

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JULIANA MIHO TANABE

**EFEITO DO ASPARTATO SOBRE O CRESCIMENTO E FORMAÇÃO DE
BIOFILMES POR *Staphylococcus aureus***

BURI – SP

2021

JULIANA MIHO TANABE

EFEITO DO ASPARTATO SOBRE O CRESCIMENTO E FORMAÇÃO DE BIOFILMES
POR *Staphylococcus aureus*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Alimentos pela
Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel
Filho.

BURI – SP

2021

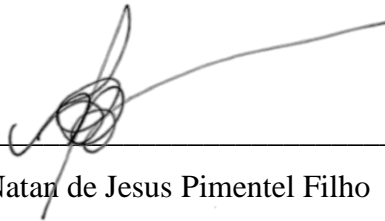
JULIANA MIHO TANABE

**EFEITO DO ASPARTATO SOBRE O CRESCIMENTO E FORMAÇÃO DE
BIOFILMES POR *Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Alimentos pela
Universidade Federal de São Carlos.

Aprovado em: 04/05/2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel Filho
(Orientador)

Universidade Federal de São Carlos

Documento assinado digitalmente
gov.br Moyses Naves de Moraes
Data: 05/05/2021 19:17:14-0300
CPF: 946.407.001-30

Prof. Dr. Moysés Naves de Moraes
Universidade Federal de São Carlos



Prof.ª. Dr.ª Cleriane André
Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo

Tanabe, Juliana Miho

Efeito do aspartato sobre o crescimento e formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* / Juliana Miho
Tanabe -- 2021.

48f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos,
campus Lagoa do Sino, Buri

Orientador (a): Natan de Jesus Pimentel Filho

Banca Examinadora: Moysés Naves de Moraes, Cleriane
André

Bibliografia

1. Controle de crescimento microbiano. 2. Virulência. 3.
Peptídeos antimicrobianos. I. Tanabe, Juliana Miho. II.
Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Lissandra Pinhatelli de Britto - CRB/8 7539

Dedico este trabalho às mulheres da minha vida,

Minha mãe e irmãs.

AGRADECIMENTOS

Às forças maiores por me dar saúde.

À minha mãe Clarice, que tanto se sacrificou para que não me faltasse nada, e sempre incentivou meus estudos.

À minhas irmãs Fabiola e Fernanda, que me deram e dão apoio emocional sempre que precisei, por serem minhas melhores amigas.

À Universidade Federal de São Carlos, que me permitiu realizar o curso dos meus sonhos.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa, auxiliando-me financeiramente.

Ao meu orientador Natan de Jesus Pimentel Filho, por acreditar no meu potencial, e por ter me ajudado a descobrir o amor pela pesquisa. Sou extremamente agradecida por todos os ensinamentos e paciência. Sempre que eu falar de pessoas que me inspiram, me lembrarei dele.

Ao Moysés Naves de Moraes, que foi fundamental para realização da parte estatística deste trabalho.

À República Sen π , formada por mulheres extremamente fortes, que me proporcionou anos de felicidade, amor, companheirismo e, principalmente muito aprendizado.

Ao Denner, que me levou para o laboratório aos sábados de manhã para que eu pudesse medir as densidades ópticas.

À Ysabela, que me traz conforto e palavras amigas quando mais preciso.

A todos meus amigos, minha segunda família.

OBRIGADA POR TANTO!

RESUMO

Staphylococcus aureus é um patógeno oportunista de grande relevância, uma vez que está frequentemente associado a surtos de intoxicações alimentares. Quando submetidos a algum tipo de estresse celular, certos microrganismos tendem a se aglomerar em forma de biofilme, tornando-se mais resistente a agentes externos, incluindo tratamentos antimicrobianos como o uso da bacteriocina nisina. O aspartato é uma molécula importante para o metabolismo celular, pois há evidências de sua participação na manutenção da homeostase e também na expressão de fatores de virulência. Neste estudo, objetivou-se avaliar as possíveis influências do aminoácido aspartato sobre o crescimento, adesão e formação de biofilme por *S. aureus*. Estudou-se também a influência da bacteriocina nisina, em concentrações subinibitórias, sobre a formação de biofilme em superfície de poliestireno na presença e ausência de aspartato. O crescimento celular foi avaliado em meio sintético suplementado ou não com o aminoácido em duas condições, aerofilia e microaerofilia, em frascos cônicos sob agitação orbital e em microplacas de 96 poços, respectivamente. Adesão celular e formação de biofilmes foram avaliadas em duas superfícies comumente utilizadas nas indústrias de alimentos, aço inoxidável e poliestireno, sendo a formação de biofilme nesta última superfície também avaliada na presença de concentrações subinibitórias de nisina. *S. aureus* cresceu atingindo absorvância máxima, tanto em condições aeróbicas quanto em condições microaeróbicas, em meio sintético adicionado de aspartato. A adesão celular sobre a superfície de poliestireno não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) na presença ou ausência de aspartato. Por outro lado, em superfície de aço inoxidável, a adesão inicial foi superior em meio suplementado com aspartato ($p < 0,05$), mas não houve diferença significativa no biofilme formado após 24 e 48 h na presença ou ausência do aminoácido. Concentrações subinibitórias de nisina não influenciaram na adesão celular em superfície de poliestireno. Os resultados indicam a influência do aspartato no crescimento microbiano e na adesão inicial do microrganismo sobre aço inoxidável. Mais estudos, avaliando diferentes estirpes de *S. aureus*, precisam ser realizados para se obter respostas mais conclusivas do papel do aminoácido para a espécie.

Palavras-chave: Controle de crescimento microbiano. Virulência. Peptídeos antimicrobianos.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen of great relevance, since it is often associated with outbreaks of food poisoning. When submitted to some type of cell stress, certain microorganisms tend to cluster in the form of a biofilm, becoming more resistant to external agents, including antimicrobial treatments such as the use of the bacteriocin nisin. Aspartate is an important molecule for cellular metabolism, as there is evidence of its role in maintaining cellular homeostasis and also in the expression of virulence factors. This study aimed to evaluate the possible influences of the amino acid aspartate on growth, adhesion, and biofilm formation by *S. aureus*. The influence of the bacteriocin nisin, in subinhibitory concentrations, on the formation of biofilm on a polystyrene surface in the presence and absence of aspartate was also evaluated. Cell growth was conducted in a synthetic medium supplemented or not with the amino acid in two conditions, aerophilic and microaerophilic, in conical flasks under orbital assembly and into 96-well microplates, respectively. Cell adhesion and biofilm formation were studied on two surfaces commonly used in the food industries, stainless steel and polystyrene, and the biofilm formation on this last surface was also evaluated in the presence of subinhibitory dosages of nisin. *S. aureus* grew reaching maximum absorbance, both in aerobic and microaerobic conditions in synthetic medium with aspartate. Cell adhesion on a polystyrene surface did not show a significant difference ($p > 0.05$) in the presence or absence of aspartate. On the other hand, in stainless steel surface, the initial adhesion was higher in medium supplemented with aspartate ($p < 0.05$), but there was no difference in the biofilm formed after 24 and 48 h in the presence or absence of the amino acid. Subinhibitory concentrations of nisin did not influence cell adhesion on a polystyrene surface. The results highlight the effect of aspartate on microbial growth and initial adhesion of the microorganism on stainless steel. Further studies, evaluating different strains of *S. aureus*, need to be carried out to obtain more conclusive responses to the role of the amino acid for this species.

