para a OCl, a porcentagem de diminuição variou de 75,38 a 76,99%, nas concentrações de 62,5 a 250 µg/mL, mas nas demais concentrações avaliadas não houve redução significativa. Na concentração de 1000 µg/mL, a produção de biomassa foi maior, com um aumento de 76,88% em relação ao controle (Figura 16 d).

Por fim, na quantificação de atividade metabólica houve diminuição em todas as concentrações testadas para ambas óleorresinas avaliadas. Para a OCa, nas três maiores concentrações essas reduções ficaram entre 73,11 e 85,93%, sendo o maior decréscimo na concentração de 500 µg/mL e nas demais entre 37,48 e 49,77% (Figura 16 e). Para a OCl, foram observadas reduções entre 67,43 e 89,95%, em que a maior diminuição foi na menor concentração (15,625 µg/mL) (Figura 16 f).

**Figura 16.** Atividade antibiofilme das óleorresinas extraídas de *C. arenicola* e de *C. langsdorffii* em biofilmes pré-formados de *S. aureus* ATCC 25923.



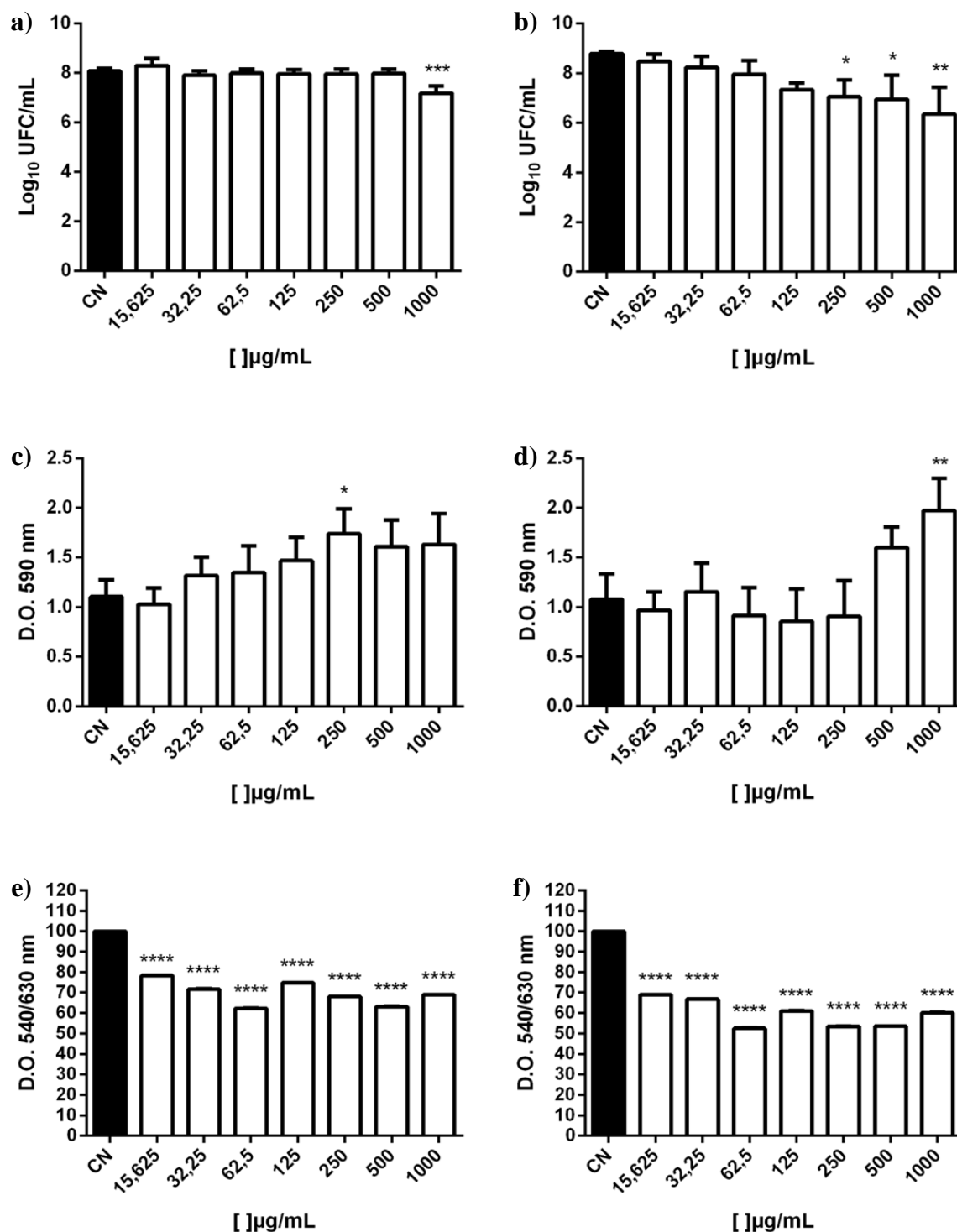
Fonte: próprio autor. Barras escuras são referentes ao controle negativo (CN). Barras brancas são referentes aos tratamentos com as óleorresinas. Gráficos a), c) e e) são referentes ao tratamento com a óleorresina extraída da espécie *C. arenicola*. Gráficos b), d) e f) são referentes ao tratamento com a óleorresina extraída da espécie *C. langsdorffii*. Contagem de células viáveis (a, b). Quantificação de biomassa (c, d). Atividade metabólica (e, f). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001 representam diferença estatística em relação ao controle.

Sobre a estirpe *S. aureus* ATCC 700698, as óleorresinas conseguiram reduzir somente as UFCs e a porcentagem da atividade metabólica, não havendo diminuição significativa da biomassa total do biofilme em relação ao controle (Figura 17). Na enumeração de células viáveis, para os ensaios com a OCa houve decréscimo significativo de UFCs somente na maior concentração (1000 µg/mL), de 0,71 log (Figura 17 a). Para a OCl, houve reduções nas maiores concentrações de 250 a 1000 µg/mL, sendo de 1,54 a 2,09 logs (Figura 17 b).

No ensaio de quantificação de biomassa, não houve diminuição significativa da biomassa para ambos os tratamentos com as óleorresinas testadas (Figura 17 c, d). Na concentração de 250 µg/mL (para o tratamento com a OCa) e na concentração de 1000 µg/mL (para o tratamento com a OCl) foi observada uma produção de biomassa maior em relação ao controle, com um aumento de 57,24 e 82,98%, respectivamente.

Por fim, na quantificação de atividade metabólica, houve redução em todas as concentrações testadas para ambas óleorresinas avaliadas. Para a OCa, as diminuições variaram entre 21,69 e 37,62%, em que a maior porcentagem de decréscimo foi na concentração de 62,5 µg/mL (Figura 17 e). No entanto, para a OCl, as reduções foram de 31,08 a 47,46%, em que a maior porcentagem de diminuição de atividade metabólica foi, também, na concentração de 62,5 µg/mL (Figura 17 f).

**Figura 17.** Atividade antibiofilme das óleorresinas extraídas de *C. arenicola* e de *C. langsdorffii* em biofilmes pré-formados de *S. aureus* ATCC 700698.



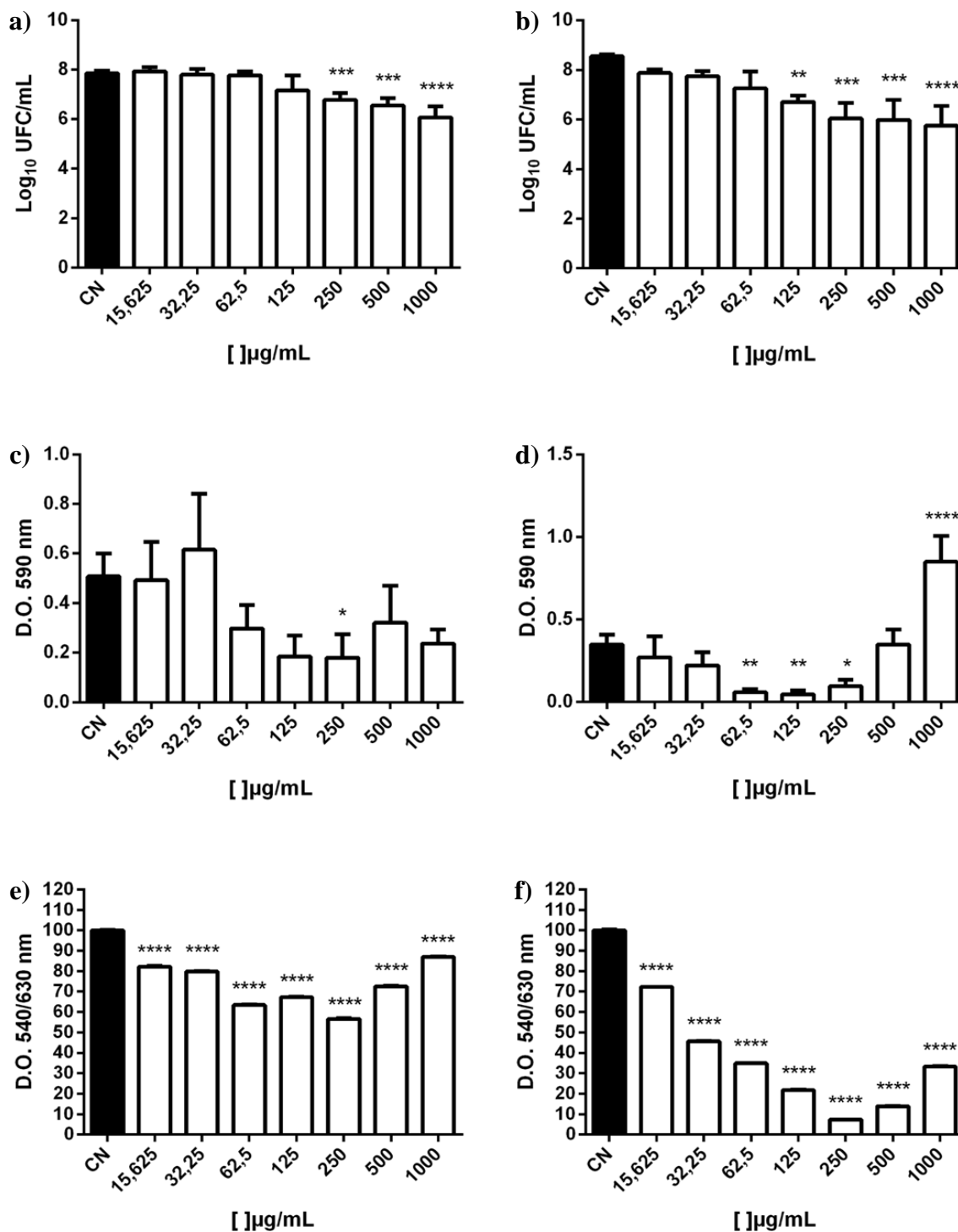
Fonte: próprio autor. Barras escuras são referentes ao controle negativo (CN). Barras brancas são referentes aos tratamentos com as óleorresinas. Gráficos a), c) e e) são referentes ao tratamento com a óleorresina extraída da espécie *C. arenicola*. Gráficos b), d) e f) são referentes ao tratamento com a óleorresina extraída da espécie *C. langsdorffii*. Contagem de células viáveis (a, b). Quantificação de biomassa (c, d). Atividade metabólica (e, f). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  representam diferença estatística em relação ao controle.

No que diz respeito a *S. aureus* JKD 6008, as óleorresinas tiveram efeito sobre a enumeração de células viáveis, a biomassa total do biofilme e a atividade metabólica, reduzindo-as (Figura 18). O decréscimo de UFCs, para ambas óleorresinas, ocorreu nas maiores concentrações. Para a OCa, as diminuições variaram entre 1,23 a 1,83 logs nas três maiores concentrações (250 a 1000 µg/mL) (Figura 18 a). Para a OCl, as reduções variaram entre 1,82 e 2,71 logs de UFCs, nas quatro primeiras concentrações (125 a 1000 µg/mL) (Figura 18 b).

Sobre a quantificação de biomassa, a concentração de 250 µg/mL foi única, dentre todas testadas, em que foi observada diminuição significativa para o tratamento com a OCa, com redução de 64,65% (Figura 18 c). Para a OCl, foram obtidas reduções entre 72,57 a 86,58% nas concentrações de 62,5 a 250 µg/mL. Nas demais concentrações, para essa mesma óleorresina, não houve decréscimo significativo em relação ao controle negativo (Figura 18 d).

Por fim, na quantificação da atividade metabólica houve redução em todas as concentrações testadas para ambas óleorresinas avaliadas (Figura 18 e, f). Para a OCa, as porcentagens de decréscimo mantiveram-se entre 17,77 e 43,33%, em que nas concentrações intermediárias (62,5 a 250 µg/mL) houve menor porcentagem da atividade metabólica (com diminuições de 27,37 a 43,33%) (Figura 18 e). Para a OCl, as reduções variaram entre 27,75 e 92,62%, em que a menor porcentagem de atividade metabólica foi na concentração de 250 µg/mL (Figura 18 f).

**Figura 18.** Atividade antibiofilme das óleorresinas extraídas de *C. arenicola* e de *C. langsdorffii* em biofilmes pré-formados de *S. aureus* JKD 6008.



Fonte: próprio autor. Barras escuras são referentes ao controle negativo (CN). Barras brancas são referentes aos tratamentos com as óleorresinas. Gráficos a), c) e e) são referentes ao tratamento com a óleorresina extraída da espécie *C. arenicola*. Gráficos b), d) e f) são referentes ao tratamento com a óleorresina extraída da espécie *C. langsdorffii*. Contagem de células viáveis (a, b). Quantificação de biomassa (c, d). Atividade metabólica (e, f). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001 representam diferença estatística em relação ao controle.

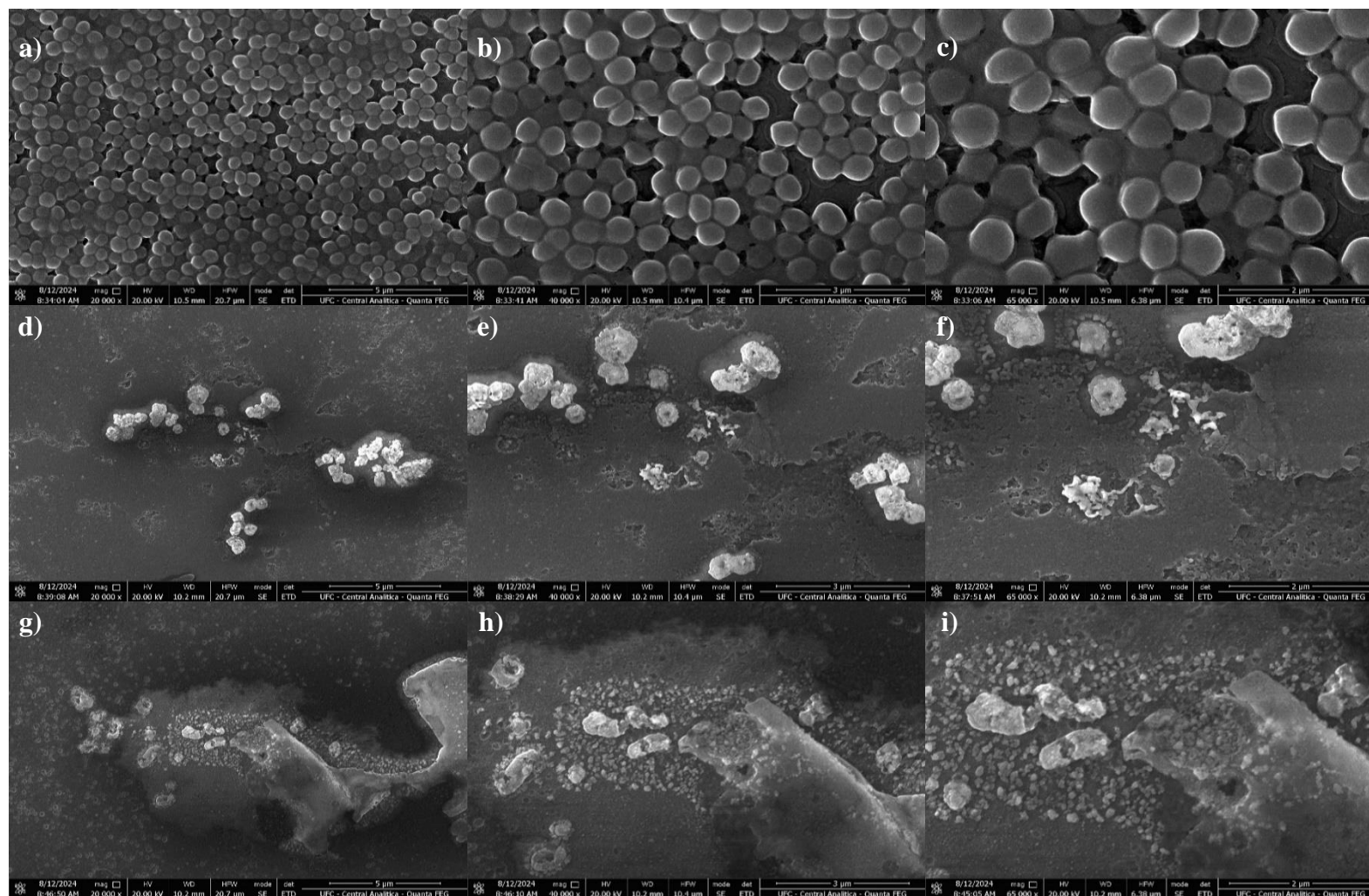
### 6.2.3 Microscopia eletrônica de varredura em biofilmes em formação

A Figura 19 mostra as eletromicrografias dos biofilmes em formação de *S. aureus* ATCC 700698 sem tratamento e sob a ação das óleorresina testadas. No geral, as óleorresinas extraídas de *C. arenicola* e *C. langsdorffii* conseguiram inibir a formação de biofilmes dessa estirpe em questão em suas respectivas concentrações de CIM, ou seja, de 125 µg/mL, para ambos tratamentos (Figuras 19 d, e, f, g, h, i).

Nas figuras relativas ao controle negativo (Figuras 19 a, b, c), há a conformação normal de *S. aureus*, em que as células apresentaram forma esférica (coco) e agrupamento em cachos, semelhantes a uvas. Além disso, também é evidente a alta densidade celular e presença da matriz polimérica embebendo essas células.

