



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

KARINA MAYUMI MORI

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA
EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO GENE AGR-C EM
STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

Araraquara, SP

2024

KARINA MAYUMI MORI

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA
EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO GENE AGR-C EM
STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro(a) de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Coorientador(a): Me. Rafael Bianchini Fulindi

Araraquara, SP

2024

M854p

Mori, Karina Mayumi.

Padronização de metodologia para avaliação da expressão diferencial do gene agr-C em *Staphylococcus aureus* / Karina Mayumi Mori. – Araraquara, 2024.

56 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Paulo Inácio da Costa.

Coorientador: Rafael Bianchini Fulindi.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Sistema agr. 3. AgrC. 4. RT-PCR em tempo real. 5. Expressão diferencial. 6. Nanopartículas. 7. Óxido de zinco. 7. Sulfeto de zinco. I. Costa, Paulo Inácio da, orient. II. Fulindi, Rafael Bianchini, coorient. III. Título.

KARINA MAYUMI MORI

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO
DIFERENCIAL DO GENE AGR-C EM STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharel(a) em Engenharia de bioprocessos e biotecnologia.

Área de Concentração:

Data da defesa: 27/05/2024

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Rualdo Valderrama Filho
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Eloise Trostdorf Monteiro Filardi
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Aline Reis
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Me. Lorrane Davi Brito
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Resumo

Staphylococcus aureus é um patógeno oportunista humano que coloniza as fossas nasais, a pele e o intestino de grande parte da população e provoca diversas doenças. A formação de biofilme por essa bactéria representa um grave problema clínico devido à resistência aos antibióticos que tal estrutura proporciona, além de resistência a estressores ambientais e a resposta imune do hospedeiro. Além disso, infecções crônicas e persistentes causadas por biofilme de *S. aureus* são muito frequentes em dispositivos médicos implantados como cateteres endovenosos, articulações prostáticas e marca-passos. Um mecanismo essencial para o desenvolvimento do biofilme é o quorum sensing, forma de comunicação entre as células que regula diversos processos relacionados a sua formação. Este mecanismo é controlado pelo sistema regulador de genes acessórios, constituído por RNA II, contendo os genes *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD* e pelo RNAIII. Tal sistema tem grande importância no controle de determinantes de virulência e diversos alvos metabólicos. Dada sua relevância, abordagens visando-o para o tratamento de infecções por biofilme vem sendo estudadas, porém necessita-se de maior entendimento para uma possível aplicação. Visto isso, este estudo tem como objetivo padronizar e validar uma metodologia de RT-PCR em tempo real para avaliar a diferença da expressão do gene *agrC* de *S. aureus* ATCC 25923 ao ser tratada com nanopartículas de ZnO, utilizando o gene constitutivo 16S rRNA como controle, e verificar a atividade antimicrobiana de ZnS.

Palavras-chave: *staphylococcus aureus*; sistema *agr*; *agrC*; RT-PCR em tempo real; expressão diferencial; nanopartículas; óxido de zinco; sulfeto de zinco.

Abstract

Staphylococcus aureus is an opportunistic human pathogen that colonizes the nasal cavity, skin, and intestines of a large part of the population and causes numerous diseases. Biofilm formation by this bacterium represents a significant clinical problem due to the resistance to antibiotics that this structure provides, in addition to resistance to environmental stressors and the host's immune response. Furthermore, chronic and persistent infections caused by *S. aureus* biofilm are frequent in implanted medical devices such as intravenous catheters, prostate joints, and pacemakers. An essential mechanism for biofilm development is quorum sensing, a mechanism of communication between cells that regulates several processes related to its formation. This mechanism is handled by an accessory gene regulator system, constituted by RNA II, that contains the *agrA*, *agrB*, *agrC*, and *agrD* genes and RNAIII. Such a system is indispensable in virulence determinants regulation and various metabolic targets. Given its relevance, approaches targeting it for biofilm infection treatment have been studied, but a greater understanding is crucial for possible application. Given this, this study aims to standardize and validate a real-time RT-PCR methodology to evaluate the difference in the expression of *S. aureus* ATCC 25923 *agrC* gene when treated with ZnO nanoparticles, using the constitutive 16S rRNA gene as internal control, and verify the antimicrobial activity of ZnS and ZnO.

Keywords: *staphylococcus aureus*; *agr* system; *agrC*; real-time RT-PCR; differential expression; nanoparticles; zinc oxide; zinc sulfide.

Lista de Figuras

Figura 1 – Representação de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
Figura 2 – Processos envolvidos no desenvolvimento de um biofilme.....	15
Figura 3 – Ilustração esquemática do sistema regulador de genes acessórios (agr) em <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Figura 4 – Diferentes tipos de sinal AIP	21
Figura 5 – Topologia da proteína AgrC em <i>E. coli</i>	22
Figura 6 – Curva de amplificação obtida por PCR em tempo real.....	30
Figura 7 – MIC de ZnO com <i>S. aureus</i> a 10^6 UFC/ml.....	37
Figura 8 – MIC de ZnS com <i>S. aureus</i> a 10^6 UFC/ml.....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Concentrações de ZnO e ZnS nos poços de 1 a 9 após adição de 100µl de suspensão de <i>S. aureus</i> com 106 UFC/ml em 100µl de caldo MH com dispersão das nanopartículas (µg/µl)	33
Tabela 2 – Primers utilizados na RT-qPCR.....	36
Tabela 3 – Concentrações de ácidos nucleicos totais e razões de absorbância 260/280 e 260/230 obtidos por leitura em espectrofotômetro de microvolume após extração de RNA com sistema magnético.....	38
Tabela 4 – Concentrações de ácidos nucleicos totais e razões de absorbância 260/280 e 260/230 em amostras não tratadas e tratadas com ZnO (indicada com ZnO) obtidos por leitura em espectrofotômetro de microvolume após extração de RNA com TRI reagente.....	39
Tabela 5 – Valores de C_T para os genes <i>agrC</i> e 16S em amostras não tratadas e tratadas com ZnO obtidos com segunda RT-qPCR.....	40
Tabela 6 – Dados da segunda RT-qPCR transformados com base em 2^{-C_T} ...	40
Tabela 7 – Análise de variância e teste de Tukey em relação aos resultados obtidos com segunda RT-qPCR.....	41
Tabela 8 – Valores de C_T para os genes <i>agrC</i> e 16S em amostras não tratadas e tratadas com ZnO obtidos com terceira RT-qPCR.....	41
Tabela 9 – Valores de C_T da terceira RT-qPCR transformados com base em 2^{-C_T}	42
Tabela 10 – Análise de variância e teste de Tukey em relação aos resultados da terceira RT-qPCR.....	42

Lista de Abreviaturas e Siglas

QS	Quorum sensing
agr	Regulador de genes acessórios
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
AI	Auto indutor
AI-1	Autoindutor-1
AI-2	Autoindutor-2
AIP	Peptídeo auto indutor
NP	Nanopartícula
ZnO	Óxido de zinco
ZnS	Sulfeto de zinco
ZnO-NPs	Nanopartículas de óxido de zinco
ZnS-NPs	Nanopartículas de sulfeto de zinco
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
MH	Müller Hinton
UFC	Unidades formadoras de colônias
CIM	Concentração inibitória mínima
ANOVA	Análise de variância
CV	Coeficiente de variação

Sumário

1.Introdução	9
2.Desenvolvimento	12
2.1 Revisão da literatura	12
2.1.1 Staphylococcus aureus	12
2.1.2 Biofilmes.....	13
2.1.3 Síntese de biofilme	14
2.1.4 Quorum sensing	16
2.1.5 Sistema agr	18
2.1.6 agrC.....	21
2.1.7 Estratégias para controle de biofilmes.....	23
2.1.8 Nanopartículas	23
2.1.9 Nanopartículas de ZnO (ZnO-NPs)	25
2.1.10 Nanopartículas de ZnS (ZnS-NPs)	26
2.1.11 PCR e PCR quantitativa em tempo real	28
2.2 Objetivos	31
2.2.1 Objetivo geral	31
2.2.2 Objetivos específicos.....	31
2.3 Metodologia.....	32
2.3.1 Micro-organismo e condições de crescimento	32
2.3.2 Nanopartículas	32
2.3.3 Avaliação da viabilidade celular e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas	33
2.3.4 Extração e padronização do RNA	34
2.3.5 RT-qPCR.....	35
2.3.6 Análise dos dados	36
2.4 Resultados e discussões.....	37
2.4.1 Concentração Inibitória Mínima.....	37
2.4.2 Extração e padronização do RNA	38
2.4.3 RT-qPCR.....	40
3.Conclusão	45
Referências	46

1. Introdução

Os biofilmes são um aglomerado funcional de células microbianas, que podem ser de diferentes espécies, aderidas a uma superfície e ligadas por meio de uma matriz de material poroso, composta geralmente de uma mistura de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, que são excretadas pelas próprias células, e células mortas. Essa estrutura proporciona aos microrganismos proteção contra forças físicas e antibióticos, por exemplo, atuando assim como um mecanismo de autodefesa. Também fornece um ambiente mais favorável em questão de disponibilidade de nutrientes e vitaminas e, além disso, permite uma comunicação estreita entre as células. Tal comunicação se dá pelo chamado *quorum sensing* (QS), que coordena a formação dessa comunidade (MADIGAN *et al.*, 2016; MUHAMMAD *et al.*, 2020).

Basicamente, este processo pode ser descrito através das seguintes etapas: adesão reversível de algumas células planctônicas da bactéria à superfície por meio de ligações fracas; adesão irreversível, em que as ligações são consolidadas; crescimento do biofilme com a produção e excreção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), componente essencial da matriz, reguladas por QS, em que a bactéria sintetiza e libera moléculas mensageiras que funcionam como sinalizadores químicos (auto indutores, AI); maturação, quando há um aumento na densidade populacional e no acúmulo de EPS; e dispersão, com o desprendimento de bactérias que podem então começar um novo ciclo (MUHAMMAD *et al.*, 2020; MUKHERJEE *et al.*, 2022; OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010).

Uma bactéria que apresenta notável destaque devido a ampla variedade de doenças que provoca, sendo uma das causas mais frequentes de morbidez e mortalidade decorrente de um agente infeccioso no mundo, é a gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Este patógeno coloniza de forma assintomática as fossas nasais de uma considerável parte da população, além de diversos locais da pele e intestino (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021; LISTER;

HORSWILL, 2014). Essa colonização facilita a infecção, que pode ocorrer por meio de alguma lesão na pele. O tratamento é significativamente dificultado pela habilidade de desenvolver resistência a antibióticos, sendo as cepas resistentes a meticilina (MRSA) de grande relevância clínica. Ademais, a formação de biofilme leva a uma maior resistência a múltiplas drogas e defesas do sistema imune do hospedeiro, além de um incremento na tolerância a estresses ambientais. Provoca, também, infecções crônicas e persistentes, seja no tecido do hospedeiro, como ossos e válvulas cardíacas, ou em dispositivos médicos implantados, como cateteres endovenosos, prótese de articulações e marca-passos (ÁLVAREZ *et al.*, 2019; CHEUNG; BAE; OTTO, 2021; LISTER; HORSWILL, 2014; OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018).

No processo de formação de biofilme por *S. aureus*, o sistema regulador de genes acessórios (*agr*) é muito importante pois é o responsável pelo *quorum sensing*. Nele encontra-se duas unidades de transcrição, RNAII, que contém os genes *agrA*, B, C e D; e RNAIII. Os genes *agrD* e *agrB* regulam a expressão e exportação do peptídeo auto indutor (AIP). Já os genes *agrC* e *agrA* formam um sistema de transdução de sinal, em que *agrC* é fosforilado ao se ligar com o AIP, fazendo com que, desse modo, o *agrA* seja ativado e se ligue aos promotores das regiões RNAII e RNAIII (P2 e P3, respectivamente). Assim, o sistema *agr* influencia no controle de determinantes de virulência e diversos alvos metabólicos (IDREES *et al.*, 2021; LE; OTTO, 2015).