Key-words: Microbial growth control. Virulence. Antimicrobial peptide.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.2	Biofilme	13
2.2.1	Mecanismos moleculares envolvidos na formação de biofilme em <i>S. aureus</i> ...	15
2.2.2	Medidas de controle de biofilme	18
2.3	Importância do aspartato para fisiologia microbiana.....	22
3	METODOLOGIA	23
3.1	Microrganismos e condição de cultivo	23
3.2	Bacteriocina	23
3.3	Efeito de aspartato sobre o crescimento de <i>S. aureus</i>	24
3.4	Influência de aspartato na formação de biofilmes por <i>S. aureus</i>	24
3.4.1	Adesão de <i>S. aureus</i> em superfície de poliestireno	24
3.4.2	Formação de biofilme em cupons de aço inoxidável por <i>S. aureus</i>	25
3.5	Influência do aspartato na resistência de <i>S. aureus</i> à nisina	26
3.6	Análise de dados	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um microrganismo oportunista de grande relevância, pois é responsável por diversas doenças que incluem intoxicações alimentares. A capacidade de produzir enterotoxinas é considerada um dos principais fatores de virulência. Somada a outras diversas características que tornam esse patógeno uma bactéria extremamente resistente a tratamentos antimicrobianos.

Outro importante fator de virulência em *S. aureus* é a capacidade de formar biofilmes, uma forma de vida bacteriana de agregados de células em que a aderência em superfícies sólidas confere proteção ao micro-organismo em situações em que a condição não é favorável à sua sobrevivência. Essa adesão é embebida por uma matriz viscosa produzidas pelas próprias bactérias. A ruptura do biofilme caracteriza seu último estágio e é nesta etapa que o *quorum sensing*, mecanismo de comunicação celular, se mostra mais presente. Estudos apontam que esse meio de comunicação está ligado a expressão de fatores de virulência.

A partir do momento em que o biofilme atinge a etapa de adesão irreversível, sua remoção exige métodos abrasivos e são de difícil remoção, portanto, a melhor medida de controle é evitar sua formação. Assim, estudos são realizados a fim de melhorar os protocolos de limpeza e sanitização, seja por meio da redução da adesão, ou da desestabilização da matriz extracelular, de modo que os sanitizantes sejam capazes de penetrar nos biofilmes. Os efeitos da nisina, bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sobre os biofilmes vêm sendo estudados, uma vez que é muito eficaz contra bactérias, principalmente gram-positivas.

Outra importante molécula, o aspartato, tem sido estudada pelo nosso grupo de pesquisa e tem sido associada como molécula chave na adaptação de *S. aureus* a peptídeos antimicrobianos.

Considerando a importância dos biofilmes, este trabalho avaliou a possível influência do aminoácido aspartato sobre o crescimento, adesão e formação do biofilme por *S. aureus*, bem como a influência da bacteriocina nisina, em concentrações subinibitórias, na formação de biofilmes na presença e ausência de aspartato.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva, não esporulada, aeróbia ou anaeróbia facultativa, com metabolismo respiratório e fermentativo (DEINHARDT-EMMER *et al.*, 2018; ALHASHIMI; AHMED; MUSTAFA, 2017), mesófila e, normalmente, halotolerante, ou seja, cresce em meios com até 10 % da composição de sal e em baixa atividade de água (0,86), além de suportar ampla faixa de pH, variando de 4,0 a 9,0 (ALHASHIMI; AHMED; MUSTAFA, 2017; FEITOSA *et al.*, 2017). Apresenta formato esférico que varia de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro e pode ser encontrado comumente sobre a pele, pelo e nas fossas nasais de humanos saudáveis. É considerado um patógeno oportunista muitas vezes presente em ambientes hospitalares, onde podem causar diversas doenças, como infecções cutâneas, endocardites, choque tóxico, dentre outras, além de ser frequentemente associado a casos e surtos de intoxicação alimentar (FERRASSO; GONZALEZ; TIMM, 2015; LI *et al.*, 2019).

A importância de *S. aureus* está relacionada à facilidade em causar infecções em humanos, tornando o que antes poderia ser uma bactéria inócua em patogênica (GOMES, 2013). Parte de sua virulência está associada à sua morfologia, que permite produção de toxinas e hemolisinas; apresenta estruturas de aderência como as adesinas; se adapta e desenvolve resistência a antimicrobianos e sanitizantes; além de formar biofilme (WELTE *et al.*, 2019; MALEKI *et al.*, 2019; SURESH; BISWAS, 2019).

O mecanismo de *quorum sensing* é considerado essencial na virulência de *S. aureus*. Esse mecanismo está presente em diversas espécies bacterianas e possibilita a comunicação entre as bactérias em função da densidade populacional, levando a alterações na expressão dos genes, permitindo a regulação de funções fisiológicas responsáveis pelos fatores de virulência, motilidade, bioluminescência, dentre outros (LE SCORNET; REDDER, 2018; BRAMHACHARI, 2018; SOLA *et al.*, 2012; HAQUE *et al.*, 2018). O *quorum sensing* é regulado por moléculas sinalizadoras, que recebem o nome de auto indutoras (AI), liberadas pela bactéria no meio extracelular por difusão sendo a quantidade proporcional à densidade populacional. É perigosa ao hospedeiro, pois só é detectada em altas concentrações, depois que as bactérias já iniciaram o processo de expressão dos genes que as tornam patogênicas (LE SCORNET; REDDER, 2018; SOLA *et al.*, 2012; BRAMHACHARI, 2018). Em *S. aureus* o sistema de *quorum sensing* é coordenado pelo operon *agr*.

As toxinas são metabólitos tóxicos que surgem do desenvolvimento das bactérias e, segundo Boswihi e Udo (2018), além da ingestão de alimentos contaminados, há a possibilidade de o indivíduo adquirir patologias por meio da quebra da barreira do epitélio, havendo inserção dessas toxinas na corrente sanguínea. Além de apresentar resistência ao calor, não sendo destruídos mesmo quando submetidos a processos térmicos e a radiações ionizante e não ionizante, esses metabólitos não apresentam odor ou sabor, não sendo, portanto, detectado no momento da ingestão (LI *et al.*, 2018).

As enterotoxinas são conhecidas como superantígenos e, no genoma bacteriano, os genes que as codificam são identificados pela sua inicial “SE”, de enterotoxina estafilocócica (*staphylococcal enterotoxin*). Sua principal função é converter o tecido em que o microrganismo se encontra em nutrientes para seu próprio crescimento (ZELL *et al.*, 2008). As cepas de *S. aureus* produzem cerca de 23 superantígenos, divididas entre os clássicos (SEA, SEB, SEC, SED e SEE), e não clássicos, sendo as mais comumente envolvidas em casos e surtos de intoxicação alimentar (BOSWIHI; UDO, 2018; GOLDMANN; MEDINA, 2018; LI *et al.*, 2018).

De acordo com Samadi, Klems e Untersmayr, (2018), SEB induziu ao aumento da secreção da proteína claudina-2 que agem na permeabilidade das células endo e epiteliais, facilitando o transporte do antígeno nos tecidos epiteliais de camundongos.

Staphylococcus aureus apresenta cápsula de polissacarídeo externa à parede celular, sendo que de 11 tipos de polissacarídeos identificados, os tipos 6 e 7 estão altamente associados às intoxicações anteriormente citadas. Essa cápsula faz com que a fagocitose seja inibida, uma vez que essa estrutura camufla a célula microbiana, aumentando sua capacidade de invadir os tecidos. No glicocálice ainda há a presença de adesinas, que têm poder de aderência da bactéria, por ligar-se por meio de receptores químicos à superfície da célula hospedeira (GOMES, 2013).

O uso desenfreado de antibióticos desde a descoberta da penicilina tem sido a maior razão do aumento da resistência dos microrganismos aos fármacos. Portanto, algumas cepas de *S. aureus* vêm apresentando resistência a antibióticos β -lactâmicos, que são os medicamentos mais usados contra bactérias de Gram-positivas (CHACÓN *et al.*, 2019; DADASHI *et al.*, 2019).