Em comparação ao controle negativo, as figuras referentes aos tratamentos com as óleorresinas sobre os biofilmes em formação de *S. aureus* ATCC 700698, há a redução da quantidade de células, redução da SPE e não há a formação de aglomerados celulares (Figuras 19 d, g). Em adição, há uma mudança na conformação da morfologia normal das células de *S. aureus*. Como mostrado nas imagens, algumas células apresentam forma de bacilos e outras apresentaram enrugamento da parede celular. Ademais, também há a presença de células lisadas e, conseqüentemente, o extravasamento do conteúdo celular (Figuras 19 d, e, f, g, h, i).

**Figura 19.** Eletromicrografias da atividade antibiofilme das óleorresinas extraídas de *C. arenicola* e de *C. langsdorffii* sobre biofilmes em formação de *S. aureus* ATCC 700698.



Fonte: próprio autor. Biofilmes apresentados nas magnificações de 20.000x (a, d, g), 40.000x (b, e, h) e 65.000x (c, f, i). Controle negativo (a, b, c). Tratamentos com óleorresina extraída de *C. arenicola* (d, e, f) e com óleorresina extraída de *C. langsdorffii* (g, h, i) na concentração de 125 µg/mL.

### 6.3 Ensaio de citotoxicidade

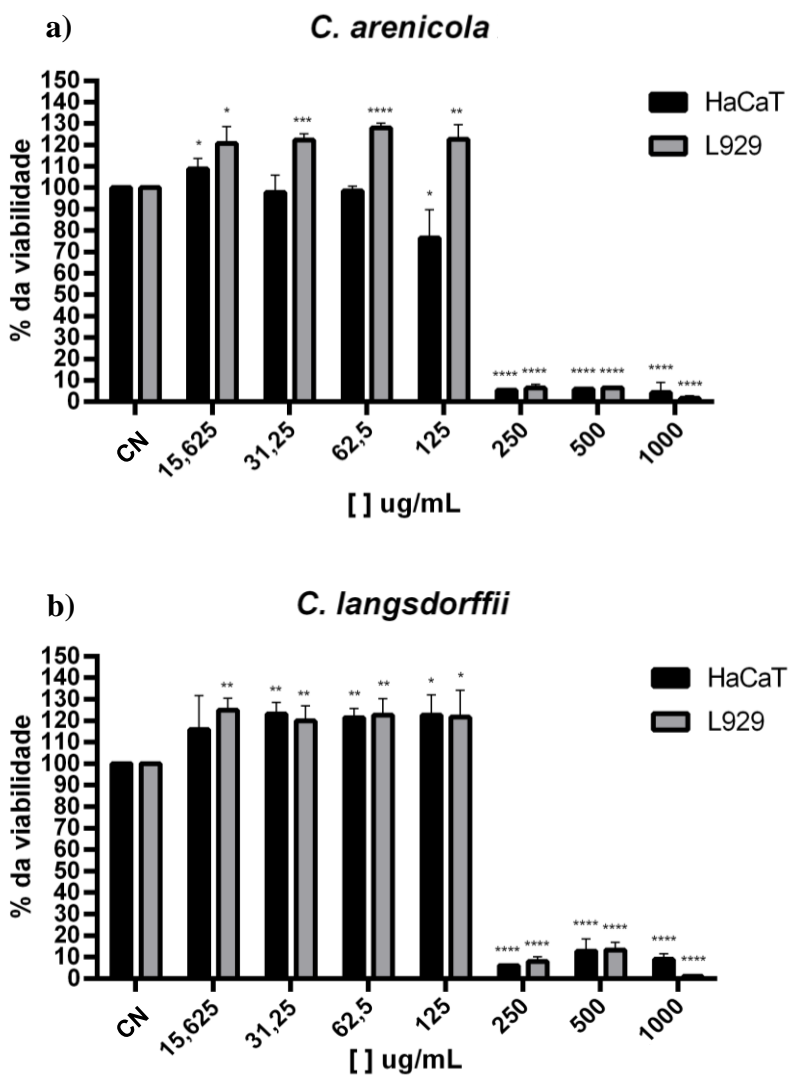
A Figura 20 mostra a ação das óleorresinas extraídas de *C. arenicola* e *C. langsdorffii* sobre as linhagens celulares de fibroblasto murino (L929) e queratinócito humano (HaCaT). Ambas óleorresinas não tiveram efeito citotóxico até a concentração de 125 µg/mL, em que a viabilidade celular se manteve entre 61,34 e 128,30%, em relação ao controle. Entretanto, tanto a OCa quanto a OCl reduziram a viabilidade celular nas três maiores concentrações (250 a 1000 µg/mL), em que as linhagens celulares apresentaram porcentagens de viabilidade variando entre 0,29 a 10,54%.

Para o tratamento com a OCa, nas concentrações de 15,625 a 125 µg/mL não houve efeito citotóxico para ambas linhagens celulares. Entretanto, tanto para a linhagem L929 quanto para HaCaT, a viabilidade celular foi próxima de zero nas três maiores concentrações (250 a 1000 µg/mL), com as porcentagens variando entre 0,29 e 10,54%. Para a linhagem L929, nas concentrações de 15,625 a 125 µg/mL houve um aumento da viabilidade celular, com porcentagens entre 111,48 a 128,30% (Figura 20 a). Para a linhagem HaCaT, na concentração de 125 µg/mL a porcentagem foi de 61,34%, nas demais concentrações (de 15,625 a 62,5 µg/mL) as porcentagens variaram entre 96,14 a 114,35% (Figura 20 a).

Em relação ao tratamento com a OCl, nas concentrações abaixo de 250 µg/mL também não houve efeito citotóxico para ambas as linhagens celulares. Porém, como visto para OCa, nas maiores concentrações (250 a 1000 µg/mL) a viabilidade celular também foi próxima de zero, com as porcentagens variando entre 0,29 e 10,54%. Tanto para HaCaT quanto para L929, nas concentrações de 15,625 a 125 µg/mL houve um aumento da viabilidade celular em relação ao controle, com porcentagens variando entre 112,70 a 123,81%; exceto para a concentração de 15,625 µg/mL para HaCaT, em que não houve diferença estatística significativa (Figura 20 b).

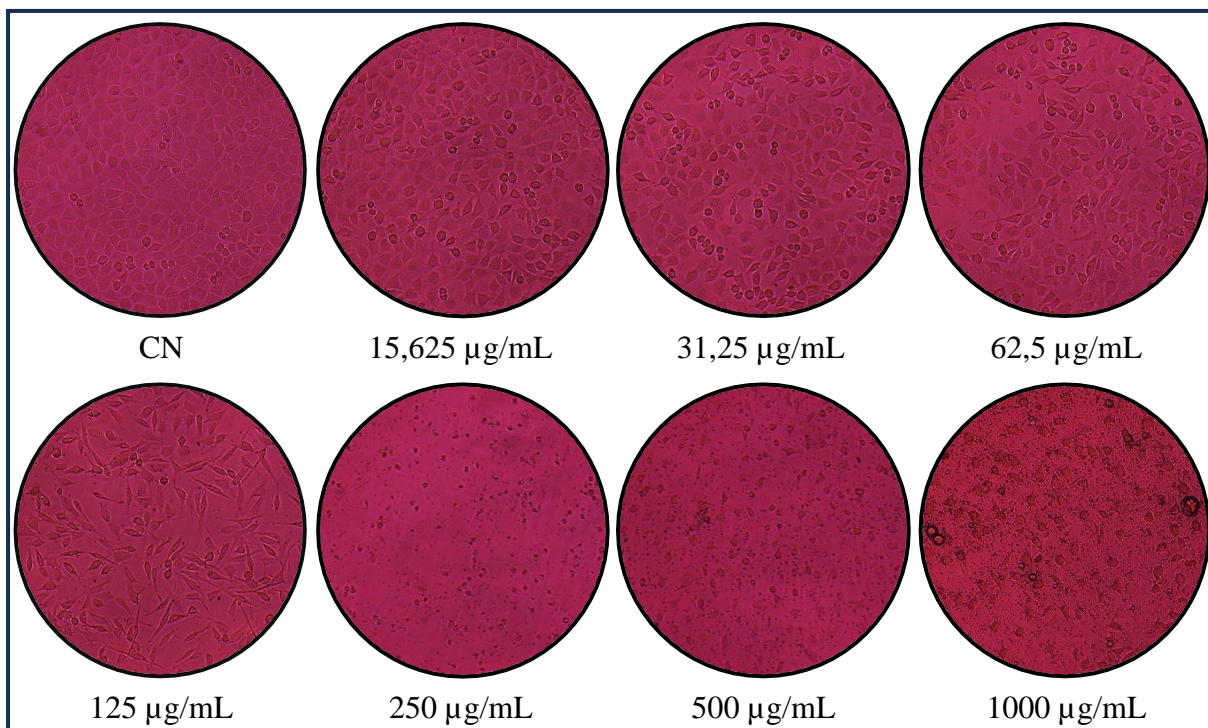
Em relação as fotomicrografias das linhagens celulares de L929 e HaCaT (Figuras 21, 22, 23 e 24), até a concentração de 125 µg/mL, é clara a presença das características morfológicas normais das linhagens celulares, em que HaCaT tem um aspecto cubóide, e L929, fusiforme. A partir da concentração de 250 µg/mL, ambas as linhagens celulares perdem a conformação normal para os tratamentos com ambas óleorresinas. Além disso, também é possível perceber um início de formação de aglomerados em colônias, corroborando com os resultados observados no ensaio em de viabilidade celular.

**Figura 20.** Ação das óleorresinas extraídas de *C. arenicola* e de *C. langsdorffii* sobre a viabilidade celular das linhagens celulares L929 e HaCaT.



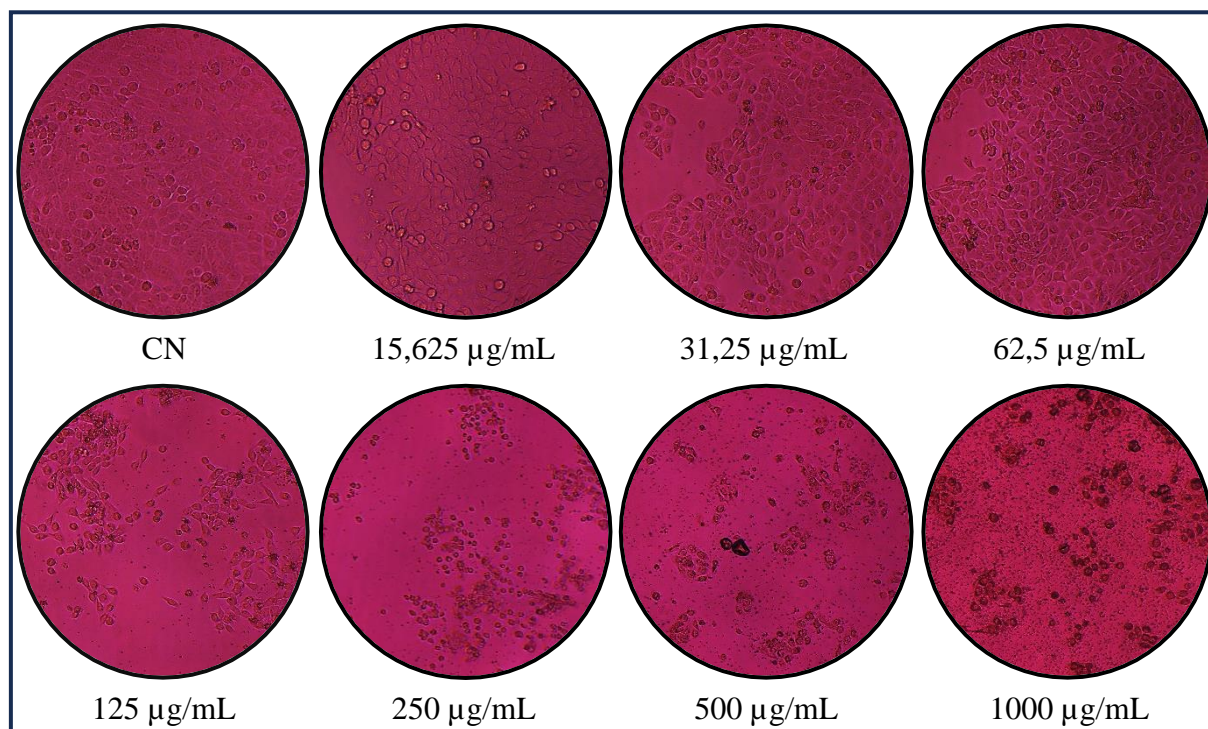
Fonte: próprio autor. Controle Negativo (CN; meio DMEM + 1% de DMSO). Barras escuras são referentes a linhagem celular HaCaT. Barras cinzas são referentes a linhagem celular L929. Gráfico a) é referente ao efeito da óleorresina extraída de *C. arenicola* sobre a viabilidade celular de L929 e HaCaT por 24 horas. Gráfico b) é referente ao efeito da óleorresina extraída de *C. langsdorffii* sobre a viabilidade celular de L929 e HaCaT por 24 horas. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  representam diferença estatística em relação ao controle.

**Figura 21.** Fotomicrografias da óleorresina extraída de *C. arenicola* sobre a linhagem celular L929.



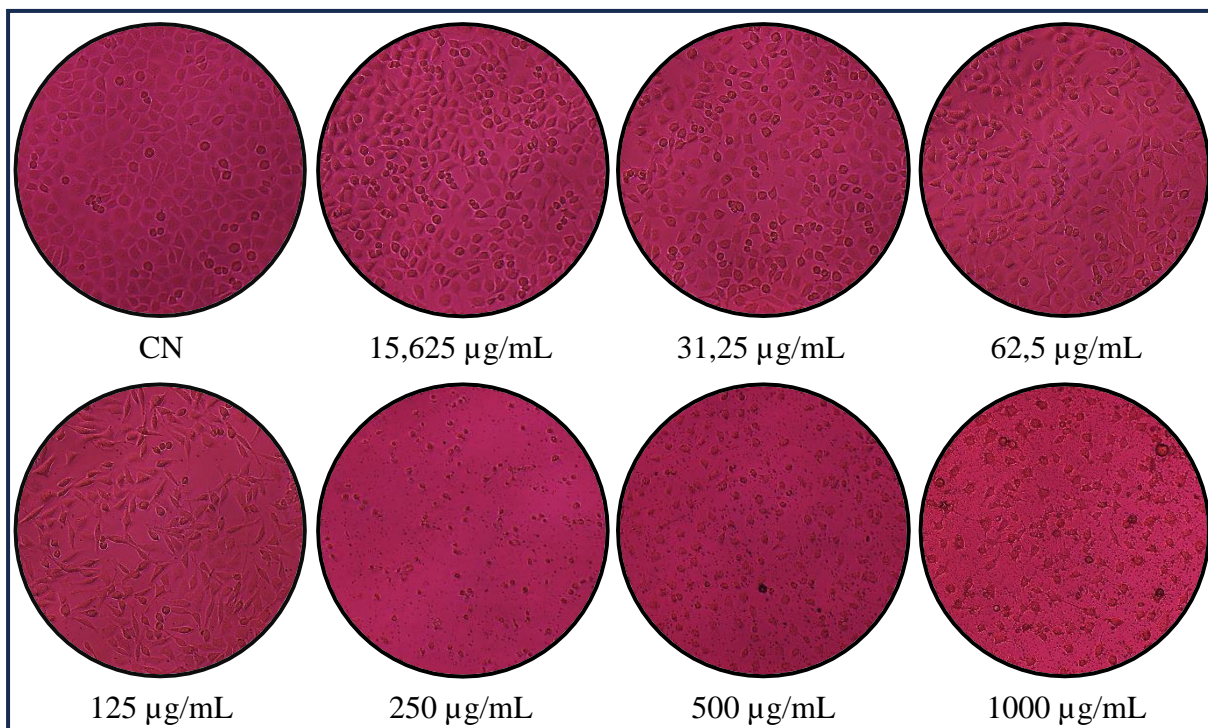
Fonte: próprio autor. Concentrações indicadas na imagem. Aumento de 100x. Controle Negativo (CN; meio DMEM + 1% de DMSO).

**Figura 22.** Fotomicrografias da óleorresina extraída de *C. arenicola* sobre a linhagem celular HaCaT.



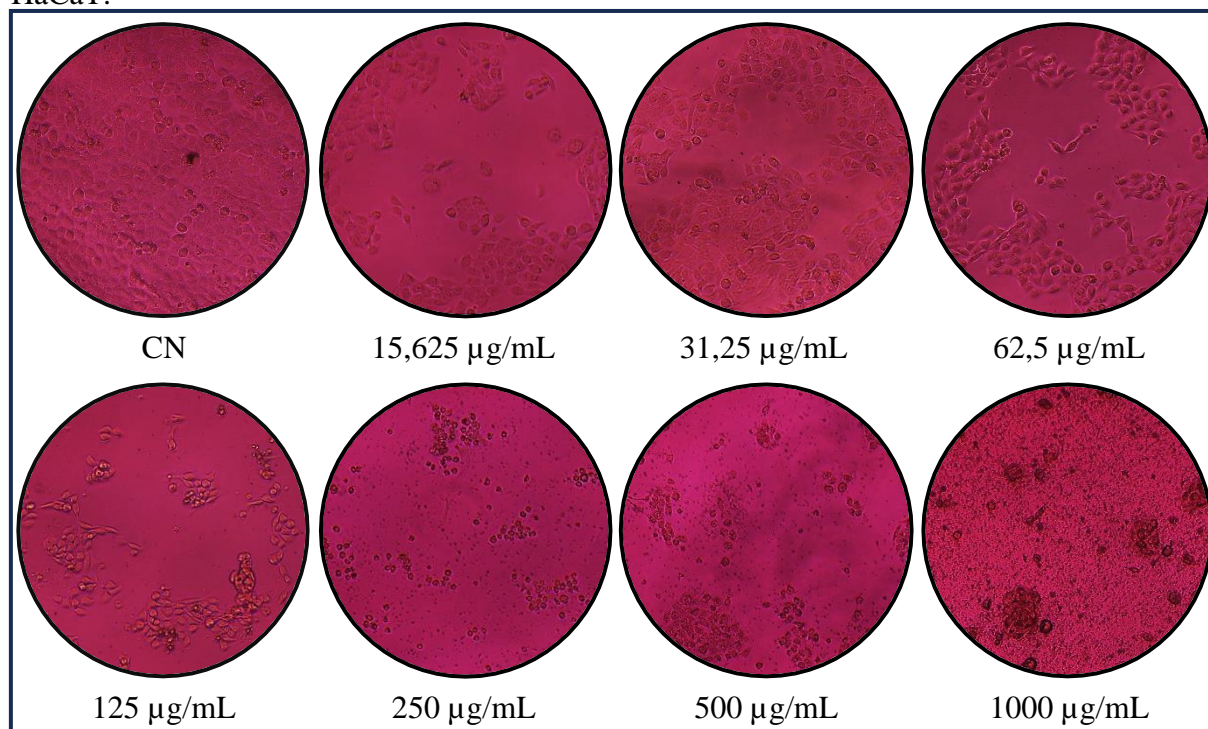
Fonte: próprio autor. Concentrações indicadas na imagem. Aumento de 100x. Controle Negativo (CN; meio DMEM + 1% de DMSO).