O uso de agentes que inibem os sistemas reguladores como o *agr* é uma alternativa promissora que vem sendo estudada no combate às infecções, porém ainda é preciso mais estudos para a compreensão do funcionamento e uso contra infecções por biofilmes (BHATTACHARYA *et al.*, 2015). Um método que vem sendo estudado é o uso de nanopartículas, como por exemplo o sulfeto de zinco (ZnS) e óxido de zinco (ZnO) (SHIRKHANLOU *et al.*, 2017).

Visto isso, técnicas para analisar a expressão dos genes destes sistemas são de extrema importância para poder investigar os resultados obtidos por esses métodos de inibição. Entre os métodos genotípicos usualmente empregados, a reação em cadeia da polimerase (PCR) se destaca por sua confiabilidade, alta especificidade e sensibilidade. A técnica de PCR em tempo real (qPCR), além de permitir a quantificação, é mais rápida, específica e sensível em comparação ao método convencional (CUNHA, 2018). Nela, o fragmento de DNA de interesse é amplificado em múltiplos ciclos com a ajuda da enzima DNA polimerase e os *primers*, que são sequências de DNA complementares às duas extremidades do fragmento. Há também a presença de uma substância fluorescente, como o *SYBR® Green*, um intercalante de DNA que emite fluorescência ao se ligar ao DNA de dupla fita gerado. A partir do número de ciclos e da intensidade da fluorescência obtém-se uma curva de amplificação, a partir da qual é estabelecido o *threshold cycle* (C_T) em um dado ciclo, geralmente com a reação na fase exponencial, e que é inversamente proporcional à quantidade da sequência de interesse presente na amostra (HESS, 2020; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). A técnica de RT-PCR em tempo real é similar a qPCR, porém inicia-se com a transcrição reversa do RNA da amostra para o DNA complementar (cDNA), que é então utilizado nas reações seguintes de amplificação (HESS, 2020).

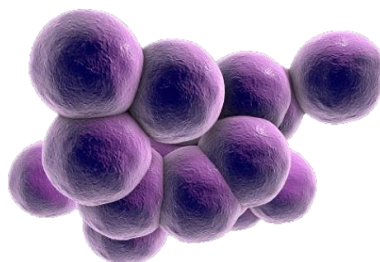
2. Desenvolvimento

2.1 Revisão da literatura

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, representada na Figura 1, é uma bactéria oportunista Gram-positiva, anaeróbia facultativa, que pode ser encontrada frequentemente e de forma assintomática habitando a mucosa nasal e a pele humana e pertence ao gênero *Staphylococcus* (LISTER; HORSWILL, 2014; MANARA *et al.*, 2018).

Figura 1 – Representação de *Staphylococcus aureus*



Fonte: adaptado de Dr_Microbe (2017)

Bactérias desse gênero foram primeiramente isoladas em 1880 pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston a partir de amostras de pus de abscessos cirúrgicos, que deu esse nome devido à sua forma que lembrava cachos de uvas (do grego antigo *staphyle* e *kokkos*, que significam cacho de uvas e grão, respectivamente). Mais tarde, em 1884, a primeira cepa de *S. aureus* foi isolada pelo cirurgião alemão Anton Rosenbach, que assim a nomeou por causa da coloração de suas colônias, que varia desde o acinzentado até o amarelo (*aureus* significa ouro) (GRACE; FETSCH, 2018; OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018; SANTOS *et al.*, 2007).

O índice de mortalidade de infecções por *S. aureus* era extremamente alto até que, já na Segunda Guerra Mundial, introduziu-se o uso da penicilina. Porém, rapidamente surgiram

cepas resistentes ao antibiótico. Assim se seguiu com o uso de meticilina, logo aparecendo amplamente *S. aureus* resistente à mesma (MRSA). Novos tratamentos foram introduzidos e seguidos pelo desenvolvimento de resistência pela bactéria (GRACE; FETSCH, 2018; OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018; SANTOS *et al.*, 2007).

A habilidade de formar biofilmes e a consequente resistência a diversos medicamentos faz dela um grande perigo para a saúde humana. Pode levar a doenças como infecções de pele, incluindo furúnculos, abscessos e infecções de feridas, bacteremia, endocardite, osteomielite e sepse (CHEN *et al.*, 2016; CHEUNG, 2021; MANARA *et al.*, 2018). Ademais, constitui um problema sobretudo na indústria alimentícia e no âmbito hospitalar, trazendo considerável prejuízo. No primeiro, é uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos (GRACE; FETSCH, 2018). No segundo, pode formar biofilmes em diversos tecidos humanos e dispositivos médicos implantados, sendo uma das mais frequentes causas de infecções por implantes médicos e ocasionando infecções persistentes e crônicas. Válvulas cardíacas, cateteres, marca passos e articulações protéticas são exemplos de dispositivos comumente infectados, nesses casos muitas vezes precisando serem substituídos. (BOLES; HORSWILL, 2008; CHEN *et al.*, 2016; LISTER; HORSWILL, 2014; OTTO, 2019).

2.1.2 Biofilmes

Na natureza, os microrganismos geralmente se desenvolvem através de biofilmes. Estes são comunidades de uma ou mais espécies de microrganismos que se aderem a superfícies bióticas ou abióticas por meio de matrizes extracelulares que elas mesmas produzem. São compostos principalmente por água, EPS, que inclui DNA extracelular (eDNA), proteínas e polissacarídeos, e micro colônias (IDREES *et al.*, 2021). É uma forma vantajosa para o crescimento das células, pois confere consideravelmente maior proteção

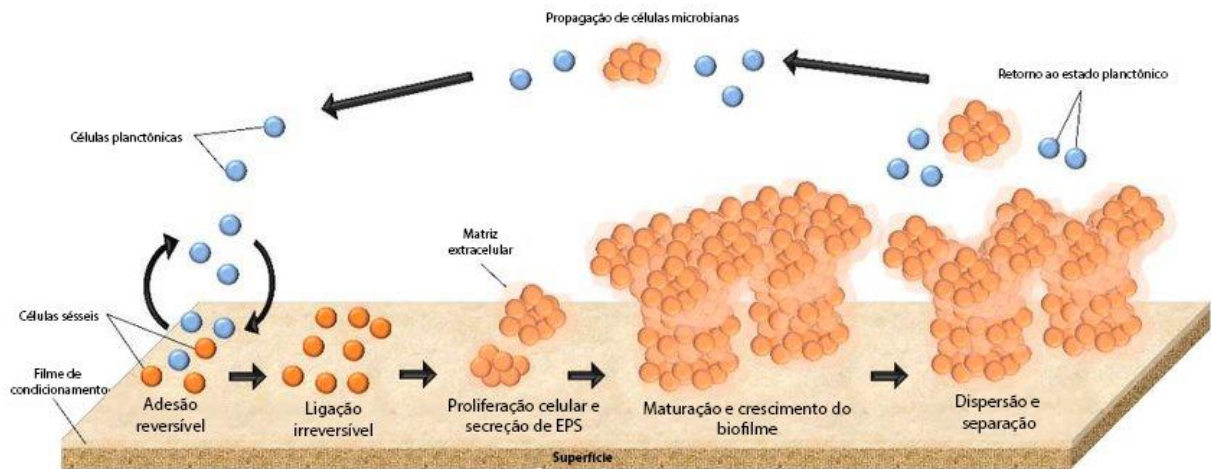
contra condições adversas do ambiente (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, 2018; SUBHADARA *et al.*, 2018; MUHAMMAD *et al.*, 2020; OTTO, 2019).

Podem se formar em todo tipo de superfície, em materiais inorgânicos como plásticos, metais e materiais orgânicos como tecidos de plantas e do corpo humano, seja na natureza ou em ambientes industriais e hospitalares, por exemplo (SÁNCHEZ, 2018; SUBHADARA *et al.*, 2018; MUKHERJEE *et al.*, 2022). Na indústria, gera contaminação de comida e água, obstrução de equipamentos e corrosão de superfícies metálicas, sendo um grande problema em especial na indústria alimentícia. Já no setor médico, é responsável pela maior parte das infecções em humanos. Consegue se estabelecer em dispositivos médicos e implantes internos, e originar infecções persistentes. Assim, resulta em um aumento na morbidade e mortalidade, além de maiores gastos para o sistema de saúde (MUHAMMAD *et al.*, 2020; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, 2018; SUBHADARA *et al.*, 2018).

2.1.3 Síntese de biofilme

O processo de formação do biofilme ocorre em 5 etapas principais, sendo elas: adesão reversível, adesão irreversível, crescimento, maturação e dispersão, como pode ser observado na Figura 2. Primeiramente, forma-se o filme condicionante na superfície pela adsorção de macromoléculas presentes no meio ou que revestem a superfície. As células na forma planctônica então se ligam de forma reversível, por meio de forças físicas favoráveis, como forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e interações de Lifshitz-van der Waals (ANDRE, 2015; MUKHERJEE *et al.*, 2022; OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010). Nessa fase os microrganismos se apresentam em movimento Browniano na superfície, consequentemente se desprendendo facilmente com a mobilidade da bactéria ou a aplicação de forças fracas (MUKHERJEE *et al.*, 2022; OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010).

Figura 2 – Processos envolvidos no desenvolvimento de um biofilme



Fonte: adaptado de Vázquez-Sánchez e Rodríguez-López (2018)

A adesão irreversível se inicia, segundo indicam estudos, após 20 minutos, variando a até 4 horas a uma temperatura de 4 a 20°C. Ela se dá por meio de interações como dipolo-dipolo e hidrofóbicas, ponte de hidrogênio e ligações iônicas e covalentes. A presença de apêndices projetados para fora da célula, como flagelo, pili, proteínas adesinas e lipopolissacarídeos auxiliam na aderência à superfície (MUKHERJEE *et al.*, 2022; OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, 2018). Com a ajuda do mecanismo de sinalização entre as células chamado *quorum sensing*, em que as bactérias liberam no ambiente sinais químicos, ou auto indutores (AI), é regulada a produção de substâncias poliméricas extracelulares. EPS é um componente essencial da matriz extracelular do biofilme e é responsável por fixá-lo irreversivelmente à superfície e manter as células juntas umas às outras (MUKHERJEE *et al.*, 2022). Microrganismos aderidos dessa forma são de custosa remoção, necessitando o emprego de forte força mecânica ou agentes como enzimas, detergentes, sanitizantes e surfactantes e, ainda assim, com alta probabilidade de as células permanecerem aderidas (MAYTON; WALKER; BERGER, 2021).

Na fase de crescimento e maturação, as células proliferam e produzem a matriz de EPS, que é composta em geral principalmente por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. Forma-se então micro colônias e, após algum tempo da primeira adesão, o biofilme está maduro, com maior densidade de células e deposição de EPS. Com a instalação da matriz organizam-se canais de água que servem para distribuir nutrientes e moléculas sinalizadoras entre as células e transportar produtos para fora do biofilme. (MUKHERJEE *et al.*, 2022; OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, 2018)

Por último, ocorre a dispersão. Nessa etapa, células individuais ou em aglomerados se desprendem e voltam às suas formas planctônicas. Células nessa forma tem alta motilidade e, assim sendo, podem se mover e formar colônias em novos sítios. Esse processo pode ocorrer devido a mudanças no ambiente ou a condições fisiológicas adequadas, controlado por QS (MUHAMMAD *et al.*, 2020; MUKHERJEE *et al.*, 2022; OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, 2018).