Além de se associarem a biofilme, o mecanismo de resistência de *S. aureus* contra esse grupo de antibióticos conta com ação de enzimas e até mesmo a mudança de sítio de ação. A

β -lactase é a enzima responsável por hidrolisar e inativar o anel β -lactâmico do antibiótico, tendo poder de reduzir ou anular a eficácia do mesmo (IWASE et al., 2019). Já a mudança de sítio de ação é mediada pelo elemento Cassete Cromossômico (SCCmec), que consegue reduzir a afinidade entre as proteínas de ligação e o antibiótico ao codificar uma outra proteína semelhante, a PBP2A, que se liga à penicilina no lugar da bactéria (SILVA; ALCANTARA; MOTA, 2018; CONG; YANG; RAO, 2020).

A fim de driblar os mecanismos de defesa de *S. aureus*, o antibiótico metilina surgiu como alternativa, porém já nos anos de 1960 foi identificada a primeira cepa resistente, nomeada de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) (DADASHI et al., 2019); posteriormente passou-se a utilizar a vancomicina como alternativa no tratamento de MRSA, porém também surgiram cepas resistentes à mesma (VRSA) (CONG; YANG; RAO, 2020).

Além da resistência aos antimicrobianos, é importante salientar a resistência de *S. aureus* aos sanitizantes, visto que estes agentes são comumente utilizados para inativar e destruir patógenos nas indústrias (SEIER-PETERSEN et al., 2015; SANTANA, 2016). A preocupação não é em relação à eficácia dos produtos, mas sim pela capacidade dos microrganismos permanecerem ativos por longos períodos em superfícies secas graças à formação de biofilme, o que dificulta a ação de inativação dos sanitizantes. Ademais, o uso em doses subletais dos produtos de limpeza têm permitido o surgimento de cepas adaptadas (BUZÓN-DURÁN et al., 2017; QUERIDO et al., 2019; SEIER-PETERSEN et al., 2015).

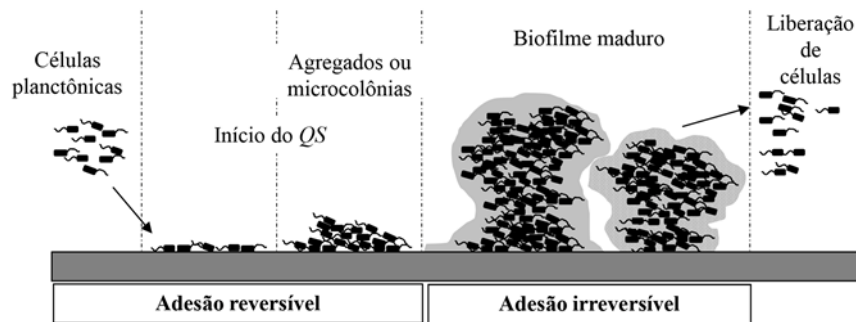
2.2 Biofilme

Biofilme é um termo que descreve uma forma de existência microbiana caracterizada pela adesão dos microrganismos em superfícies, sejam elas biológicas ou não, por meio de produção de substâncias poliméricas extracelulares, capazes de formar redes gelatinosas com função de manter a sobrevivência em condições não favoráveis (KASNOWSKI et al., 2010). Essa forma de vida permite a colonização de superfícies, além de reduzir a sensibilidade a antimicrobianos, pois torna mais difícil a penetração do fármaco nesta estrutura tridimensional (SHI; MAO; WANG, 2014; DONG et al., 2015).

Diferentes pesquisadores têm proposto diferentes etapas para explicar o processo de formação de biofilme por *S. aureus* (MOHAMMED et al., 2018; SURESH; BISWAS, 2019; APARNA; YADAV, 2008; MACEDO; ABRAHAM, 2009). A figura 1 apresenta um modelo muito aceito no qual a formação de biofilmes microbianos inicia-se pela adesão reversível à

superfície com a formação de microcolônias, seguida pela adesão irreversível com a produção de EPS e formação de estruturas com formato típico de cogumelos e, por fim, a ruptura dos biofilmes. Para cada uma das etapas, diversos fenômenos estão envolvidos.

Figura 1. Estágios do desenvolvimento dos biofilmes.



Fonte: Adaptado de Macedo e Abraham (2009).

O início do desenvolvimento do biofilme se dá de forma muito rápida, podendo ocorrer em poucos segundos, sendo esse estágio denominado agregação no qual as células se fixam a um substrato. Essa aderência entre a superfície microbiana e a superfície do substrato ocorre graças às interações hidrofóbicas, eletrostáticas e de *Van der Waals* (MONDS; TOOLE, 2009). Superfícies onde há rugosidades têm menor tensão superficial e maior da área de contato, tornando-a mais suscetível à formação do biofilme, bem como materiais hidrofóbicos (como o teflon e outros plásticos), como apontam alguns estudos. Nessa fase, as bactérias crescem de forma logarítmica (ANTUNES *et al.*, 2010; APARNA; YADAV, 2008; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

Minutos após a etapa de agregação, ocorre a ligação irreversível. As bactérias começam a se multiplicar e ativar a produção de matriz composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS – *extracellular polymeric substances*) (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). O EPS representa cerca de 90% da massa do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Quando o agregado atinge uma espessura maior que 10 μm , a matriz extracelular composta de proteínas (BRANDA *et al.*, 2006; DIGGLE *et al.*, 2006), carboidratos e DNA extracelular (eDNA) (GUITON *et al.*, 2009), pili, flagelo e outras estruturas de adesão como as adesinas (CEGELSKI *et al.*, 2009; PINKNER *et al.*, 2006) formam uma estrutura tridimensional que estabilizar o biofilme. A retenção da água se dá por meio de interações com

polissacarídeos hidrofílicos, enquanto os nutrientes que se encontram na matriz são usados para no metabolismo das bactérias associadas (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Graças ao mecanismo do *quorum sensing*, enzimas são secretadas de modo que a composição da EPS muda conforme o contexto em que o biofilme se encontra (GJERMANSSEN *et al.*, 2005; SAUER *et al.*, 2004). Pode-se afirmar, então, que essa estrutura é altamente robusta e complexa fornecendo elevada proteção a agentes físicos e químicos, e à dessecação (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

No estágio de maturação, a espessura do biofilme se encontra superior a 100 µm, sendo a função da matriz proteger a bactéria contra defesas da resposta imune, como a opsonização, fagocitose e antimicrobianos (JEFFERSON, 2004; LEID *et al.*, 2002). Quando o biofilme é heterogêneo e as bactérias atuam em harmonia, é possível desencadear mais mecanismos de defesa e fatores de virulência (VUONG *et al.*, 2004), tornando toda a estrutura mais tolerante contra antimicrobianos (FRANK *et al.*, 2007); extrema resistência à fagocitose (SCHOMMER *et al.*, 2011; WAGNER *et al.*, 2009); e maior resistência à força física, bem como à força de tensão causada por lavagem cirúrgica (JEFFERSON, 2004).

O último acontecimento é a dispersão celular. Nessa etapa algumas das bactérias se desprendem do biofilme para retornarem ao estado planctônico, onde elas podem colonizar outro local. Porém, essa etapa é demorada e pode levar vários dias após o término da etapa anterior (ANTUNES *et al.*, 2010; APARNA; YADAV, 2008). Esse desprendimento pode ocorrer devido à formação de um ambiente anaeróbio, o que aumenta a concentração de gases insolúveis e ácidos no interior do biofilme, tornando a estrutura mais fraca (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010).

