

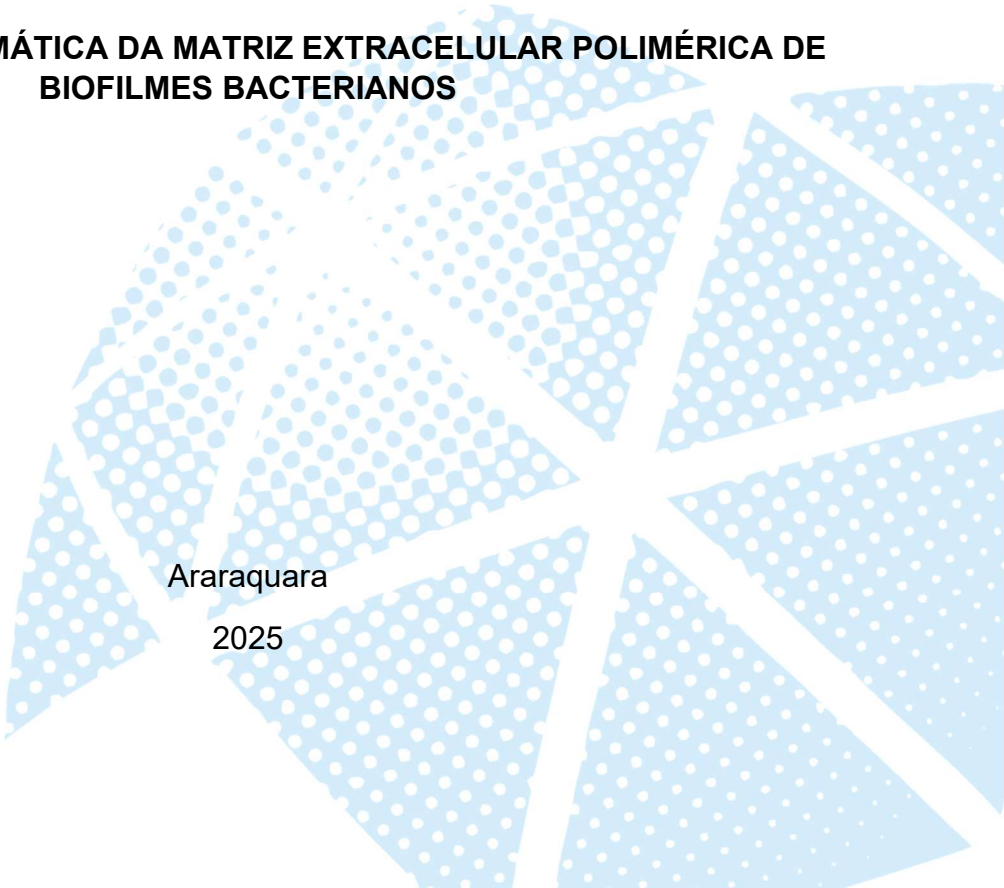
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus de Araraquara

ANDREI NICOLI GEBIELUCA DABUL DIAS DE SOUSA

**DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA MATRIZ EXTRACELULAR POLIMÉRICA DE
BIOFILMES BACTERIANOS**

Araraquara

2025



ANDREI NICOLI GEBIELUCA DABUL DIAS DE SOUSA

**DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA MATRIZ EXTRACELULAR POLIMÉRICA DE
BIOFILMES BACTERIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Bacteriologia

Orientadora: Prof. Dr. Carla Raquel Fontana

Coorientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

Araraquara

2025

S725d

Sousa, Andrei Nicoli Gebieluca Dabul Dias de.
Degradação enzimática da matriz extracelular polimérica de
biofilmes bacterianos / Andrei Nicoli Gebieluca Dabul Dias de Sousa. –
Araraquara, 2025.
50 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de
Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.
Área de concentração: Bacteriologia.

Orientadora: Carla Raquel Fontana.
Coorientador: Igor Polikarpov.

1. Biofilmes. 2. Enzimas. 3. *Staphylococcus aureus*. 4.
Fotoquimioterapia. I. Fontana, Carla Raquel, orient. II. Polikarpov, Igor,
coorient. III. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Vilma Bruna Mastelari Costa - CRB 8/10938

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A pesquisa destaca a viabilidade do emprego de enzimas que atuam em biofilmes, abrindo caminho para que sejam desenvolvidos coquetéis enzimáticos eficazes em erradicar biofilmes multiespécie. Apesar dos desafios, a biodiversidade e os avanços biotecnológicos tornam isso viável. O problema além de afetar a área da saúde, impacta na indústria, o que pode impulsionar a concepção de soluções inovadoras.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The research highlights the feasibility of using enzymes that act on biofilms, paving the way for the development of enzymatic cocktails effective in eradicating multispecies biofilms. Despite the challenges, biodiversity and biotechnological advances make this possible. The issue affects not only healthcare but also industry, which may drive the conception of innovative solutions.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Degradação enzimática da matriz extracelular polimérica de biofilmes bacterianos

AUTORA: ANDREI NICOLI GEBIELUCA DABUL DIAS DE SOUSA

ORIENTADORA: CARLA RAQUEL FONTANA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área de conhecimento: Bacteriologia pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA (Participação Presencial)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Dra. VANESSA DE OLIVEIRA ARNOLDI PELLEGRINI (Participação Presencial)
Engenharia de Processos E2G / Raízen S.A.

Prof. Dr. TÚLIO MORANDIN FERRISSE (Participação Presencial)
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia / Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 03 de julho de 2025

Mais uma vez, dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marilda e Abilio (*in memorian*), pelo incansável esforço em garantir que eu tivesse uma educação de qualidade.

Aos meus filhos, Matheus e Felipe, minhas fontes de inspiração.

A meu marido, Denis, pelo apoio incondicional.

A meu irmão, Audrei, por ter me iniciado no universo da pesquisa.

À minha orientadora, Carla Raquel Fontana, e meu coorientador, Igor Polikarpov, por toparem fazer parte dessa jornada.

Ao Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP e ao Instituto de Física de São Carlos da USP por fornecerem a infraestrutura necessária para execução do presente trabalho.

À chefia do Departamento de Análises Clínicas por ter permitido que eu realizasse o Mestrado concomitantemente às minhas atividades profissionais.

Aos colegas de departamento, e principalmente aos colegas de laboratório, por serem sempre solícitos.

“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho
mais certo de vencer é tentar mais uma vez.”
(Thomas Edison)

RESUMO

Staphylococcus aureus é um dos principais patógenos humanos a nível global, em grande parte devido à sua alta capacidade de estabelecer infecções resistentes aos tratamentos convencionais, principalmente por sua habilidade em formar biofilmes. Biofilmes são comunidades microbianas envoltas por uma matriz extracelular polimérica (MEP), composta por diversas biomoléculas, especialmente polissacarídeos. Esta MEP confere proteção aos microrganismos contra fatores externos, incluindo agentes antimicrobianos. Portanto, a busca por estratégias que visem erradicar ou prevenir a formação de biofilmes é essencial para permitir o tratamento eficaz de infecções com os antimicrobianos disponíveis atualmente. Uma abordagem promissora é o uso de enzimas da classe das hidrolases de glicosídeos (GH), capazes de degradar os polissacarídeos presentes nas MEPs dos biofilmes bacterianos. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de três enzimas da família GH20 na ação sobre o biofilme de uma linhagem de *S. aureus*. As enzimas AaGH20, ApGH20 e ChGH20 demonstraram capacidade tanto de inibir a formação de biofilme da linhagem *S. aureus* 03, quanto de degradar biofilmes previamente formados, como foi observado ao se utilizar a técnica de coloração com cristal violeta para quantificar a biomassa do biofilme. O pré-tratamento com essas enzimas no biofilme de *S. aureus* 03 foi capaz de restaurar a atividade antimicrobiana da gentamicina e de aprimorar a eficácia da Terapia Fotodinâmica com Azul de Metileno, como observado nos testes de viabilidade celular utilizando resazurina. Estes resultados promissores abrem caminho para investigações mais profundas, visando a avaliação de diversas enzimas sobre diferentes biofilmes. O objetivo futuro é o desenvolvimento de um coquetel enzimático que possa atuar de forma abrangente em biofilmes multiespécie, os mais frequentemente associados a infecções.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; biofilmes; enzimas; fotoquimioterapia.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the leading human pathogens worldwide, largely due to its high ability to establish infections that are resistant to conventional treatments, primarily by forming biofilms. Biofilms are microbial communities enclosed by an extracellular polymeric matrix (EPM), composed of various biomolecules, especially polysaccharides. This EPM provides protection to microorganisms against external factors, including antimicrobial agents. Therefore, the search for strategies to eradicate or prevent biofilm formation is crucial for enabling the effective treatment of infections with available antimicrobial agents. A promising approach is the use of glycoside hydrolase enzymes capable of degrading the polysaccharides present in bacterial biofilm EPMs. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of three GH20 family enzymes in acting on *S. aureus* biofilms. The enzymes AaGH20, ApGH20, and ChGH20 were able to both inhibit biofilm formation by the *S. aureus* 03 strain and degrade pre-formed biofilms, as observed with crystal violet staining to measure the biofilm biomass. Pre-treatment with these enzymes on *S. aureus* 03 biofilms restored the antimicrobial activity of gentamicin and improved the effectiveness of Photodynamic Therapy with Methylene Blue, as observed measuring the cell viability with resazurin. These promising results pave the way for further investigations aimed at evaluating different enzymes on various biofilms. The future goal is to develop an enzymatic cocktail that can act comprehensively on multispecies biofilms, which are most commonly associated with infections.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; biofilms; enzymes; photochemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura cristalográfica da Dispersina B (PDB:1YHT), evidenciando a topologia típica de barril TIM	15
Figura 2 – Estrutura química da gentamicina	17
Figura 3 – Ilustração do mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	18
Figura 4 – Árvore filogenética mostrando o posicionamento da linhagem <i>S. aureus</i> 03 em relação aos principais clones de <i>S. aureus</i>	27
Figura 5 – Operon <i>ica</i>	30
Figura 6 – Quantificação de biomassa em biofilmes de <i>S. aureus</i> 03 crescidos por 24 h em diferentes meios de cultura e com diferentes quantidades de inóculo	31
Figura 7 - Quantificação de biomassa em biofilmes de <i>S. aureus</i> 03 crescidos por 48 h em diferentes meios de cultura e com diferentes quantidades de inóculo	32
Figura 8 – Etapas envolvidas na coloração da biomassa do biofilme de <i>S. aureus</i> 03 para quantificação	33
Figura 9 – Resumo da quantificação de biomassa dos biofilmes de <i>S. aureus</i> 03 crescidos por 24 ou 48 h em diferentes condições, indicando a condição escolhida para os ensaios posteriores	33
Figura 10 – Quantificação de biomassa do biofilme de <i>S. aureus</i> 03 após tratamento com diferentes concentrações de <i>AaGH20</i> , <i>ApGH20</i> ou <i>ChGH20</i> , relativa ao tratamento apenas com tampão	34
Figura 11 – Quantificação relativa da biomassa de biofilme de <i>S. aureus</i> 03 após experimento de inibição da formação de biofilme pelas enzimas em diferentes concentrações	36
Figura 12 – Efeito do pré-tratamento enzimático na atividade de gentamicina sobre o biofilme de <i>S. aureus</i> 03	38
Figura 13 – Efeito do pré-tratamento enzimático na atividade antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica sobre o biofilme de <i>S. aureus</i> 03	40
Figura 14 – Imagens de microscopia confocal de varredura à laser da degradação do biofilme de <i>S. aureus</i> 03 por <i>ApGH20</i> e <i>ChGH20</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais para Terapia Fotodinâmica

25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A ₅₉₅	Absorbância em 595 nm
AM	Azul de Metileno
ANOVA	Análise de Variância (do inglês, <i>Analysis of Variance</i>)
CAZymes	Enzimas ativas sobre carboidratos (do inglês, <i>Carbohydrate-Active Enzymes</i>)
CEBM	Concentração de Erradicação de Biofilme Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DO ₆₀₀	Densidade Ótica em 600 nm
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GFP	Proteína Fluorescente Verde (do inglês, <i>Green Fluorescent Protein</i>)
GH	Hidrolase de Glicosídeo (do inglês, <i>Glycoside Hydrolase</i>)
IFSC-USP	Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo
LB	Caldo Luria-Bertani
MCVL	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (do inglês, <i>Methicillin-resistant <u>Staphylococcus aureus</u></i>)
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina (do inglês, <i>Methicillin-susceptible <u>Staphylococcus aureus</u></i>)
PNAG	Poli-β-(1,6)-N-acetil-D-glucosamina
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês, <i>Ribonucleic Acid</i>)
ST	Tipo de Sequência (do inglês, <i>Sequence Type</i>)
TC	Terapia Combinada
TEV	Vírus da Corrosão do Tabaco (do inglês, <i>Tobacco Etch Virus</i>)
TFDa	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
TSA	Ágar Triptona de Soja (do inglês, <i>Tryptic Soy Agar</i>)
TSB	Caldo Triptona de Soja (do inglês, <i>Tryptic Soy Broth</i>)
TSB + G	Caldo Triptona de Soja suplementado com 0,75% de glicose
TSB 0,1%	Caldo Triptona de Soja 10 x diluído
URF	Unidade Relativa de Fluorescência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	LINHAGEM BACTERIANA	20
3.2	ENZIMAS	20
3.3	PADRONIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BIOFILME DA LINHAGEM <i>S. aureus</i> 03	21
3.4	DEGRADAÇÃO DE BIOFILME PRÉ-FORMADO DE <i>S. aureus</i> 03 POR GH20	22
3.5	INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>S. aureus</i> 03 POR GH20	23
3.6	TERAPIA COMBINADA DE ENZIMA E ANTIMICROBIANO	23
3.7	TERAPIA COMBINADA DE ENZIMA E AÇÃO FOTODINÂMICA	24
3.8	MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA DOS BIOFILMES DE <i>S. aureus</i> 03 TRATADOS	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE <i>S. aureus</i> 03	27
4.2	PADRONIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>S. aureus</i> 03	30
4.3	DEGRADAÇÃO DO BIOFILME PRÉ-FORMADO DE <i>S. aureus</i> 03 POR ENZIMAS GH20	34
4.4	INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME DE <i>S. aureus</i> 03 POR ENZIMAS GH20	35
4.5	AÇÃO COMBINADA – PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO + ANTIMICROBIANO	36
4.6	AÇÃO COMBINADA – PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO + TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA	39
4.7	MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER	41
5	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus está entre as bactérias mais isoladas de infecções em humanos no mundo todo. Além disso, está associada com uma alta taxa de mortalidade, chegando a mais de 1 milhão das 13,7 milhões de mortes relacionadas a infecções em 2019. (Ikuta et al., 2022) As infecções causadas por *S. aureus* incluem aquelas que atingem o trato respiratório, o sistema cardiovascular, próteses articulares, bacteremia nosocomial, entre outras. (Cheung et al., 2021)