**Figura 23.** Fotomicrografias da óleorresina extraída de *C. langsdorffii* sobre a linhagem celular L929.



Fonte: próprio autor. Concentrações indicadas na imagem. Aumento de 100x. Controle Negativo (CN; meio DMEM + 1% de DMSO).

**Figura 24.** Fotomicrografias da óleorresina extraída de *C. langsdorffii* sobre a linhagem celular HaCaT.



Fonte: próprio autor. Concentrações indicadas na imagem. Aumento de 100x. Controle Negativo (CN; meio DMEM + 1% de DMSO).

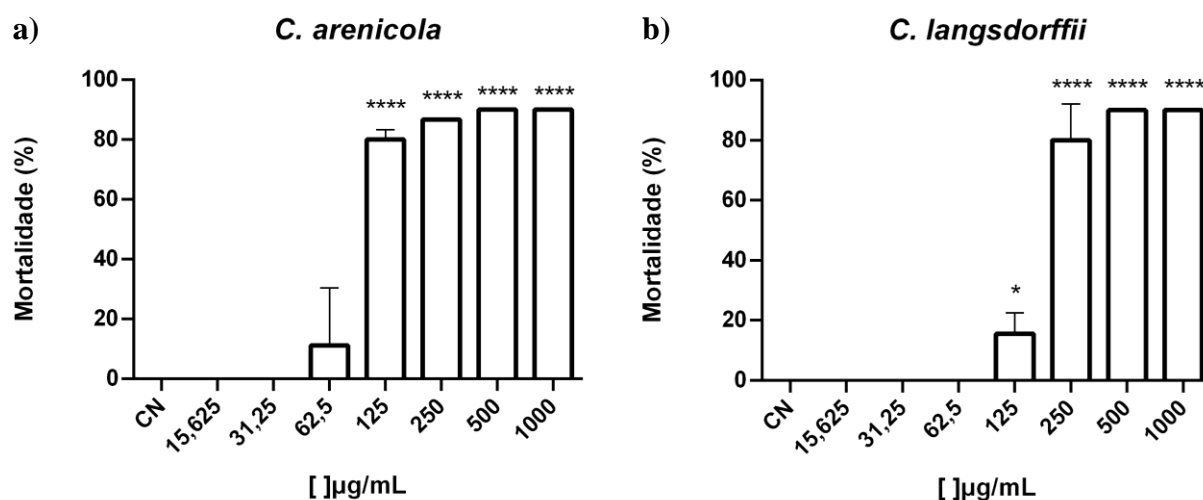
#### 6.4 Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*

A figura 25 mostra a ação das óleorresinas sobre *A. salina*. Em linhas gerais, ambas óleorresinas não apresentaram efeito tóxico nas menores concentrações testadas.

Para a OCa, nas concentrações de 15,625 a 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , a porcentagem de mortalidade de *A. salina* variou entre 0 e 11,11% (Figura 25 a). Nas demais concentrações, essa óleorresina teve efeito tóxico, inibindo mais que 50% da população. Na concentração de 125  $\mu\text{g/mL}$ , a taxa de mortalidade foi de 80%. Nas maiores concentrações (250 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ), a porcentagem de mortalidade variou em torno de 86,66 a 90%.

Para a OCl, nas concentrações de 15,625 a 125  $\mu\text{g/mL}$ , as porcentagens de mortalidade de *A. salina* variaram entre 0 e 13,33% (Figura 25 b). Entretanto, um efeito tóxico foi observado a partir da concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$ , em que as taxas de mortalidade de *A. salina* variaram entre 83,33 e 90%.

**Figura 25.** Ação das óleorresinas extraídas de *C. arenicola* e *C. langsdorffii* sobre *A. salina*.



Fonte: próprio autor. Controle Negativo (CN). Barras brancas são referentes aos tratamentos com as óleorresinas. Gráfico a) é referente ao efeito da óleorresina extraída de *C. arenicola* sobre a viabilidade de *A. salina*. Gráfico b) é referente ao efeito da óleorresina extraída de *C. langsdorffii* sobre a viabilidade de *A. salina*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  representam diferença estatística em relação ao controle.

## 7 DISCUSSÃO

Com o surgimento dos antibióticos como tratamento para diversas infecções bacterianas, a qualidade de vida e a saúde pública global melhoraram significativamente. Antes da descoberta desses antimicrobianos, muitas doenças causadas por bactérias eram comuns e resultavam em altas taxas de mortalidade e morbidade, principalmente entre idosos e crianças, ao longo do século XX (Madigan *et al.*, 2016; Mohr, 2016; Tortora; Funke; Case, 2017). Com a descoberta da penicilina, somado aos avanços da produção em larga escala de antibióticos, houve a redução dos efeitos colaterais em relação aos tratamentos anteriormente utilizados, além da diminuição da taxa de letalidade de várias infecções importantes naquele período (Madigan *et al.*, 2016; Mohr, 2016; Smith; Bradshaw, 2008; Tortora; Funke; Case, 2017).

No entanto, com o passar dos anos e com o uso indiscriminado de antibióticos, as bactérias, através de pressão seletiva de genes, conseguiram desenvolver RAM (Madigan *et al.*, 2016). Como resultado, a preocupação global com bactérias multirresistentes se tornou uma realidade. Ao mesmo tempo, a descoberta de novos antimicrobianos que consigam neutralizar esses microrganismos não acompanha o surgimento de fenótipos bacterianos mais resistentes, principalmente porque o desenvolvimento de fármacos é um processo que pode levar anos até a droga ser segura para uso (Coates; Halls; Hu, 2011; Madigan *et al.*, 2016).

Em vista disso, se tornou urgente a busca por novos antibióticos que consigam combater esses microrganismos multirresistentes, como também o biofilme produzido por eles, já que a prevalência desses fenótipos resistentes leva a ineficiência de terapias antimicrobianas utilizadas (Baker, 2015; Sengupta; Chattopadhyay; Grossart, 2013). Nesse cenário, plantas medicinais podem ser uma possível alternativa no enfrentamento à RAM, pois estudos anteriores comprovaram várias atividades farmacológicas, evidenciando sua importância clínica (Braga, 2011; Chandra, 2014). Dessa forma, o gênero *Copaifera* se destaca pela produção de óleos essenciais, que é amplamente utilizada na medicina popular, como também no comércio e na área industrial (Carvalho, 2003). Ademais, diversas atividades biológicas relevantes de espécies desse gênero foram comprovadas na literatura (Garcia; Yamaguchi, 2012; Martins-da-Silva; Pereira; Lima, 2008; Santos *et al.*, 2008a; Santos *et al.*, 2008b).

No presente estudo, foi testada a ação antibacteriana das óleos essenciais extraídas de diferentes espécies de copaíba (*C. arenicola* e *C. langsdorffii*), como também suas frações voláteis e não-voláteis e os compostos majoritários isolados das frações não-voláteis contra diferentes estirpes de *S. aureus*. Também foi avaliada a atividade antibiofilme das óleos essenciais contra as estirpes de *S. aureus*, além da toxicidade contra linhagens celulares e *A. salina*.

Ambas óleorresinas tiveram tanto ação bacteriostática quanto bactericida para todas estirpes de *S. aureus* testadas. Além disso, também tiveram efeito antibiofilme, reduzindo o número de células viáveis no biofilme, diminuindo a porcentagem da atividade metabólica e decaindo a taxa de quantificação da biomassa total do biofilme em quase todas as estirpes. Esses resultados seguem de acordo com estudos anteriores, os quais apontam diversas atividades farmacológicas para óleorresinas extraídas de diferentes espécies de *Copaifera*, incluindo as ações avaliadas nesse estudo (antibacteriana, antibiofilme e citotoxicidade) (Bardají *et al.*, 2016; Masson *et al.*, 2013; Masson-Meyers *et al.*, 2013; Powers *et al.*, 2018). Dentre as várias espécies anteriormente testadas em estudos na literatura, estão bactérias Gram-positivas: *Streptococcus salivarius*, *S. mitis*, *S. mutans*, *E. faecalis* e *S. aureus*, sendo a última bactéria testada no presente estudo (Bardají *et al.*, 2016; Masson-Meyers *et al.*, 2013).

No que diz respeito à atividade antibacteriana, em comparação aos valores de CIM e CBM para ambas óleorresinas, tanto as frações não-voláteis quanto os compostos majoritários apresentaram valores menores em sua maioria. Entretanto, para as frações voláteis, não houve atividade antibacteriana, sendo uma evidência de que a ação antibacteriana observada tanto nas óleorresinas quanto nas frações não-voláteis tenha origem nos compostos majoritários (ácido poliáltico, ácido hardwickiico + ácido colavênico) que foram extraídos das frações não-voláteis. No geral, tanto a fração não-volátil quanto os compostos majoritários (ácido hardwickiico + ácido colavênico) de *C. arenicola* tiveram concentrações menores em comparação aos compostos de *C. langsdorffii*. Essa diferença pode se dar, principalmente, pela ação dos compostos majoritários, visto que os ácidos hardwickiico + colavênico foram mais efetivos, com concentrações menores para CIM e CBM, em comparação ao ácido poliáltico.

Em relação a espécie *C. arenicola*, *S. aureus* JKD 6008 foi menos sensível em comparação as estirpes *S. aureus* ATCC 25923 e 700698 para a OCa e os compostos majoritários (ácido hardwickiico + ácido colavênico). Para a fração não-volátil extraída da óleorresina dessa copaíba, os valores para CIM e CBM foram os mesmos para todas as estirpes testadas. Já para *C. langsdorffii*, os valores para CIM e CBM da fração não-volátil e CBM da óleorresina dessa espécie foram maiores para a estirpe *S. aureus* ATCC 700698 em comparação as duas outras estirpes avaliadas (*S. aureus* ATCC 25923 e JKD 6008).

No geral, a estirpe *S. aureus* ATCC 25923 se mostrou mais sensível para ambas óleorresinas em comparação as duas outras estirpes de *S. aureus* testadas. Uma possível explicação para isso, é que a espécie *S. aureus* ATCC 25923 é sensível a meticilina, sendo *mecA* negativa, ou seja, sensível a esse antibiótico, visto que a característica de resistência a ele se dá, também, pela presença desse gene, além de ser sensível a vancomicina (Clinical and

Laboratory Standards Institute, 2015; Utsui; Yokota, 1985). Em contraponto, tanto *S. aureus* ATCC 700698 e *S. aureus* JKD 6008 apresentaram maiores para CIM e CBM, podendo ser explicado pelo fato de que ambas são SARM e apresentam resistência a vancomicina, sendo a primeira estirpe hSAIV e a segunda, SAIV (Hiramatsu *et al.*, 1997; Howden *et al.*, 2006b). Assim, a configuração da parede celular pra essas duas estirpes são diferentes, visto que são mais espessas em comparação àquelas não-SAIV (Schito, 2006). Em adição, também possuem uma maior síntese de peptidoglicano com resíduos expostos de D-alanil-D-alanina, capturando o antibiótico (Cosgrove; Carroll; Perl, 2004; Schito, 2006). Entretanto, os valores de CBM para a OCa, como também a fração não-volátil desta espécie (*C. arenicola*) e o ácido poliáltico se mantiveram os mesmos para todas as estirpes, evidenciando um possível efeito tóxico desses compostos nessas concentrações sobre as estirpes de *S. aureus* analisadas, justificando o efeito bactericida na mesma CBM.

Estudos anteriores comprovam o efeito bacteriostático e bactericida da óleorresina extraída de copaíba, como visto no estudo de Masson *et al.* (2013), em que a OCl apresentou o valor de 200 µg/mL para CIM e CBM. Nesse trabalho, foram observados menores valores para CIM, já para CBM foram maiores em comparação ao presente estudo. No estudo de Santos *et al.* (2008a), foram testadas óleorresinas extraídas de diferentes espécies de copaíba, incluindo uma espécie utilizada nesse trabalho (*C. langsdorffii*), em que para a estirpe SASM (a mesma utilizada no presente estudo, *S. aureus* ATCC 25923) e a cepa SARM apresentaram valores entre 62,5 até maior que 1000 µg/mL para CIM e CBM. Ainda sobre o trabalho anteriormente citado, no que é tocante a espécie *C. langsdorffii*, os valores para CIM da óleorresina foram superiores a 1000 µg/mL, sendo concentrações maiores que às encontradas no presente estudo (Santos *et al.*, 2008a).

Em relação aos compostos extraídos/isolados, há na literatura o trabalho de Silva (2015), em que foi avaliado o extrato hidroetanólico de várias plantas medicinais, dentre elas *C. langsdorffii* Desf. e *C. marginata* Benth., apresentando valores de CIM superiores a 800 µg/mL para *S. aureus* ATCC 25923. No presente trabalho, os valores de CIM foram menores em comparação as concentrações bacteriostáticas encontradas por Silva (2015), tanto em relação as frações não-voláteis quanto em relação aos compostos majoritários. A atividade antibacteriana do ácido poliáltico foi testada anteriormente por Santiago *et al.* (2023) sobre espécies Gram-positivas cariogênicas, em que os valores de CIM e CBM variaram entre 25 e 50 µg/mL. Em comparação aos valores encontrados por Santiago *et al.* (2023), foram obtidas maiores concentrações para CIM e CBM (125 µg/mL) no presente estudo para o mesmo ácido. No trabalho de Abrão *et al.* (2021), o ácido poliáltico e o ácido hardwickiico foram testados

contra bactérias Gram-negativas relacionadas a periodontites, apresentando valores entre 1,59 e 25 µg/mL para CIM e 1,59 a 50 µg/mL para CBM. Em comparação, esses valores foram menores do que os vistos no presente trabalho, e, em adição, os compostos majoritários não apresentaram ação contra bactérias Gram-negativas (dados não apresentados). Na pesquisa de Tincusi *et al.* (2002), as CIM do ácido poliáltico sobre *S. aureus* ficaram entre 40 e 50 µg/mL, valores menores do que os encontrados no presente estudo para o mesmo composto. Já no trabalho de Argentin *et al.* (2023), o ácido poliáltico apresentou valor de CIM superior a 512 µg/mL para as estirpes *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 8095, sendo um resultado maior do que o encontrado neste estudo. Em linhas gerais, todos esses estudos corroboram com os resultados de CIM e CBM encontrados no presente trabalho, em que as OCa e OCl apresentaram efeito bacteriostático e bactericida contra diferentes estirpes de *S. aureus*, como também as frações não-voláteis e seus compostos majoritários. Entretanto, para o seguimento do estudo realizado, optou-se por utilizar somente as óleorresinas pelo valor comercial e pela fácil obtenção destes produtos naturais em detrimento aos compostos isolados contidos no mesmo, visto que as óleorresinas tiveram atividade bacteriostática e bactericida contra *S. aureus*.

A óleorresina de copaíba é composta por sesquiterpenos e diterpenos, sendo demonstrado na literatura que as atividades farmacológicas vêm desses terpenos (Garcia; Yamaguchi, 2012; Leandro *et al.*, 2012). Diante disso, os compostos majoritários apresentados neste estudo são diterpenos anteriormente relatados em outros trabalhos, nos quais já foram levantadas hipóteses de alguns possíveis mecanismos de ação. Foi proposto que a atividade antimicrobiana pode estar associada com a capacidade de afetar a membrana bacteriana através da alteração de suas propriedades físicas, como a presença de grupos doadores de ligações de hidrogênio e alteração da cadeia respiratória, agindo como desacopladores (Argentin *et al.*, 2023; Torres-Bustos *et al.*, 2009). Entretanto, o mecanismo de ação do ácido poliáltico e do ácido colavênico não foram relatados na literatura até então (Argentin *et al.*, 2023).

Nesse sentido, Moraes *et al.* (2020) propõem que o ácido hardwickiico apresenta características estruturais que corroboram com a ação de lise celular, sendo elas: (i) um anel trans-decalina lipofílico que se insere na membrana celular; e (ii) a presença de um doador de ligação de hidrogênio que pode interagir com os grupos fosforilados da membrana celular bacteriana, causando a ruptura. Esses achados corroboram com os resultados vistos anteriormente no presente estudo em relação a ação bacteriostática e bactericida dos diterpenos testados, incluindo o próprio ácido hardwickiico, justificando essas ações sobre *S. aureus*. Em adição, Fallarero *et al.* (2013) propuseram que o diterpeno ácido desidroabiético pode afetar o crescimento bacteriano em altas concentrações, prevenindo a colonização bacteriana, além de

apresentar CIM para *S. aureus* na concentração de 70 µg/mL. Esse trabalho também corrobora com os resultados encontrados no presente estudo, visto que os diterpenos isolados exibiram efeito bactericida e bacteriostático em concentrações semelhantes (entre 15,625 e 125 µg/mL). Além disso, os compostos majoritários também preveniram o estabelecimento e crescimento de *S. aureus*, pois tanto para CIM quanto para CBM os valores foram os mesmos, evidenciando o efeito antimicrobiano desses compostos isolados das óleorresinas.