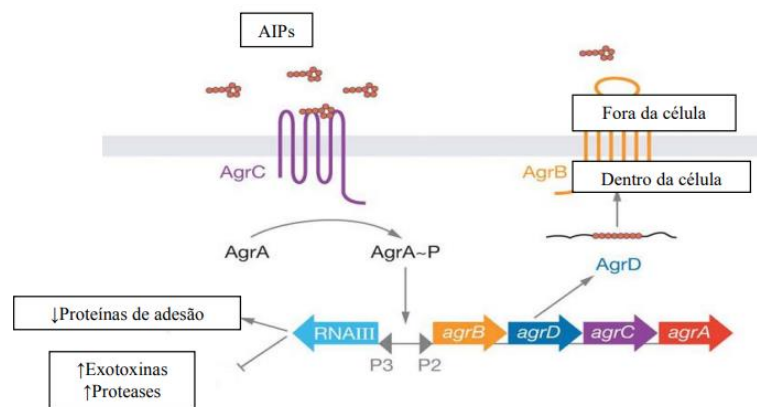
2.2.1 Mecanismos moleculares envolvidos na formação de biofilme em *S. aureus*

Não se pode relacionar ao certo a formação de biofilme com os diferentes fenótipos de *S. aureus*, mas sabe-se que reguladores globais de virulência, incluindo SigB, LuxS, SarA (*staphylococcal accessory regulator*) além do sistema *quorum sensing* mediado pelo locus *agr* estão envolvidos no referido processo (VALLE *et al.*, 2003; CEGELSKI *et al.*, 2008; OTTO, 2008; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013).

O locus *agr* constitui-se de dois operons divergentes controlados pelos promotores P2 - que codifica as proteínas AgrA, AgrB, AgrC e AgrD - e P3, que codifica o RNAlII. As proteínas

AgrB e AgrD são produtos dos genes *agrB* e *agrD*, respectivamente, e formam um peptídeo chamado auto-indutor (AIP). Em elevada densidade celular, as altas concentrações de AIP facilitam sua ligação ao receptor presente em AgrC, uma proteína transmembrânica, que leva à fosforilação de AgrA, que induz os promotores P2 e P3 a ativarem a transcrição de várias proteínas e também do RNAIII, um importante fator de transcrição de diversos genes de virulência. O RNAIII, quando em altas concentrações, regula negativamente a expressão de genes que codificam exoproteínas, associadas aos danos causados pelo microrganismo ao hospedeiro, facilitando o desenvolvimento de infecções por MRSA (GEORGE; MUIR, 2007; CEGELSKI *et al.*, 2008; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013). A figura 2 sumariza a regulação do locus *agr* em *S. aureus*.

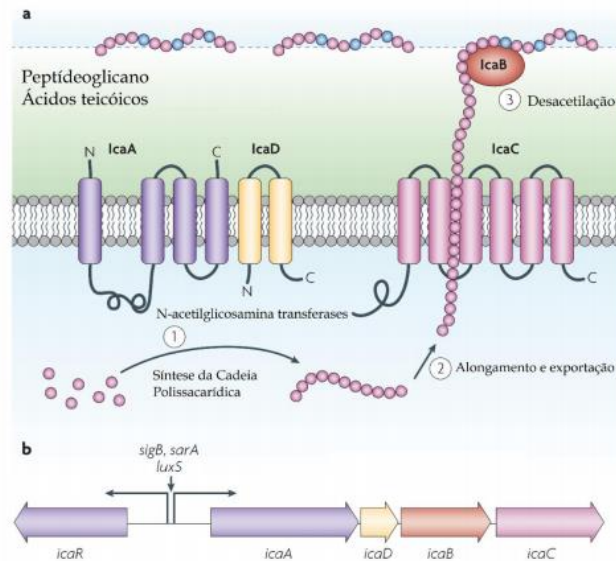
Figura 2. Diagrama esquemático do gene regulatório *agr*.



Fonte: Adaptado de Water e Bassler (2005).

A formação de biofilmes por bactérias do gênero *Staphylococcus* está intimamente associada à produção da adesina intercelular polissacarídica (PIA), que é basicamente um polímero de carga positiva. Sua produção é resultante da expressão dos genes presentes no locus *ica*, que compreende tanto o gene regulatório *icaR* quanto o operon *icaADBC*. Este operon codifica as proteínas IcaA e IcaD; N-acetilglicosamina transferases envolvidas na síntese da cadeia de N-acetilglicosamina; IcaC, supostamente envolvida no alongamento e consequente externalização do polissacarídeo crescente; e a proteína IcaB, responsável pelo processo de desacetilação parcial da PIA, que produz resíduos essenciais para que o polissacarídeo se ligue às superfícies onde ocorrerão as primeiras etapas de adesão do biofilme (O’GARA, 2007; OTTO, 2008; 2009 LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013).

Figura 3. Síntese da adesina intercelular polissacarídica (PIA).



Fonte: Adaptado de Otto (2009).

(a) A imagem evidencia o processo de síntese (1), alongamento e exportação (2) e desacetilação da cadeia polissacarídica (3). (b) Estrutura do locus *ica* em espécies do gênero *Staphylococcus*. Os reguladores de virulência SigB, SarA e LuxS têm ação importante sobre a expressão desse locus. Sombras verdes representam cargas negativas enquanto as azuis cargas positivas. C, grupo carboxila; N, grupo amina.

Em estudo avaliando a produção de biofilmes, Marques *et al.* (2013) detectaram uma frequência de 7,8 e 23,5% dos genes *icaA* e *icaD*, respectivamente, nas cepas isoladas do leite de vacas com mastite no Rio de Janeiro. Apesar de ter sido baixa a frequência, 84,31% das cepas eram formadoras de biofilme. Já em São Paulo, Melo *et al.* (2012) também detectaram a presença dos genes *ica* em *S. aureus* isolados a partir de vacas com mastite. A produção de matriz de EPS foi observada em 98,9% das estirpes de *S. aureus* enquanto os genes *icaA* e *icaD*, foram detectados em 95,7% dos isolados. Ambos os estudos indicam forte relação entre o desenvolvimento de biofilme e a expressão dos genes do operon *ica*.

A PIA já mostrou grande relevância para a virulência de *S. aureus*, mas hoje em dia já se sabe da participação de outra proteína denominada proteína *ica*-independente, principalmente em amostras clínicas de MRSA (ROHDE *et al.*, 2007).

Estudos apontam a participação na formação de biofilmes de proteínas da parede celular, bem como a proteína associada ao biofilme (Bap). Essa proteína de superfície tem função de fixar as células às superfícies abióticas, além de mediar a adesão intercelular (CUCARELLA *et al.*, 2001). Porém, até o momento, essas proteínas foram descritas somente *S. aureus* isolado de mastite bovina (CUCARELLA *et al.*, 2004; DARWISH; ASFOUR, 2013).

A proteína G de superfície de *S. aureus* (SasG) atua de forma similar à proteína associada à acumulação (Aap - *accumulation associated protein*) de *S. epidermidis*, que induzem na produção de estruturas fibrilares sobre a parede celular, auxiliando na adesão às células epiteliais (GEOGHEGAN *et al.*, 2010; GRUSZKA *et al.*, 2012).

A proteína C (SasC) foi caracterizada como um fator auxiliar na agregação de células em algumas cepas de *S. aureus* (SCHROEDER *et al.*, 2009).

A proteína ligadora de colágeno (Cna), codificada pelo gene *cna*, promove a adesão em tecidos colagenosos, tornando-se necessária para que *S. aureus* seja capaz de se ligar a tecidos cartilagosos *in vivo* (SIMOJOKI *et al.*, 2012).

De acordo com Downer *et al.* (2002), *S. aureus* é ainda capaz de aderir em tecidos ricos em elastina, principal componente que mantém a função de tecidos flexíveis, graças à proteína EbpS, codificada pelo gene *ebpS*.