O sucesso desse patógeno pode ser atribuído a sua vasta gama de fatores de virulência, os quais auxiliam na evasão da fagocitose, na invasão tecidual e na persistência nos sítios de infecção. (Cheung et al., 2021) Dentre tais mecanismos, a formação de biofilme tem um papel importante, já que essa estrutura complexa protege as células microbianas dos ambientes hostis, como quando na presença do sistema imune humano. (François et al., 2023)

Biofilmes são comunidades de microrganismos embebidas em uma substância extracelular polimérica que garante proteção contra diversas ameaças ambientais, como os antimicrobianos, por exemplo, deixando as células extremamente resistentes, quando comparadas às suas versões planctônicas. (Hobley et al., 2015)

Estima-se que até 80% de toda a população de microrganismos do planeta viva sob a forma de biofilmes, que podem ser encontrados tanto em superfícies abióticas, como próteses e cateteres utilizados em tratamentos médicos, quanto em superfícies bióticas, como dentes (placa bacteriana) e tecidos (feridas infectadas, por exemplo), além dos mais diversos habitats sem importância médica. (Penesyan et al., 2021) Assim, os biofilmes bacterianos são de grande preocupação, e diversos esforços estão sendo realizados na tentativa de se encontrar terapias capazes de erradicar, ou mesmo inibir a formação de tais comunidades. (Uruén et al., 2020)

A substância extracelular polimérica que compõe a matriz dos biofilmes bacterianos é normalmente composta por proteínas, DNA extracelular e polissacarídeos, sendo este último o mais abundante na maioria dos casos. Os polissacarídeos extracelulares têm função no estabelecimento, crescimento e persistência dos biofilmes, fornecendo desde estabilidade estrutural e defesa química e física contra agentes externos e o sistema imune do hospedeiro, até adesão e agregação das células microbianas e tolerância à dessecação. (Hobley et al., 2015)

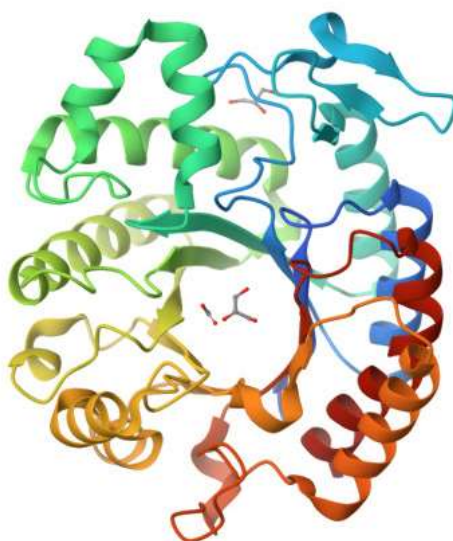
Além disso, os polissacarídeos extracelulares podem funcionar como fonte de nutrientes para as células microbianas em épocas de escassez. (Karygianni et al., 2020)

Recentemente, várias estratégias vem sendo estudadas objetivando a degradação dos biofilmes bacterianos, sendo que uma das mais promissoras consiste no emprego de enzimas do grupo das hidrolases de glicosídeos (GH). (Redman et al., 2020) Esta estratégia é particularmente eficaz devido à alta especificidade das enzimas. Em outras palavras, com tanto que o principal componente da matriz extracelular de um determinado biofilme seja um polissacarídeo e que sua natureza química seja conhecida, a GH mais adequada pode ser escolhida para degradá-lo. As GHs compoem uma das classes de CAZymes (enzimas ativas sobre carboidratos), sendo que atualmente existem mais de 170 famílias caracterizadas. Dentre essas famílias, destaca-se a família GH20, que engloba β -hexosaminidases (EC 3.2.1.52); lacto-N-biosidases (EC 3.2.1.140); β -1,6-N-acetilglucosaminidases (EC 3.2.1.-) e β -6-SO₃-N-acetilglucosaminidases (EC 3.2.1.-). (Drula et al., 2022)

A Dispersina B (Figura 1), uma β -1,6-N-acetilglucosaminidase de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi a primeira enzima com atividade demonstrada contra biofilmes cuja matriz seja composta primariamente pelo biopolímero de β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (PNAG). (Kaplan et al., 2003) Em seu estudo, os autores analisaram mutantes de *A. actinomycetemcomitans* (conhecida por produzir biofilmes robustos), produzidos por inserção de transposons, e observaram que um dos mutantes era incapaz de destacar suas células do biofilme para formar novas colônias. Eles então encontraram que o transposon daquele mutante, em específico, estava inserido em um gene inédito, a que eles chamaram *dspB*, e que codificava uma N-acetilglucosaminidase. Hoje, pelo menos 32 ortólogos do gene *dspB* já foram identificados em bactérias, normalmente entre as famílias *Pasteurellaceae* e *Neisseriaceae*. (Kaplan, Sukhishvili, et al., 2024) Dispersina B de *A. actinomycetemcomitans* e de *Actinobacillus pleuropneumoniae* já foram descritas como sendo capazes de degradar biofilmes pré-formados de *A. actinomycetemcomitans*, *A. pleuropneumoniae*, e *Staphylococcus epidermidis*, já que esses organismos compartilham do mesmo componente primário em suas matrizes extracelulares, PNAG, a qual Dispersina B tem como alvo específico. (Kaplan et al., 2003; Kaplan, Ragunath, et al., 2004; Kaplan, Velliyagounder, et al., 2004)

Biofilmes ricos em PNAG são produzidos por bactérias gram-positivas que possuem o operon *ica*, que é composto por quatro genes, como é o caso de algumas linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e por bactérias gram-negativas que possuem o operon *pgaABCD*, como linhagens de *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* e *Burkholderia* sp.. (Françoise et al., 2023; Kaplan, Velliyagounder, et al., 2004; Roux et al., 2015) Recentemente foi descrito que muitos outros microrganismos, inclusive eucariotos, são capazes de sintetizar PNAG, embora ainda não tenham sido identificados genes homólogos àqueles dos operons *ica* e *pga* em todos os casos. (Kaplan, Velliyagounder, et al., 2004; Roux et al., 2015)

Figura 1 – Estrutura cristalográfica da Dispersina B (PDB:1YHT), evidenciando a topologia típica de barril TIM



Fonte: RCSB Protein Data Bank (PDB ID: 1YHT). (Berman et al., 2000)

A fim de justificar a execução do presente trabalho, é importante destacar o panorama atual das infecções causadas por microrganismos resistentes.

Conforme os anos se passam, novas linhagens de bactérias resistentes aos antimicrobianos vão surgindo, colocando em cheque a melhora na expectativa de vida da população mundial conquistada graças ao surgimento dos antibióticos. Estima-se que casos de morte por infecções causadas por microrganismos resistentes ao antimicrobianos possam ultrapassar 700 mil por ano, além de proporcionarem internações prolongadas (e custosas), sendo que, caso a situação não seja controlada, esses números podem alcançar o patamar de 10 milhões de mortes por ano até 2050, gerando um custo de cerca de 100 trilhões de dólares. (O'Neill, 2016)

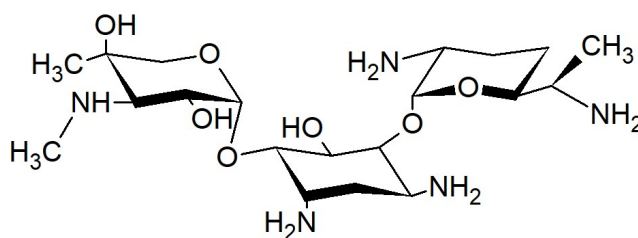
Recentemente, foi reportado que dentre os microrganismos mais frequentemente isolados de infecções de adultos, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella spp.* e *Pseudomonas aeruginosa* são os mais associados à resistência. (Weiner-Lastinger et al., 2020)

Muitos são os mecanismos de resistência aos antimicrobianos desenvolvidos pelas bactérias, como é o caso de mutações, aquisição de genes através de transferência horizontal, além da formação de biofilmes, como uma forma da bactéria se defender de ambientes inóspitos gerados pela presença de diversos fatores, dentre eles os antimicrobianos. (Algburi et al., 2017a; Li et al., 2020) Além disso, gradientes de concentração de antibióticos acabam sendo formados dentro das camadas do biofilme, sendo que parte das células bacterianas são expostas a níveis abaixo das concentrações inibitórias, potencialmente promovendo o desenvolvimento de resistência. (Algburi et al., 2017a) É possível afirmar que a formação de biofilmes bacterianos confere aumento de resistência a agentes antimicrobianos em cerca de 10 a 1000 vezes. (de la Fuente-Núñez et al., 2013)

A estratégia mencionada acima de erradicar biofilmes bacterianos com o uso de hidrolases de glicosídeos, embora promissora, foca apenas na degradação da matriz extracelular do mesmo, não tendo nenhum efeito sobre as células bacterianas que o compõem. Assim, a dispersão repentina de biofilmes poderia vir a sobrecarregar o sistema imune do hospedeiro possivelmente levando a uma disseminação da infecção e septicemia. (Fleming & Rumbaugh, 2018) Por isso, é importante sempre prever o emprego combinado de uma enzima dispersora de biofilme com agentes antimicrobianos, de modo a proteger o hospedeiro de uma possível septicemia.

Gentamicina (Figura 2) é um antimicrobiano de amplo-espectro pertencente à classe dos aminoglicosídeos. Seu mecanismo de ação baseia-se na ligação da molécula ao sítio A do 16S rRNA, o que promove a interrupção da síntese proteica, e, diferentemente de outros inibidores de síntese proteica, resulta em uma rápida ação bactericida. Sua atividade é concentração-dependente, ou seja, quanto maior a dose, maior o efeito antibacteriano, porém, a gentamicina é pouco utilizada como monoterapia para tratar infecções causadas por bactérias gram-positivas. Normalmente associa-se seu uso a um inibidor de síntese de parede que facilite a entrada do aminoglicosídeo na célula gram-positiva, onde a molécula possa então desempenhar sua função. (Dabul et al., 2020)

Figura 2 – Estrutura química da gentamicina



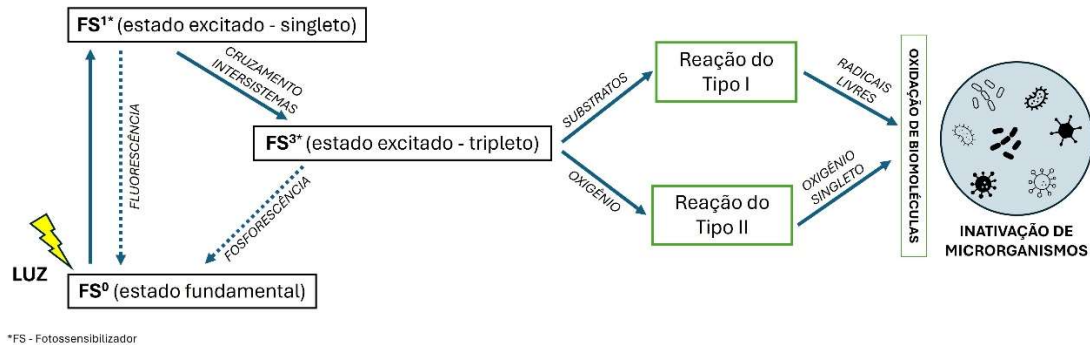
Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Tendo em vista o constante desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, principalmente no que diz respeito aos biofilmes, (Algburi et al., 2017) o que leva à escassez de opções terapêuticas, somado à facilidade de produção da gentamicina e vasto conhecimento sobre sua biodisponibilidade e toxicidade, (Karimzadeh et al., 2023; Xu et al., 2024) a possibilidade de colocá-la em uso para tratamentos de infecções causadas por biofilmes de *S. aureus* mostra-se como uma alternativa interessante. Sendo assim, é de grande interesse avaliar a atividade antimicrobiana da gentamicina sobre biofilmes de *S. aureus* após terem sido submetidos a pré-tratamento enzimático.

Uma alternativa moderna e não-invasiva às drogas antimicrobianas convencionais é a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa). Seu mecanismo envolve a ativação de um fotossensibilizador utilizando luz de um comprimento de onda específico na presença de oxigênio. O fotossensibilizador ativado é elevado do seu estado fundamental para o estado excitado, e pode então percorrer dois caminhos diferentes, a depender de sua natureza química: transferir elétrons ou hidrogênio para moléculas vizinhas, levando à formação de radicais livres (Reação do Tipo I), ou transferir energia para o oxigênio molecular, levando à produção de oxigênio singleto (Reação do Tipo II). Em ambos os casos tais espécies reativas de oxigênio (EROs) causam estresse oxidativo nas células microbianas, levando à morte (Figura 3). (de Aquino Júnior et al., 2023) O Azul de Metileno (AM) é um fotossensibilizador que vem sendo amplamente utilizado devido a sua eficácia (alta capacidade de ligação à superfície negativamente carregada de bactérias e fungos), baixo custo e segurança. (Cabral et al., 2023) Apesar de ótimos resultados terem sido observados com a aplicação da TFDa com AM sobre *S. aureus*, a forma de biofilme sempre se apresenta como um obstáculo, com resultados menos evidentes. (Chan et al., 2023; Spesia &

Durantini, 2023) O emprego combinado de TFDa após pré-tratamento enzimático do biofilme pode vir a ser uma solução elegante para tal problemática.