2.1.4 Quorum sensing

QS é um processo de comunicação entre células bacterianas regulado pela densidade populacional, que tem o intuito de coordenar seus comportamentos e expressão gênica. Esse processo ocorre com a produção de uma molécula sinalizadora de baixa massa molecular, denominada autoindutor, pela bactéria, que é liberada no ambiente e posteriormente detectada por outra bactéria. A concentração dessa molécula é proporcional ao número de células do microrganismo presentes e, ao atingir uma concentração crítica, a bactéria pode iniciar uma resposta coordenada (DANIELS; VANDERLEYDEN; MICHIELS, 2004; OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018; YARWOOD *et al.*, 2004). Tal mecanismo controla diversas

funções da célula, como por exemplo a formação de biofilme, regulação de virulência, resistência a antibióticos, motilidade, transferência de material genético e síntese de metabólitos secundários (DANIELS; VANDERLEYDEN; MICHIELS, 2004; OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018; PREDA; SÂNDEULESCU, 2019; SOLA *et al.*, 2012; SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014; YARWOOD *et al.*, 2004).

Em geral, pode-se destacar três sistemas de QS, em que as bactérias usam diferentes autoindutores. São eles: N-acil-homoserina lactonas (AHLs), ou autoindutor-1 (AI-1), moléculas derivadas de ácidos graxos utilizadas por Gram-negativas; furanosil borato diéster, ou autoindutor-2 (AI-2), aproveitados tanto por Gram-negativas quanto positivas; e oligopeptídeos, ou peptídeo autoindutor (AIP), empregados por Gram-positivas (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018; PREDA; SÂNDEULESCU, 2019; SOLA *et al.*, 2012; SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014).

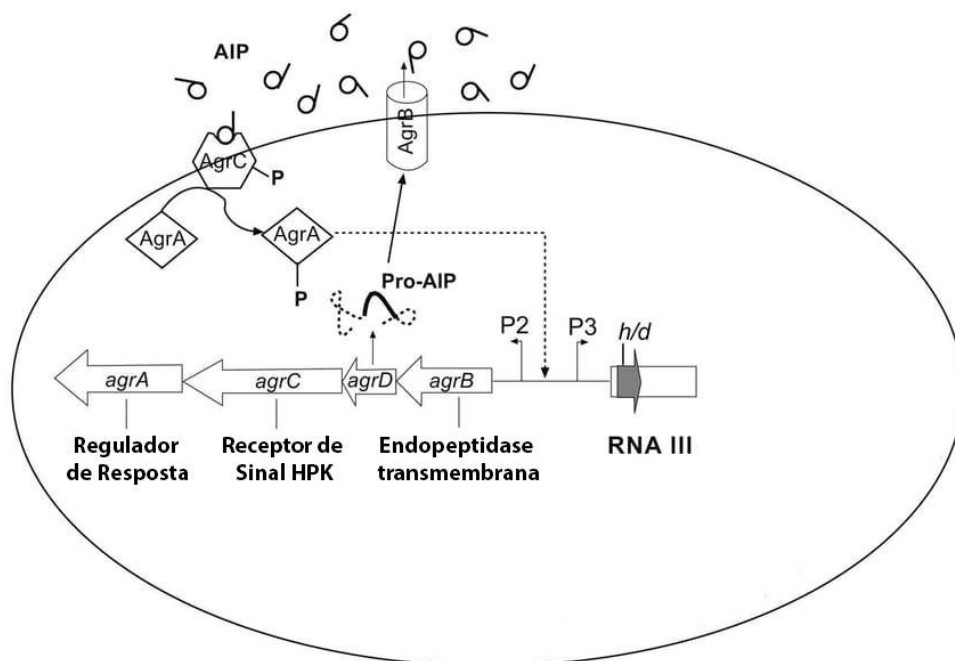
No sistema com AI-1, a produção do AI é de responsabilidade do gene LuxI, enquanto o fator de transcrição LuxR controla a expressão gênica. Com AI-2, a enzima LuxS e uma S-adenosilmetionina (SAM) são responsáveis pela síntese da molécula, que é utilizada para a comunicação entre espécies diferentes. Por último, bactérias Gram-positivas sintetizam pequenos peptídeos que são excretados e detectados ou por sensores de histidina quinase presentes na membrana celular ou por receptores intracelulares (PREDA; SÂNDEULESCU, 2019; SOLA *et al.*, 2012; SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014).

Em *S. aureus*, QS é regulado sobretudo pelo sistema regulador de genes acessórios (*agr*) (LE; OTTO, 2015; SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014; YARWOOD *et al.*, 2004). No entanto, o sistema LuxS/AI-2 também está presente. Por ser um sistema utilizado por muitas bactérias, considera-se que ele pode servir para a comunicação interespecies (KHAN *et al.*, 2015).

2.1.5 Sistema agr

O sistema agr é o que regula QS em *Staphylococci*, e é codificado por um *locus* de 3,5kb no cromossomo, com dois *operons* divergentes, ou seja, que são transcritos em direções opostas. Um *operon* inclui o promotor P2 e os genes *agrB*, *agrD*, *agrC* e *agrA*, nessa ordem, e gera a unidade transcricional RNA II. Já o outro contém o promotor P3 e um pequeno gene *hld*, e leva ao transcrito RNAIII (KHAN *et al.*, 2015; LE; OTTO, 2015; SCHILCHER; HORSWILL, 2020; THEONDEL *et al.*, 2011; YARWOOD *et al.*, 2004). Uma representação desse *locus* e do sistema agr pode ser observada na Figura 3.

Figura 3 – Ilustração esquemática do sistema regulador de genes acessórios (agr) em *Staphylococcus aureus*



Fonte: adaptado de Speziale et al. (2008)

Como pode ser observado na Figura 3, RNAII dá origem a 4 proteínas, em que AgrD e AgrB são responsáveis pela síntese do AIP, e AgrC e AgrA formam um sistema de transdução de sinal de dois componentes que leva a regulação de diversos fatores (SCHILCHER; HORSWILL, 2020; SPEZIALE *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2018; THEONDEL *et al.*, 2011).

A proteína AgrD é a precursora do AIP. É composta por três domínios: uma hélice anfipática N-terminal, que direciona o peptídeo para a membrana celular; a parte intermediária, que contém a sequência precursora de AIP; e o domínio C-terminal, que tende a ter vários resíduos carregados negativamente (THEONDEL *et al.*, 2011; VASQUEZ; BLACKWELL, 2019).

AgrB é uma proteína transmembrana com atividade de endopeptidase. Ela reconhece a parte C-terminal de AgrD e catalisa a clivagem desse domínio, induzindo na sequência a formação de um anel de tiolactona, entre o novo resíduo C-terminal e uma cisteína presente na parte intermediária de AgrD. O precursor é então transportado através da membrana para o lado de fora da célula por meio de AgrB. (KHAN *et al.*, 2015; THEONDEL *et al.*, 2011; VASQUEZ; BLACKWELL, 2019; ZHAO *et al.*, 2022).

O peptídeo AgrD passa por mais um processo até chegar à molécula final. Nele, a hélice N-terminal é clivada por meios ainda não muito bem elucidados, e então o AIP, um anel de tiolactona cíclico (macrociclo) de 5 membros com uma cauda N-terminal contendo 2 a 4 aminoácidos, é formado. (BOLES; HORSWILL, 2008; TAL-GAN *et al.*, 2013; VASQUEZ; BLACKWELL, 2019; ZHAO *et al.*, 2022). Conforme a densidade populacional aumenta, mais AIP se acumula no ambiente; até que, ao atingir um certo limiar de concentração, o peptídeo se liga a AgrC e a ativa. AgrC é um receptor histidina quinase transmembrana que, ao se ligar a AIP, se autofosforila em um resíduo histidina conservado na parte N-terminal (KHAN *et al.*, 2015; SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014; TAL-GAN, VASQUEZ; BLACKWELL, 2019).

Uma vez autofosforilado, AgrC ativa AgrA, o regulador de resposta intracelular desse sistema de dois componentes. AgrA é então fosforilada em consequência da transferência de

um grupo fosfato para um resíduo de ácido aspártico em sua composição (SPEZIALE *et al.*, 2008; THEONDEL *et al.*, 2011; VASQUEZ; BLACKWELL, 2019; ZHAO *et al.*, 2022).

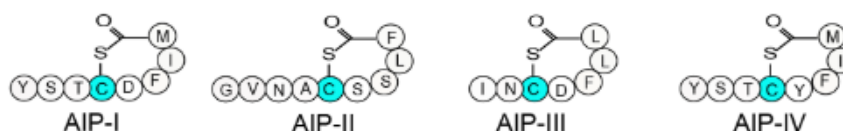
A AgrA fosforilada funciona como um regulador transcricional e se liga aos promotores P2 e P3, além dos promotores que controlam a expressão dos peptídeos PSM α e PSM β . Em um primeiro momento, quando ainda em baixas concentrações, há uma preferência pela ativação de P2, possivelmente pela maior afinidade do regulador por P2 do que por P3 (KHAN *et al.*, 2015; LE; OTTO, 2015; THEONDEL *et al.*, 2011). Forma-se, assim, um ciclo de autoindução que leva a um aumento da transcrição do *operon* e, conseqüentemente, a uma maior produção e reconhecimento de AIP (VASQUEZ; BLACKWELL, 2019; ZHAO *et al.*, 2022).

Por sua vez, a ligação de AgrA a P3 dá impulso a transcrição de RNAIII, um RNA regulador que atua como a molécula efetora do sistema agr. Ele promove ou inibe a expressão de diversos fatores de virulência, além de inibir a translação de Rot, uma proteína reguladora transcricional da família de reguladores SarA, que não só desfavorece a excreção de muitos fatores de virulência como também favorece a transcrição de genes de outros, e regula positiva ou negativamente vários genes envolvidos em diferentes processos celulares. Além disso, o gene *hld* contido em RNAIII codifica o fator de virulência delta-toxina (LE; OTTO, 2015; THEONDEL *et al.*, 2011).

Dentre cepas distintas de *S. aureus*, há regiões hipervariáveis dentro do *operon* de *agrBDCA*. Em virtude disso, nomeou-se quatro classes, agr I, agr II, agr III e agr IV, sendo de I a III mais comuns e a IV rara (THEONDEL *et al.*, 2011; VASQUEZ; BLACKWELL, 2019). As diferenças ocorrem no intervalo envolvendo o final 3' de *agrB*, *agrD* e a extremidade 5', N-terminal, de *agrC*, enquanto o restante é altamente conservado. A variação no gene *agrD* leva a diferentes sequências de AIP, denominadas AIP I a AIP IV. Em AgrC, a

parte em que se localiza o sensor que se liga a AIP muda, enquanto o domínio histidina quinase é conservado. Cada molécula de AIP inibe a atividade dos outros tipos (THEONDEL *et al.*, 2011; VASQUEZ; BLACKWELL, 2019). A Figura 4 mostra os diferentes tipos de AIPs.

Figura 4 – Diferentes tipos de sinal AIP



Fonte: adaptado de Tal-Gan *et al.* (2013)

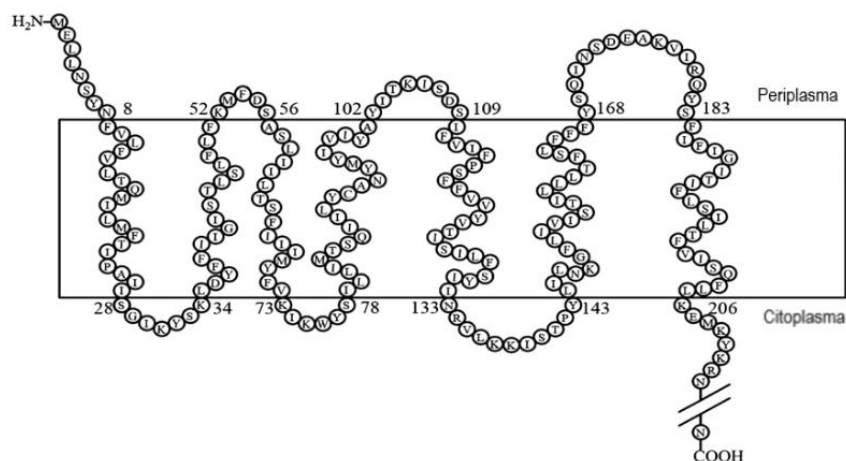
O sistema *agr* desempenha um papel importante e complexo na estruturação e dispersão de biofilmes. Isso se deve sobretudo ao controle da produção das modulinas solúveis em fenol (PSMs), que formam canais na matriz e são responsáveis pela dispersão de células do biofilme. Além disso, a expressão de outros fatores de virulência como proteases e proteínas de superfície também têm influência em biofilmes (LE; OTTO, 2015; OTTO, 2018; THEONDEL *et al.*, 2011). Com efeito, o biofilme formado por células com inibição na atividade de *agr* é sem estrutura e mais espesso. Já a adição de AIP a biofilmes estabelecidos, por exemplo, leva a dispersão do mesmo (KHAN *et al.*, 2015; OTTO, 2018; TAN *et al.*, 2018).