Segundo Houston *et al.* (2011), foi identificado o fenótipo formador de biofilme, promovido pelas proteínas ligadoras de fibronectina FnBPA e FnBPB. Essas proteínas têm capacidade de reconhecer moléculas da matriz extracelular do hospedeiro, como o fibrinogênio, a elastina e a fibronectina, formando uma interação do tipo zíper (BUCK *et al.*, 2010).

Os fatores de acoplamento (Clfs – *clumping factors*) são proteínas sintetizadas por diversas cepas de *S. aureus*. Os fatores de acoplamento A e B são codificados pelos genes *clfA* e *clfB*, respectivamente. Ambas as proteínas apresentam as importantes funções de adesão e evasão do sistema imune do hospedeiro. Assim como outros fatores de virulência, este também sofre influência das condições em que a bactéria se encontra, bem como sua fase de crescimento (WALSH *et al.*, 2008; SCALI *et al.*, 2015). O fator de acoplamento também é conhecido como fator de aglomeração, pois tem habilidade de agregar plaquetas por meio da ligação com o fibrinogênio. Assim, contribui para formação de abscessos, biofilmes, além de tornar a doença mais intensa no hospedeiro, devido ao estímulo a uma forte resposta inflamatória (MALACHOWA *et al.*, 2016).

2.2.2 Medidas de controle de biofilme

Atualmente, já foi descoberto como atuam os antibióticos *in vivo* a partir da determinação das concentrações inibitória e bactericida mínimas, CIM e CBM, respectivamente. Elas possuem função de avaliar os efeitos dos antibióticos contra bactérias

planctônicas em sua fase de crescimento exponencial. Apesar disso, doenças que estão associadas a biofilmes devem receber tratamentos diferentes dos convencionais, visto que são mais resistentes às concentrações usuais das drogas usadas (COSTERTON *et al.*, 2003; HOOGAN; KOLTER, 2002).

Além dos mecanismos de resistência do próprio biofilme, sabe-se que pode ocorrer inativação de antibiótico devido ao ambiente conter altas concentrações de íons de metal e valores de pH baixos, e devido à própria limitação de difusão da droga pela matriz extracelular. Todos esses fatores somados tornam o biofilme cerca de 1000 vezes mais tolerantes a antimicrobianos (COSTERTON; MONTANARO; ACIOLA, 2007; HOIBY *et al.*, 2010).

Devido a essas dificuldades, estudos buscam diferentes meios de modular a formação de biofilme por meio de quatro estratégias, sendo elas: (1) inibir a adesão microbiana; (2) inibir a maturação da estrutura do biofilme; (3) erradicar o biofilme; (4) induzir a dispersão do biofilme (FRANCOLINI *et al.*, 2004; FRANCOLINI; DONELLI, 2010).

Segundo Miquel *et al.* (2016), a etapa de adesão das bactérias é um fenômeno natural, mas essencial para a formação de biofilme e, portanto, tem-se desenvolvido práticas de reduzir esse processo por meio bioquímico, físico-químico e biológico.

Inibir a maturação do biofilme é interessante, pois, além do biofilme maduro atuar como barreira protetora, o biofilme jovem é mais suscetível aos antimicrobianos (ANDERL; FRANKLIN; STEWART, 2000). Isso ocorre porque a densidade celular é o que desencadeia a resposta gerada pelo mecanismo de *quorum sensing*, fazendo com que a expressão de genes dos fatores de virulência aumente (DE KIEVIT; IGLEWSKI, 2000). Importante lembrar que é comum encontrar diferentes tipos de bactérias que competem por nutrientes, criando um biofilme heterogêneo e mais resistente, de acordo com Walters *et al.*, (2003).

A estratégia de erradicar o biofilme já formado não é o melhor caminho, visto que os tratamentos costumam ser ineficazes, pois os mecanismos de defesa das células variam conforme as etapas do biofilme em que se encontram (DAVIES, 2003).

Depois que o biofilme se encontra formado, há a possibilidade de induzir a dispersão dele, uma vez que seu próprio ciclo leva ao desprendimento de células em sua última etapa. Entender esse processo pode ajudar no desenvolvimento de novas abordagens de controle do

biofilme. No entanto, o mecanismo de ação dessa estratégia conta com diferentes concentrações de substrato de oxigênio e carbono, que dispersam o biofilme (NEWELL *et al.*, 2011).

Na indústria de alimentos, é comum que sejam aplicados procedimentos de limpeza e desinfecção de modo a controlar o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e, ou deterioradores, mas sabe-se que pode não ser o suficiente para remover biofilmes (JAHID, 2012; SIMÕES; SIMÕES, VIEIRA., 2010). A fim de dissolver restos orgânicos, emulsionar gorduras ou desnaturar proteínas, são utilizados diversos produtos químicos na limpeza dos utensílios e equipamentos, inclusive produtos alcalinos ou tensoativos (MAUKONEN *et al.*, 2003).

Os sanitizantes mais usados na indústria são o cloro, peróxido de hidrogênio, iodo, ozônio e ácido peracético (KUDA; KUDA, 2008). Mas para remoção de microrganismos do biofilme, o produto deve conseguir penetrar na matriz de EPS e, assim, inativar as células (SOUZA *et al.*, 2014). Sabendo disso, diversos estudos foram feitos a fim de comparar os efeitos dos métodos químicos, e pode-se afirmar que ainda é muito difícil realizar a remoção dessas estruturas por meio de sanitizantes. Tanto Marques *et al.* (2007) quanto Meira *et al.* (2012) determinaram que o ácido peracético foi o que apresentou maior eficácia quando comparados a dicloroisocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio. Porém, em ambos os estudos, não foi possível remover completamente as células de *S. aureus*.

Outra potencial alternativa para controle de biofilmes é o uso dos biossurfactantes. A surfactina consiste em lipopeptídicos cíclicos de sete aminoácidos produzidos por cepas de *Bacillus subtilis* (CHEN; JUANG; WEI, 2015). Esse biossurfactante vem chamando atenção, pois apresenta maior capacidade de redução de tensões superficial e interfacial, se comparado a outros surfactantes sintéticos, além de apresentar grande versatilidade em sua aplicação (BARROS *et al.*, 2007; JIN *et al.*, 2016).

Os estudos de Silva e Nitschke (2017) realizados em superfícies de poliestireno, demonstraram que tanto a concentração de surfactina quanto a temperatura aplicada são fatores extremamente relevantes no processo de remoção de biofilme de *S. aureus*. Resultados similares foram obtidos por Gomes e Nitschke (2012), onde pôde ser observada a suscetibilidade de biofilme à aplicação de surfactina em biofilmes formados por outras espécies de microrganismos.

Conforme os consumidores se tornam mais exigentes quanto ao uso de compostos sintéticos na indústria de alimentos, aumentou-se o interesse por antimicrobianos naturais e que não causem danos ao meio ambiente (LEBERT; LEROY; TALON, 2007). Devido a isso, uma alternativa que se tem mostrado promissora é o uso de óleos essenciais (OE). Do ponto de vista químico, são compostos voláteis com odor forte característico, e são metabólitos de plantas aromáticas. São lipofílicos, o que lhes confere a capacidade de adentrar a célula bacteriana, permitindo a ruptura das diversas camadas que compõem sua parede (BAKKALI *et al.*, 2008).

Rocha *et al.* (2014) avaliaram a atividade de óleo essencial de alecrim, observando redução significativa de células aderidas aos cupons de polipropileno de *S. aureus*, e remoção completa dos biofilmes de *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Pode-se afirmar que o uso de OE é interessante e mostra grande potencial para remoção de biofilmes em indústrias de alimentos, tornando-se alvo de estudos (VALERIANO *et al.*, 2012). Entretanto, há relatos do uso de OE de alecrim somente nas seguintes situações: em sanitização de hortaliças minimamente processadas (AZERÊDO, 2011); em forma de extrato, atuando como antimicrobiano contra bactérias planctônicas da mucosa oral (SILVA *et al.*, 2008); e para inibir e controlar biofilmes de fungos em próteses dentárias (CRUZEIRO, 2013).