Figura 3 – Ilustração do mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Assim, é de fundamental importância a busca por maneiras de evitar a formação, ou mesmo degradar os biofilmes já formados, para facilitar a ação de terapias antimicrobianas, dessa maneira evitando que fiquemos sem opções terapêuticas para tratar mesmo as infecções mais banais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação de hidrolases de glicosídeos da família GH20 sobre biofilme de *S. aureus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Sequenciar o genoma de linhagem de *S. aureus* disponível no laboratório da Professora Carla Raquel Fontana Mendonça (*S. aureus* 03);

b) Realizar a caracterização genotípica de *S. aureus* 03 com base nos dados de sequenciamento de genoma;

c) Determinar o perfil de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos a que a linhagem *S. aureus* 03 seja potencialmente detectada como resistente, na caracterização genotípica;

d) Padronizar o crescimento do biofilme da linhagem *S. aureus* 03;

e) Avaliar a capacidade das enzimas da família GH20 (*AaGH20*, *ApGH20* e *ChGH20*) produzidas no laboratório do Professor Igor Polikarpov (IFSC-USP) de prevenir a formação e/ou erradicarem biofilme pré-formado de *S. aureus* 03;

f) Avaliar a ação combinada das enzimas com antimicrobianos e das enzimas com terapia fotodinâmica sobre a viabilidade celular das células dos biofilmes de *S. aureus* 03;

g) Coletar imagens de microscopia confocal de varredura dos biofilmes tratados e não-tratados com as enzimas GH20, a fim de visualizar o dano na matriz extracelular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGEM BACTERIANA

S. aureus 03 é um isolado clínico humano disponível na biblioteca de micro-organismos do laboratório da professora Carla Fontana, e foi rotineiramente cultivado em caldo triptona de soja suplementado com 0,75% de glicose (TSB + G) ou ágar triptona de soja (TSA) a 37 °C por 24 horas em condições estáticas. A linhagem foi caracterizada genotipicamente após coleta do rascunho de seu genoma completo através de sequenciamento por síntese (Illumina, EUA). O genoma foi anotado usando Annotation using Subsystem Technology (RAST) (Aziz et al., 2008) e a linhagem foi tipada com MLST 2.0 (Larsen et al., 2012), SCCmecFinder 1.2 (Ito et al., 2009), spaTyper 1.0 (Bartels et al., 2014) and PlasmidFinder 2.1 (Carattoli et al., 2014), todos disponíveis através do portal Center for Genomic Epidemiology (CGE). Além disso, a linhagem foi tipada com ResFinder 4.6.0 (Bortolaia et al., 2020) e VirulenceFinder 2.0 (Camacho et al., 2009), também disponíveis através do portal CGE, e com CARD (Alcock et al., 2023). O perfil de resistência em potencial foi confirmado fenotipicamente com Etest® (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) para vancomicina, microdiluição em caldo para gentamicina e disco difusão para cloranfenicol, cefoxitina, rifampicina, trimetoprima, eritromicina, norfloxacina, tetraciclina e penicilina G, utilizando os critérios de interpretação estabelecidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (Clinical Laboratory Standards Institute, 2020). *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922 foram utilizadas como linhagens de controle de qualidade para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Uma árvore filogenética foi construída com REALPHY para verificar a relação entre a linhagem *S. aureus* 03 com as principais linhagens de *S. aureus*. (Bartels et al., 2014)

3.2 ENZIMAS

AaGH20 é a Dispersina B descrita por Kaplan et al., (Kaplan et al., 2003) amplamente estudada e inclusive disponível comercialmente. Ela é uma GH20 de *A. actinomycetemcomitans* e para esse estudo, o gene codificando AaGH20 foi sintetizado, baseado no genoma de *A. actinomycetemcomitans*, após ser otimizado *in silico* para expressão em *E. coli*. ApGH20 é uma GH20 de *A. pleuropneumoniae*, também mencionada por Kaplan et al. em um de seus trabalhos, porém não estudada desde então. (Kaplan, Velliyagounder, et al., 2004) Assim como AaGH20, o gene

codificando *ApGH20* foi sintetizado após ser otimizado para expressão em *E. coli*. O gene que codifica *ChGH20* (WP_082159814) foi amplificado a partir do DNA genômico de *Cardiobacterium hominis* DSM 8339, e representa uma GH não estudada previamente.

Todos os genes foram clonados em pETTRX1a/LIC utilizando técnica de Clonagem Independente de Ligação (Camilo & Polikarpov, 2014) e as proteínas de interesse foram expressas em *E. coli* BL21 Rosetta.

A purificação se deu por cromatografia de afinidade, utilizando resina de níquel, e posteriormente a cauda de histidina das proteínas foi removida utilizando a protease de *Tobacco Etch Virus* (TEV). Após serem concentradas em dispositivos Amicon® Ultra-15 (Millipore, EUA) com corte de 10 kDa, as enzimas estavam prontas para os ensaios em biofilme. O preparo das mesmas foi realizado no laboratório do professor Igor Polikarpov (Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo).

3.3 PADRONIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BIOFILME DA LINHAGEM *S. aureus* 03

Para identificar a melhor condição de crescimento de biofilme de *S. aureus* 03, foram testados quatro meios de cultura, três concentrações de inóculo e dois tempos de incubação diferentes.

Os meios de cultura testados foram TSB, um meio de cultura complexo e rico; TSB + G, onde adicionou-se 0,75% de glicose ao meio TSB, pois já foi reportado que a presença de glicose influencia positivamente a produção de biofilmes por *Staphylococcus* sp.; (Lade et al., 2019; Syed et al., 2024; Waldrop et al., 2014) caldo Luria-Bertani (LB) e TSB 0,1%, meios de cultura complexos, porém pobres, já que se sabe que para algumas linhagens a escassez de nutrientes pode favorecer a formação de biofilmes. (Du et al., 2022; Ramadhan & Hegedus, 2005)

As concentrações de inóculo testadas foram $DO_{600}=0,1$, $DO_{600}=0,01$ e $DO_{600}=0,001$, e os tempos de incubação de 24 e 48 horas. (Haney et al., 2021)

Para formação do biofilme em cada uma das condições, primeiramente foi preparado um pré-inóculo da linhagem semeando cerca de 5 colônias isoladas de uma placa de TSA em 5 mL do caldo correspondente. Os tubos foram mantidos em estufa a 37 °C por 16 horas e então as culturas tiveram suas densidades óticas em 600 nm

ajustadas para 0,1, utilizando o espectrofotômetro Biotek Synergy H1 (Agilent, EUA), e diluídas para 0,01 ou 0,001, em seus respectivos meios de cultura.

Foi distribuído um volume de 200 µL de cada inóculo, sendo seis replicatas para cada condição, nos poços de microplacas de 96 poços (Kasvi, Brasil), sendo que os poços das bordas foram preenchidos com meio de cultura estéril para evitar evaporação nos poços centrais, além de servirem como controle de esterilidade. As placas foram então incubadas em estufa a 37 °C por 24 ou 48 horas.

Após o tempo de incubação, o meio de cultura gasto, juntamente com as células planctônicas foram removidos e procedeu-se três lavagens com 200 µL de salina estéril. Em seguida, a biomassa dos biofilmes foi corada com 200 µL de uma solução de Cristal Violeta 0,5%, que foi mantida por 5 minutos em temperatura ambiente. Após coloração, a solução foi removida e realizou-se três lavagens com solução salina. A descoloração foi então realizada com 200 µL de uma solução de ácido acético 30%, que foi mantida sobre os biofilmes por 5 minutos, em temperatura ambiente. Cem microlitros da solução de cada poço foram transferidos para uma nova microplaca, da qual foi realizada medida de absorbância em 595 nm utilizando o espectrofotômetro Biotek Synergy H1 (Agilent, EUA). As médias e desvios-padrão de cada condição foram plotados em gráficos de barras para visualização da condição que produziu biofilme com maior biomassa.

3.4 DEGRADAÇÃO DE BIOFILME PRÉ-FORMADO DE *S. aureus* 03 POR GH20

Para avaliar a capacidade das enzimas AaGH20, ApGH20 e ChGH20 de degradar o biofilme pré-formado de *S. aureus* 03, primeiramente ele foi cultivado nas condições determinadas previamente (item 3.3), ou seja, utilizando um inóculo com DO₆₀₀=0,01 em caldo TSB + G, e cultivado por 24 horas a 37 °C.

Após formação do biofilme, o conteúdo dos poços foi removido e foram realizadas três lavagens com solução salina estéril. Em seguida, foram adicionadas soluções de enzima em diversas concentrações (500 µg/mL, 50 µg/mL e 5 µg/mL), num volume de 200 µL por poço, em sextuplicata. O experimento foi realizado em três ocasiões diferentes. As enzimas encontravam-se diluídas em tampão 20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl. A microplaca foi incubada em estufa a 37 °C por tempos pré-estabelecidos (0,5 h, 1 h, 2 h e 4 h), e após o tempo de incubação a biomassa foi quantificada através da coloração com cristal violeta descrita no item 3.3, sendo que

os resultados foram plotados relativos ao tratamento apenas com tampão (sem enzima). Foi realizado o teste de Análise de Variância (one-way ANOVA), com pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

3.5 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *S. aureus* 03 POR GH20

Para avaliar a capacidade das enzimas de inibir a formação do biofilme de *S. aureus* 03, AaGH20, ApGH20 e ChGH20 foram preparadas em uma solução-estoque dez vezes mais concentrada do que a concentração de teste, e esterilizadas por filtração. A solução de dissolução foi o tampão 20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl.

O preparo do biofilme se deu como descrito anteriormente (item 3.3), utilizando as melhores condições detectadas no ensaio de padronização, exceto que o inóculo foi preparado dez vezes mais concentrado, e que a cada conjunto de poços de determinada condição avaliada foram adicionados 160 μ L de caldo TSB + G, 20 μ L do pré-inóculo ajustado (10x concentrado) e 20 μ L da solução de enzima (10x concentrada). A microplaca foi incubada por 24 horas a 37 °C. Diversas concentrações enzimáticas foram avaliadas (500 μ g/mL, 50 μ g/mL e 5 μ g/mL) e comparadas com o tratamento apenas com o tampão de diluição das enzimas (sem adição de enzima). Foram realizadas seis replicatas técnicas de cada condição avaliada, e o experimento foi repetido em três diferentes ocasiões.

Após o tempo de incubação, a biomassa foi quantificada através da coloração com cristal violeta descrita no item 3.3, sendo que os resultados foram plotados relativos ao tratamento apenas com tampão (sem enzima). Foi realizado o teste de Análise de Variância (one-way ANOVA), com pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

3.6 TERAPIA COMBINADA DE ENZIMA E ANTIMICROBIANO

Para avaliar se a presença das enzimas poderia melhorar a performance da gentamicina sobre o biofilme de *S. aureus* 03, primeiramente o biofilme foi cultivado como descrito no item 3.3, e em seguida foi lavado por três vezes com salina estéril. Em seguida, foi aplicado o pré-tratamento enzimático, onde 200 μ L de AaGH20 a 50 μ g/mL, ApGH20 a 50 μ g/mL ou ChGH20 a 500 μ g/mL diluídas em tampão 20 mM Tris-

HCl, pH 8 e 100 mM NaCl foram aplicados nos poços contendo biofilme. A microplaca foi mantida a 37 °C por 1 hora e então os poços foram lavados com salina estéril por três vezes. Em paralelo, realizou-se o mesmo procedimento de pré-tratamento, porém utilizando apenas o tampão de diluição das enzimas, como controle negativo.

Após a lavagem, aplicou-se 200 µL de gentamicina diluída em caldo Mueller-Hinton, em triplicata, nas seguintes concentrações: 0; 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 e 8 mg/L. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após incubação, 100 µL do conteúdo de cada poço foram transferidos para uma microplaca de 96 poços preta, e a cada poço foram ainda adicionados 20 µL de uma solução de resazurina a 0,15 mg/mL. As microplacas foram mantidas a 37 °C por 2 horas e então mediu-se a fluorescência do conteúdo dos poços em espectrofotômetro Biotek Synergy H1 com excitação em 550 nm e emissão em 590 nm, para que a fosse feita uma estimativa da viabilidade das células bacterianas. (Costa et al., 2021) As médias e os desvios-padrão foram plotados em Unidades Relativas de Fluorescência (URF) versus Concentração de Gentamicina (mg/L). O experimento foi repetido em três diferentes ocasiões.

3.7 TERAPIA COMBINADA DE ENZIMA E AÇÃO FOTODINÂMICA

Para avaliar se o pré-tratamento enzimático melhora a eficiência da TFDa, o biofilme de *S. aureus* 03 foi cultivado em duas microplacas como descrito no item 3.3, e após remoção do meio de cultura e células planctônicas, os biofilmes foram lavados por três vezes com salina estéril.

Dos quatro grupos de triplicatas a serem testados em cada microplaca, dois deles receberam 100 µL de AaGH20, ApGH20 ou ChGH20 a 50 µg/mL, diluídas em tampão 20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, enquanto os outros dois foram tratados apenas com 100 µL do mesmo tampão de diluição das enzimas. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 1 hora, para que ocorresse o pré-tratamento enzimático. Em seguida, 100 µL de uma solução 50 µg/mL de AM dissolvido em salina foram adicionados a um dos grupos de poços pré-tratados enzimaticamente (em ambas as microplacas) e a um dos grupos tratados apenas com tampão. Aos demais poços foram adicionados 100 µL de salina estéril. A partir do momento em que se adicionou o fotossensibilizador, todas as etapas foram realizadas ao abrigo da luz. As microplacas foram mantidas no escuro por 10 minutos em temperatura ambiente para

que houvesse internalização do AM, e em seguida uma das microplacas permaneceu no escuro, enquanto a outra foi submetida à irradiação por 900 segundos a 660 nm e 72,96 mW/cm². Um resumo dos grupos experimentais é mostrado na Tabela 1.