Comparando as concentrações de CIM e CBM entre os antibióticos e as óleorresinas, como também suas respectivas frações não-voláteis e compostos majoritários, é possível perceber que tanto ampicilina quanto a tetraciclina tiveram menores concentrações em detrimento dos demais compostos testados. Curiosamente, a exceção foi para CIM e CBM da fração não-volátil e os compostos majoritários extraídos da OCa, como também a CIM da OCl, em que foram obtidos resultados menores do que os encontrados para a estirpe *S. aureus* ATCC 700698 sob a ação da tetraciclina. Relacionando os mecanismos de ação com as atividades antimicrobianas, a ampicilina pertence a classe de β-lactâmicos, apresentando um anel β-lactâmico que se liga à PBP presente na parede celular, inibindo a formação da cadeia de peptidoglicano, havendo ação bactericida (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Tortora; Funke; Case, 2017). Já a tetraciclina, pertence a classe de mesmo nome e tem ação bacteriostática, se liga de forma irreversível a subunidade 30S, bloqueando a ligação do RNA transportador ao complexo RNAm-ribossomo 30S (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014; Parker *et al.*, 2016). Essa diferença entre os valores de CIM e CBM das óleorresinas, frações não-voláteis e compostos majoritários em comparação aos antibióticos pode ser justificada pela menor concentração dos agentes com ação antibacteriana, como também pela diversidade de substâncias antimicrobianas contidas nas óleorresinas, atuando em diferentes alvos celulares e não em um alvo único, como é no caso dos antibióticos (Machado *et al.*, 2020).

Entretanto, é importante destacar que produtos naturais são uma alternativa interessante para combater microrganismos multirresistentes, visto que podem apresentar menos efeitos colaterais em comparação as drogas comercializadas, além de serem eficazes, também, contra estirpes que apresentam RAM (Alvarenga *et al.*, 2020; Argentin *et al.*, 2023; Morguette *et al.*, 2019; Reis *et al.*, 2023; Valadas *et al.*, 2019). Ademais, estudos apontam certa seletividade das óleorresinas para algumas espécies bacterianas, sendo interessante para um tratamento direcionado, sem atingir a microbiota humana normal (Marangon *et al.*, 2017; Morguette *et al.*, 2019). Em adição, trabalhos anteriores demonstraram o efeito sinérgico entre antibióticos, incluindo ampicilina, testada no presente estudo, e óleorresinas extraídas de diferentes espécies de copaíba, em que as CIM de ambos diminuíram em comparação a

atividade bacteriostática desses compostos isolados (Machado *et al.*, 2020; Marangon *et al.*, 2017; Sampaio *et al.*, 2024).

No que diz respeito aos ensaios relacionados a atividade antibiofilme das óleorresinas, ambos conseguiram reduzir a contagem de UFCs tanto na formação de biofilmes quanto em biofilmes pré-formados, pelo menos nas maiores concentrações. Esses dados corroboram com os resultados encontrados de CIM e CBM anteriormente, em que a partir da concentração de 125 µg/mL é evidenciada uma diminuição significativa de UFCs, apesar de que em biofilmes em formação também foi observada redução de UFCs estatisticamente significativa em relação ao controle a partir da concentração de 15,625 µg/mL, e redução total de células viáveis a partir da concentração de 62,5 µg/mL. No estabelecimento dos biofilmes, em relação a quantificação de biomassa, a diminuição foi de quase 100% na maioria das concentrações para todas as estirpes sob a ação de ambas óleorresinas. Entretanto para biofilmes pré-estabelecidos, houve redução da biomassa somente para as estirpes *S. aureus* ATCC 25923 e JKD 6008. Para *S. aureus* ATCC 700698 não houve diminuição significativa da biomassa total do biofilme pré-formado após os tratamentos com as óleorresinas. Na verdade, para esta estirpe, houve aumento estatisticamente significativo da produção de biomassa em relação ao controle negativo nas concentrações de 250 e 1000 µg/mL, para OCa e OCl, respectivamente. Sobre o ensaio de quantificação de atividade metabólica, para os tratamentos com ambas óleorresinas houve decréscimo desde a menor concentração, tanto para biofilmes em formação quanto para biofilmes pré-estabelecidos.

No geral, tanto para a contagem de UFCs e para quantificação de biomassa no ensaio de inibição de formação de biofilmes a OCl apresentou maiores reduções de células viáveis e de biomassa, principalmente para a estirpe *S. aureus* JKD 6008, em que as UFCs começam a crescer somente nas duas menores concentrações e a diminuição da biomassa foi quase total em todas as concentrações analisadas. Em relação aos biofilmes pré-estabelecidos, a OCl novamente mostrou maiores reduções tanto na contagem de UFCs quanto na porcentagem de biomassa total, em que mais uma vez a estirpe *S. aureus* JKD 6008 se mostrou mais sensível em comparação as outras estirpes testadas. Fato interessante, visto que *S. aureus* ATCC 25923 é uma produtora fraca de biofilme, sendo comumente utilizada como controle negativo para produção de biofilmes, então seria esperado que essa estirpe apresentasse maior diminuição de UFCs como também de porcentagem de biomassa (Neopane *et al.*, 2018). Para *S. aureus* ATCC 700698 era esperado que as óleorresinas tivessem um efeito antibiofilme menor sobre essa estirpe, visto que ela é uma boa produtora de biofilme, sendo utilizada como

controle positivo para a formação de biofilme e para *mecA*, além de ser SARM e hSAIV (Benites *et al.*, 2021; Neopane *et al.*, 2018).

Também foi possível observar um efeito de estresse causado pelos tratamentos com as óleorresinas sobre a porcentagem de biomassa dos biofilmes pré-formados de *S. aureus*, em que nas concentrações intermediárias (62,5 a 250 µg/mL) pode ser vista uma redução dessa biomassa para *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* JKD 6008, além desse mesmo efeito na atividade metabólica para essa última estirpe. Em que mesmo nas maiores concentrações em que há um aumento da produção da biomassa, mas ainda assim há o decréscimo de células viáveis e de atividade metabólica. Essas evidências apontam que as óleorresinas, através de algum mecanismo envolvido na produção do biofilme, atuam diminuindo a biomassa total do biofilme de *S. aureus*, expondo as células contidas neles. Dessa forma, as óleorresinas agem reduzindo diretamente a quantidade de UFCs, como também promovendo a diminuição da atividade metabólica dessas células tanto em biofilmes em formação quanto em biofilmes pré-formados.

A atividade antibiofilme das óleorresinas, mais especificamente dos diterpenos isolados, é relatada na literatura por apresentar ação sobre UFCs, como também sobre a biomassa total do biofilme. O ácido hardwickiico pode ter o mecanismo de ação envolvido na ruptura da biomassa, com consequente ação nas células planctônicas liberadas e/ou morte direta das células inseridas no biofilme (Moraes *et al.* 2020). Nesse sentido, Fallarero *et al.* (2013) propuseram que o diterpeno ácido desidroabiético tem provável ação em eventos específicos do estágio de acumulação do biofilme de *S. aureus*, visto que essa molécula não afeta a adesão inicial do biofilme. Como esse composto pode afetar o crescimento bacteriano em altas concentrações, os autores teorizam que também module processos não associados com o estilo de vida do biofilme (Fallarero *et al.*, 2013). Esse achado corrobora com os resultados vistos em relação ao biofilme no presente estudo, em que há a redução da quantidade de UFCs, tanto no biofilme em estabelecimento, quanto no biofilme maduro.

Os resultados para biofilmes contidos no presente trabalho também corroboram com estudos anteriores, os quais apontam que as óleorresinas de copaíba conseguem reduzir tanto a contagem de células viáveis quanto a biomassa para bactérias Gram-positivas (Abrão *et al.*, 2021; Moraes *et al.*, 2016). No estudo de Leandro *et al.* (2016), é testado o extrato hidroalcolico de *C. trapezifolia* sobre a formação de biofilmes de *Peptostreptococcus micros* e *Porphyromonas gingivalis*, em que na concentração de 200 µg/mL houve decréscimo de pelo menos 50% da biomassa e diminuição total da contagem de UFCs sobre os biofilmes de ambas bactérias testadas. Esses resultados são similares aos encontrados no presente estudo,

entretanto, foi observada um decréscimo maior da biomassa em comparação aos achados de Leandro *et al.* (2016), visto que houve redução a partir de 72,78% para a menor concentração avaliada (15,625 µg/mL) e diminuição total de UFCs para *S. aureus* JKD 6008 a partir da concentração de 62,5 µg/mL.

No estudo de Fernández *et al.* (2018), foram testadas óleorresinas de diferentes espécies de *Copaifera* sp., em que para o biofilme produzido pela estirpe *S. aureus* ATCC 29213, a concentração inibitória mínima de 50% da biomassa (CIMB<sub>50</sub>) estava entre as concentrações de 100 e 125 µg/mL, com porcentagens variando entre 50,84 e 72,63%. Esses resultados são similares aos encontrados no presente estudo, apesar ter sido observado maiores reduções de porcentagens de biomassa total do biofilme em formação. Abrão *et al.* (2015) utilizaram o ácido copálico isolado da óleorresina extraída de *C. langsdorffii* contra diferentes estirpes de bactérias Gram-positivas, dentre elas *S. aureus*, em que esta apresentou decréscimo de 50% da biomassa em uma concentração quatro vezes maior (62,5 µg/mL) que de CIM encontrada (15,6 µg/mL). Esse achado não condiz com os resultados encontrados no presente estudo, visto que para a inibição da formação de biofilme, as porcentagens de diminuição foram superiores a 50% desde a menor concentração testada (15,625 µg/mL).

Em relação a ação das óleorresinas sobre a atividade metabólica das bactérias contidas nos biofilmes, Otaguiri *et al.* (2017) testaram a óleorresina extraída de *C. multijuga* contra biofilmes em formação de diferentes estirpes isoladas de *Streptococcus agalactiae* de esfregaços vaginais-retais de mulheres sem infecção clínica evidente, além de uma cepa padrão ATCC (13813). Esses achados mostraram que na formação do biofilme houve uma diminuição da atividade metabólica em relação às células sésseis do biofilme para todas as cepas testadas, em que nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL houve mais de 70 e 85% de redução média dessa atividade (Otaguiri *et al.*, 2017). No presente trabalho, na formação de biofilme as diminuições da atividade metabólica foram maiores do que no estudo supracitado, em que houve decréscimo em todas as concentrações testadas.

Sobre biofilmes pré-formados, na literatura também existem alguns estudos comprovando o efeito de diferentes espécies de copaíba contra biofilmes maduros. Vieira *et al.* (2018) testaram a óleorresina extraída de *C. duckei* contra diferentes estirpes de *S. aureus* isoladas de uma unidade de hemodiálise, tanto na formação de biofilmes quanto em biofilmes pré-estabelecidos. Nesse trabalho, houve CIMB<sub>50</sub> em concentrações que variaram entre 0,78 e 100 µg/mL na inibição da formação de biofilmes e para biofilmes pré-estabelecidos, as concentrações variaram entre 112,7 a superior ao valor de 2000 µg/mL exceto para uma estirpe de *S. aureus* que apresentou o valor de 21,85 µg/mL (Vieira *et al.*, 2018). Em comparação, o

presente estudo obteve porcentagens de redução semelhantes no que é relativo a biofilmes em formação, mas para biofilmes pré-formados as diminuições da biomassa foram maiores em menores concentrações testadas. No estudo de Otaguiri *et al.* (2017), também foi testada a óleorresina extraída de *C. multijuga* em biofilmes pré-formados de *S. agalactiae*, em que apenas nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL causou decréscimo significativo da atividade metabólica, com percentuais entre 19,40 e 60,60%. Essas porcentagens foram menores em comparação ao presente estudo, visto que a partir da menor concentração houve redução de 17,77% e nas maiores concentrações, os valores variaram entre 27,37 e 86,04%; com exceção para o tratamento com OCa na concentração de 1000 µg/mL sobre a estirpe *S. aureus* JKD 6008, que teve uma diminuição de 13,01% do percentual de atividade metabólica. Nesse mesmo contexto, Morguette *et al.* (2019) observaram o efeito da óleorresina extraída de *C. officinalis* contra biofilmes pré-estabelecidos de estirpes isoladas de *S. agalactiae* de esfregaços vaginais-retais de mulheres sem infecção clínica evidente. Nesse trabalho, a porcentagem de inibição da atividade metabólica de biofilmes maduros variou entre 72,8 e 98,6%, em que as concentrações para a inibição de 80% da atividade metabólica das células sésseis do biofilme variaram entre 60 a 500 µg/mL. Esses resultados são semelhantes com os valores encontrados no presente estudo no que é tocante a ação das óleorresinas sobre a atividade metabólica de biofilmes pré-estabelecidos, visto que a partir da concentração de 250 µg/mL, para *S. aureus* ATCC 25923, sob ação de ambas óleorresinas, e para *S. aureus* JKD 6008 sob a ação da OCl, porcentagens de redução variando entre 66,65 e 92,62%.

Comparando os resultados do presente estudo das óleorresinas sobre biofilmes em formação e biofilmes pré-estabelecidos, os últimos tiveram um menor decréscimo tanto de UFCs quanto de porcentagem de biomassa e de atividade metabólica. Isso evidencia que as óleorresinas tiveram uma menor atividade antibiofilme em comparação aos biofilmes jovens. Essa diferença de resultados pode ser explicada pela maior complexidade dos biofilmes pré-formados que, por isso, se tornam menos susceptíveis a ação das óleorresinas (Stojicic; Shen; Haapasalo, 2013). Corroborando com essa visão, Bowler *et al.* (2012) demonstraram que biofilmes maduros foram menos sensíveis aos antimicrobianos testados em comparação aos biofilmes jovens.

As eletromicrografias dos biofilmes em formação de *S. aureus* ATCC 700698 corroboram com os resultados observados tanto em relação a atividade antimicrobiana quanto antibiofilme no que diz respeito aos biofilmes em formação. Visto que após os tratamentos com as óleorresinas na concentração de CIM de 125 µg/mL, ambas conseguiram reduzir a biomassa, refletindo na diminuição da quantidade de UFCs, já que as células inseridas no biofilme ficaram

expostas a atividade antimicrobiana da OCa e da OCl. Isso também reforça os resultados em relação ao decréscimo da porcentagem da atividade metabólica, pois, nas eletromicrografias, as células presentes na matriz estavam morfologicamente alteradas. Segundo Flemming e Wingender (2010), com a redução da SPE, as células inseridas no biofilme ficam mais suscetíveis a ação dos antimicrobianos, corroborando com os resultados encontrados tanto nas eletromicrografias quanto nos ensaios de enumeração de UFCs, quantificação de biomassa e de atividade metabólica. Ademais, também reforça a ideia de um possível mecanismo de ação das óleorresinas associado a lise celular através da membrana bacteriana, visto que os diterpenos, como o ácido hardwickiico, têm a atividade antimicrobiana direcionada nesse viés por conta da sua estrutura molecular, como comentado anteriormente (Moraes *et al.* 2020).

Nesse sentido, Santos *et al.* (2008a) observaram o efeito da óleorresina extraída de *C. martii*, em concentrações subinibitórias, na morfologia de diferentes estirpes de *S. aureus* (SASM e SARM). As eletromicrografias desse estudo demonstraram que as bactérias apresentaram ruptura da parede celular, liberação do conteúdo citoplasmático e diminuição do volume celular. Dessa forma, evidenciando que as óleorresinas podem ter ação direta na parede celular e, conseqüentemente, causar lise celular. Outros estudos com diferentes espécies de bactérias Gram-positivas (*S. agalactiae* e *Bacillus cereus*) também apresentaram o mesmo efeito das óleorresinas sobre a superfície celular, em que as bactérias apresentaram modificações morfológicas, como também extravasamento do conteúdo celular (Otaguiri *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2013).

Além da atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*, também foi avaliada a citotoxicidade da OCa e da OCl. A viabilidade celular das linhagens celulares HaCaT e L929 apresentaram um menor decréscimo da viabilidade celular nas concentrações de 15,625 a 125 µg/mL, não havendo efeito tóxico, uma vez que as porcentagens foram maiores que 50%. Segundo Ćwiklińska-Jurkowska *et al.* (2023), são consideradas citotóxicas aquelas moléculas ou compostos que inibem a partir de 50% da viabilidade celular, em que a concentração que inibe 50% dessa viabilidade é denominada de concentração inibitória mínima de 50% da viabilidade celular (IC<sub>50</sub>). Entretanto, a partir da concentração de 250 µg/mL, houve citotoxicidade, já que a viabilidade celular foi bastante reduzida, com porcentagens menores que 50%. Apesar disso, é importante destacar que nas concentrações em que não houve efeito tóxico, houve um aumento da viabilidade celular (com exceção para HaCaT sob a ação da OCa na concentração de 125 µg/mL), em que as porcentagens foram maiores em relação ao controle, sendo uma evidência para um possível efeito proliferativo e cicatrizante das óleorresinas. Todavia, são necessários mais estudos para avaliar essa possibilidade. Nesse contexto, trabalhos

anteriores evidenciam esse potencial, por exemplo, no estudo de Amorim *et al.* (2017), foi observado que o uso da óleoresina extraída de *C. paupera* em feridas de ratos diabéticos, promovendo a cicatrização. Em adição, Gushiken *et al.* (2017) utilizaram o extrato hidroalcoólico de folhas de *C. langsdorffii* em feridas de ratos saudáveis, havendo, também, o efeito cicatrizante. Ademais, a concentração de 125 µg/mL foi a CIM de ambas óleorresinas contra a maioria das estirpes (com exceção para *S. aureus* JKD 6008, em que a CIM foi 500 µg/mL), mostrando uma margem de segurança para o uso dessas óleorresinas em uma possível formulação de fitoterápico, visando infecções causadas por *S. aureus*.

Na literatura há trabalhos de óleorresinas extraídas de diferentes espécies de *Copaifera* sp. que demonstraram baixa citotoxicidade. Santiago *et al.* (2023) utilizaram a linhagem V79-4 (células de fibroblastos isoladas do pulmão de um hamster chinês macho) sob a ação da óleoresina extraída de *C. lucens*, em que as concentrações entre 4,88 a 39,0 µg/mL não apresentaram efeito citotóxico. Apesar disso, a CIM para as diferentes espécies cariogênicas testadas no estudo supracitado foi de 25 µg/mL, oferecendo uma margem segura de uso. Símaro *et al.* (2021) utilizaram as linhagens celulares L929 e CHO-k1 (células de ovário de hamster chinês), em que a IC<sub>50</sub> para a óleoresina extraída de *C. pubiflora* foi de 154,36 e 378,19 µg/mL, respectivamente. Esses valores foram semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Símaro *et al.* (2021) ressaltam que não teve efeito citotóxico, visto que em outros ensaios realizados neste estudo evidenciaram que a óleoresina testada apresentou ação analgésico e anti-inflamatória. No trabalho de Bardají *et al.* (2016), utilizando a linhagem celular GM07492-A (fibroblastos pulmonares humanos) sob ação da óleoresina extraída de *C. reticulata*, a IC<sub>50</sub> foi de 51,58 µg/mL, e somente nas concentrações menores que 39,0 µg/mL não houve redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle. No estudo supracitado, a CIM para diferentes patógenos orais variou entre 6,25 e 50 µg/mL, em que o efeito citotóxico foi em uma concentração maior em comparação a CIM encontrada. Esses resultados se contrapõem ao presente trabalho, pois a menor concentração com efeito citotóxico foi 250 µg/mL e a CIM para as estirpes de *S. aureus* foi de 125 µg/mL (exceto *S. aureus* JKD 6008 sob ação da OCa).