Uma alternativa que foi encontrada para maximizar a segurança de alimentos é o uso empírico de microrganismos ou seus produtos, principalmente subprodutos de bactérias lácticas, que agem como bioconservantes, pois têm capacidade de inibir agentes deterioradores (MAGNUSSON; SCHNÜRER, 2001; DEEGAN *et al.*, 2006). Outro inibidor que chama atenção são os peptídeos sintetizados ribossomicamente produzidos não apenas por procariotos, mas também por eucariotos superiores (PAPAGIANNI, 2003).

Nisina é um peptídeo antimicrobiano produzido por *Lactococcus lactis* mais estudado, sendo reconhecido como GRAS (*Generally recognized as safe*) desde 1989 pela *Food and Drug Administration* (FDA). Seu mecanismo de ação se deve à interação com lipídeos aniônicos presentes na membrana das bactérias, levando à formação de poros. Por esses poros ocorre o efluxo de íon, que leva à dissipação da força protomotiva, hidrólise de ATP e, por consequência, lise celular (BREUKINK *et al.*, 2003; ENNAHAR *et al.*, 2000). Aplicando-se concentração de 250 UI/mL de nisina em superfície de polipropileno, foi possível reduzir em 99% a quantidade de células sésseis de *S. aureus* (CABO *et al.*, 2009).

A nisina, na concentração de 25 µg/mL foi capaz de impedir a formação de biofilme por 25 estirpes diferentes de *S. aureus* (SUDAGIDAN; YEMENICIO, 2012). Combinando essa bacteriocina com cloro e glutaraldeído, Davison, Pitts e Stewart (2010) conseguiu atingir o interior do biofilme de *S. epidermidis* em menor tempo que outros agentes, porém sem remoção do biofilme. Pimentel-Filho et al. (2014) avaliaram concentrações subinibitórias das bacteriocinas nisina e bovicina HC5, e determinou que elas podem reduzir a adesão de *S. aureus*.

2.3 Importância do aspartato para fisiologia microbiana

A efetividade dos agentes antimicrobianos é baseada em seu mecanismo de ação, que inclui a inibição da síntese de parede celular, de proteínas, de ácidos nucleicos ou folato, e a desestabilização da membrana celular (NOGUEIRA *et al.*, 2016). Ter como alvo a síntese de proteínas, demonstra a importância delas para os microrganismos e sua sobrevivência.

Em *S. aureus*, o aspartato, em conjunto com a histidina e a serina, são responsáveis pela homeostase da célula, ao degradarem proteínas já danificadas (CLAUSEN; SOUTHAN; EHRMANN., 2002). O dipeptídeo Asp-Ser está presente em forma de uma longa cadeia, chamada domínio R, que é uma característica das adesinas ClfA e ClfB, ou fatores de acoplamento (FOSTER; HÖÖK, 1998). O ácido aspártico, bem como lisina, ácido glutâmico e tripsina são encontrados abundantemente na estrutura primária das enterotoxinas estafilocócicas (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Percebe-se então, a importância deste aminoácido, tanto para sobrevivência, quanto para sua virulência.

Apesar de ser importante para sobrevivência das células, aminoácidos são estudados como forma de prevenir ou destruir biofilmes. De acordo com Leiman *et al.* (2013), a combinação de alguns D-aminoácidos é capaz de inibir a formação de biofilme de *Bacillus subtilis*, ao mesmo passo que seus isômeros L-aminoácidos são capazes de reverter sua ação inibitória. É afirmado nesse estudo que essa suscetibilidade da bactéria ao efeito dos D-aminoácidos se dá principalmente aos efeitos tóxicos que eles têm sobre a síntese de proteínas de *B. subtilis*.

Os estudos de Kolodkin-Gal *et al.* (2010) apresentaram resultados similares, afirmando que a mistura dos mesmos D-aminoácidos teve capacidade de desfazer biofilmes já formados. A ação inibitória foi observada tanto sobre biofilmes de *S. aureus* quanto de *P. aeruginosa*. Em

ambas as pesquisas, os aminoácidos utilizados foram D-leucina, D-metionina, D-tirosina e D-triptofano.

Segundo Yang (2015), ambas as formas isômeras (D ou L) do aspartato, em grandes concentrações apresentaram eficácia para cessar o crescimento de células planctônicas, enquanto em quantidades reduzidas, a atividade metabólica do microrganismo é reduzida. Isso se deve à diminuição da síntese de proteínas e DNA na matriz do biofilme por conta da presença do aspartato na mesma.

Esse trabalho teve como objetivo estudar o efeito do aminoácido aspartato sobre o crescimento, adesão e formação de biofilmes em superfícies de poliestireno e aço inoxidável por *S. aureus*, bem como a influência da bacteriocina nisina em concentrações subinibitórias na formação de biofilmes na ausência e presença de aspartato.

3 METODOLOGIA

3.1 Microrganismos e condição de cultivo

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* ATCC 25923 (INCQS 00015), cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro) foi utilizado como microrganismo teste.

O estoque da estirpe foi obtido por meio do cultivo bacteriano em caldo infuso de cérebro e coração (BHI) em aerobiose a 37 °C por 18 h. Alíquotas do cultivo foram transferidas para microtubos, e glicerol foi adicionado em concentração final de 20 % (v/v). Os microtubos foram armazenados a -20 °C até serem utilizados nos experimentos.

Para os ensaios propostos, a estirpe de *S. aureus* foi pré-cultivada em caldo BHI sob agitação a 150 rpm a 37 °C por 24 h.

3.2 Bacteriocina

Nisina A produzida por *Lactococcus lactis* (2,5 % nisina \geq 1,000 IU/mg; Sigma-Aldrich, Alemanha) foi ressuspensa em tampão fosfato de sódio estéril (10 mM, pH 7.2) e estocada a 7 °C até o uso.

3.3 Efeito de aspartato sobre o crescimento de *S. aureus*

A influência do aminoácido aspartato sobre a cinética de crescimento de *S. aureus* foi avaliada em meio sintético (GERTZ *et al.*, 1999) em duas condições diferentes: aerobiose (macroensaio) e microaerofilia (microensaio).

Para avaliação do crescimento microbiano em aerobiose, 50 mL de meio sintético adicionado ou não de 1 mM de aspartato foram inoculados com cultura de *S. aureus* previamente propagada no mesmo meio por 18 h a fim de se obter absorbância a 500 nm (Abs._{500nm}) de, aproximadamente, 0,075. Os frascos contendo o meio inoculado foram incubados a 36 °C por 24 h a 150 rpm. O monitoramento do crescimento microbiano foi realizado nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 24 h por meio da determinação da Abs._{500nm} em espectrofotômetro (Spectrophotometer - Model NOVA 1600UV, Nova Instruments, Brasil). Para efeito de comparação, experimento controle foi realizado nas mesmas condições citadas, porém utilizando caldo BHI.

O crescimento microbiano também foi avaliado em microaerofilia utilizando placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços. Assim, 200 µL de meio sintético adicionados ou não de aspartato foram inoculados com cultura de *S. aureus* ajustando-se a Abs._{500nm} para, aproximadamente, 0,045. A microplaca foi incubada em leitor de microplacas (Synergy HT Plate Reader, BioTek Instruments, EUA) em condição estática e o crescimento monitorado por meio de medidas de absorbância a 500 nm a cada hora por 24 h, sempre precedidas de agitação por 15 seg.

Os experimentos foram realizados em três repetições biológicas e os dados foram plotados e, por meio dos gráficos gerados, foram obtidas a velocidade específica de crescimento (μ) e máxima DO alcançada em cada meio.