Para avaliar a viabilidade das células bacterianas após o experimento, foram adicionados 40 µL de uma solução de resazurina a 0,15 mg/mL a cada um dos poços. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 2 horas e então 100 µL foram transferidos para uma placa de 96 poços preta. Mediu-se a fluorescência do conteúdo dos poços em espectrofotômetro Synergy H1 com excitação em 550 nm e emissão em 590 nm, e as médias e respectivos desvios-padrão foram plotados em Unidades Relativas de Fluorescência (URF). Foi realizado o teste de Análise de Variância (one-way ANOVA), com pós-teste de Tukey, e diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

Tabela 1 – Grupos experimentais para Terapia Fotodinâmica

GRUPO	Pré-tratamento	Fotossensibilizador	Irradiação
<i>Luz</i>	Tampão	Não	Sim
<i>Enzima + Luz</i>	Enzima	Não	Sim
<i>TFD</i>	Tampão	Sim	Sim
<i>TC</i>	Enzima	Sim	Sim
<i>Controle de Crescimento</i>	Tampão	Não	Não
<i>Enzima</i>	Enzima	Não	Não
<i>AM</i>	Tampão	Sim	Não
<i>Enzima + AM</i>	Enzima	Sim	Não

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

3.8 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA DOS BIOFILMES DE *S. aureus* 03 TRATADOS

Para coletar as imagens de Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL) do biofilme de *S. aureus* 03, foi seguido o protocolo de formação do biofilme descrito no item 3.3, com exceção do tamanho do inóculo, que foi de 1 mL por poço de microplaca de 24 poços (Kasvi, Brasil).

Após a incubação, o meio de cultura gasto e as células planctônicas foram removidos, procedeu-se com três lavagens com salina estéril, e então foram adicionados 500 µL de ApGH20 ou ChGH20 a 50 µg/mL diluídas em 20 mM Tris-HCl,

pH 8, 100 mM NaCl, ou apenas o tampão, sem a presença de enzimas, para servir como controle negativo. A microplaca foi incubada a 37 °C por 1 hora, e em seguida foram realizados dois processos independentes de coloração fluorescente.

O kit para microscopia LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability (Invitrogen EUA) foi utilizado para acessar a viabilidade das células bacterianas no biofilme, sendo que uma mistura 1000 x diluída de SYTO 9 e iodeto de propídeo em salina foi aplicada à cada poço avaliado. A microplaca foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos no escuro, e foi realizada uma lavagem com salina para remover o excesso de corante.

Para identificação de carboidratos e proteínas na matriz extracelular do biofilme, foi realizado um procedimento de duas etapas. Primeiramente, o biofilme foi corado com uma solução a 10 µg/mL de Calcofluor White Stain (Sigma-Aldrich, EUA), que foi mantida por 15 minutos no escuro, e em seguida submetida à lavagem com salina. Posteriormente o biofilme foi corado com FilmTracer™ SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain (Invitrogen, USA), que foi mantido em incubação por 20 minutos ao abrigo da luz. Finalmente, realizou-se lavagem com salina.

As imagens foram coletadas em microscópio confocal Zeiss LSM 780 (Zeiss, Alemanha) equipado com um laser Chameleon Coherent (Tisapphire) com lentes objetivas de 10 X, e analisadas utilizando o programa ZEISS ZEN 3.6 (Zeiss, Alemanha) por colaboradores do IFSC-USP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

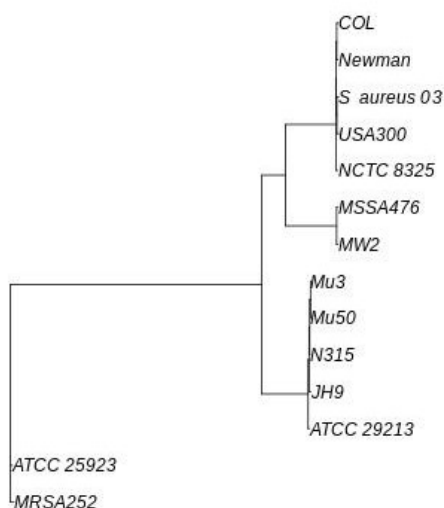
4.1 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE *S. aureus* 03

O rascunho do genoma de *S. aureus* 03 é composto por um contig de 2.598.718 pb, correspondendo ao cromossomo, um contig de 20.731 pb, correspondente a um plasmídeo, e outros quatro contigs, cada um menor que 3.500 pb. Foram anotadas 2.439 sequências codificadoras e 59 RNAs.

Quanto à tipagem molecular, a linhagem foi classificada com pertencente ao *spa* type t0008, e ao tipo de sequência (ST) 8, embora um dos sete alelos, *aroE*, tenha exibido um polimorfismo de nucleotídeo único.

Apesar de *S. aureus* 03 ser uma linhagem de *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA), é relacionada ao clone USA300 (Figura 4), uma linhagem de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) de ST8 e t008, a qual é amplamente disseminada na América do Norte e geralmente associada com infecções adquiridas na comunidade. (Diep et al., 2006) Essa mesma linhagem tem sido recentemente reportada em hospitais brasileiros. (Augusto et al., 2022; Silva et al., 2023; Whitaker et al., 2023)

Figura 4 – Árvore filogenética mostrando o posicionamento da linhagem *S. aureus* 03 em relação aos principais clones de *S. aureus*



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Foram identificados vários genes de virulência no genoma de *S. aureus* 03, como *hlgA*, *hlgB* e *hlgC*, codificando γ -hemolisina, *lukD* e *lukE*, codificando leucocidinas, *spIABCDEF*, codificando serino-proteases, e aureolisina. O locus da γ -hemolisina (*hlgACB*) está presente em quase todas as linhagens de *S. aureus*, e

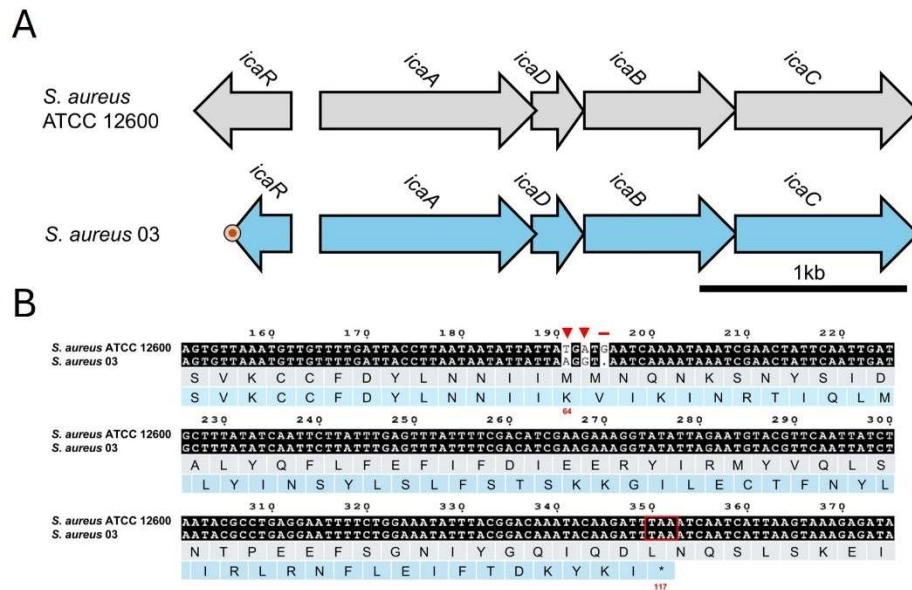
consiste em duas subunidades S (HlgA e HlgC) e uma subunidade F (HlgB). A combinação HlgAB é capaz de lisar tanto hemácias quanto leucócitos, enquanto HlgCB tem atividade primariamente leucotóxica. Embora seu papel na virulência de *S. aureus* não esteja completamente elucidado, acredita-se que γ -hemolisina auxilie o microrganismo na proliferação sanguínea por escapar de macrófagos através da sua lise, além da captura de nutrientes como ferro após a lise de células da linhagem vermelha. A leucotoxina LukED também apresenta atividade lítica contra leucócitos e hemácias, por outro lado, também é capaz de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Essa toxina bicomponente formadora de poros é amplamente disseminada, particularmente dentre as linhagens de *S. aureus* adquiridas na comunidade. (Zhu et al., 2023) A aureolisina é uma metaloprotease, enquanto o locus *spIABCDEF* codifica seis serino-proteases, todas secretadas. A função de todas essas proteases muitas das vezes permanece ainda contraditória, mas estudos recentes sugerem que sua ausência possa levar a um fenótipo hipervirulento. Isso porque pode ser que essas proteases regulem fatores de virulência, consequentemente controlando a severidade e a progressão da doença, além de desempenharem papéis na invasão bacteriana ao clivarem proteínas do hospedeiro. (Gimza et al., 2019, 2021)

Os replicons de plasmídeos que foram identificados pelo PlasmidFinder 2.1 incluíam *rep5a* e *rep16*, ambos presentes no contig de 20.731 pb. Esse mesmo contig também contém genes conferindo resistência ao cádmio e o gene *blaZ*, que confere resistência aos beta-lactâmicos. Esse plasmídeo de *S. aureus* 03 é similar a um membro da família Inc18, pSaa6159. (Kwong et al., 2017) Um dos contigs menores (<3.500 pb) contém o gene de replicação *rep10b*, embora nenhuma outra característica significativa tenha sido encontrada neste mesmo contig. O contig correspondente ao cromossomo de *S. aureus* 03 (2.598.718 pb) contém o gene *rep7c*, que poderia ser resultado de um evento de integração anterior.

A busca na base de dados ResFinder 4.6.0 identificou apenas o gene *blaZ* no genoma de *S. aureus* 03, que pode conferir resistência aos beta-lactâmicos. Tal fenótipo foi confirmado através do teste de difusão em disco de Penicilina G. Por outro lado, a busca na base de dados CARD identificou diversos genes relacionados a bombas de efluxo, como *ImrS* (relacionado à resistência aos macrolídeos, aminoglicosídeos, oxazolidinonas, diaminopirimidinas e fenicóis), *alrR* e *alrS* (relacionados à resistência às fluoroquinolonas e antissépticos), *mgrA* (relacionado à resistência às fluoroquinolonas, cefalosporinas, penams, tetraciclina, peptídeos e

antissépticos), *mepA* e *mepR* (relacionados à resistência às glicilciclinas e tetraciclina), *sdrM* (relacionado à resistência às fluoroquinolonas e antissépticos) e *sepA* (relacionado à resistência aos antissépticos). Apesar da detecção de tais genes, quando a resistência foi testada *in vitro* o fenótipo não foi confirmado na maioria dos casos. Por exemplo, apesar da presença de *lmrS*, de acordo com os resultados de difusão em disco a linhagem foi sensível ao cloranfenicol, ao trimetoprim e à eritromicina, e ainda sensível à gentamicina (CIM=0,25 mg/L), como determinado por microdiluição em caldo. Do mesmo modo, *S. aureus* 03 é sensível ao norfloxacino, apesar da presença de *mgrA* e *sdrM*, e à tetraciclina, apesar da presença de *mepA* e *mepR*. A única resistência detectada *in silico* que foi confirmada *in vitro*, além da resistência aos beta-lactâmicos, foi a resistência à rifampicina devido a uma mutação (H481N) em RpoB, que havia sido detectada pelo CARD. Ainda, de acordo com os resultados de Etest, a linhagem é sensível à vancomicina (CIM=1,5 mg/L).

Embora a maioria das linhagens de *S. aureus* produtoras de biofilme produzam uma matriz extracelular rica em PNAG, algumas podem produzir um biofilme independente de PNAG, baseado em um componente proteico. (Figueiredo et al., 2017; Toledo-Arana et al., 2005) Esse não é o caso de *S. aureus* 03, já que o operon *ica* completo (genes *icaADBC*) foi identificado no genoma da linhagem, confirmando que o biofilme produzido por ela contém PNAG e, portanto, pode ser degradado pelas enzimas da família GH20. Além disso, a linhagem apresenta um defeito no gene *icaR* devido a uma deleção da guanina 195, o que levou a uma mudança de quadro de leitura e resultou em um códon de parada prematuro (Figura 5). Essa mutação faz com que a proteína IcaR seja expressa com 116 aminoácidos, ao invés dos 186 aminoácidos originais. IcaR é um regulador de resposta da família TetR, e sabe-se que é capaz de reprimir fortemente a expressão do operon *ica*. (Peng et al., 2022) Assim, tal defeito no repressor IcaR pode explicar o fenótipo altamente mucóide observado na linhagem *S. aureus* 03, assim como já foi observado em outras linhagens de *S. aureus* por outros autores. (Schwartbeck et al., 2024)

Figura 5 – Operon *ica*

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: A - Comparação entre operon *ica* de *S. aureus* ATCC 12600 (genoma de referência: ASM1672758v1) e *S. aureus* 03; B – Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *icaR* enfatizando a região onde ocorre a deleção da guanina 195 em *S. aureus* 03 e a consequente alteração de quadro de leitura no regulador de resposta IcaR que leva ao término prematuro da expressão.