2.1.6 *agrC*

O gene *agrC* codifica a proteína AgrC, de 46kDa, que pertence à família de proteínas histidina quinase (HPKs) induzíveis por peptídeos. É essencial para o sistema *agr* em *S. aureus*, e forma um sistema de transdução de sinal de dois componentes junto com AgrA (TAN *et al.*, 2018; THEONDEL *et al.*, 2011). Se encontra na membrana, possuindo sete

segmentos transmembrana, uma extremidade N-terminal no espaço periplasmático e outra C-terminal no citoplasma, conforme ilustra a Figura 5 (WANG, B. *et al.*, 2014).

Figura 5 – Topologia da proteína AgrC em *E. coli*



Fonte: adaptado de Wang et al. (2014)

A parte para fora da célula contém uma alça que é responsável pela ligação de AIP e um sensor com o papel de transmitir o sinal para o domínio citoplasmático. O elemento intracelular abrange os domínios histidina quinase e receptor (SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014; TAN *et al.*, 2018).

A ligação de AIP ocasiona uma mudança conformacional na alça citoplasmática que leva a uma autofosforilação dependente de ATP de um resíduo histidina. Transfere-se então o grupo fosfato desse resíduo a um resíduo aspartato em AgrA (SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014; TAN *et al.*, 2018; THEONDEL *et al.*, 2011).

Apesar de AgrC ser altamente conservado, o domínio de ligação a AIP apresenta variações entre cepas diferentes (TAN *et al.*, 2018).

Mutações nessa proteína podem levar a mudanças no comportamento e virulência. Por exemplo, o rompimento do domínio de ligação a AIP pode reduzir a atividade de QS e a virulência, enquanto mutações que aumentam a afinidade de ligação a AIP podem resultar no efeito contrário (YARWOOD *et al.*, 2004).

2.1.7 Estratégias para controle de biofilmes

Os métodos contra biofilmes podem ser tanto para prevenir ou inibir sua formação quanto para a sua dispersão ou desmembramento (IDREES *et al.*, 2022). Dentre eles, de maneira geral, há três estratégias que podem ser usadas. São elas: inibição da adesão inicial da bactéria à superfície, que se dá por mudanças químicas ou físicas nas propriedades dos biomateriais, como ocorre com o uso de antibióticos; ruptura do biofilme durante seu processo de maturação, seja por enzimas que degradam a matriz, por surfactantes ou por ácidos graxos livres, aminoácidos ou doadores de óxido nítrico; e *quorum quenching*, ou seja, a interferência no sistema QS, que pode ser pela inibição da síntese da molécula sinalizadora, pela degradação da mesma, por moléculas antagonistas ao autoindutor, pela inibição da transdução de sinal ou pela inibição do transporte dela. Já foi reportado que nanopartículas de cobre e prata se enquadram neste último caso, isto é, inibem o transporte do AI. Outras nanopartículas, como as de zinco, interferem na formação de biofilmes, mas seu mecanismo ainda não foi desvendado (SUBHADARA *et al.*, 2018).

2.1.8 Nanopartículas

As nanopartículas são nanomateriais que têm bastante destaque devido a suas propriedades diferentes que as fazem úteis em potenciais aplicações em diversas áreas, como medicina, eletrônica e energia. Elas são definidas como partículas cujo tamanho varia de 1 a 100 nanômetros. Podem ser compostas por vários materiais, incluindo metais, óxidos metálicos, polímeros e cerâmicas (SIRELKHATIM *et al.*, 2015; WANG, L; HU; SHAO, 2017).

A redução do seu tamanho à escala nanométrica faz com que a partícula adquira diferentes propriedades químicas, mecânicas, elétricas, ópticas, estruturais e morfológicas. Uma das propriedades mais atrativas é a maior proporção da área de superfície por volume, o que leva a uma maior reatividade e permite que a partícula interaja com moléculas e células de formas diferenciadas (SHIRKHANLOU *et al.*, 2017; SIRELKHATIM *et al.*, 2015). A possibilidade de se preparar nanopartículas altamente ordenadas, do tamanho e forma desejados, também é importante para as suas aplicações (JONES *et al.*, 2007).

Uma aplicação que vem crescendo é como inibidor de bactérias e seus biofilmes. NPs vem sendo cada vez mais estudadas e a sua capacidade de tratar infecções por bactérias comprovada, sendo uma possível alternativa para antibióticos. Elas podem ser usadas, por exemplo, como sistema de entrega de antibióticos, revestimento de materiais e dispositivos médicos e em sistemas de detecção de bactérias para diagnósticos microbianos (JANAKI; SAILATHA; GUNASEKARAN, 2015;. WANG, L.; HU; SHAO, 2017) A larga gama de espécies atingidas é um ponto de destaque; estima-se que NPs podem matar cerca de 650 microrganismos. Ademais, NPs podem prevenir a resistência a antibióticos em alguns casos. Os mecanismos da atividade antibacteriana ainda não são compreendidos, necessitando-se, portanto, de mais estudos (SCHILCHER; HORSWILL, 2020; WANG, L.; HU; SHAO, 2017).

As NPs semicondutoras vêm sendo amplamente estudadas devido a suas propriedades estruturais, ópticas, elétricas, catalíticas e fotoluminescentes extraordinárias, que proporcionam a elas aplicações promissoras (DHUPAR *et al.*, 2021). Entre elas, os compostos semicondutores do grupo II-IV têm grande importância por causa da sua capacidade de ter um *gap* de energia mais amplo. ZnO e ZnS são importantes semicondutores desse grupo que têm inúmeras propriedades, entre elas a ação antibacteriana, e são largamente utilizadas (KUMAR; SAKTHIVEL; MANI, 2019; SHIRKHANLOU *et al.*, 2017).

2.1.9 Nanopartículas de ZnO (ZnO-NPs)

ZnO é um óxido metálico versátil e promissor com diversas aplicações. É denominado como semicondutor II-IV; apresenta um *gap* direto de energia (3.3eV) no espectro próximo a UV, uma alta energia de ligação excitônica (60meV) à temperatura ambiente e uma condutividade elétrica natural tipo N. Pode se apresentar em três estruturas cristalinas, sendo elas wurtzita, blend de zinco (esfalerita) e sal de rocha (sal-gema) (SHARMA *et al.*, 2010; SIRELKHATIM *et al.*, 2015).

As ZnO-NPs são mais estáveis, têm cristalinidade superior e menos falhas em relação a seu homólogo de maior tamanho. É umas das mais utilizadas, e seu uso tem crescido devido às suas propriedades únicas semicondutoras, elétricas, piezoelétricas, magnéticas e óticas (NAGAR *et al.*, 2022; SIRELKHATIM *et al.*, 2015). Elas vêm sendo cada vez mais aproveitadas em diversos setores industriais, como nanoeletrônica, ótica, cosméticos, alimentos, processamento de borrachas, farmacêuticos, produtos químicos, cerâmicas, etc. (GUDKOV *et al.*, 2021; JANAKI; SAILATHA; GUNASEKARAN, 2015). Entre seus diversos usos, estão na produção de células solares, sensores de gás, sensores químicos, biosensores, fotodetectores, diodos emissores de luz (LEDs) e também na remediação de elementos tóxicos no ambiente (GUDKOV *et al.*, 2021; NAGAR *et al.*, 2022). Ademais, destaca-se seu papel na medicina, pois possui atividades citostática contra células cancerígenas, antimicrobiana e antifúngica, anti-inflamatória, propriedades antidiabéticas e capacidade de acelerar a cicatrização de feridas, entre outros (GUDKOV *et al.*, 2021).

A atividade antimicrobiana dessa NP é uma das propriedades mais atrativas, sendo explorada por diversos pesquisadores. Ela exhibe atividade expressiva contra uma ampla variedade de microrganismos, sendo eles bactérias, tanto Gram-positivas como Gram-

negativas – embora apresente maior eficácia contra positivas – fungos ou vírus (SHIRKHANLOU *et al.*, 2017; SIRELKHATIM *et al.*, 2015). O tamanho das partículas e a concentração são fatores importantes na capacidade antimicrobiana, sendo que quanto menor o tamanho, maior a atividade. Há diversos estudos acerca da influência do formato da partícula, que também parece impactar na toxicidade (SIRELKHATIM *et al.*, 2015). O mecanismo através do qual ocorre essa atividade antimicrobiana ainda não foi desvendado, sendo necessário, portanto, mais estudos para seu entendimento e possível aplicação da NP (KADIYALA *et al.*, 2016; SHIRKHANLOU *et al.*, 2017). A teoria mais difundida é a de que tal propriedade pode ser causada pela geração de espécies reativas do oxigênio (ERO), embora há estudos que indiquem que esse não é o mecanismo principal (KADIYALA *et al.*, 2016; PATI *et al.* 2014). Outro importante mecanismo é a liberação de íons de zinco (Zn^{2+}) (MAHAMUNI-BADIGER *et al.*, 2020). Além disso, estudos observaram que a NP reduz a formação de biofilmes (FULINDI *et al.*, 2023). As nanopartículas de ZnO tem diversas vantagens, como a possibilidade de se usar baixas concentrações para obter significativos resultados, uma maior área da superfície em relação ao seu volume e relativo baixo custo (GUDKOV *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2007).

2.1.10 Nanopartículas de ZnS (ZnS-NPs)

ZnS é um semicondutor II-VI muito importante que é bastante estudada devido às suas diversas aplicações. Pode ter duas formas cristalinas: esfalerita, cúbica; e wurtzita, hexagonal (KAUR *et al.*, 2016; KUMAR; SAKTHIVEL; MANI, 2019; VIJAYAN *et al.*, 2021). Tem um *gap* de energia amplo de aproximadamente 3,68 eV para a primeira forma e de 3,80eV para a segunda à temperatura ambiente (DHUPAR *et al.*, 2021). Pode ser sintetizada por diferentes métodos, como precipitação química, hidrotermal e solvotermal, que permitem o

controle do tamanho, forma e morfologia da partícula e que, consequentemente, afetam as propriedades da mesma (DHUPAR *et al.*, 2021; SHIRKHANLOU *et al.*, 2017).

Apresenta diversas vantagens em relação ao ZnS de tamanho maior. Entre elas, estão um aumento da área de superfície em relação ao volume, absorção ótica mais alta, ponto de fusão mais baixo, maior estabilidade química e térmica, e efeito de tunelamento quântico no nível macroscópico (DHUPAR *et al.*, 2021; KAUR *et al.*, 2016; VIJAYAN *et al.*, 2021).

Em virtude de suas singulares propriedades, ZnS-NPs têm sido amplamente estudadas por suas potenciais aplicações em vários setores, como eletrônica, optoeletrônica, energia e biomedicina. Por exemplo, são utilizadas na produção de transistores de efeito de campo, sensores ópticos, LEDs, células solares, fotodetectores, fibras ópticas, fotocatalisadores e como biomarcadores, agentes de imagem e veículos de distribuição de medicamentos (DHUPAR *et al.*, 2021; SHIRKHANLOU *et al.*, 2017; VIJAYAN *et al.*, 2021).