3.4 Influência de aspartato na formação de biofilmes por *S. aureus*

3.4.1 Adesão de *S. aureus* em superfície de poliestireno

Para avaliar a capacidade de aspartato interferir na adesão de *S. aureus* à superfície de poliestireno, 500 µL de meio sintético adicionados ou não de aspartato, foram transferidos para microtubos de 0,5 mL e inoculados com *S. aureus* em crescimento exponencial previamente propagadas no mesmo meio para Abs._{500nm} de, aproximadamente, 0,1. Após 24 h de incubação, o sobrenadante do cultivo foi descartado e as células aderidas à superfície dos tubos foram

coradas com 500 µL de cristal violeta 0,1 % (p/v) por 30 min. Em seguida, o cristal violeta foi removido e os tubos lavados três vezes com água destilada estéril. Após secagem por 15 min a 40 °C, as células aderidas foram indiretamente quantificadas pela adição de 500 µL de etanol 95 % (v/v) com objetivo de recuperar o corante retido pelas células. Finalmente, os 500 µL de solução foram transferidos para uma cubeta, adicionado de 500 µL de etanol 95 % (v/v) e a absorbância foi medida a 590 nm.

Para efeito de comparação, a adesão de *S. aureus* cultivado em BHI nas mesmas condições anteriormente citadas foi avaliada.

Controle do experimento foi realizado em meios de cultivo não inoculados.

3.4.2 Formação de biofilme em cupons de aço inoxidável por *S. aureus*

3.4.2.1 Preparo dos cupons de aço inoxidável

Para realizar a análise da formação de biofilmes por *S. aureus* nos meios sintéticos adicionados ou não aspartato, utilizou-se cupons de aço inoxidável AISI 304#4, tendo 10 × 10 × 0,5 mm como dimensões.

Os cupons foram submetidos à escovação com detergente neutro e enxaguados em água destilada. Resíduos de gordura foram retirados pela imersão em acetona por 30 minutos e NaOH 1 % por 1 hora. Após secagem ao ar os cupons foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos (PARIZZI et al., 2004).

Antes de acondicionar os cupons nas placas de cultivo de células com 24 poços, preparou-se uma suspensão de células de *S. aureus* padronizada com Abs._{500nm} de 0,5. Desta solução, foram transferidas uma alíquota de 1% para os poços contendo 2,2 mL de meio sintético adicionados ou não de aspartato e, por fim, os cupons. A placa foi incubada a 37 °C, sendo que 2 cupons foram retirados nos tempos 0, 24 e 48, a fim de quantificar as células sésseis.

Os cupons foram acondicionados em placas de cultivo celular com 24 poços contendo 2,2 mL de meio sintético adicionados ou não de aspartato e 1 % de uma suspensão de células de *S. aureus* padronizada com Abs._{500nm} de 0,5. Os cupons foram incubados a 37 °C e após 0, 24 e 48 h cupons foram retirados para quantificação de células sésseis.

3.4.2.2 Quantificação de células sésseis

Para quantificação das células sésseis, os cupons retirados das placas de cultivo celular nos diferentes tempos de amostragem foram lavados durante 1 min em 10 mL de solução salina 0,85 % para retirada de células planctônicas. A seguir, foram mergulhados em 10 mL de solução salina 0,85 % contida em tubos de ensaio e submetida à ação de ultrassom (Ultrasonic Cleaners – Model 1510) durante 30 min, para remoção das células sésseis. Essa suspensão foi homogeneizada e uma alíquota foi retirada para o preparo de diluições decimais que foram plaqueadas, pela técnica de microgotas, em ágar para contagem padrão (PCA). Após incubação por 10-20 h a 37 °C, a contagem de colônias foi feita em contados de colônias (Quimis, modelo Q295B, Brasil).

O número de UFC/cm² de superfície foi calculado relacionando-se o volume do diluente utilizado para rinsagem (VD), a alíquota usada no plaqueamento (VA), a média da contagem de colônias expressa em UFC (M), a diluição (D) realizada e a área total dos cupons (A) de acordo com a equação (1) abaixo:

$$UFC/cm^2 = \frac{(VD/VA).M.D}{A} \quad (1)$$

O experimento foi realizado em duas repetições biológicas e quatro repetições técnicas, com três observações cada.

3.5 Influência do aspartato na resistência de *S. aureus* à nisina

Para avaliar a influência do aspartato sobre o perfil de resistência de *S. aureus* à nisina, a concentração mínima inibitória (CMI) da bacteriocina sobre o micro-organismo foi determinada em placas de microtitulação contendo 96 poços. Duzentos microlitros de meio sintético adicionados ou não de aspartato foram suplementados com concentrações crescentes de nisina (de 0,2 a 2,0 µM) e inoculados com, aproximadamente, 5 x 10⁵ UFC/mL de *S. aureus*. A concentração mínima capaz de impedir a turbidez do meio após 20 h de incubação a 37 °C foi considerada a CMI de nisina sobre o patógeno oportunista.

Para avaliar o efeito do aspartato na adesão de *S. aureus* em superfície de poliestireno contendo concentrações subinibitórias de nisina, foi utilizado o mesmo *design* experimental previamente descrito para o experimento de CMI, avaliando-se as concentrações 0,4, 0,8 e 1,2 µM. Após 20 h de incubação, a cultura sobrenadante foi descartada e as células aderidas à

superfície foram coradas com 200 µl de cristal violeta 0.1% (p/v) por 30 min. Em seguida, o cristal violeta foi removido e os poços lavados por três vezes com água destilada estéril. Após 15 min de secagem em estufa com temperatura ajustada para 45 °C, células aderidas foram determinadas a 590 nm em leitor de microplacas (Synergy HT Plate Reader, BioTek Instruments, EUA) pela adição de 200 µl de etanol 95% (v/v).

Experimentos de CMI e adesão na presença de nisina foram realizados em três repetições biológicas e quatro repetições técnicas. Meio sintético adicionado ou não de aspartato suplementados com tampão fosfato de sódio e inoculado ou não com a bactéria foram utilizados como controle positivo e negativo do experimento, respectivamente (PIMENTEL-FILHO *et al.*, 2014).

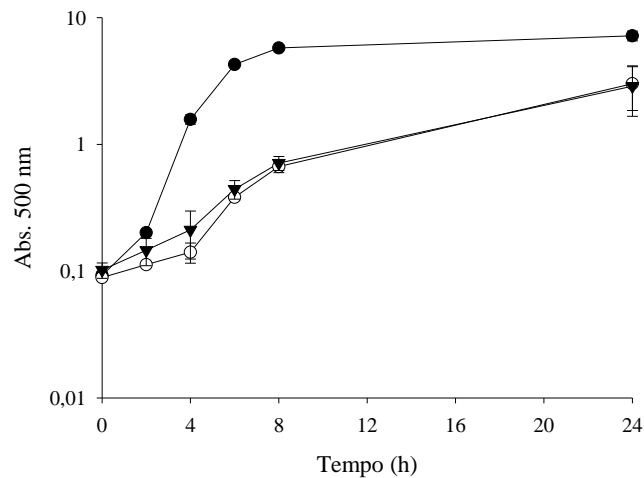
3.6 Análise de dados

Os dados obtidos nas análises adesão e formação de biofilmes foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA) e, quando houve diferença significativa, foram comparadas por meio do teste de Tukey com 95% de confiança, através do software R (R Development Core Team, 2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de avaliar o efeito do aminoácido aspartato sobre o crescimento de *S. aureus*, a bactéria foi cultivada a 37 °C em meio sintético suplementado ou não com 1 mM de aspartato, em aerobiose (macroensaio) e em microaerofilia (microensaio).