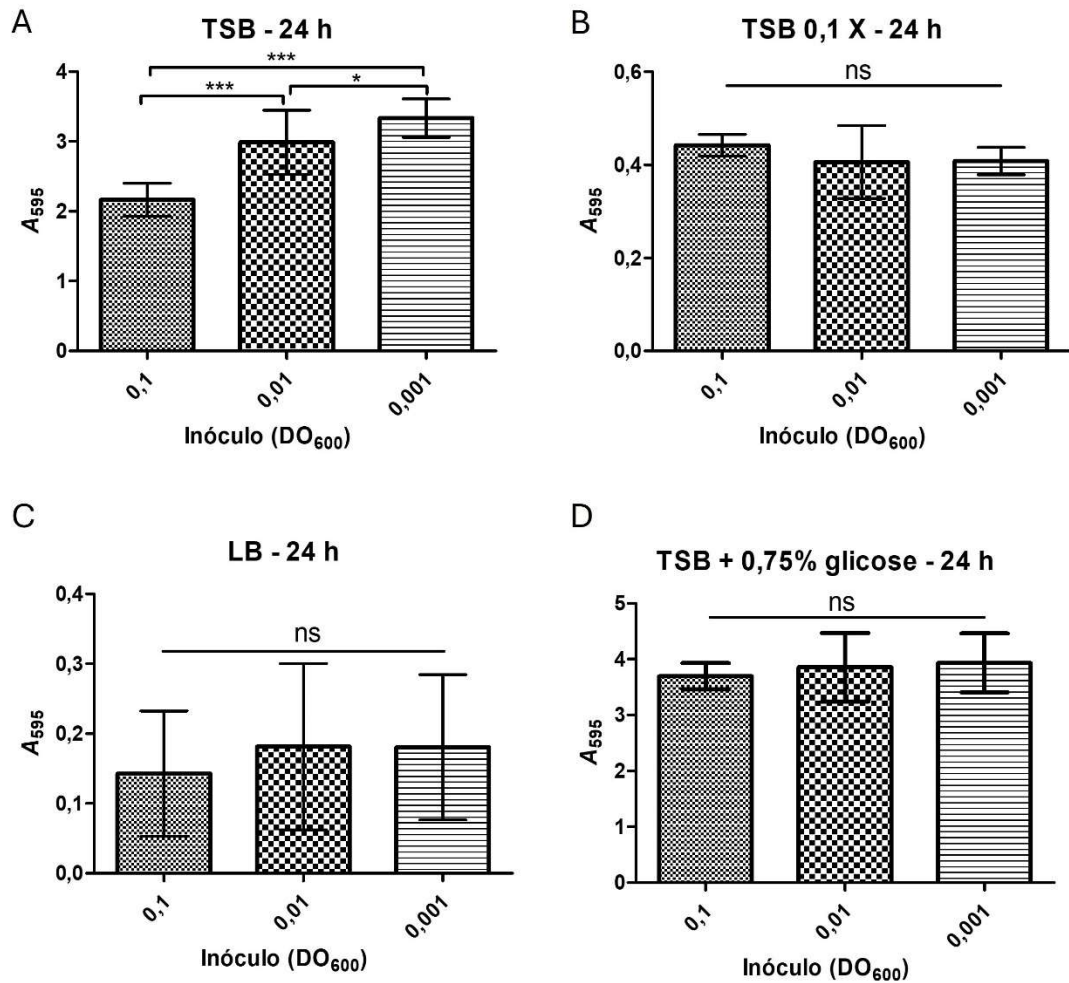
4.2 PADRONIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *S. aureus* 03

Quando o meio de cultura TSB foi utilizado para a formação do biofilme de *S. aureus* 03, com 24 horas de incubação foi obtida boa quantidade de biomassa, com as leituras de absorbância em 595 nm (A_{595}) após a coloração atingindo valores próximos a 3 para quaisquer dos três inóculos testados (Figura 6A), porém a figura muda quando o tempo de incubação é de 48 horas. Há uma queda brusca na quantidade de biomassa, para leituras de A_{595} próximas a 0,25 (Figura 7A). Uma das hipóteses que pode ser levantada na tentativa de se explicar tal fenômeno é que o biofilme atingiu sua maturidade e as células começaram a se dispersar na tentativa de colonizar novos nichos. Outra possibilidade é que os nutrientes tenham se esgotado e as células tenham iniciado a utilização de sua própria matriz extracelular de biofilme como fonte energética.

Com o emprego do meio de cultura TSB 10x diluído foram obtidas leituras de A_{595} próximas a 0,4 com 24 horas de incubação (Figura 6B), ou menores que 0,15 com 48 horas de incubação (Figura 7B), independentemente do inóculo utilizado. Portanto esse não seria um meio de cultura adequado para os ensaios posteriores.

Resultados semelhantes foram obtidos com o meio LB (Figuras 6C e 7C), confirmando que meios de cultura pobres não favorecem a formação de biofilme pela linhagem *S. aureus* 03.

Figura 6 – Quantificação de biomassa em biofilmes de *S. aureus* 03 crescidos por 24 h em diferentes meios de cultura e com diferentes quantidades de inóculo

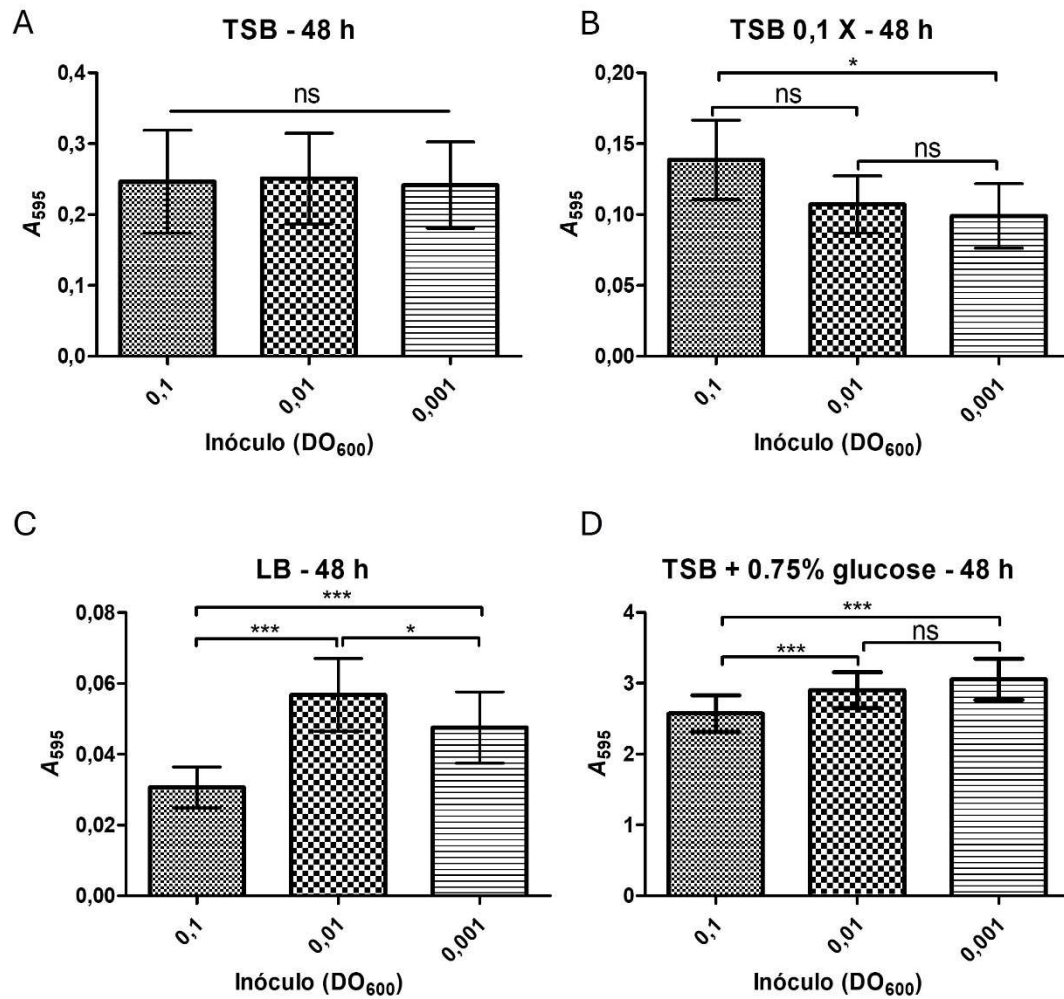


Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: A – Caldo Triptona de Soja; B – Caldo Triptona de Soja 10 x diluído; C - Caldo Luria-Bertani; D – Caldo Triptona de Soja suplementado com 0,75% de glicose. Barras representam o desvio-padrão; *P*-value < 0,05; ns - diferença não significativa.

Por outro lado, quando se utiliza TSB+G as leituras A_{595} ficam próximas de 4 após 24 horas de incubação (Figura 6D) e próximas a 3 com 48 horas de incubação (Figura 7D), o que representa uma boa quantidade de biomassa. Na Figura 8 é possível visualizar todas as etapas de coloração da biomassa para o experimento realizado após 48 horas de incubação para os meios de cultura TSB e TSB+G.

Figura 7 - Quantificação de biomassa em biofilmes de *S. aureus* 03 crescidos por 48 h em diferentes meios de cultura e com diferentes quantidades de inóculo

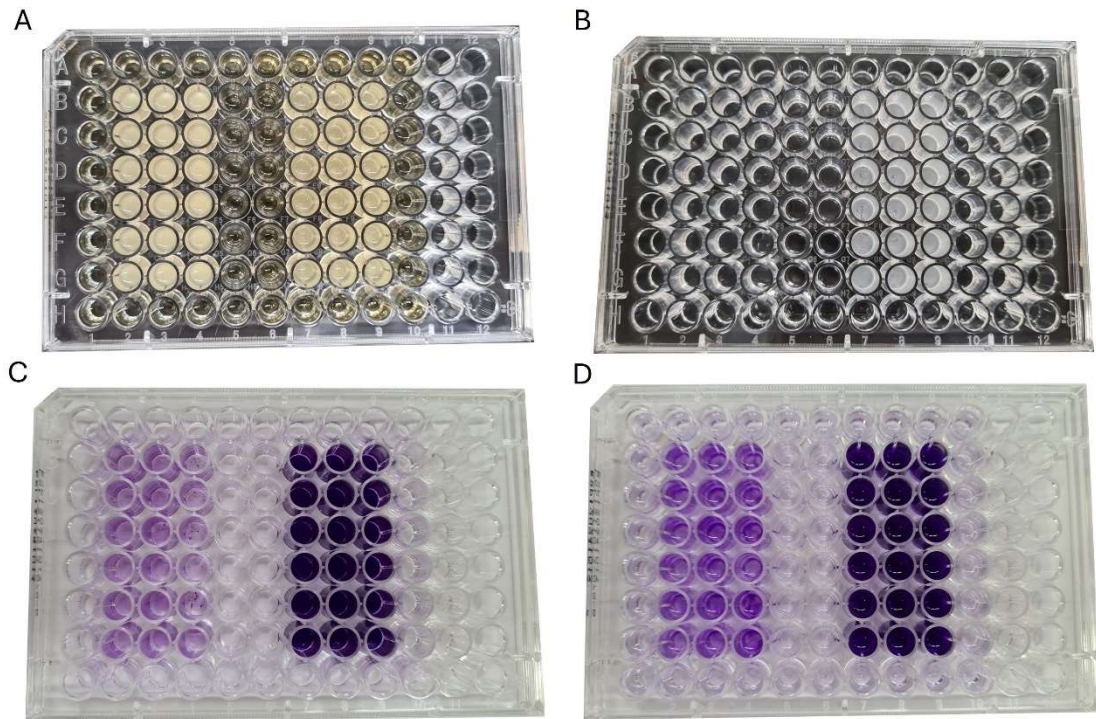


Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: A – Caldo Triptona de Soja; B – Caldo Triptona de Soja 10 x diluído; C - Caldo Luria-Bertani; D – Caldo Triptona de Soja suplementado com 0,75% de glicose. Barras representam o desvio-padrão; P -value < 0,05; ns - diferença não significativa.

Com 24 horas de incubação no meio de cultura TSB + G, não há diferença significativa quando se utilizam os diferentes inóculos, por isso a condição de formação de biofilme escolhida para os ensaios posteriores foi utilizando meio de cultura TSB + G, 24 horas de incubação e inóculo com $DO_{600}=0,01$ (Figura 9).

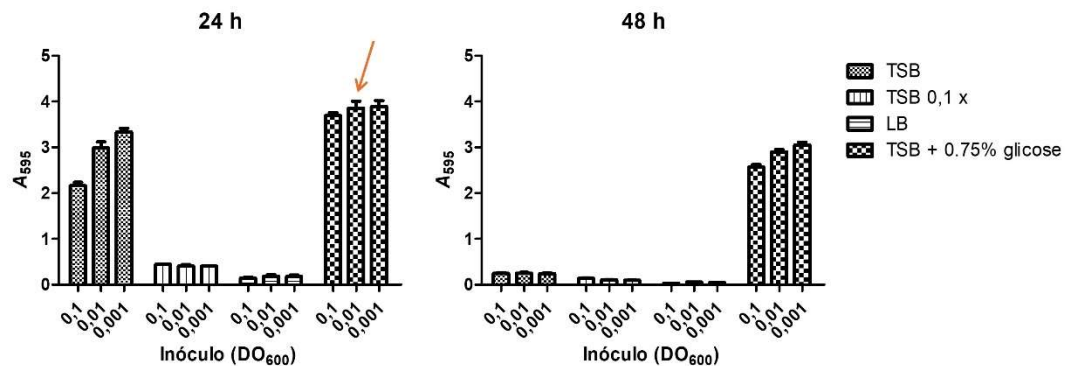
Figura 8 – Etapas envolvidas na coloração da biomassa do biofilme de *S. aureus* 03 para quantificação



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: Os poços da esquerda correspondem ao crescimento por 48 h em TSB, sendo que a colunas 2 a 4 correspondem aos inóculos com $DO_{600}=0,001$, $DO_{600}=0,01$ e $DO_{600}=0,1$, respectivamente. Os poços da direita correspondem ao crescimento por 48 h em TSB+G, sendo que a colunas 7 a 10 correspondem aos inóculos com $DO_{600}=0,001$, $DO_{600}=0,01$ e $DO_{600}=0,1$, respectivamente. A – Após crescimento do biofilme; B – Após lavagem do biofilme; C – Após coloração com Cristal Violeta; D – Após aplicação da solução descorante.