ZnS-NPs também apresenta significativa atividade antimicrobiana. Tal atividade já foi estudada em diferentes cepas bacterianas, tanto Gram positivas quanto negativas, bem como fungos e vírus (SHIRKHANLOU *et al.*, 2017). A inibição do crescimento microbiano aumenta com o incremento da concentração das NPs, porém o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não foi desvendado. Assim como com ZnO, a atividade foi atribuída à geração de ROS com a exposição à luz, ou então à liberação de íons de zinco que rompe a membrana celular e inibe o crescimento (DHUPAR *et al.*, 2021; SHIRKHANLOU *et al.*, 2017; VIJAYAN *et al.*, 2021). Igualmente, ZnS também inibe a formação de biofilmes (FULINDI *et al.*, 2023). O uso de ZnS na biomedicina é promissor ainda pelo fato de apresentar boa biocompatibilidade e baixa toxicidade. No entanto, não há tantos estudos sobre a atividade antibacteriana de ZnS. Visto isso, mais pesquisas são necessárias para entender o mecanismo

de funcionamento e possíveis aplicações da NP (DHUPAR *et al.*, 2021; VIJAYAN *et al.*, 2021).

2.1.11 PCR e PCR quantitativa em tempo real

A PCR é um procedimento que permite amplificar fragmentos específicos de DNA ou, se precedido por transcrição reversa (RT-PCR) a 42-55°C, RNA, a partir de quantidades iniciais ínfimas dos mesmos. Para sua realização, precisa-se da dupla fita de DNA alvo, dois *primers* – oligonucleotídeos de fita simples, especificamente construídos para serem complementares a uma parte de cada fita do DNA de modo que delimitem a sequência de interesse – DNA polimerase, dNTPs, tampão e sais (LIMA, 2008; MACKAY, 2004).

O processo da PCR tradicional pode ser dividido em três etapas, sendo elas: separação da fita dupla de DNA sob temperaturas acima de 90°C pelo rompimento das ligações de hidrogênio que as ligam; anelamento dos *primers*, que ocorre geralmente entre 50 a 60°C – a temperatura em que os *primers* anelam, usualmente referidas como T_m , depende da sequência nucleotídica dos mesmos, e corresponde à temperatura na qual 50% das duplas do oligonucleotídeo se formaram; e síntese de uma nova fita de DNA, a 72-75°C, por ação da enzima DNA polimerase na sequência marcada pelos *primers*. Essas três etapas consistem em um ciclo que se repete diversas vezes, levando a cumulação exponencial do fragmento alvo (LIMA, 2008; MACKAY, 2004).

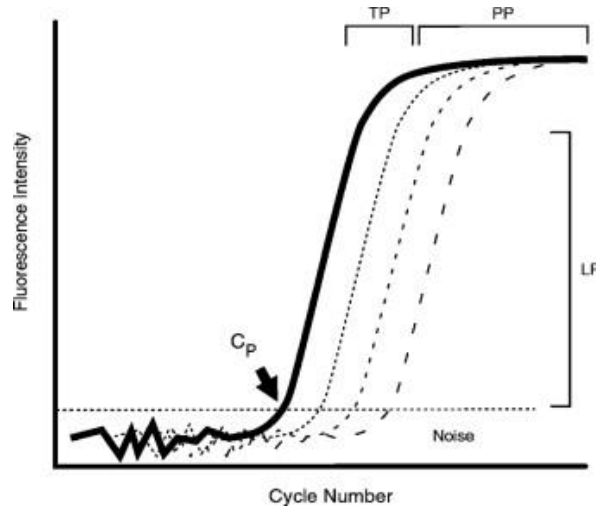
A partir de 1996, passou a ser disponibilizado comercialmente o aparelho para a PCR em tempo real, se tornando o método mais preciso e sensível para a identificação de ácidos nucleicos até então (SHIPLEY, 2006). Em comparação com a técnica convencional, a PCR em tempo real é mais rápida, sensível e reproduzível. A capacidade de amplificar e detectar o amplicon simultaneamente faz com que necessite menos tempo para a realização, além de

reduzir as chances de contaminação por não carecer de manuseio do amplicon após a reação (MACKAY, 2004).

A detecção é feita devido a uma substância fluorescente, que pode ser um intercalante de DNA, sonda de hibridização ou sonda de hidrólise. Em todos os casos, o aumento na fluorescência é diretamente proporcional ao aumento do produto da amplificação. Um dos corantes mais utilizados, e que pode ser aplicado para a quantificação de RNA em RT-PCR, é o *SYBR® Green I*, um intercalante de DNA que emite fluorescência ao se ligar ao DNA de dupla fita gerado. Ele apresenta baixo custo e facilidade de desenvolvimento do ensaio, porém não é muito específico, podendo gerar sinal com qualquer molécula de fita dupla presente – como um dímero de *primers*, por exemplo (HESS, 2020; SHIPLEY, 2006).

Conforme o prosseguimento dos ciclos e a respectiva detecção da intensidade de fluorescência, é obtida uma curva de amplificação do DNA, que se apresenta como uma curva sigmoidal (Figura 6). Assim, em geral ele apresenta 4 fases, que são linha de base, exponencial, linear e platô. Na primeira etapa, a amplificação ainda não consegue ser detectada pelo equipamento. Na fase exponencial, observa-se o primeiro sinal detectável de uma reação em cadeia da polimerase, durante a qual a amplificação está ocorrendo na sua taxa máxima de crescimento exponencial. A duração dessa fase depende da concentração do modelo de DNA e da qualidade do ensaio em tempo real. Posteriormente, a eficiência da replicação diminui gradualmente e entra em uma fase de transição, alcançando eventualmente uma fase de platô, na qual observamos pouquíssimo ou nenhum aumento na fluorescência (MACKAY, 2004; SHIPLEY, 2006).

Figura 6 – Curva de amplificação obtida por PCR em tempo real



Fonte: adaptado de Mackay (2004)

Em um certo ciclo, em que a fluorescência ultrapassa o ruído de fundo, é estabelecido o ciclo limite. C_T é definido como o ciclo em que a fluorescência gerada supera dez desvios padrão da fluorescência média da linha de base, estabelecida com dados dos ciclos 3 a 15. Quanto menor a concentração inicial do DNA ou RNA alvo, maior o valor de C_T . Na reação de PCR quantitativa em tempo real, esse valor é utilizado para o cálculo da quantidade do gene ou RNA presente (MACKAY, 2004). Essa quantificação pode ser absoluta, utilizada para quantificar amostras desconhecidas por meio de uma curva padrão, ou relativa, quando se deseja analisar mudanças na expressão gênica de uma amostra em comparação com outra de referência. Pode ser pelo método da curva padrão ou pelo método de C_T comparativo, que tem a vantagem de não necessitar desenhar a curva padrão. O cálculo se dá pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ e, para ser válida, as eficiências das amplificações do gene de interesse e da referência devem ser aproximadamente iguais (APPLIED BIOSYSTEMS, 2023). A equação 1 mostra uma fórmula utilizada para a quantificação por esse método (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

$$\text{Mudança na expressão} = 2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-[(C_{Tg}-C_{Tc})_A-(C_{Tg}-C_{Tc})_B]} \quad \text{Eq. 1}$$

Em que C_{Tg} é o C_T do gene de interesse, C_{Tc} do gene de controle interno, A indica a amostra de interesse, ou tratada, e B a amostra de referência, ou não tratada.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

Padronizar e validar a técnica de RT-PCR quantitativa em tempo real para a avaliação da expressão diferencial do gene *agrC* do sistema regulador de genes acessórios (*agr*) de *S. aureus* sob tratamento com nanopartículas de ZnO.

2.2.2 Objetivos específicos

O presente trabalho teve como objetivos:

1. Avaliar a atividade antimicrobiana das partículas de ZnO e ZnS em *S. aureus*;
2. Validar uma metodologia para extração do RNA da bactéria;
3. Validar uma metodologia para realização de RT-qPCR a fim de comparar a expressão do gene *agrC* com e sem tratamento com nanopartículas de ZnO.

2.3 Metodologia

2.3.1 Micro-organismo e condições de crescimento

Para o presente estudo utilizou-se cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*agr* III). Esta foi cultivada em caldo Müeller Hinton (MH) e mantida sob refrigeração para formar o inóculo principal. Semanalmente criou-se a partir deste inóculo culturas em placas de Petri para a padronização pelo método de suspensão direta de colônias, coletando-se amostras da cultura e suspendendo-as em caldo para definição da densidade óptica a 625nm (DO_{625}) entre 0,08 a 0,13. Padronizou-se o cultivo a cerca de 10^6 UFC/ml, realizando diluições seriadas até ser atingida a concentração necessária, seguida de plaqueamento em Ágar para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) e confirmação da diluição. Todos os procedimentos seguiram as recomendações do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2003)

2.3.2 Nanopartículas

As nanopartículas de ZnO e ZnS foram sintetizadas por este laboratório com parceria com o Laboratório de Ciência dos Materiais Aplicada à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp). O ZnO foi sintetizado pelo método hidrotermal e apresentou estrutura de wurtzita com tamanho de aproximadamente 500nm. Já ZnS, com estruturas de esfalerita e wurtzita de aproximadamente 150nm, foi feito pelo método solvotermal de micro-ondas. A partir das NPs adquiridas, preparou-se suspensões estoque de ZnO e ZnS com concentrações de 40 μ g/ μ l e 80 μ g/ μ l, respectivamente, pela sonicação das NPs com água ultrapura do tipo 1 (Milli-Q®) e 1% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO). As suspensões foram então armazenadas ao abrigo da luz e a uma temperatura de 5°C.

2.3.3 Avaliação da viabilidade celular e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas

Em uma placa de 96 poços, pipetou-se 100µl de caldo MH em todos os poços utilizados e mais 100µl da dispersão preparada de nanopartículas na primeira coluna. Homogeneizou e passou-se 100µl para a próxima coluna. Assim se seguiu sucessivamente nas colunas seguintes. Então foi adicionada 100µl da suspensão de *S. aureus* com 10^6 UFC/ml em todos os poços. Também foi feito um controle positivo, contendo o inóculo de bactéria e DMSO a 1%, um controle negativo, com inóculo e caldo MH, e um controle de veículo, com a NP e caldo MH. A microplaca foi então deixada em estufa a 37°C. As concentrações de nanopartículas nos poços estão representadas na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1 – Concentrações de ZnO e ZnS nos poços de 1 a 9 após adição de 100µl de suspensão de *S. aureus* com 10^6 UFC/ml em 100µl de caldo MH com dispersão das nanopartículas (µg/µl)

Nanopartícula	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ZnO	10,00	5,00	2,50	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04
ZnS	20,00	10,00	5,00	2,50	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08

Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Após 24h, realizou-se a avaliação da viabilidade celular pelo teste de XTT. O XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) é um sal tetrazólico de cor amarela que é reduzido a um produto de formazan, de coloração laranja, por ação de enzimas desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas (KOBAN et al., 2012). A formação deste produto é então observada por absorção em espectrofotômetro a 490nm.

Para o preparo da solução estoque de XTT, solubilizou-se 4mg de XTT (Sigma) em 10 ml de caldo MH e adicionou-se 100µl de solução de menadiona preparada com 55 mg de bissulfato de sódio menadiona (Sigma) e 100ml de acetona.

A partir dos resultados obteve-se a concentração inibitória mínima das NPs e o CIM₅₀, a concentração de NPs quando 50% das bactérias foram inibidas.

2.3.4 Extração e padronização do RNA

Primeiramente, amostras de 5ml da suspensão de bactéria, expostas e não expostas a nanopartículas na concentração de CIM₅₀, foram mantidas por 24h em estufa a 37°C sob agitação de 150RPM. Após esse tempo, centrifugou-se a amostra a 5000RPM por 20 minutos, descartando o sobrenadante.