Sobre os resultados do ensaio de toxicidade das óleorresinas sobre *A. salina*, os achados corroboram com dados obtidos no ensaio de citotoxicidade com as linhagens celulares HaCaT e L929, pois em concentrações menores, as óleorresinas não apresentaram efeito tóxico. A OCI teve um desempenho melhor em contraste aos dados relativos à OCa, já que esta última óleoresina, na concentração de 125 µg/mL ainda foi observada toxicidade. Em adição, no ensaio de viabilidade celular, não houve citotoxicidade nessa concentração, tendo em vista que

as células se mantiveram com viabilidade acima de 50%. Entretanto, uma menor porcentagem de viabilidade foi constatada nessa mesma concentração para HaCaT (61,43%) em contraste com L929, reiterando os dados observados relativos à toxicidade da OCa sobre *A. salina*. Lima *et al.* (2021) testaram micropartículas de quitosana carregadas com a óleorresina extraída de *C. officinalis* sobre *A. salina*, na qual apresentou baixa toxicidade, com IC<sub>50</sub> em 537,1 µg/mL. Governa e Biagi (2020) testaram a óleorresina da casca e um extrato de copaíba rico em polifenóis de *C. langsdorffii* Desf. sobre *A. salina*, com concentrações variando entre 250 e 2000 µg/mL, em que não apresentaram toxicidade para esse crustáceo. Ambos trabalhos supracitados demonstraram menor toxicidade para *A. salina* em comparação ao presente estudo. Apesar disso, esses resultados ainda corroboram com os dados obtidos no presente estudo, pois as óleorresinas de copaíba apresentam baixa toxicidade para esse crustáceo.

## 8 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi visto que as óleorresinas, as frações não-voláteis e os compostos majoritários de *C. arenicola* e *C. langsdorffii* tiveram ação antimicrobiana, em que conseguiram ter efeito tanto bacteriostático quanto bactericida contra as todas as estirpes de *S. aureus* testadas. Em adição, tanto a OCa quanto a OCl apresentaram ação antibiofilme, em que tiveram atividade sobre a formação de biofilmes e em biofilmes pré-estabelecidos. Além disso, os biofilmes de *S. aureus* sob os tratamentos com ambas óleorresinas na CIM, apresentaram alteração na morfologia celular, como também redução de quantidade de células e de matriz extracelular. Ademais, ambas óleorresinas não apresentaram ação tóxica sobre as linhagens celulares e sobre *A. salina* nas concentrações menores que 250 µg/mL, em sua maioria. Dessa forma, obteve-se uma margem segura de uso, visando a utilização como potencial substância antimicrobiana, dado que a concentração de 125 µg/mL, foi a CIM para maioria das estirpes de *S. aureus* e também teve ação sobre biofilmes em formação e biofilmes pré-formados. Todavia, ainda se faz necessário mais estudos em relação a toxicidade da OCa e da OCl, como também determinar as IC<sub>50</sub> dessas óleorresinas, assim como o mecanismo de ação para uma possível aplicação farmacológica.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAN, M. K. *et al.* The burden of hospital acquired infections and antimicrobial resistance. **Heliyon**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. e20561, 2023.

ABRANCHES, S. Biological Megadiversity as a Tool of Soft Power and Development for Brazil. **Brazilian Political Science Review**, [s. l.], v. 14, n. 2, 2020.

ABRANTES, J. A.; NOGUEIRA, J. M. da R. Resistência bacteriana aos antimicrobianos: uma revisão das principais espécies envolvidas em processos infecciosos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [s. l.], v. 53, n. 3, 2022.

ABRÃO, F. *et al.* Copaifera langsdorffii oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 443, 2015.

ABRÃO, F. *et al.* Oleoresins and naturally occurring compounds of Copaifera genus as antibacterial and antivirulence agents against periodontal pathogens. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 4953, 2021.

ADEDEJI, W. A. The treasure called antibiotics. **Annals of Ibadan postgraduate medicine**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 56–57, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde no 30 Avaliação dos Indicadores - Nacionais de Infecções Relacionadas a Assistência a Saúde (IRAS) e Resistência Microbiana (RM). Anos 2012 a 2022.** Brasil: [s. n.], 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) 2021 a 2025.** Brasília: [s. n.], 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Segurança do Paciente em Serviços de Saúde: Higienização das Mãos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Brasília: [s. n.], 2009.

ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 73, n. 8, p. 2003–2020, 2018.

ALENCAR, J. C. Estudos silviculturais de uma população natural de Copaifera multijuga Hayne-Leguminosae, na Amazônia Central. 2 - P r o d u ç ã o de óleo-resina. **Acta Amazônica**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 75–89, 1982.

ALLISON, D. G. The Biofilm Matrix. **Biofouling**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 139–150, 2003.

ALLOCATI, N. *et al.* Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria. **Cell Death & Disease**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. e1609–e1609, 2015.

ALMEIDA, M. Z. de. **Plantas medicinais.** [S. l.]: EDUFBA, 2011.

ALVARENGA, M. O. P. *et al.* Safety and Effectiveness of Copaiba Oleoresin (*C. reticulata* Ducke) on Inflammation and Tissue Repair of Oral Wounds in Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 3568, 2020.

AMINOV, R. I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 1, 2010.

AMORIM, J. L. *et al.* Wound healing properties of *Copaifera paupera* in diabetic mice. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. e0187380, 2017.

APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 526–530, 2008.

ARCHER, N. K. *et al.* *Staphylococcus aureus* biofilms. **Virulence**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 445–459, 2011.

ARGENTA, S. C. *et al.* Plantas Medicinais: Cultura Popular Versus Ciência. **Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 51–60, 2011.

ARGENTIN, M. *et al.* Synthesis and Antibacterial Activity of Polyalthic Acid Analogs. **Antibiotics**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 1202, 2023.

ARMSTRONG, G. L. Trends in Infectious Disease Mortality in the United States During the 20th Century. **JAMA**, [s. l.], v. 281, n. 1, p. 61, 1999.

ASTLEY, R. *et al.* An Eye on *Staphylococcus aureus* Toxins: Roles in Ocular Damage and Inflammation. **Toxins**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 356, 2019.

ATKINS, K. L. *et al.* *S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi: Host specificity and mechanisms of immune complex formation. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 1600–1611, 2008.

AUSTRIAN, R. Pneumococcus and the Brooklyn connection. **The American Journal of Medicine**, [s. l.], v. 107, n. 1, p. 2–6, 1999.

AYRAPETYAN, M.; WILLIAMS, T. C.; OLIVER, J. D. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 7–13, 2015.

BAGGE, N. *et al.* Dynamics and Spatial Distribution of  $\beta$ -Lactamase Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 1168–1174, 2004.

BAKER, S. A return to the pre-antimicrobial era?. **Science**, [s. l.], v. 347, n. 6226, p. 1064–1066, 2015.

BALASUBRAMANIAN, D. *et al.* *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. **Pathogens and Disease**, [s. l.], p. ftx005, 2017.

BANDEIRA, T. de J. P. G. *et al.* *In Vitro* Activities of Amoxicillin-Clavulanate, Doxycycline, Ceftazidime, Imipenem, and Trimethoprim-Sulfamethoxazole against Biofilm of Brazilian Strains of *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 57, n. 11, p. 5771–5773, 2013.

BARBOSA, A. L. P. *et al.* Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 233, p. 94–100, 2019.

BARDAJÍ, D. K. R. *et al.* *Copaifera reticulata* oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. **Anaerobe**, [s. l.], v. 40, p. 18–27, 2016.

BAUR, S. *et al.* A Nasal Epithelial Receptor for *Staphylococcus aureus* WTA Governs Adhesion to Epithelial Cells and Modulates Nasal Colonization. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. e1004089, 2014.

BAYLES, K. W. The biological role of death and lysis in biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 9, p. 721–726, 2007.

BEAR, A. *et al.* The immune evasion roles of *Staphylococcus aureus* protein A and impact on vaccine development. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 13, 2023.

BEARMAN, G. *et al.* Hospital Infection Prevention: How Much Can We Prevent and How Hard Should We Try?. **Current Infectious Disease Reports**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 2, 2019.

BECKER, G. *et al.* *Copaiba* oleoresin has topical antinociceptive activity in a UVB radiation-induced skin-burn model in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 250, p. 112476, 2020.

BECKER, S. *et al.* Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 111, n. 4, p. 1574–1579, 2014.

BELLAVIA, D. *et al.* Terpenoid treatment in osteoporosis: this is where we have come in research. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 32, n. 11, p. 846–861, 2021.

BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J.-M. *Escherichia coli* Biofilms. *In*: [S. l.: s. n.], 2008. p. 249–289.

BENITES, N. R. *et al.* Genotypic evaluation of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine clinical mastitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 302–310, 2021.

BENTLEY, R. Mycophenolic Acid: A One Hundred Year Odyssey from Antibiotic to Immunosuppressant. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 100, n. 10, p. 3801–3826, 2000.

BERA, A. *et al.* Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan *O*-acetyltransferase *OatA* is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 778–787, 2005.

BERRY, K. A. *et al.* *Staphylococcus aureus* adhesion to the host. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1515, n. 1, p. 75–96, 2022.

BERUBE, B. J. *et al.* The *psm*  $\alpha$  Locus Regulates Production of *Staphylococcus aureus* Alpha-Toxin during Infection. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 82, n. 8, p. 3350–3358, 2014.

BHAT, A. H. *et al.* Anchoring surface proteins to the bacterial cell wall by sortase enzymes: how it started and what we know now. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 60, p. 73–79, 2021.

BHAVANIRAMYA, S. *et al.* Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & Oil Science and Technology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 49–55, 2019.

BHUNIA, A. K. *Staphylococcus aureus*. In: [S. l.: s. n.], 2018. p. 181–192.

BITRUS, A. A. *et al.* *Staphylococcus aureus*: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms. **Veterinary Sciences: Research and Reviews**, [s. l.], v. 4, n. 2, 2018.

BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015.

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. e1000052, 2008.

BONAR, E.; MIĘDZOBRODZKI, J.; WŁADYKA, B. The Staphylococcal Coagulases. In: PET-TO-MAN TRAVELLING STAPHYLOCOCCI. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 95–102.

BONIL, L. N.; BUENO, S. M. Plantas Medicinais: Benefícios e Malefícios. **Revista Científica Unilago**, [s. l.], v. 1, n. 1, 2017.

BOWLER, L. L. *et al.* Mature *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Prevail Compared to Young Biofilms in the Presence of Ceftazidime. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 56, n. 9, p. 4976–4979, 2012.

BRADY, R. A. *et al.* Comparison of the immune response during acute and chronic *Staphylococcus aureus* infection. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. e0195342, 2018.

BRAGA, C. M. **Histórico da utilização de plantas medicinais**. 2011. 0–24 f. Monografia - Universidade de Brasília, Universidade Estadual de Goiás, Brasília, 2011.

BRAGANÇA, L. A. R. Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar. **EDUFF**, [s. l.], 1996.

BRAGUINI, W. L.; ALVES, B. B.; PIRES, N. V. Toxicity assessment of *Lavandula officinalis* extracts in Brine Shrimp (*Artemia salina*). **Toxicology Mechanisms and Methods**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 411–420, 2019.

BRASIL. **Obriga os hospitais a contratar biomédicos com a finalidade de controlar e prevenir as infecções hospitalares**. Brasil: 30 abr. 2024.

BRAUWEILER, A. M.; GOLEVA, E.; LEUNG, D. Y. M. *Staphylococcus aureus* Lipoteichoic Acid Damages the Skin Barrier through an IL-1–Mediated Pathway. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 139, n. 8, p. 1753–1761.e4, 2019.

BRYERS, J. D. Medical biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 1–18, 2008.

BUCHAN, K. D.; FOSTER, S. J.; RENSHAW, S. A. *Staphylococcus aureus*: setting its sights on the human innate immune system. **Microbiology**, [s. l.], v. 165, n. 4, p. 367–385, 2019.

CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. Extracellular DNA (eDNA). A Major Ubiquitous Element of the Bacterial Biofilm Architecture. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 16, p. 9100, 2021.

CANGUI-PANCHI, S. P. *et al.* Biofilm-forming microorganisms causing hospital-acquired infections from intravenous catheter: A systematic review. **Current Research in Microbial Sciences**, [s. l.], v. 3, p. 100175, 2022.

CARVALHEIRO, J. R.; MARQUES, M. C. C.; MOTA, A. **A Construção da Saúde Pública no Brasil no Século XX e Início do Século XXI**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2013.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. **Embrapa Florestas**, [s. l.], p. 394–405, 2003.

CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. *et al.* Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 120, n. 3, p. 600–606, 2016.

CERI, H. *et al.* The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 1771–1776, 1999.

CHANDRA, S. Importance of pharmacognostic study of medicinal plants: An overview. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 69–73, 2014.

CHARACKLIS W G; MARSHALL K C. Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. **New York: John Wiley & Sons**, [s. l.], p. 3–15, 1990.

CHENG, A. G. *et al.* A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 225–232, 2011.

CHENG, A. G. *et al.* Contribution of Coagulases towards *Staphylococcus aureus* Disease and Protective Immunity. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. e1001036, 2010.

CHEUNG, G. Y. C. *et al.* Phenol-soluble modulins – critical determinants of staphylococcal virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 698–719, 2014.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 26–40, 2020.

CHUA, K. Y. L.; STINEAR, T. P.; HOWDEN, B. P. Functional genomics of *Staphylococcus aureus*. **Briefings in Functional Genomics**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 305–315, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI document M07-A10**. 10. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

COATES, A. R.; HALLS, G.; HU, Y. Novel classes of antibiotics or more of the same?. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 163, n. 1, p. 184–194, 2011.

COLET, C. F. *et al.* Análises das embalagens de plantas medicinais comercializadas em farmácias e drogarias do município de Ijuí/RS. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 331–339, 2015.

CONG, Y.; YANG, S.; RAO, X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. **Journal of Advanced Research**, [s. l.], v. 21, p. 169–176, 2020.

CONLON, B. P.; ROWE, S. E.; LEWIS, K. Persister Cells in Biofilm Associated Infections. *In: [S. l.: s. n.]*, 2015. p. 1–9.

COOKSON, B. Five decades of MRSA: controversy and uncertainty continues. **The Lancet**, [s. l.], v. 378, n. 9799, p. 1291–1292, 2011.

CORRÊA, J. S. *et al.* Antimicrobial resistance in Brazil: an integrated research agenda. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, [s. l.], v. 56, 2022.

COSGROVE, S. E.; CARROLL, K. C.; PERL, T. M. *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 539–545, 2004.

COSTA, P. *et al.* Application of the Resazurin Cell Viability Assay to Monitor *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* Inactivation Mediated by Phages. **Antibiotics**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 974, 2021.

COSTA, A. S. **Avaliação fenológica e fitoquímica da *Copaifera* spp. e o uso do NDVI na análise da estrutura da vegetação**. 2022. 99 f. Tese - Universidade Federal do Pará, Belém, 2022.

COSTA, J. A. S. *Copaifera*. **Coleção Flora do Brasil 2020**, [s. l.], p. 1–54, 2020.

COSTA, A. R. *et al.* *Staphylococcus aureus* virulence factors and disease. **Formatex Research Center**, [s. l.], v. 1, p. 702–710, 2013.

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

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S. Battling Biofilms. **Scientific American**, [s. l.], v. 285, n. 1, p. 74–81, 2001.

CRAMTON, S. E. *et al.* The Intercellular Adhesion ( *ica* ) Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and Is Required for Biofilm Formation. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 67, n. 10, p. 5427–5433, 1999.

CUATRECASAS, P.; FUCHS, S.; ANFINSEN, C. B. Catalytic properties and specificity of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 242, n. 7, p. 1541–1547, 1967.

CUCARELLA, C. *et al.* Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 183, n. 9, p. 2888–2896, 2001.

CUE, D. *et al.* Rbf Promotes Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* via Repression of *icaR* , a Negative Regulator of *icaADBC*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 191, n. 20, p. 6363–6373, 2009.

ĆWIKLIŃSKA-JURKOWSKA, M. *et al.* Disparities in Cisplatin-Induced Cytotoxicity—A Meta-Analysis of Selected Cancer Cell Lines. **Molecules**, [s. l.], v. 28, n. 15, p. 5761, 2023.

DAI, J. *et al.* Resazurin as an indicator of reducing capacity for analyzing the physiologic status of deep-sea bacterium *Photobacterium phosphoreum* ANT-2200. **Journal of Oceanology and Limnology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 297–305, 2021.

DALECKI, A. G.; CRAWFORD, C. L.; WOLSCHEENDORF, F. Targeting Biofilm Associated <em>*Staphylococcus aureus*</em> Using Resazurin Based Drug-susceptibility Assay. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 111, 2016.

DALENOGARE, D. P. *et al.* Antinociceptive activity of *Copaifera officinalis* Jacq. L oil and kaurenoic acid in mice. **Inflammopharmacology**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 829–844, 2019.

DAROUICHE, R. O. Treatment of Infections Associated with Surgical Implants. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 350, n. 14, p. 1422–1429, 2004.

DAS, B. *et al.* Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage-Associated Antibacterial Activity against Clinically Isolated Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Infectious Diseases: Research and Treatment**, [s. l.], v. 9, p. IDRT.S31741, 2016.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 847–867, 2000.

DE JONG, N. W. M.; VAN KESSEL, K. P. M.; VAN STRIJP, J. A. G. Immune Evasion by *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 7, n. 2, 2019.

DE PASCALE, G.; WRIGHT, G. D. Antibiotic Resistance by Enzyme Inactivation: From Mechanisms to Solutions. **ChemBioChem**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 1325–1334, 2010.