Figura 9 – Resumo da quantificação de biomassa dos biofilmes de *S. aureus* 03 crescidos por 24 ou 48 h em diferentes condições, indicando a condição escolhida para os ensaios posteriores



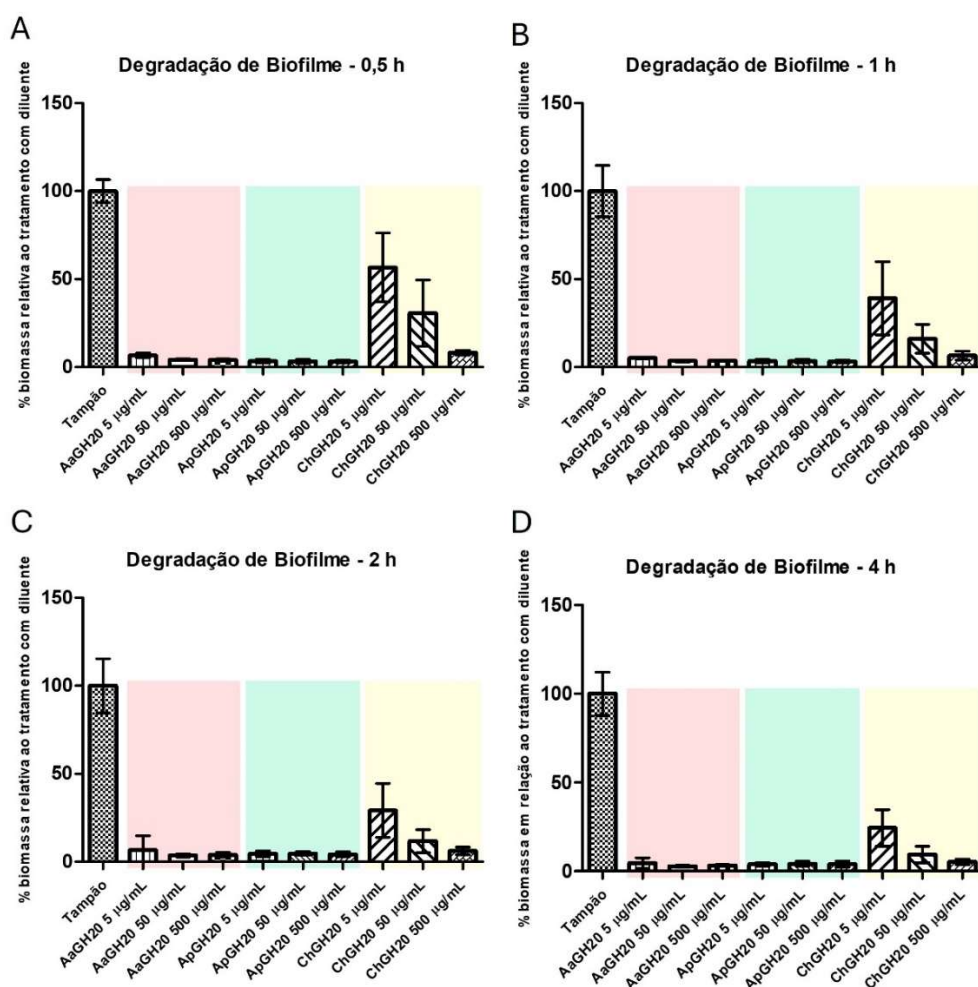
Fonte: Elaborada pela autora (2025).

4.3 DEGRADAÇÃO DO BIOFILME PRÉ-FORMADO DE *S. aureus* 03 POR ENZIMAS GH20

As enzimas AaGH20 e ApGH20 foram capazes de degradar quase que completamente o biofilme de *S. aureus* 03 com quaisquer das concentrações testadas, mesmo nos menores tempos de tratamento, resultando em redução na biomassa próxima a 97% (Figura 10).

Já no caso de ChGH20 observa-se uma atividade dependente de concentração, com a redução da biomassa variando desde aproximadamente 44% quando se utilizou 0,5 horas de tratamento com 5 µg/mL de enzima, até quase 95% quando a enzima a 500 µg/mL foi incubada sobre o biofilme por 4 horas (Figura 10).

Figura 10 – Quantificação de biomassa do biofilme de *S. aureus* 03 após tratamento com diferentes concentrações de AaGH20, ApGH20 ou ChGH20, relativa ao tratamento apenas com tampão



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: A – 0,5 h de tratamento, B – 1 h de tratamento, C – 2 h de tratamento, D – 4 h de tratamento.

Quando Kaplan et al. (2003) demonstraram a atividade de Dispersina B de *A. actinomycetemcomitans* pela primeira vez, os autores aplicaram-na sobre o biofilme desse mesmo microrganismo que produzia a enzima, na concentração de 50 µg/mL por 6 horas e observaram uma redução de biomassa de aproximadamente 85%. (Kaplan et al., 2003) No ano seguinte o mesmo grupo de pesquisa testou a performance da mesma enzima, mas desta vez sobre biofilme de *S. epidermidis*, e verificaram que um tratamento de 30 minutos com 40 µg/mL foi suficiente para degradar praticamente todo o biofilme. (Kaplan, Ragunath, et al., 2004)

Tais achados sugerem que quaisquer proteínas ortólogas da Dispersina B possam ser eficazes na degradação de biofilmes cuja composição primária seja de PNAG.

4.4 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *S. aureus* 03 POR ENZIMAS GH20

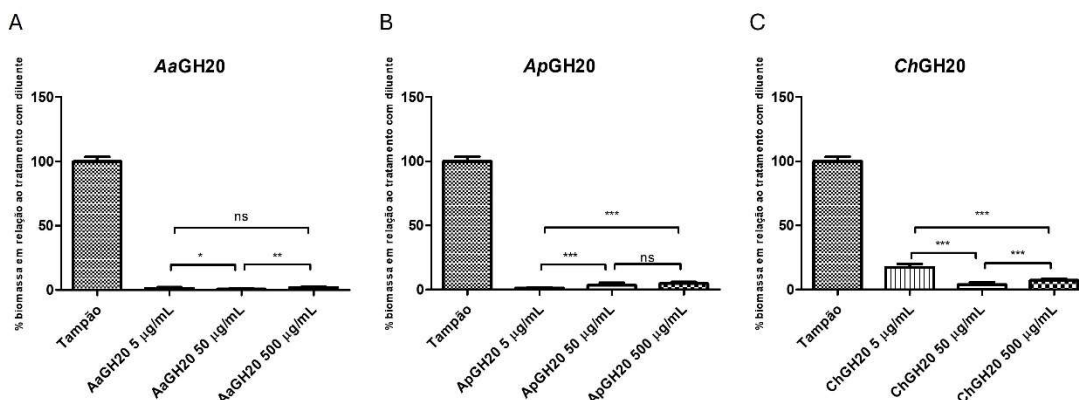
Similarmente à degradação do biofilme pré-formado, todas as enzimas foram capazes de significativamente reduzir a quantidade de biofilme formado quando adicionadas previamente ao desenvolvimento do biofilme de *S. aureus* 03 (Figura 11), e, do mesmo modo, AaGH20 e ApGH20 apresentaram melhores resultados com menores concentrações de enzima, quando comparadas à ChGH20. A inibição da formação de biofilme observada com o emprego de AaGH20 superou os 98% e foi maior que 95% com ApGH20, com quaisquer das concentrações testadas. Quando ChGH20 foi adicionada ao meio de cultura na concentração de 5 µg/mL, apenas 17,4% do biofilme de *S. aureus* 03 foi formado, enquanto quando foram utilizados 50 ou 500 µg/mL da mesma enzima, houve inibição maior que 93% em ambos os casos.

Indo de encontro com nossos resultados, Yu et al. demonstraram que a hidrolase de glicosídeos PslG, de *P. aeruginosa*, foi capaz não só de degradar biofilmes pré-formados de *P. aeruginosa*, como também de prevenir sua formação, ressaltando que essa é uma característica comum entre as hidrolases de glicosídeos ativas sobre biofilmes bacterianos. O estudo de Yu et al. ainda avaliou a possibilidade de essa inibição da formação de biofilme ser devida a algum tipo de impacto da enzima no crescimento das células bacterianas, porém o que eles observaram foi que a taxa de crescimento das células planctônicas de *P. aeruginosa* PA01 era similar na presença ou ausência de PslG, independente da concentração utilizada. Descartaram

também um impacto na fisiologia do microrganismo, ao avaliar a expressão de GFP (do inglês, *Green Fluorescent Protein*) em clones modificados de *P. aeruginosa* PA01 e o nível do segundo mensageiro di-GMP cíclico, tanto na presença e quanto na ausência de PslG. (Yu et al., 2015)

Assim, levando esses dados em consideração, provavelmente, conforme as moléculas de PNAG sejam sintetizadas, elas sejam imediatamente hidrolisadas pelas enzimas da família GH20, o que impede que o biofilme seja formado por *S. aureus* 03 devido à falta de seu componente majoritário. Porém, essa é apenas uma hipótese, e exige investigação mais aprofundada.

Figura 11 – Quantificação relativa da biomassa de biofilme de *S. aureus* 03 após experimento de inibição da formação de biofilme pelas enzimas em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: A – AaGH20, B – ApGH20 e C – ChGH20. Barras representam o desvio-padrão; P -value < 0,05; ns - diferença não significativa.

4.5 AÇÃO COMBINADA – PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO + ANTIMICROBIANO

As três enzimas, AaGH20, ApGH20 e ChGH20, quando usadas sozinhas, foram efetivas tanto em prevenir a formação de biofilme, quanto degradar biofilme pré-formado de *S. aureus* 03, além disso ainda foram capazes de melhorar a performance da gentamicina sobre o biofilme de *S. aureus* 03.

Embora gentamicina tenha um efeito bactericida rápido, esse aminoglicosídeo raramente é utilizado como monoterapia para tratar infecções estafilocócicas; normalmente seu uso é combinado com um inibidor de síntese de parede celular. De fato, quando gentamicina foi aplicada sobre o biofilme pré-formado

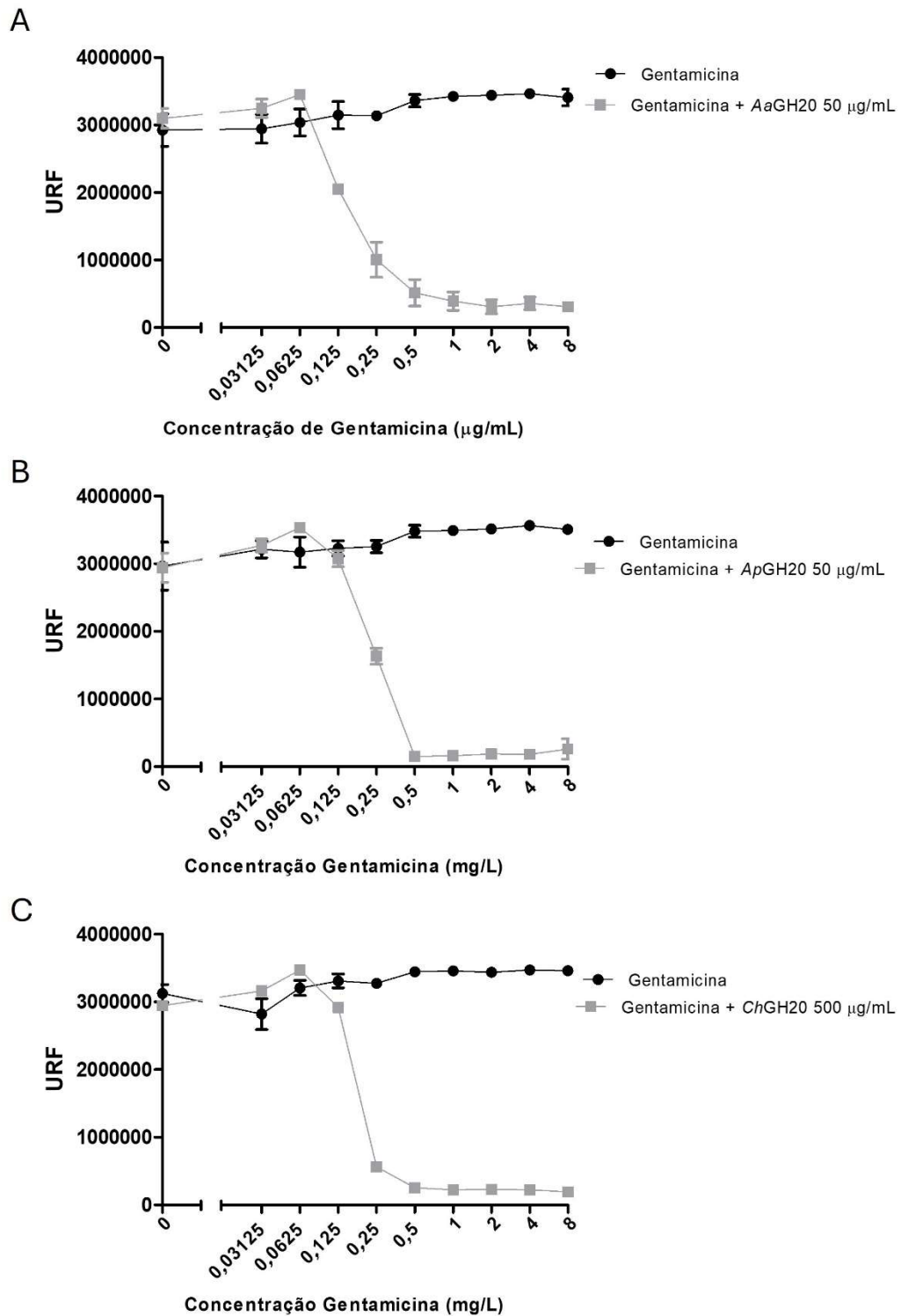
de *S. aureus* 03, esse antimicrobiano foi incapaz de matar as células bacterianas, mesmo em concentrações maiores que 8 mg/L (dados não mostrados).

Por outro lado, quando o biofilme foi pré-tratado por 1 hora com 50 µg/mL de AaGH20, ou ApGH20, ou 500 µg/mL de ChGH20, 0,5 mg/L de gentamicina foram capazes de eliminar as células bacterianas remanescentes (Figura 12), o que representa uma diminuição na Concentração de Erradicação de Biofilme Mínima (CEBM) maior que 16 vezes. Resultados semelhantes foram reportados recentemente por Kaplan et al. sobre biofilmes de *Cutibacterium acnes*, o agente etiológico da acne vulgaris. O primeiro passo dos autores foi confirmar que a matriz extracelular do biofilme de tal espécie bacteriana continha PNAG, então eles demonstraram que Dispersina B, de *A. actinomycetemcomitans*, era capaz de diminuir a tolerância à tetraciclina nesses biofilmes. (Kaplan, Cywes-Bentley, et al., 2024) Esse efeito não é limitado às enzimas do tipo Dispersina B. Por exemplo, um estudo que combinou o uso de um coquetel enzimático contendo uma endo-1,4-β-D-glucanase, uma β-1,6-hexosaminidase e uma endonuclease RNA/DNA não-específica com vários antibióticos demonstrou um efeito sinérgico sobre biofilmes de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, em modelos de prótese articular. (Poilvache et al., 2021) De modo semelhante, uma combinação de celulase com ceftazidima reduziu a CEBM em biofilmes de *P. aeruginosa* de 32 a 128 vezes. (Kamali et al., 2021)

Talvez seja esse o caminho para o futuro da antibioticoterapia, já que, apesar dos grandes esforços para a descoberta de novas moléculas ativas, as bactérias podem rapidamente desenvolver resistência após a introdução de novos antimicrobianos no mercado, o que acaba limitando os investimentos no desenvolvimento de novos antibióticos. (Anderson et al., 2023; Brüssow, 2024) Considerando isso, uma maneira de reestabelecer a eficácia de antibióticos seria seu uso combinado com enzimas, e desse modo tornar possível o tratamento de infecções causadas por biofilmes resistentes à antibioticoterapia convencional.