A extração ocorreu por dois métodos diferentes, uma utilizando um sistema magnético e a outra o TRI reagente (TRIzol[®]). Na primeira, empregou-se o kit *mSample Preparation System* RNA (Abbott). Pipetou-se 100µL das partículas magnéticas em um tubo de 5mL livre de DNase e RNase, adicionando 2,4mL de tampão de lise e a ressuspensão do pellet em 500µL de tampão fosfato salino (PBS). O tubo foi então posicionado em bloco térmico a 50°C por 20 minutos, e em seguida na rack magnética por 2 minutos, retirando-se o sobrenadante ao final desse tempo. Seguiu-se duas lavagens com 700µl do tampão de lavagem Wash 1 e duas com Wash 2, ressuspensando o pellet com o tampão e repetindo o procedimento descrito na rack magnética. Após isso pipetou-se 25µl do eluente de RNA, mantendo em bloco térmico a 70°C por mais 20 minutos. Ressuspendeu-se com 63µL de Wash 2 e manteve em repouso por 1 minutos na rack magnética, finalmente reservando o sobrenadante contendo o RNA e mantendo-o congelado a -70°C.

O segundo método se deu com o kit *QIAamp Viral RNA Mini* (Qiagen). O pellet previamente obtido foi ressuspendido em 1ml de PBS, seguido da centrifugação a 5000 RPM por 3 minutos e pipetagem de 100µl da camada contendo as células em um tubo livre de DNase e RNase. Adicionou-se então 300µl de TRI reagente, homogeneizando, e 200µl de clorofórmio. Centrifugou-se por 15 minutos em 12000 RPM e então foi coletada a fase aquosa contendo o RNA. Adicionou-se 450µL de isopropanol e 450µl de etanol 70%. Após vortexar por 15s, o líquido foi transferido para a coluna do kit e centrifugado a 12000RPM por 15s para a filtragem da amostra. Fez-se então três lavagens, uma acrescentando na membrana 400µl de tampão AW1, outra com 300µl do mesmo, e a última com 500µL de AW2, centrifugando por 15s a 12000RPM após cada tampão. Centrifugou-se novamente, com a tampa do tubo aberta. Por último, acrescentou-se 60µl do tampão AVE, deixando por 1 minuto, e então centrifugando-se novamente. O eluído foi então armazenado a -70°C.

As amostras obtidas foram analisadas em espectrofotômetro de microvolume para quantificar os ácidos nucleicos presentes e os contaminantes, pela razão da absorbância de 260nm pela de 280 e 230nm, para detectar, respectivamente, proteínas e outros reagentes contaminantes.

2.3.5 RT-qPCR

Empregou-se a técnica de RT-qPCR para a avaliação da expressão gênica diferencial do gene *agrC*, na presença e ausência de NPs. O RNA ribossômico 16S foi utilizado como controle interno. O reagente *KiCqStart™ One-Step Probe RT-qPCR ReadyMix™* (Sigma-Aldrich) foi usado para a síntese do cDNA e amplificação, junto com o detector *SYBR® Green*. Realizou-se a técnica no equipamento *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (Bio-rad), com os primers, conforme Sully (2014), representados na Tabela 2. As

temperaturas aplicadas foram de 50°C por 15min, 95°C por 3 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1min.

Tabela 2 – Primers utilizados na RT-qPCR

Gene	Primer	Sequência (5'-3')	T _m (°C)
<i>agrC</i>	agrC-F	AAGATGACATGCCTGGCCTA	60
	agrC-R	TGTGCACGTAAAATTTTCGCAG	60
<i>16S rRNA</i>	16s-F	TGATCCTGGCTCAGGATGA	60
	16s-R	TTCGCTCGACTTGCATGTA	60

Fonte: Elaboração própria (2023)

2.3.6 Análise dos dados

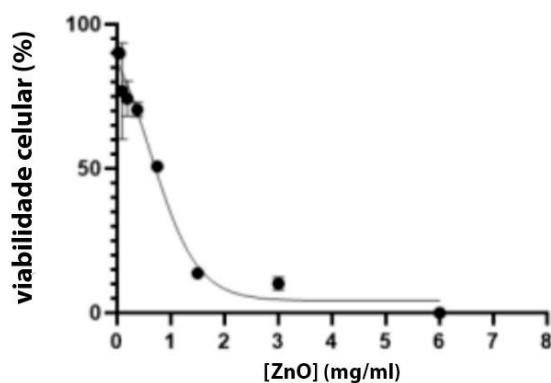
Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de intervalo de Tukey aos níveis de significância de 5% para se averiguar a diferença dos valores. A quantificação dos dados obtidos pela RT-qPCR foram averiguadas com base no método de de C_T comparativo $2^{-\Delta\Delta C_T}$, conforme Schmittgen e Livak (2008).

2.4 Resultados e discussões

2.4.1 Concentração Inibitória Mínima

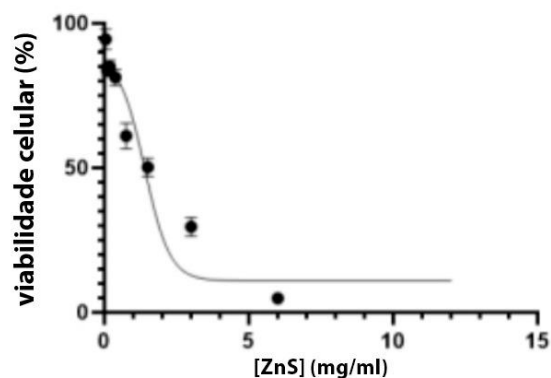
Com os dados obtidos no ensaio de XTT e leitura em espectrofotômetro, plotou-se os gráficos de viabilidade celular por concentração de ZnO e ZnS, representados nas Figuras 7 e 8.

Figura 7 – CIM de ZnO com *S. aureus* a 10^6 UFC/ml



Fonte: Elaborado pelo doutorando responsável (2022)

Figura 8 – CIM de ZnS com *S. aureus* a 10^6 UFC/ml



Fonte: Elaborado pelo doutorando responsável (2022)

As CIM obtidas foram de $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para ZnO e $3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para ZnS e, portanto, as CIM₅₀ foram de $0,75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ e $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Assim, conclui-se que ambas as NPs apresentam atividade

antimicrobiana contra *S. aureus*, sendo ZnO um tratamento mais efetivo visto o menor valor de CIM.

2.4.2 Extração e padronização do RNA

Os resultados obtidos com a quantificação dos ácidos nucleicos totais após a extração com sistema magnético estão representados na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3 – Concentrações de ácidos nucleicos totais e razões de absorbância 260/280 e 260/230 obtidos por leitura em espectrofotômetro de microvolume após extração de RNA com sistema magnético

	Medição 1	Medição 2	Medição 3	Média	Coeficiente de variação (%)
Concentração de ácidos nucleicos (ng/μl)	11,70	3,40	3,80	6,30	74,30
A 260/280	1,48	5,25	6,00	4,24	57,06
A 260/230	0,21E-01	0,07E-01	0,28E-01	0,19E-01	57,28

Fonte: Elaboração própria (2023)

Como pode ser observado na tabela 3, houve grande variação entre as medições, evidenciada pelo coeficiente de variação (CV) alto. Ainda assim, em geral é possível afirmar que não se obteve uma extração eficiente com este método, visto as baixas concentrações de ácidos nucleicos obtidas. Em relação às razões de absorbâncias, também apresentaram grande variação entre as leituras. Além disso, as concentrações muito baixas de ácidos nucleicos podem ter levado a imprecisões dessa medida. Em suma, esta metodologia não se mostrou eficaz e confiável, tanto a técnica de extração como o aparelho utilizado para as medições, que mostrou resultados discrepantes ao analisar uma mesma amostra. Por isso, realizou-se uma nova metodologia, com diferentes técnica de extração e equipamento para medição, e dessa vez comparando com e sem tratamento com ZnO. Os dados resultantes seguem na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentrações de ácidos nucleicos totais e razões de absorbância 260/280 e 260/230 em amostras não tratadas e tratadas com ZnO (indicadas com ZnO) obtidos por leitura em espectrofotômetro de microvolume após extração de RNA com TRI reagente

	Medição 1	Medição 2	Medição 3	Média	Coefficiente de variação (%)
Concentração de ácidos nucleicos (ng/μl)	97,20	97,20	98,80	97,73	0,95
Concentração de ácidos nucleicos (ZnO) (ng/μl)	88,00	87,20	86,80	87,33	0,70
A260/280	1,72	1,68	1,66	1,69	1,99
A260/280 (ZnO)	1,69	1,70	1,70	1,70	0,34
A260/230	4,13E-01	4,18E-01	4,20E-01	4,17E-01	0,87
A260/230 (ZnO)	3,89E-01	3,90E-01	3,91E-01	3,90E-01	0,26

Fonte: Elaboração própria (2023)

Na Tabela 4, em que as amostras tratadas estão especificadas com ZnO, observa-se que a quantidade de ácidos nucleicos extraídos foi significativamente maior, indicando a eficácia desse método. As variâncias calculadas, consideravelmente menores, mostra que os resultados são consistentes. A razão de absorbância 260/280 considerada boa, em que não há contaminantes, fica em torno de 2, e a razão 260/230, em torno de 2 a 2,2, usualmente um pouco acima dos valores de 260/280 (MATLOCK, 2015). Como pode ser visto, os resultados obtidos diferem desses números. Porém, isso é devido ao tampão de eluição usado, que contém azida de sódio para evitar o crescimento de microrganismos e contaminação com RNases. Ele interfere em leituras de entre 220 e 280nm, mas não interfere na PCR. Assim, esses dados não indicam necessariamente haver uma contaminação. Para se avaliar a pureza por esse método, pode-se trocar o tampão AVE por água livre de RNase (QIAGEN, 2023). O menor valor de A260/230 também pode indicar resíduos do TRI reagente usado, uma solução fenólica. O kit utilizado também contém RNA carreadores, o que leva a uma superestimação, porém não muito significativa, da quantidade de RNA presente.

2.4.3 RT-qPCR

Após o primeiro método de extração, a RT-qPCR não conseguiu detectar nenhum dos genes medidos, possivelmente devido a uma ineficácia do método de extração de RNA utilizado. Com o segundo método, a reação conseguiu detectar alguns genes, e os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 5. Não foi realizado o experimento com a nanopartícula de ZnS devido a problemas sua produção.

Tabela 5 – Valores de C_T para os genes *agrC* e *16S* em amostras não tratadas e tratadas com ZnO obtidos com segunda RT-qPCR

Gene	C_{T1}	C_{T2}	C_{T3}	Média
<i>agrC</i>	-	-	-	-
<i>agrC</i> (ZnO)	16,05	11,46	12,02	13,18
16S	21,32	18,23	13,26	17,60
16S (ZnO)	10,16	15,58	19,070	14,94

Fonte: Elaboração própria (2023)

Pela Tabela 5 fica evidente que o gene *agrC* sem tratamento com a nanopartícula não foi devidamente amplificado, uma vez que ele não atingiu o C_T em nenhum ciclo. Além de algumas amostras amplificarem pouco, outras não apresentaram uma curva no padrão sigmóide, como deveria ocorrer. Os dados foram transformados com base em 2^{-C_T} para a realização dos testes estatísticos, como pode ser visto na Tabela 6 e 7. Para a realização dos cálculos, o C_T do *agrC* foi colocado como 40, o número máximo de ciclos realizado.