DE VOR, L.; ROOIJAKKERS, S. H. M.; VAN STRIJP, J. A. G. Staphylococci evade the innate immune response by disarming neutrophils and forming biofilms. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 594, n. 16, p. 2556–2569, 2020.

DE WEGER, L. A. *et al.* Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 169, n. 6, p. 2769–2773, 1987.

DEIVANAYAGAM, C. C. S. A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of *Staphylococcus aureus*: crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 21, n. 24, p. 6660–6672, 2002.

DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 51–65, 2018.

DENG, Z. *et al.* Quorum Sensing, Biofilm, and Intestinal Mucosal Barrier: Involvement the Role of Probiotic. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2020.

DENGLER, V. *et al.* An Electrostatic Net Model for the Role of Extracellular DNA in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 197, n. 24, p. 3779–3787, 2015.

DERDE, L. P. G. *et al.* Interventions to reduce colonisation and transmission of antimicrobial-resistant bacteria in intensive care units: an interrupted time series study and cluster randomised trial. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 31–39, 2014.

DESPOTOVIC, A. *et al.* Hospital-acquired infections in the adult intensive care unit—Epidemiology, antimicrobial resistance patterns, and risk factors for acquisition and mortality. **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 48, n. 10, p. 1211–1215, 2020.

DEUS, R. J. A.; ALVES, C. N.; ARRUDA, M. S. P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 01–07, 2011.

DIAS, B. F. S. Política Nacional de Biodiversidade: roteiro de consulta para elaboração de uma proposta. [s. l.], p. 0–48, 2000.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 16–34, 2000.

DIXON, R. E.; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Control of health-care-associated infections, 1961-2011. **MMWR supplements**, [s. l.], v. 60, n. 4, p. 58–63, 2011.

DMITRIEV, B. A. *et al.* Tertiary Structure of *Staphylococcus aureus* Cell Wall Murein. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 186, n. 21, p. 7141–7148, 2004.

DOBELL, C. Antony van Leeuwenhoek and his ‘Little animals’. **Dover Publications**, [s. l.], p. 239–255, 1960.

- DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.
- DONLAN, R. M. Role of Biofilms in Antimicrobial Resistance. **ASAIO Journal**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. S47–S52, 2000.
- DUTTA, B. *et al.* Introduction to Bacterial Biofilm and Acute Infections. *In: BIOFILM-MEDIATED DISEASES: CAUSES AND CONTROLS*. Singapore: Springer Singapore, 2021. p. 1–20.
- DWIVEDI, D.; SEHGAL, T. Biofilm Development in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *In: FOCUS ON BACTERIAL BIOFILMS*. [S. l.]: IntechOpen, 2022.
- DZIARSKI, R.; GUPTA, D. *Staphylococcus aureus* Peptidoglycan Is a Toll-Like Receptor 2 Activator: a Reevaluation. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 73, n. 8, p. 5212–5216, 2005.
- ECDC. The bacterial challenge: time to react. [s. l.], 2009.
- ELIAS, S.; BANIN, E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 990–1004, 2012.
- ELLEN, R. P.; LOESCHE, W. J.; BRATTHALL, D. Discovering the Impact of Ronald Gibbons on Dental Research and Beyond. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 84, n. 12, p. 1089–1092, 2005.
- ENDL, J. *et al.* Chemical composition and structure of cell wall teichoic acids of staphylococci. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 135, n. 3, p. 215–223, 1983.
- ENRIGHT, M. C. *et al.* The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 99, n. 11, p. 7687–7692, 2002.
- FAHMI, T. *et al.* The Second Messenger c-di-AMP Regulates Diverse Cellular Pathways Involved in Stress Response, Biofilm Formation, Cell Wall Homeostasis, SpeB Expression, and Virulence in *Streptococcus pyogenes*. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 87, n. 6, 2019.
- FALLARERO, A. *et al.* (+)-Dehydroabietic Acid, an Abietane-Type Diterpene, Inhibits *Staphylococcus aureus* Biofilms in Vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 12054–12072, 2013.
- FAMPA, P. *et al.* Anti-Leishmania Effects of Volatile Oils and Their Isolates. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 561–578, 2021.
- FARIAS, L. F.; BORGES, F.; PEREIRA, M. **Levantamento etnofarmacológico de plantas medicinais utilizadas no bairro Jardim Primavera, Alta Floresta - MT**. [S. l.: s. n.], 2015.
- FERNÁNDEZ, Y. A. *et al.* Antibacterial, Preservative, and Mutagenic Potential of *Copaifera* spp. Oleoresins Against Causative Agents of Foodborne Diseases. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 790–797, 2018.

FERREIRA, E. *et al.* Risk factors for health care–associated infections: From better knowledge to better prevention. **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 45, n. 10, p. e103–e107, 2017.

FINLAND, M. Nosocomial Infections in Surgical Patients. **Archives of Surgery**, [s. l.], v. 111, n. 2, p. 143, 1976.

FLECK, E. C. D. A abordagem historiográfica dos séculos XIX e XX sobre a atuação de médicos e boticários jesuítas na América platina no século XVIII. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 667–685, 2014.

FLEMMING, H.-C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

FLOYD, K. A. *et al.* Adhesive Fiber Stratification in Uropathogenic *Escherichia coli* Biofilms Unveils Oxygen-Mediated Control of Type 1 Pili. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. e1004697, 2015.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Dossiê Óleos. **Food Ingredients Brasil**, [s. l.], n. 31, p. 38–55, 2014.

FORMOSA-DAGUE, C. *et al.* Zinc-dependent mechanical properties of *Staphylococcus aureus* biofilm-forming surface protein SasG. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 113, n. 2, p. 410–415, 2016.

FORTALEZA, C. M. C. B. *et al.* Multi-state survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 139–144, 2017.

FOSTER, T. J. *et al.* Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 49–62, 2014.

FOSTER, T. J. The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 27, n. 11, p. 927–941, 2019.

FOSTER, T. J.; GEOGHEGAN, J. A. *Staphylococcus aureus*. In: MOLECULAR MEDICAL MICROBIOLOGY. [S. l.]: Elsevier, 2015. p. 655–674.

FOULSTON, L. *et al.* The Extracellular Matrix of *Staphylococcus aureus* Biofilms Comprises Cytoplasmic Proteins That Associate with the Cell Surface in Response to Decreasing pH. **mBio**, [s. l.], v. 5, n. 5, 2014.

FRASER, J. R. E.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 242, n. 1, p. 27–33, 1997.

GAJEWSKA, J. *et al.* Impact of the Food-Related Stress Conditions on the Expression of Enterotoxin Genes among *Staphylococcus aureus*. **Pathogens**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 954, 2023.

GAMA, D. C.; JÚNIOR, J. M. N. Copaifera arenicola [(Ducke) J. Costa e L. P. Queiroz] Fabaceae-Caesalpinioideae em regiões do nordeste da Bahia. **Agroforestalis News**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. i–viii, 2019.

GARCIA, R. F.; YAMAGUCHI, M. H. Óleo de Copaíba e Suas Propriedades Medicinais: Revisão Bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 137–146, 2012.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 1049–1056, 2008.

GEOGHEGAN, J. A.; FOSTER, T. J. Cell Wall-Anchored Surface Proteins of *Staphylococcus aureus*: Many Proteins, Multiple Functions. In: [S. l.: s. n.], 2015. p. 95–120.

GERKE, C. *et al.* Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the Staphylococcus epidermidis Polysaccharide Intercellular Adhesin. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 273, n. 29, p. 18586–18593, 1998.

GHIZONI, C. V. C. *et al.* Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions of Copaiba Oil Are Related to Liver Cell Modifications in Arthritic Rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 118, n. 10, p. 3409–3423, 2017.

GIBBONS, R. J. Role of Adhesion in Microbial Colonization of Host Tissues: A Contribution of Oral Microbiology. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 866–870, 1996.

GIBBONS, R. J. *et al.* Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. **Archives of Oral Biology**, [s. l.], v. 35, p. S107–S114, 1990.

GIESBRECHT, P. *et al.* Staphylococcal Cell Wall: Morphogenesis and Fatal Variations in the Presence of Penicillin. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 1371–1414, 1998.

GOMES, N. de M. *et al.* Antineoplastic activity of Copaifera multijuga oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 179–184, 2008.

GOMES, N. M. *et al.* Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 109, n. 3, p. 486–492, 2007.

GOMES, T. V. **Determinação do módulo complexo do ligante asfáltico modificado por adição de óleo de copaíba**. 2018. 0–57 f. Monografia - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2018.

GONZÁLEZ-MARTÍN, M. *et al.* Virulence factors in coagulase-positive staphylococci of veterinary interest other than *Staphylococcus aureus*. **Veterinary Quarterly**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 118–131, 2020.

GOSIO, B. Contributo all'etiologia della pellagra. Ricerche chimiche e batteriologiche sulle alterazioni del mais. **G. Accad. Med. Torino**, [s. l.], v. 61, p. 464–487, 1893.

GOSIO, B. Ricerche batteriologiche e chimiche sulle alterazioni del mais. Contributo all'etiologia della pellagra. **Riv. d'Ig. San. Pubbl.**, [s. l.], v. 7, p. 825–849, 1896.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 1367–1378, 2002.

GÖTZ, F.; BANNERMAN, T.; SCHLEIFER, K.-H. The Genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*. In: **THE PROKARYOTES**. New York, NY: Springer US, 2006. p. 5–75.

GOVERNA, P.; BIAGI, M. *Copaifera langsdorffii* Desf.: *in vitro* investigation on anti-*Helicobacter pylori* and anti-inflammatory activities of oleoresin and fruit methanolic extract. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, [s. l.], v. 154, n. 1, p. 117–124, 2020.

GRASSELLI, G. *et al.* Hospital-Acquired Infections in Critically Ill Patients With COVID-19. **Chest**, [s. l.], v. 160, n. 2, p. 454–465, 2021.

GRISPOLDI, L. *et al.* *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food of animal origin and staphylococcal food poisoning risk assessment from farm to table. **Italian Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 677–690, 2021.

GUGGENBICHLER, J. P. *et al.* Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials - catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections. **GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. Doc18, 2011.

GUO, N. *et al.* Target-based screening for natural products against *Staphylococcus aureus* biofilms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 63, n. 14, p. 2216–2230, 2023.

GUSHIKEN, L. F. S. *et al.* Skin Wound Healing Potential and Mechanisms of the Hydroalcoholic Extract of Leaves and Oleoresin of *Copaifera langsdorffii* Desf. Kuntze in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2017, p. 1–16, 2017.

HA, D.-G.; O'TOOLE, G. A. c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas Aeruginosa* Review. In: **MICROBIAL BIOFILMS**. Washington, DC, USA: ASM Press, 2015. p. 301–317.

HAAG, A. F.; FITZGERALD, J. R.; PENADÉS, J. R. *Staphylococcus aureus* in Animals. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 7, n. 3, 2019.

HABBOUSH, Y.; GUZMAN, N. **Antibiotic Resistance**. [S. l.: s. n.], 2023.

HADJIFRANGISKOU, M. *et al.* Transposon Mutagenesis Identifies Uropathogenic *Escherichia coli* Biofilm Factors. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 194, n. 22, p. 6195–6205, 2012.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 1034–1043, 2009.

HAQUE, M. *et al.* Health care-associated infections &ndash; an overview. **Infection and Drug Resistance**, [s. l.], v. Volume 11, p. 2321–2333, 2018.

HECK, M. C.; VIANA, L. A.; VICENTINI, V. E. P. Importância do Óleo de Copaifera sp. **SaBios-Revista De Saúde E Biologia**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 82–90, 2012.

HEFFRON, R. Pneumonia with Special Reference to Pneumococcus Lobar Pneumonia. **Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 113, n. 24, p. 2175, 1939.

HEILMANN, C. *et al.* Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 1083–1091, 1996.

HEILMANN, C.; GÖTZ, F. Cell–Cell Communication and Biofilm Formation in Gram-Positive Bacteria. *In*: BACTERIAL SIGNALING. [S. l.]: Wiley, 2009. p. 7–22.

HELAINÉ, S.; KUGELBERG, E. Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 417–424, 2014.

HENRICI, A. T. Studies of Freshwater Bacteria. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 277–287, 1933.

HERMAN-BAUSIER, P. *et al.* Mechanical Strength and Inhibition of the *Staphylococcus aureus* Collagen-Binding Protein Cna. **mBio**, [s. l.], v. 7, n. 5, 2016.

HIRAMATSU, K. *et al.* Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **The Lancet**, [s. l.], v. 350, n. 9092, p. 1670–1673, 1997.

HOBLEY, L. *et al.* Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 649–669, 2015.

HØIBY, N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. **Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 205–211, 2014.

HØIBY, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. **APMIS**, [s. l.], v. 125, n. 4, p. 272–275, 2017.

HØIBY, N. *et al.* Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 322–332, 2010.

HØIBY, N. *et al.* ESCMID\* guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 21, p. S1–S25, 2015.

HØIBY, N. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed

immunoelectrophoresis. **Scandinavian journal of respiratory diseases**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 65–79, 1977.

HØIBY, N. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Relationship between mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the humoral immune response. **Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B: Microbiology and immunology**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 551–558, 1974.

HØIBY, N.; AXELSEN, N. H. Identification and quantitation of precipitins against *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis by means of crossed immunoelectrophoresis with intermediate gel. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 81B, n. 3, p. 298–308, 1973.

HOWDEN, B. P. *et al.* Complete Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Strain JKD6008, an ST239 Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Intermediate-Level Vancomycin Resistance. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 192, n. 21, p. 5848–5849, 2010a.

HOWDEN, B. P. *et al.* Isolates with Low-Level Vancomycin Resistance Associated with Persistent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 50, n. 9, p. 3039–3047, 2006a.

HOWDEN, B. P. *et al.* Isolates with Low-Level Vancomycin Resistance Associated with Persistent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 50, n. 9, p. 3039–3047, 2006b.

HOWDEN, B. P. *et al.* Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 99–139, 2010b.

HOWDEN, B. P. *et al.* *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 380–395, 2023.

HU, D.-L. *et al.* *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. In: **STAPHYLOCOCCUS AUREUS**. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 39–55.

HUMPHREYS, H. *Staphylococcus aureus*: The enduring pathogen in surgery. **The Surgeon**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 357–360, 2012.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 51, p. 72–80, 2019.

HUTTON, G. *et al.* Financial and economic costs of healthcare-associated infections in Africa. **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 150, p. 1–8, 2024.

IBÁÑEZ DE ALDECOA, A. L.; ZAFRA, O.; GONZÁLEZ-PASTOR, J. E. Mechanisms and Regulation of Extracellular DNA Release and Its Biological Roles in Microbial Communities. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, 2017.

IPPOLITO, G. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 14, p. S7–S11, 2010.

JAVID, F. *et al.* Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on coagulase gene. **Veterinary World**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 423–430, 2018.

JAYACHANDRAN, S. Pre-antibiotics era to post-antibiotic era. **Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 100–101, 2018.

JENDRESEN, M. D. *et al.* Microtopography and Clinical Adhesiveness of an Acid Etched Tooth Surface. **Acta Odontologica Scandinavica**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 47–53, 1981.

JENDRESEN, M. D.; GLANTZ, P.-O. Clinical Adhesiveness of Selected Dental Materials. **Acta Odontologica Scandinavica**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 39–45, 1981.

JEVONS, M. P. “Celbenin” - resistant Staphylococci. **Br Med J**, [s. l.], v. 1, n. 5219, p. 124–125, 1961.

JONES, G. W.; ISAACSON, R. E. Proteinaceous Bacterial Adhesins and Their Receptors. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 229–260, 1982.

JONES, H. C.; ROTH, I. L.; SANDERS, W. M. Electron Microscopic Study of a Slime Layer. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 316–325, 1969.

JOO, H.-S.; OTTO, M. Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s. l.], v. 1848, n. 11, p. 3055–3061, 2015.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C. O gênero copaifera L. **Química Nova**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 273–286, 2002.

KARWEHL, S.; STADLER, M. Exploitation of Fungal Biodiversity for Discovery of Novel Antibiotics. *In*: [S. l.: s. n.], 2016. p. 303–338.

KAWABATA, S. *et al.* Enzymatic Properties of Staphylothrombin, an Active Molecular Complex Formed between Staphylocoagulase and Human Prothrombin12. **The Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 98, n. 6, p. 1603–1614, 1985.

KAWABATA, S.-I.; IWANAGA, S. Structure and Function of Staphylothrombin. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, [s. l.], v. 20, n. 04, p. 345–350, 1994.

KEENER, A. B. *et al.* *Staphylococcus aureus* Protein A Disrupts Immunity Mediated by Long-Lived Plasma Cells. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 198, n. 3, p. 1263–1273, 2017.

KERMASHA, S.; ESKIN, M. N. A. Selected industrial enzymes. *In*: ENZYMES. [S. l.]: Elsevier, 2021. p. 259–305.

KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 478–482, 2017.

KIEREK-PEARSON, K.; KARATAN, E. Biofilm Development in Bacteria. *In: [S. l.: s. n.]*, 2005. p. 79–111.

KIFFER, C. R. V *et al.* Exploratory model for estimating occupation-day costs associated to Hospital Related Infections based on data from national prevalence project: IRAS Brasil Project. **Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 30–33, 2015.

KIRIUKHIN, M. Y. *et al.* Biosynthesis of the Glycolipid Anchor in Lipoteichoic Acid of *Staphylococcus aureus* RN4220: Role of YpfP, the Diglucoxyldiacylglycerol Synthase. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 183, n. 11, p. 3506–3514, 2001.

KLAUSEN, M. *et al.* Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 1511–1524, 2003.

KONG, K.-F.; VUONG, C.; OTTO, M. Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 296, n. 2–3, p. 133–139, 2006.

KOOL, J. L. Risk of Person-to-Person Transmission of Pneumonic Plague. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 40, n. 8, p. 1166–1172, 2005.

KOTB, E. The biotechnological potential of fibrinolytic enzymes in the dissolution of endogenous blood thrombi. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 656–672, 2014.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 1–2, p. 9–27, 1998.

LADHANI, S. *et al.* Clinical, Microbial, and Biochemical Aspects of the Exfoliative Toxins Causing Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 224–242, 1999.

LAHIRI, D. *et al.* Biofilm and Antimicrobial Resistance. *In: BIOFILM-MEDIATED DISEASES: CAUSES AND CONTROLS*. Singapore: Springer Singapore, 2021. p. 183–208.