É de extrema importância mencionar o fato de que utilizar agentes dispersivos de biofilmes, como é o caso das hidrolases de glicosídeos, sem combiná-los com agentes antimicrobianos pode ter efeitos nocivos. Isso porque o rompimento do biofilme pode vir a liberar um grande número de células microbianas no sítio de infecção, e que eventualmente poderiam atingir a corrente sanguínea, causando uma sobrecarga no sistema imune e aumentando o risco de disseminação da infecção e até mesmo de septicemia. (Fleming & Rumbaugh, 2018)

Figura 12 – Efeito do pré-tratamento enzimático na atividade de gentamicina sobre o biofilme de *S. aureus* 03



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: A – Pré-tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$ de AaGH20; B – Pré-tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$ de ApGH20; C – Pré-tratamento com 500 $\mu\text{g/mL}$ de ChGH20. Barras representam os desvios-padrão. UFR - Unidades de Fluorescência Relativa.

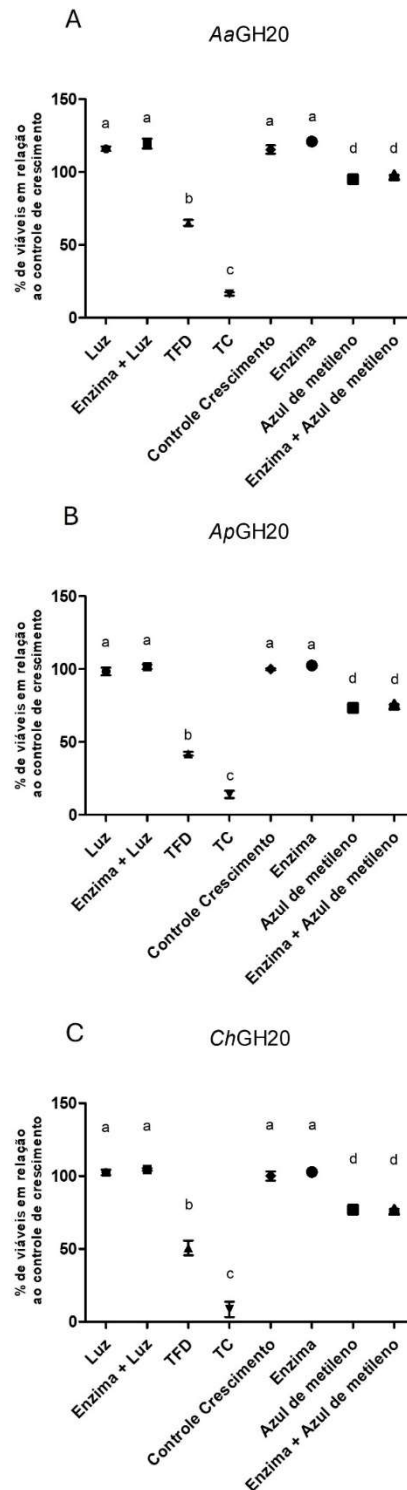
4.6 AÇÃO COMBINADA – PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO + TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

Seguindo o raciocínio explanado na seção anterior, de que é preciso combinar o uso de enzimas dispersoras de biofilmes com um agente antimicrobiano, a TFDa foi avaliada como alternativa aos antibióticos convencionais.

Na figura 13 é possível visualizar que, como esperado, os tratamentos-controle, que utilizaram apenas luz, enzima com irradiação e apenas enzima mantiveram a viabilidade das células bacterianas em níveis comparáveis aos do controle de crescimento. A presença do fotossensibilizador por si só foi prejudicial às células, como é possível observar nos resultados dos grupos tratados com AM ou enzima e AM, que não foram expostos à luz. Porém, uma redução mais significativa na viabilidade bacteriana foi observada no grupo que foi submetido à TFDa, e um efeito ainda maior no grupo submetido à terapia combinada (enzima + TFDa).

Assim, é possível afirmar que o pré-tratamento enzimático melhora a eficácia da TFDa sobre o biofilme de *S. aureus* 03, abrindo precedente para que essa abordagem possa ser mais explorada para uso em biofilmes de outros microrganismos.

Figura 13 – Efeito do pré-tratamento enzimático na atividade antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica sobre o biofilme de *S. aureus* 03



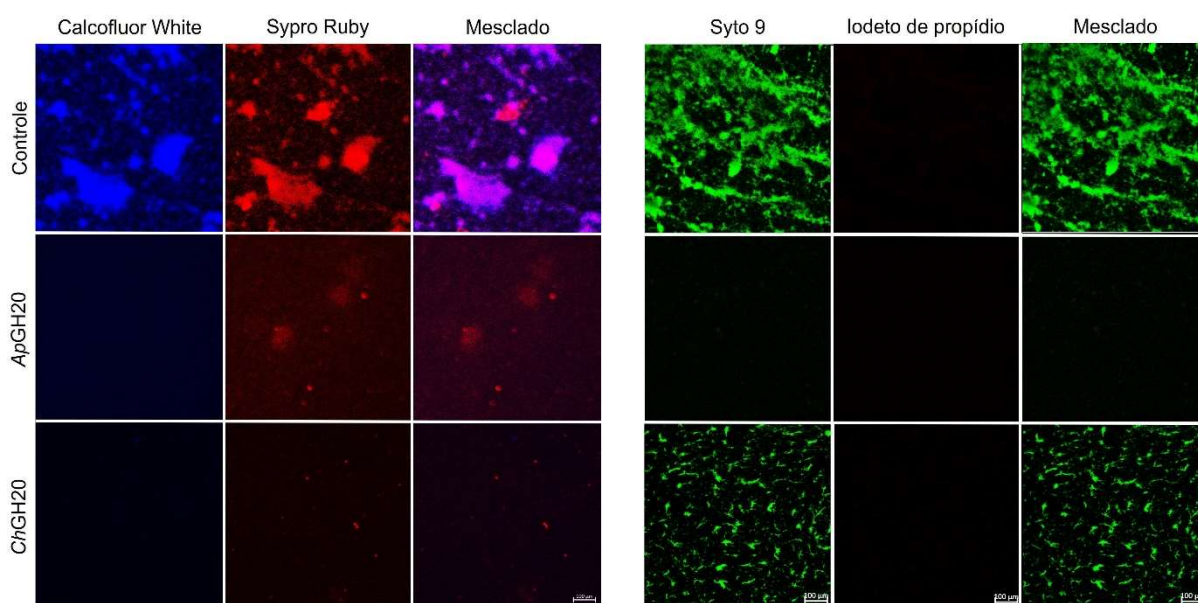
Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: A – Pré-tratamento com 50 µg/mL de *AaGH20*; B – Pré-tratamento com 50 µg/mL de *ApGH20*; C – Pré-tratamento com 50 µg/mL de *ChGH20*. *P*-value < 0,05; Diferentes letras significam diferença estatisticamente significativa na ANOVA unidirecional com teste de comparações múltiplas de Tukey. TFD: Terapia Fotodinâmica; TC: Terapia Combinada.

4.7 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER

As imagens de MCVL do biofilme não tratado de *S. aureus* 03 mostram a presença tanto de carboidratos (detectados por fluorescência azul após coloração com Calcofluor White) quanto de proteínas (detectadas por fluorescência vermelha após coloração com SYPRO Ruby) na sua matriz extracelular (Figura 14). Após tratamento enzimático com *ApGH20* ou *ChGH20* a fração de carboidratos praticamente desaparece, enquanto a fração proteica permanece, ainda que sua intensidade diminua, provavelmente por grande parte ser levada juntamente com os carboidratos desagregados enzimaticamente, durante as etapas de lavagem.

Figura 14 – Imagens de microscopia confocal de varredura à laser da degradação do biofilme de *S. aureus* 03 por *ApGH20* e *ChGH20*.



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: A matriz proteica é mostrada em vermelho e os carboidratos são mostrados em azul, após coloração com SYPRO Ruby e Calcofluor White, respectivamente. As células viáveis são detectadas no canal de fluorescência verde, enquanto as células não-viáveis são identificadas no canal de fluorescência vermelha.

Quanto à viabilidade celular, observamos que praticamente não há células não-viáveis no biofilme controle. Quando há tratamento com *ApGH20*, por ser mais eficaz que o tratamento com *ChGH20*, as células provavelmente também são levadas durante as etapas de lavagem. Já o tratamento com *ChGH20*, por ser mais brando, faz com que algumas células viáveis ainda permaneçam aderidas ao biofilme no fundo da microplaca.

5 CONCLUSÃO

Dada a limitada eficácia da maioria dos antibióticos em tratar infecções causadas por biofilmes bacterianos, o uso de hidrolases de glicosídeos oferece uma alternativa promissora para restabelecer sua efetividade. Essa estratégia é particularmente útil no atual cenário, onde vivenciamos investimentos insuficientes no desenvolvimento de novos antimicrobianos.

As hidrolases de glicosídeos estudadas no presente trabalho, AaGH20, ApGH20 e ChGH20, foram efetivas tanto em inibir a formação quanto em degradar biofilme pré-formado de uma linhagem de *S. aureus* isolada de infecção humana (*S. aureus* 03). Esse efeito foi observado devido ao fato de que a matriz extracelular do biofilme de *S. aureus* 03 é primariamente composta por polissacarídeos, como observado nas imagens de MCVL, e tal polissacarídeo refere-se à PNAG, como confirmado na análise genômica do operon *ica* da linhagem, que inclusive mostrou um defeito no seu repressor, o que leva a uma produção mais abundante do biopolímero. Essa especificidade é uma característica-chave das enzimas e enfatiza a importância da escolha da enzima mais apropriada para degradar um determinado biofilme, a depender da sua composição e da espécie bacteriana envolvida, ou mesmo linhagem de uma determinada espécie.

É fato bem estabelecido que as infecções causadas por biofilmes, sejam em humanos ou em animais, muitas vezes são multiespécie. Esse é um fator a ser considerado em investigações futuras, que possam requerer o emprego de coquetéis enzimáticos para atacar os biofilmes do mundo real.

Apesar dessas considerações, os achados do presente estudo podem ser considerados de importância significativa. Eles destacam uma abordagem alternativa para tratar infecções causadas por biofilmes estafilocócicos. Notavelmente, a Concentração de Erradicação de Biofilme Mínima para gentamicina após o tratamento enzimático fez com que o interesse neste antimicrobiano fosse reavivado. Apesar de raramente ser utilizado para tratar esse tipo de infecções, trata-se de um antimicrobiano de fácil produção, além de possuir mecanismo de ação e toxicidade bem estabelecidos.

Além de melhorar a eficácia de um antibiótico, a adição das enzimas previamente à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com azul de metileno foi capaz

de torná-la também mais eficaz em diminuir a viabilidade das células de *S. aureus* 03 na forma de biofilme.

Enquanto pesquisas mais aprofundadas são necessárias para identificar combinações ótimas de enzimas e terapias antimicrobianas para casos específicos, os presentes esforços se mostram importantes dados os desafios que estão sendo impostos pelas doenças infecciosas.

Os resultados dessa pesquisa abrem perspectivas promissoras para o avanço de novas investigações nesta área da ciência. É essencial obter dados sobre outras enzimas que atuam em biofilmes de diferentes microrganismos, a fim de ampliar nosso conhecimento e, assim, possibilitar o desenvolvimento de misturas, como coquetéis enzimáticos, com uma ação mais eficaz contra biofilmes microbianos, que frequentemente são de natureza multiespécie.

Embora essa tarefa não seja simples, pois cada enzima possui uma faixa específica de temperatura e pH para sua atividade ótima, ela não é impossível. A vasta biodiversidade disponível para a descoberta de novas enzimas e o significativo conhecimento biotecnológico adquirido até hoje oferecem as condições necessárias para modificar enzimas e adaptá-las a perfis específicos de ação.

Trata-se de um trabalho extremamente laborioso, devido à grande quantidade de variáveis a serem consideradas, mas que se faz absolutamente necessário, especialmente diante da escassez de opções de tratamento para algumas infecções.

Além de seu apelo médico, os biofilmes também representam um desafio significativo em várias indústrias, afetando tubulações, caixas d'água e equipamentos, entre outras superfícies. Dessa forma, investimentos de setores além da área da saúde podem acelerar o desenvolvimento de soluções inovadoras para o controle de biofilmes, como é o caso da erradicação por enzimas.

REFERÊNCIAS

- Alcock, B. P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K. W., Raphenya, A. R., Wlodarski, M. A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S. A., Tsang, K. K., Baker, S. J. C., Dave, M., Mccarthy, M. C., Mukiri, K. M., Nasir, J. A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., ... Mcarthur, A. G. (2023). CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D690–D699. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC920>
- Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L. M. T., & Chikindas, M. L. (2017a). Control of Biofilm Formation: Antibiotics and Beyond. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.02508-16>
- Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L. M. T., & Chikindas, M. L. (2017b). Control of Biofilm Formation: Antibiotics and Beyond. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.02508-16>
- Anderson, M., Panteli, D., van Kessel, R., Ljungqvist, G., Colombo, F., & Mossialos, E. (2023). Challenges and opportunities for incentivising antibiotic research and development in Europe. *The Lancet Regional Health - Europe*, 33, 100705. <https://doi.org/10.1016/J.LANEPE.2023.100705>
- Augusto, M. F., da Silva Fernandes, D. C., de Oliveira, T. L. R., Cavalcante, F. S., Chamon, R. C., Ferreira, A. L. P., Nouér, S. A., Rangel, A. P., Castiñeiras, A. C., Gonçalves, C. M., Freire, J., Guimarães, L. F., Batista, R., & dos Santos, K. R. N. (2022). Pandemic clone USA300 in a Brazilian hospital: detection of an emergent lineage among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from bloodstream infections. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 11(1), 114. <https://doi.org/10.1186/S13756-022-01154-3>
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., ... Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75/TABLES/3>
- Bartels, M. D., Petersen, A., Worning, P., Nielsen, J. B., Lerner-Svensson, H., Johansen, H. K., Andersen, L. P., Jarløv, J. O., Boye, K., Larsen, A. R., & Westh, H. (2014). Comparing Whole-Genome Sequencing with Sanger Sequencing for spa Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(12), 4305. <https://doi.org/10.1128/JCM.01979-14>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.1.235>. Disponível em: <https://www.rcsb.org/>. Acesso em: 30 jul. 25.