Tabela 6 – Dados da segunda RT-qPCR transformados com base em 2^{-C_T}

Replicata	<i>agrC</i>	<i>agrC</i> (ZnO)	16S	16S (ZnO)
1	9,09E-13	1,47E-05	3,82E-07	8,74E-04
2	9,09E-13	35,50E-05	32,53E-07	2,04E-05
3	9,09E-13	24,08E-05	10,19E-05	1,82E-06
Média	9,09E-13	20,35E-05	3,52E-05	2,99E-04
Desvio Padrão	0	17,32E-05	5,78E-05	4,98E-04
Coeficiente de Variação	0%	85,09%	164,31%	166,79%

Fonte: Elaboração própria (2023)

Tabela 7 – Análise de variância e teste de Tukey em relação aos resultados obtidos com segunda RT-qPCR

Teste estatístico	Valor p	F
Análise de variância	0,51	0,85
Teste Tukey agrC	0,79	-
Teste Tukey 16S	0,63	-

Fonte: Elaboração própria (2023)

Os testes apontaram que não houve diferença significativa para nenhum dos genes. O aumento na expressão de *agrC* relativo ao controle interno seria de $2E+07$, e o gene constitutivo sofre uma elevação de 8,49 vezes. Contudo, os dados apresentaram coeficiente de variação alto, o que demonstra que não houve muita precisão nos resultados. Isso pode ser devido a uma contaminação das amostras com alguma substância que prejudique a PCR, erros de pipetagem ou falta de otimização dos procedimentos, por exemplo.

Por isso, realizou-se nova RT-PCR em tempo real, tomando-se mais cuidados em relação aos procedimentos e realizando modificações nos processos. Os dados adquiridos estão resumidos na Tabela 8 a seguir.

Tabela 8 – Valores de C_T para os genes *agrC* e *16S* em amostras não tratadas e tratadas com ZnO obtidos com terceira RT-qPCR

Gene	C_{T1}	C_{T2}	C_{T3}
<i>agrC</i>	32,44	32,17	32,41
<i>agrC</i> (ZnO)	-	-	-
<i>16S</i>	23,03	19,86	19,98
<i>16S</i> (ZnO)	28,08	28,19	29,21

Fonte: elaboração própria (2023)

Nesse procedimento, as curvas se aproximaram mais da esperada. Embora o gene *agrC* após o tratamento não tenha sido detectado, os coeficientes de variação dos outros genes apresentaram expressiva melhora, sobretudo para o gene *agrC* sem tratamento, indicando a maior precisão de suas medidas.

Como a RT-qPCR teve um máximo de 40 ciclos realizados, assumiu-se esse valor para o C_T do gene *agrC* na amostra tratada com ZnO-NPs para a realização das análises

estatísticas. Transformando os valores com base em 2^{-C_T} , chegou-se aos resultados apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de C_T da terceira RT-qPCR transformados com base em 2^{-C_T}

Replicata	agrC	agrC (ZnO)	16S	16S (ZnO)
1	1,72E-10	9,10E-13	1,17E-07	3,52E-09
2	2,07E-10	9,10E-13	10,51E-07	3,27E-09
3	1,75E-10	9,10E-13	9,67E-07	1,61E-09
Média	1,85E-10	9,10E-13	7,12E-07	2,80E-09
Desvio padrão	1,94361E-11	0	5,16797E-07	1,03846E-09
Coeficiente de variação (%)	10,52856212	0	72,63139988	37,08652231

Fonte: elaboração própria (2023)

Os resultados obtidos com a ANOVA e teste de Tukey podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10 – Análise de variância e teste de Tukey em relação aos resultados da terceira RT-qPCR

Teste estatístico	Valor p	F
Análise de variância	0,02	5,67
Teste Tukey - <i>agrC</i>	1	-
Teste Tukey - 16S	0,04	-

Fonte: elaboração própria (2023)

A ANOVA mostra que há diferença significativa entre as expressões dos genes, observada pelo valor de F que é menor que F crítico de 4,07, e evidenciado pelo valor de p menor que o nível de significância de 0,05. Avaliando o teste de Tukey, percebe-se que não houve significância na diferença de expressão de *agrC*, porém, curiosamente, o gene 16S com e sem tratamento com ZnO apresenta diferença estatística.

A quantificação da expressão de *agrC* relativo ao 16S na amostra tratada em comparação com o controle não tratado foi de 0,92. Isso revela que houve uma redução de 1,08 vezes devido ao tratamento em relação ao gene de controle interno. Como demonstrado

pelo teste de Tukey, não é uma diminuição expressiva. No entanto, *16S* sofre uma redução de 254,11 vezes na expressão com o tratamento. Visto sua expressiva mudança, cogita-se que esse pode não ter sido um gene adequado para ser usado como controle para averiguar a variação de expressão gênica em *S.aureus* devido ao tratamento com ZnO-NPs. O que não condiz com os dados presentes na literatura, pois esse gene é frequentemente usado como controle, mesmo com tratamento de ZnO-NPs (DAWWAM; AL-SHEMY; EL-DEMERDASH, 2022; PATI *et al.*, 2014). As nanopartícula podem ser responsáveis por ter causado um efeito de redução na expressão desse gene e, conseqüentemente, impactar na síntese de proteínas. Porém, nota-se também que parte da redução pode ter sido causada por degradação dos RNAs, e que na segunda PCR, embora tenha dado valores menos confiáveis, não houve tamanha diferença na expressão desse gene. Assim, talvez seja necessário ajustar mais as condições experimentais, otimizar os protocolos ou considerar alternativas para avaliar a expressão gênica sob a influência do ZnO.

Em comparação, *agrC* teve uma redução de 202,97 vezes. Assim, *agrC* também apresentou redução na expressão, porém menor que o controle. Lembra-se, porém, que o gene apresentou baixa amplificação mesmo sem tratamento e, na condição tratada com ZnO, não obteve um C_T de 40, como foi colocado, não conseguindo ao menos atingir o ciclo limite. Assim, a redução seria ainda maior.

Houve significativa discrepância entre os resultados da segunda e terceira PCRs. Além dos motivos já elencados, essa disparidade pode ter ocorrido por diferença no tempo de cultivo. Nesse caso, a extração dos RNAs pode ter ocorrido quando o microrganismo se encontrava em etapas de crescimento diferentes nas duas análises. Assim, conclui-se que a diferença da expressão de *agrC*, importante gene do sistema agr, é variável e depende do tempo do cultivo. Por conseguinte, a realização de estudos da expressão do gene em diferentes tempos de cultivo e, portanto, diferentes fases de crescimento, seria apropriada.

Além disso, outra possibilidade para confirmar o efeito contra biofilmes por meio do sistema agr é a utilização de cepas mutantes em agr para a comparação.

3. Conclusão

Em relação à atividade antimicrobiana das duas nanopartículas, verificou-se que as duas possuem ação antimicrobiana, porém ZnO apresenta maior atividade. Realizou-se com sucesso uma metodologia para extração do RNA. Também foi possível padronizar uma metodologia para a análise da expressão diferencial do gene *agrC* de *Staphylococcus aureus* com tratamento de ZnO-NPs. Efetuou-se mudanças nos protocolos utilizados para a melhora e concretização dos processos. Por exemplo, no caso da extração de RNAs, passou-se da deficiência na extração do RNA até a extração de quantias consideráveis, atingido pela troca do método e do protocolo. Na RT-qPCR, também se conseguiu significativa melhora estatística dos resultados, alcançando resultados mais realistas. O procedimento ainda pode contar com algumas mudanças para sua otimização, como, por exemplo, a troca do tampão AVE de eluição por água livre de RNase ou substituição do método de verificação da qualidade dos RNAs extraídos, uma vez que esse tampão interfere na averiguação pelo método utilizado e, assim, não sendo possível analisar a qualidade da amostra devidamente antes de realizar a PCR. O protocolo da reação também pode ser modificado para se alcançar melhores resultados, como no que diz respeito ao gene de controle interno que apresentou significativa variação. A pesquisa não pôde ser finalizada com ZnS-NPs devido a entraves na sua produção, o que impede a comparação direta dos efeitos de ZnO e ZnS na expressão do gene *agrC*. No entanto, o estudo com ZnO oferece informações interessantes sobre a modulação deste gene. Verificou-se também que a variação de *agrC* depende da etapa de crescimento da bactéria, por isso sendo adequado um estudo em diferentes tempos de crescimento.

Referências

ÁLVAREZ, A. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals: latest trends and treatments based on bacteriophages. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 12, Nov. 2019. DOI: 10.1128/JCM.01006-19. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.01006-19>. Acesso em: 13 maio 2022.

ANDRE, C. A. **Adesão, formação e composição de biofilme por *Staphylococcus aureus* em poliestireno na presença de nisina**. 2015. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Clínica) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2015. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/6504>. Acesso em: 18 ago. 2022.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Essentials of Real Time PCR**. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>. Acesso em: 20 out. 2023.

BHATTACHARYA, M. *et al.* Prevention and treatment os *Staphylococcus aureus* biofilms. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v. 6, n. 12, p. 1499-1516, Nov. 2015. DOI: 10.1586/14787210.2015.1100533. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14787210.2015.1100533>. Acesso em: 23 set. 2022.

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. *agr*-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 4, ed. 1000052, Apr. 2008. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000052. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000052>. Acesso em: 21 maio 2023.

CHEN, Y. *et al.* Baicalein Inhibits *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and the Quorum Sensing System In Vitro. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, Apr. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0153468. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0153468>. Acesso em: 21 jun. 2022.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n.1, p. 547-569, 2021. DOI: 10.1080/21505594.2021.1878688. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2021.1878688>. Acesso em: 13 maio 2022.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). M7-A6 v. 23, n. 2, 2003. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição, p. 1-53, 2003.

CUNHA, M. L. R. S. Methods for the identification, characterization, and tracking the spread of *Staphylococcus aureus*. In: FETSCH, A. (Ed.). **Staphylococcus aureus**. Academic Press, 2018, cap. 6, p. 112-113. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/book/9780128096710/staphylococcus-aureus>. Acesso em: 23 set. 2022.

CYTIVA, 2000. RNAspin Mini RNA Isolation Kit: Product booklet. 2020. Disponível em: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/molecular-biology/extraction/rna/illustration/rnaspinn-mini-kit-p-06266>. Acesso em: 28 set. 2022.

DANIELS, R.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 261-289, June 2004. DOI: 10.1016/j.femsre.2003.09.004. Disponível em:

<https://academic.oup.com/femsre/article/28/3/261/601729>. Acesso em: 23 ago. 2023.

DHUPAR, A. *et al.* K. In-doped ZnS nanoparticles: structural, morphological, optical and antibacterial properties. **Applied Physics A**, v. 127, n. 263, Mar. 2021. DOI: 10.1007/s00339-021-04425-9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00339-021-04425-9>. Acesso em: 13 set. 2023.

DR_MICROBE. **Staphylococcus aureus bacterias**. 2017. Il. color. Disponível em: <https://www.istockphoto.com/es/foto/staphylococcus-aureus-bacterias-gm643275940-116631709>. Acesso em: 25 out. 2023.

FULINDI, R. B. *et al.* Zinc-Based Nanoparticles Reduce Bacterial Biofilm Formation. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 2, Mar-Apr. 2023. DOI: 10.1128/spectrum.04831-22. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.04831-22>. Acesso em: 13 set. 2023.

GRACE, D; FETSCH, A. *Staphylococcus aureus*—A Foodborne Pathogen: Epidemiology, Detection, Characterization, Prevention, and Control: An Overview. In: FETSCH, A. (Ed.). **Staphylococcus aureus**. Academic Press, 2018, cap. 6, p. 112-113. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128096710/staphylococcus-aureus>. Acesso em: 23 set. 2022.

GUDKOV, S. V. *et al.* A Mini Review of Antibacterial Properties of ZnO Nanoparticles. **Frontiers in Physics**, v. 9, Mar. 2021. DOI: 10.3389/fphy.2021.641481. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphy.2021.641481/full>. Acesso em: 10 set. 2023.