LAMEIRA, O. A. *et al.* Copaifera spp.: Copaíba. *In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; VIEIRA, I. C. G. (org.). Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Norte. [S. l.: s. n.]*, 2022. v. 53, p. 1028–1040.

LARSON, E. Innovations in health care: antisepsis as a case study. **American Journal of Public Health**, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 92–99, 1989.

LEAL, M. A.; FREITAS-VILELA, A. A. de. Costs of healthcare-associated infections in an Intensive Care Unit. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [s. l.], v. 74, n. 1, 2021.

LEANDRO, L. F. *et al.* Assessment of the antibacterial, cytotoxic and mutagenic potential of the phenolic-rich hydroalcoholic extract from *Copaifera trapezifolia* Hayne leaves. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 65, n. 9, p. 937–950, 2016.

- LEANDRO, L. M. *et al.* Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. **Molecules**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 3866–3889, 2012.
- LEBEAUX, D.; GHIGO, J.-M.; BELOIN, C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 510–543, 2014.
- LECHNER, S.; LEWIS, K.; BERTRAM, R. *Staphylococcus aureus* Persists Tolerant to Bactericidal Antibiotics. **Microbial Physiology**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 235–244, 2012.
- LEE, C. Y.; LEE, J. C. Staphylococcal Capsule. In: GRAM-POSITIVE PATHOGENS. Washington, DC, USA: ASM Press, 2014. p. 456–463.
- LEE, G. Y.; YANG, S.-J. Profiles of coagulase-positive and -negative staphylococci in retail pork: prevalence, antimicrobial resistance, enterotoxigenicity, and virulence factors. **Animal Bioscience**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 734–742, 2021.
- LEITE, V. *et al.* Cicatrização de feridas crônicas tratadas com oleoresina de copaíba. **Revista de Enfermagem Referência**, [s. l.], v. VI Série, n. N°2, 2023.
- LEITE, B. M. B. Fábrica de Intelectuais. O ensino de Artes nos Colégios jesuíticos do Brasil, 1572-1759. **História Unisinos**, [s. l.], v. 24, n. 1, 2020.
- LENZ, A. P. *et al.* Localized Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 74, n. 14, p. 4463–4471, 2008.
- LEUNG, Y. L. *Staphylococcus aureus*. In: ENCYCLOPEDIA OF TOXICOLOGY. [S. l.]: Elsevier, 2014. p. 379–380.
- LEVIN, B. R.; ROZEN, D. E. Non-inherited antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. 556–562, 2006.
- LEWIS, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. **Biochemistry (Moscow)**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 267–274, 2005.
- LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 48–56, 2007.
- LEWIS, K. Programmed Death in Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 503–514, 2000.
- LEWIS, K. Riddle of Biofilm Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 999–1007, 2001.
- LI, L. *et al.* The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 5, 2014.
- LIM, Y. *et al.* Control of Glucose- and NaCl-Induced Biofilm Formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 186, n. 3, p. 722–729, 2004.

LIMA, L. R. *et al.* Anti-acetylcholinesterase and toxicity against *Artemia salina* of chitosan microparticles loaded with essential oils of *Cymbopogon flexuosus*, *Pelargonium x ssp* and *Copaifera officinalis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 167, p. 1361–1370, 2021.

LIMAYE, S. S. *et al.* A Statistical Approach to Reduce Hospital-Associated Infections. **Quality Engineering**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 414–425, 2008.

LINDSAY, J. A.; HOLDEN, M. T. G. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. **Functional & Integrative Genomics**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 186–201, 2006.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 4, 2014.

LIU, S. *et al.* Interactions Between Microplastics and Heavy Metals in Aquatic Environments: A Review. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021.

LIU, C.; CHAMBERS, H. F. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s. l.], v. 47, n. 10, p. 3040–3045, 2003.

LIU, J.-Y.; DICKTER, J. K. Nosocomial Infections. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 637–652, 2020.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 339, n. 8, p. 520–532, 1998.

LUEPKE, K. H. *et al.* Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 71–84, 2017.

LUNG, T. W. F. *et al.* *Staphylococcus aureus* adaptive evolution: Recent insights on how immune evasion, immunometabolic subversion and host genetics impact vaccine development. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2022.

LUO, Y. *et al.* Mechanisms and Control Strategies of Antibiotic Resistance in Pathological Biofilms. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 1–7, 2021.

LUONG, T. T.; LEI, M. G.; LEE, C. Y. *Staphylococcus aureus* Rbf Activates Biofilm Formation In Vitro and Promotes Virulence in a Murine Foreign Body Infection Model. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 335–340, 2009.

LYNCH, A. S.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and Fungal Biofilm Infections. **Annual Review of Medicine**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 415–428, 2008.

MA, R. *et al.* AI-2 quorum sensing negatively regulates rbf expression and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 307, n. 4–5, p. 257–267, 2017.

MACHADO, R. C. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of commercial copaiba (*Copaifera* spp.) oils against bacterial pathogens isolated from postoperative mammoplasty surgery. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. e1869108593, 2020.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MACK, W. N.; MACK, J. P.; ACKERSON, A. O. Microbial film development in a trickling filter. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 215–226, 1975.

MADANI, A.; GARAKANI, K.; MOFRAD, M. R. K. Molecular mechanics of *Staphylococcus aureus* adhesin, CNA, and the inhibition of bacterial adhesion by stretching collagen. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. e0179601, 2017.

MADIGAN, M. T. *et al.* Microbiologia de Brock. **Artmed**, [s. l.], v. 14, 2016.

MAGANA, M. *et al.* Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 31, n. 3, 2018.

MAH, T.-F. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 1061–1072, 2012.

MAH, T.-F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 34–39, 2001.

MAO, H. *et al.* Sortase-Mediated Protein Ligation: A New Method for Protein Engineering. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 126, n. 9, p. 2670–2671, 2004.

MARANGON, C. A. *et al.* Chitosan/gelatin/copaiba oil emulsion formulation and its potential on controlling the growth of pathogenic bacteria. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 99, p. 163–171, 2017.

MARRAFFINI, L. A.; DEDENT, A. C.; SCHNEEWIND, O. Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 70, n. 1, p. 192–221, 2006.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces. **Journal of General Microbiology**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 337–348, 1971.

MARTÍNEZ, J. L.; ROJO, F. Metabolic regulation of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 768–789, 2011.

MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F.; LIMA, H. C. de. O gênero *Copaifera* (Leguminosae - Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira. **Rodriguésia**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 455–476, 2008.

MASSELL, B. F. *et al.* Penicillin and the Marked Decrease in Morbidity and Mortality from Rheumatic Fever in the United States. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 318, n. 5, p. 280–286, 1988.

MASSON, D. S. *et al.* Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera langsdorffii*) oleoresin on bacteria of clinical significance in cutaneous wounds. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 15, n. 4 suppl 1, p. 664–669, 2013.

MASSON-MEYERS, D. *et al.* Cytotoxicity and wound healing properties of *Copaifera langsdorffii* oleoresin in rabbits. **International Journal of Natural Product Science**, [s. l.], v. 3, p. 10–20, 2013.

MATUSZEWSKA, M. *et al.* The Evolutionary Genomics of Host Specificity in *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 465–477, 2020.

MCADOW, M.; MISSIAKAS, D. M.; SCHNEEWIND, O. & Staphylococcus aureus & Secretes Coagulase and von Willebrand Factor Binding Protein to Modify the Coagulation Cascade and Establish Host Infections. **Journal of Innate Immunity**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 141–148, 2012.

MCDONALD, A. G.; TIPTON, K. F. Enzyme nomenclature and classification: the state of the art. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. 290, n. 9, p. 2214–2231, 2023.

MCDUGALD, D. *et al.* Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 39–50, 2012.

MCGUINNESS, W. A.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*<sup>[SEP]</sup>. **The Yale journal of biology and medicine**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 269–281, 2017.

MICHEL, E.; ALLAIN, F. H.-T. Selective Amino Acid Segmental Labeling of Multi-Domain Proteins. *In*: [S. l.: s. n.], 2015. p. 389–422.

MIHAI, M. *et al.* Microbial Biofilms: Impact on the Pathogenesis of Periodontitis, Cystic Fibrosis, Chronic Wounds and Medical Device-Related Infections. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 16, p. 1552–1576, 2015.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum Sensing in Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 165–199, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica**, [s. l.], p. 0–60, 2006.

MIRANDA, A. C. **Perfil de resistência a antimicrobianos de Escherichia coli**. 2013. - Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, Uberlândia, 2013.

MITCHELL, G. *et al.* SigB Is a Dominant Regulator of Virulence in *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. e65018, 2013.

- MOHR, K. I. History of Antibiotics Research. *In: [S. l.: s. n.]*, 2016. p. 237–272.
- MONTANARO, L. *et al.* Extracellular DNA in Biofilms. **The International Journal of Artificial Organs**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 824–831, 2011.
- MONTES LV *et al.* Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. **Natureza on line**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 61–67, 2009.
- MORAES, T. da S. *et al.* In vitro Evaluation of Copaifera oblongifolia Oleoresin Against Bacteria Causing Oral Infections and Assessment of Its Cytotoxic Potential. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 894–904, 2016.
- MØRETRØ, T. *et al.* Biofilm Formation and the Presence of the Intercellular Adhesion Locus *ica* among Staphylococci from Food and Food Processing Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 69, n. 9, p. 5648–5655, 2003.
- MORGUETTE, A. E. B. *et al.* Hydrogel Containing Oleoresin From Copaifera officinalis Presents Antibacterial Activity Against Streptococcus agalactiae. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2019.
- MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA Chelates Cations and Induces Antibiotic Resistance in Pseudomonas aeruginosa Biofilms. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 4, n. 11, p. e1000213, 2008.
- MURRAY, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, [s. l.], v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica 7ª Edição**. [S. l.: s. n.], 2014.
- NAKAGAWA, S. *et al.* Staphylococcus aureus Virulent PSM $\alpha$  Peptides Induce Keratinocyte Alarmin Release to Orchestrate IL-17-Dependent Skin Inflammation. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 667-677.e5, 2017.
- NANGINO, G. de O. *et al.* Impacto financeiro das infecções nosocomiais em unidades de terapia intensiva em hospital filantrópico de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 357–361, 2012.
- NEOPANE, P. *et al.* In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. **International Journal of General Medicine**, [s. l.], v. Volume 11, p. 25–32, 2018.
- NEWSOM, S. W. B. Ogston's coccus. **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 369–372, 2008.
- NICOLAOU, K. C.; RIGOL, S. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. **The Journal of Antibiotics**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 153–184, 2018.

NIKAIDO, H. The role of outer membrane and efflux pumps in the resistance of gram-negative bacteria. Can we improve drug access?. **Drug Resistance Updates**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 93–98, 1998.

NIKOLIC, P.; MUDGIL, P. The Cell Wall, Cell Membrane and Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* and Their Role in Antibiotic Resistance. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 259, 2023.

NOBRE, M. L. M. *et al.* Multiresistance and virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from pigs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 343–351, 2021.

NÓBREGA, L. P. da *et al.* In vitro Fungitoxic Potential of Copaiba and Eucalyptus Essential Oils on Phytopathogens. **Journal of Experimental Agriculture International**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 1–10, 2019.

NOVICK, R. P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 1429–1449, 2003.

NOVICK, R. P. *et al.* Theagr P2 operon: An autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. **Molecular and General Genetics MGG**, [s. l.], v. 248, n. 4, p. 446–458, 1995.

OLIVEIRA, R. L. C. de *et al.* Conhecimento tradicional e usos de copaíba pela comunidade Makuxi Darora na savana de Roraima. **Gaia Scientia**, [s. l.], v. 13, n. 2, 2019.

OLIVEIRA, T. D. **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas no bairro Saramenha de Cima, Ouro Preto, Minas Gerais**. 2017. 0–49 f. Monografia - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

OLIVEIRA, H. M. de; SILVA, C. P. R.; LACERDA, R. A. Policies for control and prevention of infections related to healthcare assistance in Brazil: a conceptual analysis. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 505–511, 2016.

OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 877–886, 2015.

O'NEILL, J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. [s. l.], p. 20, 2014.

O'NEILL, J. **Infection Prevention, Control and Surveillance: Limiting the Development and Spread of Drug Resistance**. [S. l.: s. n.], 2016.

ONO, K. *et al.* cAMP Signaling Affects Irreversible Attachment During Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa*; PAO1. **Microbes and Environments**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 104–106, 2014.

O'RIORDAN, K.; LEE, J. C. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 218–234, 2004.

OSME, S. F. *et al.* Estimativa do impacto financeiro das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde em Unidades de Terapia Intensiva de hospitais universitários brasileiros filiados ao Sistema Único de Saúde. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 26, p. 102240, 2022.

OTAGUIRI, E. *et al.* Antibacterial Combination of Oleoresin from *Copaifera multijuga* Hayne and Biogenic Silver Nanoparticles Towards *Streptococcus agalactiae*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 177–190, 2017.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm Formation as Microbial Development. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 49–79, 2000.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. *In*: [S. l.: s. n.], 2008. p. 207–228.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 995–1001, 2014.

PAIVA, L. A. F. *et al.* Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 73–78, 1998.

PANDEY, D. P. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 966–976, 2005.

PANLILIO, H.; RICE, C. V. The role of extracellular DNA in the formation, architecture, stability, and treatment of bacterial biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 118, n. 6, p. 2129–2141, 2021.

PARASTAN, R. *et al.* *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. **Gene Reports**, [s. l.], v. 20, p. 100739, 2020.

PARKER, N. *et al.* Mechanisms of Antibacterial Drugs. **OpenStax**, [s. l.], 2016.

PASA, M. C.; DAVID, M.; SÁNCHEZ, D. C. M. *Copaifera langsdorffii* Desf: aspectos ecológicos e silviculturais na comunidade Santa Teresa. Cuiabá, MT, Brasil. **Biodiversidade**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 13–22, 2012.

PASA, M. C.; SOARES, J. J.; GUARIM NETO, G. Estudo etnobotânico na comunidade de Conceição-Açu (alto da bacia do rio Aricá Açu, MT, Brasil). **Acta Botanica Brasilica**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 195–207, 2005.

PASTEUR, L. Mémoire sur la fermentation acétique. **Annales scientifiques de l'École Normale Supérieure**, [s. l.], v. 1, p. 113–158, 1864. Disponível em: <http://eudml.org/doc/80670>.

PATTI, J. M. *et al.* MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 585–617, 1994.

PEARSON, A. Historical and changing epidemiology of healthcare-associated infections. **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 296–304, 2009.

PERCIVAL, S. L. *et al.* Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 323–334, 2015.

PERCY, M. G.; GRÜNDLING, A. Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 81–100, 2014.

PERFECTO, D. R. *et al.* Un producto natural de posible apoyo al tratamiento de la periodontitis: Revisión bibliográfica. **Avances en Odontoestomatología**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 143–149, 2020.

PERIASAMY, S. *et al.* How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 4, p. 1281–1286, 2012a.

PERIASAMY, S. *et al.* Phenol-soluble modulins in staphylococci. **Communicative & Integrative Biology**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 275–277, 2012b.

PETERSSON, K.; FORSBERG, G.; WALSE, B. Interplay Between Superantigens and Immunoreceptors. **Scandinavian Journal of Immunology**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 345–355, 2004.

PETROVA, O. E.; SAUER, K. Sticky Situations: Key Components That Control Bacterial Surface Attachment. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 194, n. 10, p. 2413–2425, 2012.

PEYYALA, R.; EBERSOLE, J. L. Multispecies biofilms and host responses: “Discriminating the Trees from the Forest”. **Cytokine**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 15–25, 2013.

PICHERSKY, E.; RAGUSO, R. A. Why do plants produce so many terpenoid compounds?. **New Phytologist**, [s. l.], v. 220, n. 3, p. 692–702, 2018.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (Copaifera sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 465–472, 2009.

POWERS, C. *et al.* Antifungal and Cytotoxic Activities of Sixty Commercially-Available Essential Oils. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 1549, 2018.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 598–603, 1999.

PREDA, V. G.; SĂNDULESCU, O. Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. **Discoveries**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. e10, 2019.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, [s. l.], v. 109, n. 7, p. 309–318, 2015.

PUCA, V. *et al.* Detection and Quantification of eDNA-Associated Bacterial Membrane Vesicles by Flow Cytometry. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 21, p. 5307, 2019.

QUECK, S. Y. *et al.* RNAIII-Independent Target Gene Control by the agr Quorum-Sensing System: Insight into the Evolution of Virulence Regulation in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 150–158, 2008.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. [S. l.]: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

QUIRK, M. First VRSA isolate identified in USA. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 2, n. 9, p. 510, 2002.

RAMOS, M. F. S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica**. 2006. 132 f. Tese - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

RATHA, B. N.; LAHIRI, D.; RAY, R. R. Inhibition of Biofilm Formation. *In*: BIOFILM-MEDIATED DISEASES: CAUSES AND CONTROLS. Singapore: Springer Singapore, 2021. p. 209–237.

RAUSCH, M. *et al.* Coordination of capsule assembly and cell wall biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. **Nature Communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1404, 2019.

RAY, R. R.; NAG, M.; LAHIRI, D. **Biofilm-Mediated Diseases: Causes and Controls**. Singapore: Springer Singapore, 2021.

RECSEI, P. *et al.* Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agr. **Molecular and General Genetics MGG**, [s. l.], v. 202, n. 1, p. 58–61, 1986.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. **Revista Analytica**, [s. l.], n. 27, p. 60–67, 2007.

REFFUVEILLE, F. *et al.* *Staphylococcus aureus* Biofilms and their Impact on the Medical Field. *In*: THE RISE OF VIRULENCE AND ANTIBIOTIC RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS. [S. l.]: InTech, 2017.

REIS, H. D. *et al.* Clinical utility of essential oils in women's health for phytotherapeutic treatment of candidiasis: a systematic review with emphasis on the potential of copaiba oil (*Copaifera* sp) from Brazilian biodiversity and technological perspectives applied to biom. *In*: COLLECTION OF INTERNATIONAL TOPICS IN HEALTH SCIENCE- V1. [S. l.]: Seven Editora, 2023.

REISNER, A. *et al.* Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 933–946, 2003.

REVELAS, A. Healthcare - associated infections: A public health problem. **Nigerian Medical Journal**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 59, 2012.

RICE, L. B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 197, n. 8, p. 1079–1081, 2008.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C.; WADT, P. G. S.; WADT, L. H. O. Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina. **Embrapa**, [s. l.], 2004.