- Bertels, F., Silander, O. K., Pachkov, M., Rainey, P. B., & Van Nimwegen, E. (2014). Automated Reconstruction of Whole-Genome Phylogenies from Short-Sequence Reads. *Molecular Biology and Evolution*, 31(5), 1077–1088. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSU088>
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., ... Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA345>,
- Brüssow, H. (2024). The antibiotic resistance crisis and the development of new antibiotics. *Microbial Biotechnology*, 17(7). <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14510>
- Cabral, F. V., dos Santos Souza, T. H., Sellera, F. P., Fontes, A., & Ribeiro, M. S. (2023). Strengthening collaborations at the Biology-Physics interface: trends in antimicrobial photodynamic therapy. *Biophysical Reviews*, 15(4), 685. <https://doi.org/10.1007/S12551-023-01066-5>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>,
- Camilo, C. M., & Polikarpov, I. (2014). High-throughput cloning, expression and purification of glycoside hydrolases using Ligation-Independent Cloning (LIC). *Protein Expr Purif*, 99, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.03.008>
- Carattoli, A., Zankari, E., Garcíá-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F. M., & Hasman, H. (2014). In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>,
- Chan, H., Martin S Pavelka, J., & Baran, T. M. (2023). Methylene blue photodynamic therapy of bacterial species found in human abscesses: Planktonic, biofilm, and 3D silicone models. *Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering*, 12358, 1235805. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10538236/>
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547–569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- Clinical Laboratory Standards Institute. (2020). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*.
- Costa, P., Gomes, A. T. P. C., Braz, M., Pereira, C., & Almeida, A. (2021). Application of the Resazurin Cell Viability Assay to Monitor *Escherichia coli* and

Salmonella Typhimurium Inactivation Mediated by Phages. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10080974>

Dabul, A. N. G., Carrasco, L. D. de M., Carrasco, F. R., & Camargo, I. L. B. da C. (2020). Capítulo 50 – Antibacterianos que agem na síntese de proteínas. In P. C. J. de L. Santos (Ed.), *Livro-texto de Farmacologia* (1st ed., Vol. 1, pp. 797–815). Editora Atheneu Ltda.

de Aquino Júnior, A. E., Carbinatto, F. M., & Bagnato, V. S. (2023). Fotossensibilizadores. In A. E. de Aquino Júnior (Ed.), *Simplificando a Terapia Fotodinâmica para Profissionais da Saúde* (1st ed.). Gráfica IFSC/USP.

de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 16(5), 580–589. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.013>

Diep, B. A., Gill, S. R., Chang, R. F., Phan, T. H. Van, Chen, J. H., Davidson, M. G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H. A., Mongodin, E. F., Sensabaugh, G. F., & Perdreau-Remington, F. (2006). Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet (London, England)*, 367(9512), 731–739. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68231-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68231-7)

Drula, E., Garron, M. L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B., & Terrapon, N. (2022). The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D571–D577. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB1045>. Disponível em: <https://www.cazy.org/>. Acesso em 30 jul. 25.

Du, B., Wang, S., Chen, G., Wang, G., & Liu, L. (2022). Nutrient starvation intensifies chlorine disinfection-stressed biofilm formation. *Chemosphere*, 295. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.133827>

Figueiredo, A. M. S., Ferreira, F. A., Beltrame, C. O., & Côrtes, M. F. (2017). The role of biofilms in persistent infections and factors involved in ica-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(5), 602–620. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1282941>

Fleming, D., & Rumbaugh, K. (2018). The Consequences of Biofilm Dispersal on the Host. *Scientific Reports 2018 8:1*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29121-2>

François, P., Schrenzel, J., & Götz, F. (2023). Biology and Regulation of Staphylococcal Biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/IJMS24065218>

Gimza, B. D., Jackson, J. K., Frey, A. M., Budny, B. G., Chaput, D., Rizzo, D. N., & Shaw, L. N. (2021). Unraveling the Impact of Secreted Proteases on

Hypervirulence in *Staphylococcus aureus*. *MBio*, 12(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1128/MBIO.03288-20>

Gimza, B. D., Larias, M. I., Budny, B. G., & Shaw, L. N. (2019). Mapping the Global Network of Extracellular Protease Regulation in *Staphylococcus aureus*. *MSphere*, 4(5), e00676-19. <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00676-19>

Haney, E. F., Trimble, M. J., & Hancock, R. E. W. (2021). Microtiter plate assays to assess antibiofilm activity against bacteria. *Nature Protocols*, 16(5), 2615–2632. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00515-3>

Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C. E., & Stanley-Wall, N. R. (2015). Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(5), 649.
<https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUV015>

Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Aguilar, G. R., Sharara, F., Mestrovic, T., Gray, A. P., Weaver, N. D., Wool, E. E., Han, C., Hayoon, A. G., Aali, A., Abate, S. M., Abbasi-Kangevari, M., Abbasi-Kangevari, Z., Abd-Elsalam, S., Abebe, G., Abedi, A., Abhari, A. P., Abidi, H., ... Naghavi, M. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 400(10369), 2221–2248.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02185-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02185-7)

Ito, T., Hiramatsu, K., Oliveira, D. C., De Lencastre, H., Zhang, K., Westh, H., O'Brien, F., Giffard, P. M., Coleman, D., Tenover, F. C., Boyle-Vavra, S., Skov, R. L., Enright, M. C., Kreiswirth, B., Kwan, S. K., Grundmann, H., Laurent, F., Sollid, J. E., Kearns, A. M., ... Soderquist, B. (2009). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): Guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 4961–4967. <https://doi.org/10.1128/AAC.00579-09>,

Kamali, E., Jamali, A., Izanloo, A., & Ardebili, A. (2021). In vitro activities of cellulase and ceftazidime, alone and in combination against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *BMC Microbiology*, 21(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/S12866-021-02411-Y/TABLES/3>

Kaplan, J. B., Cywes-Bentley, C., Pier, G. B., Yakandawala, N., Sailer, M., Edwards, M. S., & Kridin, K. (2024). Poly- β -(1 $\rightarrow$ 6)-N-acetyl-D-glucosamine mediates surface attachment, biofilm formation, and biocide resistance in *Cutibacterium acnes*. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1386017.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2024.1386017/BIBTEX>

Kaplan, J. B., Ragunath, C., Ramasubbu, N., & Fine, D. H. (2003). Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Biofilm Cells by an Endogenous β -Hexosaminidase Activity. *Journal of Bacteriology*, 185(16), 4693.
<https://doi.org/10.1128/JB.185.16.4693-4698.2003>

Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H., & Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic Detachment of *Staphylococcus epidermidis* Biofilms.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48(7), 2633.

<https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2633-2636.2004>

Kaplan, J. B., Sukhishvili, S. A., Sailer, M., Kridin, K., & Ramasubbu, N. (2024). Aggregatibacter actinomycetemcomitans Dispersin B: The Quintessential Antibiofilm Enzyme. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 13(8).

<https://doi.org/10.3390/PATHOGENS13080668>

Kaplan, J. B., Velliyagounder, K., Ragunath, C., Rohde, H., Mack, D., Knobloch, J. K. M., & Ramasubbu, N. (2004). Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in Actinobacillus actinomycetemcomitans and Actinobacillus pleuropneumoniae biofilms. *Journal of Bacteriology*, 186(24), 8213–8220. <https://doi.org/10.1128/JB.186.24.8213-8220.2004>

Karimzadeh, I., Abdollahpour-Alitappeh, M., Ghaffari, S., Mahi-Birjand, M., Barkhordari, A., & Alemzadeh, E. (2023). Aminoglycosides: Single- or Multiple-daily Dosing? An Updated Qualitative Systematic Review of Randomized Trials on Toxicity and Efficacy. *Current Molecular Medicine*, 24(11), 1358–1373.

<https://doi.org/10.2174/1566524023666230801160452>

Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668–681. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2020.03.016>

Kwong, S. M., Ramsay, J. P., Jensen, S. O., & Firth, N. (2017). Replication of staphylococcal resistance plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 316207. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02279/BIBTEX>

Lade, H., Park, J. H., Chung, S. H., Kim, I. H., Kim, J. M., Joo, H. S., & Kim, J. S. (2019). Biofilm Formation by Staphylococcus aureus Clinical Isolates is Differentially Affected by Glucose and Sodium Chloride Supplemented Culture Media. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/JCM8111853>

Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1355–1361. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>,

Li, Y., Xiao, P., Wang, Y., & Hao, Y. (2020). Mechanisms and Control Measures of Mature Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents in the Clinical Context. *ACS Omega*, 5(36), 22684–22690. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02294>

O'Neill, J. (2016). *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*.

Penesyan, A., Paulsen, I. T., Kjelleberg, S., & Gillings, M. R. (2021). Three faces of biofilms: a microbial lifestyle, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 80.

<https://doi.org/10.1038/s41522-021-00251-2>

- Peng, Q., Tang, X., Dong, W., Sun, N., & Yuan, W. (2022). A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism. *Antibiotics*, 12(1), 12. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12010012>
- Poilvache, H., Ruiz-Sorribas, A., Cornu, O., & van Bambeke, F. (2021). In vitro study of the synergistic effect of an enzyme cocktail and antibiotics against biofilms in a prosthetic joint infection model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(4). https://doi.org/10.1128/AAC.01699-20/SUPPL_FILE/AAC.01699-20-S0001.PDF
- Ramadhan, A. A., & Hegedus, E. (2005). Biofilm formation and esp gene carriage in enterococci. *Journal of Clinical Pathology*, 58(7), 685–686. <https://doi.org/10.1136/JCP.2004.024109>
- Redman, W. K., Welch, G. S., & Rumbaugh, K. P. (2020). Differential Efficacy of Glycoside Hydrolases to Disperse Biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 379. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00379/BIBTEX>
- Roux, D., Cywes-Bentley, C., Zhang, Y.-F., Pons, S., Konkol, M., Kearns, D. B., Little, D. J., Howell, P. L., Skurnik, D., & Pier, G. B. (2015). Identification of Poly-N-acetylglucosamine as a Major Polysaccharide Component of the *Bacillus subtilis* Biofilm Matrix. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(31), 19261–19272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.648709>
- Schwartbeck, B., Rumpf, C. H., Hait, R. J., Janssen, T., Deiwick, S., Schwierzeck, V., Mellmann, A., & Kahl, B. C. (2024). Various mutations in icaR, the repressor of the icaADBC locus, occur in mucoid *Staphylococcus aureus* isolates recovered from the airways of people with cystic fibrosis. *Microbes and Infection*, 26(4), 105306. <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2024.105306>
- Silva, N. C., de Souza, M. C., Tonini, M. A. L., & Schuenck, R. P. (2023). Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 ST8/PVL-positive in breast infections in a Brazilian region. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 106(1), 115919. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2023.115919>
- Spesia, M. B., & Durantini, E. N. (2023). Photosensitizers combination approach to enhance photodynamic inactivation of planktonic and biofilm bacteria. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 22(10), 2433–2444. <https://doi.org/10.1007/S43630-023-00461-X/FIGURES/7>
- Syed, A. K., Baral, R., Van Vlack, E. R., Gil-Marqués, M. L., Lenhart, T., Hooper, D. C., Kahne, D., Losick, R., & Bradshaw, N. (2024). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* is triggered by a drop in the levels of a cyclic dinucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(52). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2417323121>
- Toledo-Arana, A., Merino, N., Vergara-Irigaray, M., Débarbouillé, M., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2005). *Staphylococcus aureus* Develops an Alternative, ica-Independent Biofilm in the Absence of the arlRS Two-Component System.

Journal of Bacteriology, 187(15), 5318. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5318-5329.2005>

Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R. C., & Arenas, J. (2020). Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(1), 1–36. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10010003>

Waldrop, R., McLaren, A., Calara, F., & McLemore, R. (2014). Biofilm growth has a threshold response to glucose in vitro. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 472(11), 3305–3310. <https://doi.org/10.1007/S11999-014-3538-5>

Weiner-Lastinger, L. M., Abner, S., Edwards, J. R., Kallen, A. J., Karlsson, M., Magill, S. S., Pollock, D., See, I., Soe, M. M., Walters, M. S., & Dudeck, M. A. (2020). Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 41(1), 1–18. <https://doi.org/DOI: 10.1017/ice.2019.296>

Whitaker, C. de O., Chamon, R. C., de Oliveira, T. L. R., Nouér, S. A., & dos Santos, K. R. N. (2023). Systemic infection caused by the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300-LV lineage in a Brazilian child previously colonized. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 27(2), 102737. <https://doi.org/10.1016/J.BJID.2022.102737>

Xu, F., Hu, K., Mohsin, A., Wu, J., Su, L., Wang, Y., Ben, R., Gao, H., Tian, X., & Chu, J. (2024). Recent advances in the biosynthesis and production optimization of gentamicin: A critical review. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 10(1), 247. <https://doi.org/10.1016/J.SYNBIO.2024.11.003>

Yu, S., Su, T., Wu, H., Liu, S., Wang, D., Zhao, T., Jin, Z., Du, W., Zhu, M. J., Chua, S. L., Yang, L., Zhu, D., Gu, L., & Ma, L. Z. (2015). PslG, a self-produced glycosyl hydrolase, triggers biofilm disassembly by disrupting exopolysaccharide matrix. *Cell Research*, 25(12), 1352–1367. <https://doi.org/10.1038/CR.2015.129>

Zhu, Z., Hu, Z., Li, S., Fang, R., Ono, H. K., & Hu, D. L. (2023). Molecular Characteristics and Pathogenicity of *Staphylococcus aureus* Exotoxins. *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol. 25, Page 395, 25(1), 395. <https://doi.org/10.3390/IJMS25010395>