HESS, V. C. **Padronização do método RT-PCR em tempo real para investigação da fusão PML-RAR α da t(15;17) em pacientes com leucemia promielocítica aguda em tratamento.** 2020. 76 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

IDREES, M. *et al.* *Staphylococcus aureus* biofilm: morphology, genetics, pathogenesis and treatments strategies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 14, July 2021. DOI: 10.3390/ijerph18147602. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/18/14/7602>. Acesso em: 13 maio 2022.

JANAKI, A.; SAILATHA, E.; GUNASEKARAN, S. Synthesis, Characteristics and Antimicrobial activity of ZnO nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 144, p. 17-22, June 2015. DOI: 10.1016/j.saa.2015.02.041. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1386142515001936?via%3Dihub>. Acesso em: 11 set. 2023.

JONES, N. *et al.* Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 279, n. 1, p. 71-76, Feb. 2008. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.01012.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/279/1/71/499797>. Acesso em: 21 jun. 2022.

KADIYALA, U. *et al.* Unexpected insights into antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Nanoscale**, n. 10, Mar. 2018. DOI: 10.1039/C7NR08499D. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/NR/C7NR08499D>. Acesso em: 11 set. 2023.

KAUR, N. *et al.* A Review on Zinc Sulphide Nanoparticles: From Synthesis, Properties to Applications. **Journal of Bioelectronics Nanotechnology**, v. 1, n. 1, Dec. 2016. Disponível em: <https://www.avensonline.org/wp-content/uploads/JBN-2475-224X-01-0006.pdf>. Acesso em: 13 set. 2023.

KHAN, B. A. *et al.* Investigational therapies targeting quorum-sensing for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 24, n. 5, 2015. DOI: 10.1517/13543784.2015.1019062. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543784.2015.1019062>. Acesso em: 23 jan. 2023.

KUMAR, R.; SAKTHIVEL, P.; MANI, P. Structural, optical, electrochemical, and antibacterial features of ZnS nanoparticles: incorporation of Sn. **Applied Physics A**, v. 125, n. 543, July 2019. DOI: 10.1007/s00339-019-2823-2. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00339-019-2823-2>. Acesso em: 13 set. 2023.

LE, K. Y.; OTTO, M. Quorum-sensing regulation in staphylococci – an overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, Oct. 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01174. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01174/full>. Acesso em: 16 set. 2022.

LEONEL, T. F. *et al.* The influence of copper and chromium ions on the production of exopolysaccharide and polyhydroxybutyrate by *Rhizobium tropici* LBMP-C01. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 27, p. 445-455, Jan. 2019. DOI: 10.1007/s10924-018-1359-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10924-018-1359-4>. Acesso em: 28 set. 2022.

LIMA, L. M. Conceitos básicos de técnicas em biologia molecular. 1. ed. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/278102/1/DOC191.pdf>. Acesso em: 20 out. 2023.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, artigo 178, Dec. 2014. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00178. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2014.00178/full>. Acesso em: 30 maio 2022.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 3, p. 190-212, Mar. 2004. Il. p&b. DOI: 10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14631001>. Acesso em: 27 out. 2023.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. cap. 19.

MAHAMUNI-BADIGER *et al.* Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 108, Mar. 2020. DOI: 10.1016/j.msec.2019.110319. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493119323793>. Acesso em: 18 mar. 2024.

MANARA, S. *et al.* Whole-genome epidemiology, characterisation, and phylogenetic reconstruction of *Staphylococcus aureus* strains in a paediatric hospital. **Genome Medicine**, v. 10, n. 82, Nov. 2018. DOI: 10.1186/s13073-018-0593-7. Disponível em: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-018-0593-7>. Acesso em: 23 jan. 2023.

MATLOCK, B. Assessment of Nucleic Acid Purity. **Thermo Fisher Scientific**, Technical Note 52646, 2015. Disponível em: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>. Acesso em: 28 out. 2023.

MAYTON, H. M.; WALKER, S. L.; BERGER, B. W. Disrupting Irreversible Bacterial Adhesion and Biofilm Formation with an Engineered Enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 13, June 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00265-21>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.00265-21>. Acesso em: 25 abr. 2024.

MUHAMMAD, M. H. *et al.* Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, May 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00928. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00928/full>. Acesso em: 13 maio 2022.

MUKHERJEE, S. *et al.* Biofilm – a syntrophic consortia of microbial cells: boon or bane?. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 195, p. 5583-5604, July 2022. DOI: 10.1007/s12010-022-04075-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-022-04075-4>. Acesso em: 18 ago. 2022.

NAGAR, V. *et al.* ZnO Nanoparticles: Exposure, toxicity mechanism and assessment. **Materials Today: Proceedings**, v. 69, n. 1, p. 56-63, 2022. DOI: 10.1016/j.matpr.2022.09.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214785322057935?via%3Dihub>. Acesso em: 21 maio 2023.

OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMÕES, M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. **Toxins**, v. 10, n.6, 2018. DOI:

10.3390/toxins10060252. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/10/6/252>. Acesso em: 13 maio 2022.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 277-284, jul./set. 2010. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/32626>. Acesso em: 10 jul. 2023.

OTTO, M. *Staphylococcal* biofilms. **Microbiolol Spectrum**, v. 6, n.4, Aug. 2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.gpp3-0023-2018>. Acesso em: 1 maio 2022.

PATI, R. *et al.* Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.10, n.6, p. 1195-1208, Aug. 2014. DOI: 10.1016/j.nano.2014.02.012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1549963414001142?via%3Dihub>. Acesso em: 4 nov. 2023.

PREDA, V. G.; SÂNDEULESCU, O. Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. **Discoveries Journals**, v. 7, n. 3, July-Sep. 2019. DOI: 10.15190/d.2019.13. Disponível em: <https://discoveriesjournals.org/discoveries/D.2019.03.RA-Preda-Sandulescu.DOI>. Acesso em: 23 ago. 2023.

QIAGEN. **QIAamp® Viral RNA Mini Handbook**, June 2023. Disponível em: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>. Acesso em: 27 out. 2023.

SANTOS, A. L. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007. DOI: 10.1590/S1676-24442007000600005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpml/a/gHvPXyhgzbWt69YKxGqPFHk/>. Acesso em: 23 ago. 2023.

SCHILCHER, K.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 3, ed. 00026-19, Sep. 2020. DOI: 10.1128/MMBR.00026-19. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32792334/>. Acesso em: 30 ago. 2023.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, June 2008. DOI: 10.1038/nprot.2008.73. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2008.73>. Acesso em: 28 set. 2022.

SHARMA, D. *et al.* Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 3, p. 1224-1229, Nov. 2010. DOI: 10.1016/j.tsf.2010.08.073. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0040609010011880?via%3Dihub>. Acesso em: 11 set. 2023.

SHIPLEY, G. L. An introduction to real-time PCR. In: DORAK, M. T. (Ed.). **Real-time PCR**. Taylor & Francis Group, 2006, cap. 1, p. 1-37.

SHIRKHANLOU, H. *et al.* Preparation of ZnO and ZnS nanoparticles and in-vitro study of their antimicrobial effect. **Journal of Pharmaceutical and Health Sciences**, v. 5, n. 2, p. 171-179, June 2017. Disponível em: https://jphs.tms.iau.ir/article_531698.html. Acesso em: 13 set. 2023.

SIRELKHATIM, A. *et al.* Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. **Nano-Micro Letters**, v. 7, n. 3, p. 219-242, Apr. 2015. DOI: 10.1007/s40820-015-0040-x. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40820-015-0040-x>. Acesso em: 21 jun. 2022.

SOLA, M. C. *et al.* Mecanismos de quorum sensing e sua relevância na microbiologia de alimentos. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v. 8, n. 14, p. 1419-1441, Jun. 2012. Disponível em: <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/3965>. Acesso em: 26 ago. 2023.

SOLANO, C.; ECHEVERZ, M.; LASA, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 18, p. 96-104, Apr. 2014. DOI: 10.1016/j.mib.2014.02.008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527414000290?via%3Dihub>. Acesso em: 24 ago. 2023.

SPEZIALE, P. *et al.* Prevention and Treatment of Staphylococcus Biofilms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 30, p. 3185-3195, Feb. 2008. Il. p&b. DOI: 10.2174/092986708786848442. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/13172>. Acesso em: 27 ago. 2023.

SUBHADARA, B. *et al.* Control of Biofilm Formation in Healthcare: Recent Advances Exploiting Quorum-Sensing Interference Strategies and Multidrug Efflux Pump Inhibitors. **Materials**, v. 11, n. 1676, Sep. 2018. DOI: 10.3390/ma11091676. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1996-1944/11/9/1676>. Acesso em: 21 jun. 2022.

SULLY, E. K. *et al.* Selective chemical inhibition of *agr* quorum sensing in *Staphylococcus aureus* promotes host defense with minimal impact on resistance. **PloS Pathogens**, v. 10, n. 6, June 2014. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004174. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004174>. Acesso em: 28 set. 2022.

TAL-GAN, Y. *et al.* Highly Potent Inhibitors of Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Revealed Through a Systematic Synthetic Study of the Group-III Autoinducing Peptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, p. 7869-7882, May 2013. DOI: 10.1021/ja3112115. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja3112115>. Acesso em: 27 ago. 2023.

TAN, L. *et al.* Therapeutic Targeting of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (*agr*) System. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, Jan. 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00055. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00055/full>. Acesso em: 1 set. 2023.

THEONDEL, M. *et al.* Peptide signaling in the *Staphylococci*. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 1, p. 117-151, Jan. 2011. DOI: 10.1021/cr100370n. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr100370n>. Acesso em: 21 maio 2023.

VÁSQUEZ, J. K.; BLACKWELL, H. E. Simplified Autoinducing Peptide Mimetics with Single-Nanomolar Activity Against the *Staphylococcus aureus* AgrC Quorum Sensing Receptor. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, p. 484-492, Feb. 2019. DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00002. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.9b00002>. Acesso em: 27 ago. 2023.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. In: FETSCH, A. (Ed.). **Staphylococcus aureus**. Academic Press, 2018, cap. 6, p. 112-113. Il. color Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128096710/staphylococcus-aureus>. Acesso em: 23 set. 2022.

VIJAYAN, S. *et al.* Investigation of Structural, Optical and Antibacterial Activity of ZnS Nanoparticles. **Journal of Cluster Science**, v. 32, p. 1602-1608, Nov. 2020. DOI: 10.1007/s10876-020-01923-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10876-020-01923-3>. Acesso em: 13 set. 2023.

WANG, B. *et al.* Activation and Inhibition of the Receptor Histidine Kinase AgrC Occurs through Opposite Helical Transduction Motions. **Molecular Cell**, v. 53, n.6 p. 929-940, Mar. 2014. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.02.029. Il. p&b Disponível em: [https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765\(14\)00201-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1097276514002019%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765(14)00201-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1097276514002019%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 9 set. 2023.

WANG, L.; HU, C.; SHAO, L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1227-1249, Feb. 2017. DOI: 10.2147/IJN.S121956. Disponível em: <https://www.dovepress.com/the-antimicrobial-activity-of-nanoparticles-present-situation-and-pros-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>. Acesso em: 21 set. 2023.

YARWOOD, J. M. *et al.* Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 6, p. 1838-1850, Mar. 2004. DOI: 10.1128/JB.186.6.1838-1850.2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC355980/>. Acesso em: 23 ago. 2023.

ZHANG, L. *et al.* Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). **Journal of Nanoparticle Research**, v. 9, p. 479-489, 2007. DOI: 10.1007/s11051-006-9150-1. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-006-9150-1>. Acesso em: 11 set. 2023.

ZHAO, A. *et al.* Reconstitution of the *S. aureus* agr quorum sensing pathway reveals a direct role for the integral membrane protease MroQ in pheromone biosynthesis. **PNAS**, v. 119, n. 33, ed. 2202661119, 2022. DOI: 10.1073/pnas.2202661119. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2202661119>. Acesso em: 27 ago. 2023.