RISS, T. L. *et al.* **Cell Viability Assays**. [S. l.: s. n.], 2004.

ROCHA, F. A. G. da *et al.* O uso terapêutico da flora na história mundial. **HOLOS**, [s. l.], v. 1, p. 49–61, 2015.

RODRIGUES SANTANA, S. *et al.* Uso medicinal do óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) por pessoas da melhor idade no município de Presidente Médici, Rondônia, Brasil. **Acta Agronômica**, [s. l.], v. 63, n. 4, p. 361–366, 2014.

RODRÍGUEZ-DÍAZ, J.; RUBIO-DEL-CAMPO, A.; YEBRA, M. J. Regulatory insights into the production of UDP-N-acetylglucosamine by *Lactobacillus casei*. **Bioengineered**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 339–342, 2012.

ROOIJAKKERS, S. H. M. *et al.* Anti-opsonic properties of staphylokinase. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 476–484, 2005.

RUGINÁ, S. Resistance to Antimicrobians – A Global Problem with Sectoral Resolution. **The Journal of Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 47–49, 2018.

RUMBAUGH, K. P.; SAUER, K. Biofilm dispersion. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 10, p. 571–586, 2020.

SALINAS, N. *et al.* Extreme amyloid polymorphism in *Staphylococcus aureus* virulent PSM $\alpha$  peptides. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 3512, 2018.

SAMPAIO, M. A. de L. *et al.* Antibacterial and antibiotic-modifying activity of the commercialized essential oil of *Copaifera* spp. Associated with LED lights against a *Staphylococcus aureus* strain. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 114, p. 106075, 2024.

SAMPAIO, T. **O tupi na geografia nacional**. Brasil: Ed. Nacional, 1987.

SANDERSON, A. R.; STROMINGER, J. L.; NATHENSON, S. G. Chemical structure of teichoic acid from *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 237, p. 3603–3613, 1962.

SANTA MARIA, J. P. *et al.* Compound-gene interaction mapping reveals distinct roles for *Staphylococcus aureus* teichoic acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 111, n. 34, p. 12510–12515, 2014.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2016, p. 1–8, 2016.

SANTIAGO, M. B. *et al.* Polyalthic Acid from *Copaifera lucens* Demonstrates Anticariogenic and Antiparasitic Properties for Safe Use. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 1357, 2023.

SANTOS, A. O. *et al.* Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 103, n. 3, p. 277–281, 2008a.

SANTOS, V. R. N. *et al.* Biological Activity of Copaiba in Damage to the Alveolar Bone in a Model of Periodontitis Induced in Rats. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 19, p. 6255, 2022.

SANTOS, A. O. *et al.* Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 120, n. 2, p. 204–208, 2008b.

SANTOS, E. C. G. dos *et al.* Effects of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin on the cell wall and cell division of *Bacillus cereus*. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 62, n. 7, p. 1032–1037, 2013.

SANTOS, A. S. *et al.* Estudo prospectivo de óleos vegetais. **Embrapa Agroenergia**, [s. l.], p. 0–110, 2022.

SANTOS, A. L. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007.

SARTORI, M. A. *et al.* Análise de arranjos para extração de óleos vegetais e suprimento de usina de biodiesel. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 419–434, 2009.

SCHITO, G. C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 12, p. 3–8, 2006.

SCHLIEVERT, Patrick M. Staphylococcal enterotoxin B and toxic-shock syndrome toxin-1 are significantly associated with non-menstrual TSS. **The Lancet**, [s. l.], v. 327, n. 8490, p. 1149–1150, 1986.

SCHWARTZ, K. *et al.* Functional Amyloids Composed of Phenol Soluble Modulins Stabilize *Staphylococcus aureus* Biofilms. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. e1002744, 2012.

SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M. K.; GROSSART, H.-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 4, 2013.

SERRA, D. O.; HENGGE, R. Stress responses go three dimensional – the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 1455–1471, 2014.

SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. [S. l.]: Wiley, 2005.

SHARIF, S. *et al.* *Staphylococcus aureus* Peptidoglycan Tertiary Structure from Carbon-13 Spin Diffusion. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 131, n. 20, p. 7023–7030, 2009.

SHARMA, D.; MISBA, L.; KHAN, A. U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 76, 2019.

SHIMADA, T. *et al.* *Staphylococcus aureus* Evades Lysozyme-Based Peptidoglycan Digestion that Links Phagocytosis, Inflammasome Activation, and IL-1 $\beta$  Secretion. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 38–49, 2010.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. a000414–a000414, 2010.

SILVA, A. P. S. **Atividade antinociceptiva, antipirética, anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante de extratos e substâncias isoladas de *Cleome spinosa* Jacq.** 2016. 181 f. Doutorado - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

SILVA, L. I. **Avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e análise fitoquímica preliminar de plantas medicinais utilizadas pelas populações da região do Vale do Juruena e microrregião no Norte Araguaia, Mato Grosso, Brasil.** 2015. 127 f. Dissertação - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2015.

SILVA, D. C. S. **Caracterização da gordura da amêndoa da gordura de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* S.) obtida por extração aquosa enzimática.** 2022. 90 f. Tese - Universidade Federal do Pará, Belém, 2022.

SILVA, L. M. R. **Conhecimento ecológico e uso de bens naturais por populações quilombolas e não quilombolas do Sítio Cumbe, Estado do Ceará.** 2020. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte, 2020.

SILVA, K. M. **Estudo de resistência adaptativa induzida por aminoácidos em bactérias Gram negativas.** 2022. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

SILVA, H. H. G. da *et al.* Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 264–267, 2007.

SILVA, P. F.; PADOVEZE, M. C. **Infecções relacionadas a serviços de saúde - orientações para público em geral - Conhecendo um pouco mais sobre infecção.** [S. l.: s. n.], 2012.

SILVERSTEIN, A.; DONATUCCI, C. F. Bacterial Biofilms and implantable prosthetic devices. **International Journal of Impotence Research**, [s. l.], v. 15, n. S5, p. S150–S154, 2003.

SÍMARO, G. V. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Copaifera pubiflora* Benth oleoresin and its major metabolite ent-hardwickiic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 271, p. 113883, 2021.

SINGH, S. *et al.* Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. **The Open Microbiology Journal**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 53–62, 2017.

SINGHAI, M. *et al.* A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. **Journal of Global Infectious Diseases**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 193, 2012.

SIRQUEIRA, R. F. *et al.* Limite máximo de tolerância à seca de sementes de *Copaifera arenicola* [(Ducke) J. Costa & L.P. Queiroz]. *In: CRAD-MATA SECA: COLETÂNEA II – PROJETO SENDAS*. [S. l.]: Pantanal Editora, 2023. p. 27–38.

SKINNER, D. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. **Archives of Internal Medicine**, [s. l.], v. 68, n. 5, p. 851, 1941.

SMITH, D. W.; BRADSHAW, B. S. Reduced Variation in Death Rates after Introduction of Antimicrobial Agents. **Population Research and Policy Review**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 343–351, 2008.

SOBRAL, R.; TOMASZ, A. The Staphylococcal Cell Wall. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 7, n. 4, 2019.

SOLANO, C.; ECHEVERZ, M.; LASA, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 18, p. 96–104, 2014.

SOUSA, C. A. *et al.* Phenazines: Natural products for microbial growth control. **hLife**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 100–112, 2024.

STANLEY, N. R.; LAZAZZERA, B. A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 917–924, 2004.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

STEWARTSON, A. *et al.* Back to the future: rising to the Semmelweis challenge in hand hygiene. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 855–876, 2011.

STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 292, n. 2, p. 107–113, 2002.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 199–210, 2008.

STOJICIC, S.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Effect of the Source of Biofilm Bacteria, Level of Biofilm Maturation, and Type of Disinfecting Agent on the Susceptibility of Biofilm Bacteria to Antibacterial Agents. **Journal of Endodontics**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 473–477, 2013.

STOJOWSKA-SWĘDRZYŃSKA, K.; KUCZYŃSKA-WIŚNIK, D.; LASKOWSKA, E. New Strategies to Kill Metabolically-Dormant Cells Directly Bypassing the Need for Active Cellular Processes. **Antibiotics**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1044, 2023.

STROMINGER, J. L.; GHUYSEN, J.-M. Mechanisms of Enzymatic Bacteriolysis. **Science**, [s. l.], v. 156, n. 3772, p. 213–221, 1967.

SUETENS, C. *et al.* Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017. **Eurosurveillance**, [s. l.], v. 23, n. 46, 2018.

SUN, J. *et al.* Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. **BMC Evolutionary Biology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 36, 2004.

SURESH, M. K.; BISWAS, R.; BISWAS, L. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 309, n. 1, p. 1–12, 2019.

SUTHERLAND, I. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 222–227, 2001.

SUTTER, D. E. *et al.* Capsular serotype of *Staphylococcus aureus* in the era of community-acquired MRSA. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 16–24, 2011.

SYDNOR, E. R. M.; PERL, T. M. Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 141–173, 2011.

SZABÓ, S. *et al.* An Overview of Healthcare Associated Infections and Their Detection Methods Caused by Pathogen Bacteria in Romania and Europe. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 3204, 2022.

TACCONELLI, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.

TALBOT, G. H. *et al.* The Infectious Diseases Society of America's 10 × '20 Initiative (10 New Systemic Antibacterial Agents US Food and Drug Administration Approved by 2020): Is 20 × '20 a Possibility? **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 1–11, 2019.

TAM, K.; TORRES, V. J. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 7, n. 2, 2019.

TANOUCHI, Y. *et al.* Programmed cell death in bacteria and implications for antibiotic therapy. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 265–270, 2013.

TARAI, B.; DAS, P.; KUMAR, D. Recurrent Challenges for Clinicians: Emergence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin Resistance, and Current Treatment Options. **Journal of Laboratory Physicians**, [s. l.], v. 5, n. 02, p. 071–078, 2013.

TELLO, A.; AUSTIN, B.; TELFER, T. C. Selective Pressure of Antibiotic Pollution on Bacteria of Importance to Public Health. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v. 120, n. 8, p. 1100–1106, 2012.

THATI, V.; SHIVANNAVAR, C.; GADDAD, S. M. Vancomycin resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from intensive care units of tertiary care hospitals in Hyderabad. **The Indian Journal of Medical Research**, [s. l.], v. 134, n. 5, p. 704, 2011.

TIGABU, A.; GETANEH, A. *Staphylococcus aureus*, ESKAPE Bacteria Challenging Current Health Care and Community Settings: a Literature Review. **Clinical Laboratory**, [s. l.], v. 67, n. 07/2021, 2021.

TINCUSI, B. M. *et al.* Antimicrobial Terpenoids from the Oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. **Planta Medica**, [s. l.], v. 68, n. 9, p. 808–812, 2002.

TONG, S. Y. C. *et al.* *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.

TORRES-BUSTOS, J. *et al.* The Diterpenoid *ent*-16-Kauren-19-oic Acid Acts as an Uncoupler of the Bacterial Respiratory Chain. **Planta Medica**, [s. l.], v. 75, n. 08, p. 823–828, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. [S. l.: s. n.], 2017.

TOTÉ, K. *et al.* A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 249–254, 2007.

TOYOFUKU, M. *et al.* Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 7–12, 2016.

TRINDADE, F. T. T. *et al.* *Copaifera multijuga* ethanolic extracts, oilresin, and its derivatives display larvicidal activity against *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 464–470, 2013.

TUCHSCHERR, L. *et al.* Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. e1004870, 2015.

TURNER, N. A. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 203–218, 2019.

UMSCHEID, C. A. *et al.* Estimating the Proportion of Healthcare-Associated Infections That Are Reasonably Preventable and the Related Mortality and Costs. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 101–114, 2011.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP). Bracing for Superbugs: Strengthening environmental action in the One Health response to antimicrobial resistance. [s. l.], 2023.

UTSUI, Y.; YOKOTA, T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 397–403, 1985.

VAKILI, B. *et al.* Staphylokinase Enzyme: An Overview of Structure, Function and Engineered Forms. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s. l.], v. 18, n. 13, p. 1026–1037, 2018.

VALADAS, L. A. R. *et al.* Dose-response evaluation of a copaiba-containing varnish against streptococcus mutans in vivo. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 363–367, 2019.

VALE, J. P. C. do *et al.* Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activities of *Vitex gardneriana* schauer leaves's essential oil. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 135, p. 103608, 2019.

VAN DALEN, R. *et al.* Langerhans Cells Sense *Staphylococcus aureus* Wall Teichoic Acid through Langerin To Induce Inflammatory Responses. **mBio**, [s. l.], v. 10, n. 3, 2019.

VASCONCELOS, M. A. *et al.* Antibacterial and Antioxidant Activities of Derriobtusone A Isolated from *Lonchocarpus obtusus*. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2014, p. 1–9, 2014.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

VENKATARAMAN, R. *et al.* Vaccination strategies to combat nosocomial infections. **Vacunas (English Edition)**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 60–67, 2023.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T: a peer-reviewed journal for formulary management**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015.

VERT, M. *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 377–410, 2012.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

VIEIRA, R. G. L. *et al.* In vitro studies of the antibacterial activity of *Copaifera* spp. oleoresins, sodium hypochlorite, and peracetic acid against clinical and environmental isolates recovered from a hemodialysis unit. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 14, 2018.

VILELA, J. D. [Mummification and medicine in ancient Egypt]. **Revista paulista de medicina**, [s. l.], v. 89, n. 5–6, p. 115–124, 1977.

VIOTTI, A. C. D. C. Um estudo sobre as boticas e os remédios dos jesuítas no Império Português (séculos XVII - XVIII). **História Unisinos**, [s. l.], v. 23, n. 3, 2019.

VISANSIRIKUL, S.; KOLODZIEJ, S. A.; DEMCHENKO, A. V. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides: a structural and synthetic perspective. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 783–798, 2020.

VON HOVEN, G. *et al.* *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin: small pore, large consequences. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 400, n. 10, p. 1261–1276, 2019.

VUILLEMIN, P. Antibiose et symbiose. [s. l.], 1889.

WAKSMAN, S. A. What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance?. **Mycologia**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 565, 1947.

WANG, R. *et al.* Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 1510–1514, 2007.

WANG, S. *et al.* Strategy to combat biofilms: a focus on biofilm dispersal enzymes. **npj Biofilms and Microbiomes**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 63, 2023.

WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 319–346, 2005.

WATTS, A. *et al.* *Staphylococcus aureus* Strains That Express Serotype 5 or Serotype 8 Capsular Polysaccharides Differ in Virulence. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 73, n. 6, p. 3502–3511, 2005.

WEBBER, M. A. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 9–11, 2003.

WEIDENMAIER, C. *et al.* Differential roles of sortase-anchored surface proteins and wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* nasal colonization. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 298, n. 5–6, p. 505–513, 2008.

WEIDENMAIER, C. *et al.* Lack of Wall Teichoic Acids in *Staphylococcus aureus* Leads to Reduced Interactions with Endothelial Cells and to Attenuated Virulence in a Rabbit Model of Endocarditis. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 191, n. 10, p. 1771–1777, 2005.

WEIGEL, L. M. *et al.* High-Level Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Associated with a Polymicrobial Biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 231–238, 2007.

WEILAND-BRÄUER, N.; MALEK, I.; SCHMITZ, R. A. Metagenomic quorum quenching enzymes affect biofilm formation of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. e0211366, 2019.

WILTON, M. *et al.* Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 544–553, 2016.

WISE, R. I.; OSSMAN, E. A.; LITTLEFIELD, D. R. Personal Reflections on Nosocomial Staphylococcal Infections and the Development of Hospital Surveillance. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1005–1019, 1989.

WŁADYKA, B.; BONAR, E. Application of Staphylococci in the Food Industry and Biotechnology. *In: PET-TO-MAN TRAVELLING STAPHYLOCOCCI*. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 281–291.

WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **Journal of Infection**, [s. l.], v. 59, p. S4–S16, 2009.

WOODIN, A. M. Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 158–165, 1960.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. [s. l.], 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global report on infection prevention and control**. Geneva: [s. n.], 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide**. Geneva: [s. n.], 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024 - Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance**. Geneva: [s. n.], 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. **Global progress report on water, sanitation and hygiene in health care facilities: fundamentals first**. Geneva: [s. n.], 2020.

WRIGHT, G. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 57, n. 10, p. 1451–1470, 2005.

XAVIER, K. B.; BASSLER, B. L. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 191–197, 2003.

XIA, G.; KOHLER, T.; PESCHEL, A. The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 300, n. 2–3, p. 148–154, 2010.

YADAV, S.; CHANDRA, R. Biofilm-mediated bioremediation of pollutants from the environment for sustainable development. *In*: NEW AND FUTURE DEVELOPMENTS IN MICROBIAL BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING: MICROBIAL BIOFILMS. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 177–203.

YAN, J.; BASSLER, B. L. Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 15–21, 2019.

YOSHIDA, A. Staphyococcal  $\delta$ -hemolysin I. Purification and chemical properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 71, p. 544–553, 1963.

YU, H. G. *et al.* A New Rapid and Non-radioactive Assay for Monitoring and Determining the Proliferation of Retinal Pigment Epithelial Cells. **Korean Journal of Ophthalmology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 29, 2003.

ZHANG, R. *et al.* Biofilm dynamics and EPS production of a thermoacidophilic bioleaching archaeon. **New Biotechnology**, [s. l.], v. 51, p. 21–30, 2019.

ZHAO, X. *et al.* Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. **RSC Advances**, [*s. l.*], v. 7, n. 58, p. 36670–36683, 2017.

ZHAO, X.; YU, Z.; DING, T. Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **Microorganisms**, [*s. l.*], v. 8, n. 3, p. 425, 2020.

ZHU, B.; CHEN, Y.; WEI, N. Engineering Biocatalytic and Biosorptive Materials for Environmental Applications. **Trends in Biotechnology**, [*s. l.*], v. 37, n. 6, p. 661–676, 2019.

ZIETZ, B. P.; DUNKELBERG, H. The history of the plague and the research on the causative agent *Yersinia pestis*. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, [*s. l.*], v. 207, n. 2, p. 165–178, 2004.

ZIMLICHMAN, E. *et al.* Health Care–Associated Infections. **JAMA Internal Medicine**, [*s. l.*], v. 173, n. 22, p. 2039, 2013.

ZOBELL, C. E.; ALLEN, E. C. The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces. **Journal of Bacteriology**, [*s. l.*], v. 29, n. 3, p. 239–251, 1935.