Em condições aeróbicas, é possível observar o crescimento um pouco mais pronunciado da bactéria em meio sintético sem aspartato nas primeiras seis horas de cultivo (Figura 1). Esta pequena diferença também pode ser confirmada por meio do cálculo da velocidade específica de crescimento (μ) da bactéria nas diferentes condições. Em aerobiose, *S. aureus* tem velocidade específica de crescimento superior em meio sem aspartato (Tabela 1), mas foi irrelevante para a absorbância máxima.

Figura 4. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* em condição de aerobiose.

Fonte: Elaborado pela autora.

Meio sintético contendo 1 mM de aspartato (círculo branco) e meio sintético sem aspartato (triângulo preto). Caldo BHI (círculo preto) foi utilizado como controle. Cultivo realizado em aerobiose, sob agitação a 150 rpm (macroensaio).

O caldo infuso de cérebro e coração (BHI) é um meio de cultivo complexo considerado altamente nutritivo. Para efeito de comparação, *S. aureus* foi cultivado neste meio sob as mesmas condições de temperatura e aeração utilizadas para os cultivos em meio sintético. É possível observar que mesmo o meio sintético sendo um meio de cultivo quimicamente definido contendo em sua formulação fontes de carbono e energia, além de vitaminas, aminoácidos e elementos traços, o crescimento foi superior no meio complexo, sendo que para este meio, a velocidade específica de crescimento da bactéria foi de 0,57 e a absorbância máxima atingida, muito superior àquelas obtida pela bactéria nos demais meios (Figura 4 e Tabela 1).

Tabela 1. Velocidade específica de crescimento e máximo valor de densidade óptica (Abs.500nm) alcançada durante o cultivo de *S. aureus* em meio sintético (MS) adicionado ou não de aspartato em macroensaio e microensaio.

	Aerobiose			Microaerofilia		
	μ (h ⁻¹)	R ²	Abs. máxima	μ (h ⁻¹)	R ²	Abs. máxima
MS com aspartato	0,25	0,98	3,01	0,26	0,96	0,434
MS sem aspartato	0,26	0,93	2,88	0,23	0,98	0,370
BHI	0,57	0,94	7,19	(-)	(-)	(-)

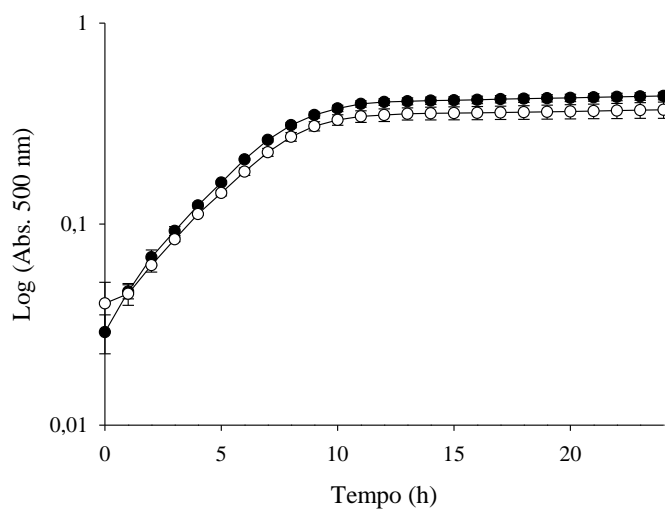
μ : velocidade específica de crescimento.

(-): análise não realizada.

Fonte: Elaborado pela autora.

Quando *S. aureus* foi cultivado em condições de microaerofilia, o crescimento global foi inferior ao obtido em condições aeróbicas (Figura 5). Isso ocorre, pois, apesar de ser um microrganismo anaeróbico facultativo, sua condição ótima de desenvolvimento requer oxigênio. Ainda assim, os resultados, tanto em aerobiose quanto em microaerofilia, seguem praticamente o mesmo padrão, onde as velocidades específicas são bem próximas nos diferentes meios (Tabela 1). Entretanto, em condições de microaerofilia (Tabela 1, Figura 5).

Figura 5. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* em condição de microaerofilia.



Fonte: Elaborado pela autora.

Meio sintético com aspartato (círculo preto) e meio sintético sem aspartato (círculo branco). Cultivo realizado em microaerofilia, sem agitação (microensaio).

Era esperado que o crescimento fosse maior no meio em que houve acréscimo do aminoácido, devido à função do mesmo sobre a célula. O aspartato, juntamente com a histidina e a serina, são responsáveis por manterem a homeostase celular por meio da degradação de proteínas danificadas que perderam sua funcionalidade (CLAUSEN; SOUTHAN; EHRMANN, 2002). Manter a homeostase é de extrema importância para manutenção da vida, visto que esse termo significa a constância do meio interno, ou seja, é a tendência de a célula manter o equilíbrio das funções vitais (HALL; GUYTON, 2017).

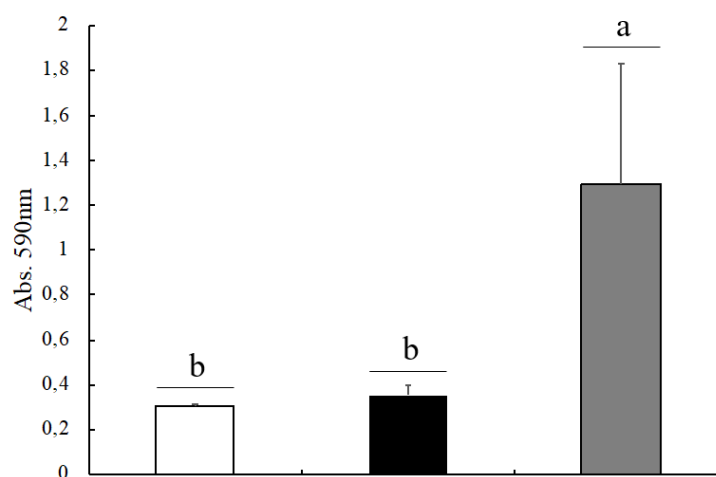
Comportamento semelhante pôde ser observado com a glutamina, que é o aminoácido livre mais abundante no citosol e, apesar de ser classificado como não essencial, sua relevância tem sido questionada devido à sua demanda exigida pelo organismo quando o mesmo é levado a situações críticas (MOREIRA *et al.*, 2007; WRAY; MAMMEN; HASSELGREN, 2002; SANTOS *et al.*, 2007; ROWBOTTOM; KEAST; MORTON., 1996). Estudos indicam que esse

aminoácido está relacionado à degradação de proteínas e à apoptose e proliferação celular (NEWSHOLME *et al.*, 2003; ROGERO; TIRAPEGUI, 2003). Sabe-se que alterações na homeostase decorrentes de agentes estressores podem levar à morte celular, porém, devido à capacidade da glutamina de ativar proteínas sinalizadoras, a chance de sobrevivência das mesmas aumenta, contribuindo para seu crescimento (CURI *et al.*, 2005; GABAI; SHERMAN., 2002).

Segundo Yang (2015), o aspartato tem efeito inibidor sobre a formação do biofilme, visto que ele age diretamente no crescimento de células planctônicas. Esse fenômeno já foi observado em outras estirpes de estafilococos e em *Bacillus subtilis* (KOLODKIN-GAL, 2010).

A adesão de *S. aureus* ATCC 25923 em superfície de poliestireno foi baixa e parece não variar em função da presença do aminoácido (Figura 6). Por outro lado, quando o crescimento se dá em meio complexo (BHI), devido à maior complexidade do meio e disponibilidade de nutrientes, pode-se verificar maior tendência das células em aderir à superfície e, conseqüentemente, estabelecer-se em comunidades microbianas denominadas biofilmes (Figura 6). Tais informações vão de encontro com o que foi obtido por meio da ANOVA ($p < 0,001$) e do teste de Tukey.

Figura 6. Adesão de *Staphylococcus aureus* em superfície de poliestireno.



Fonte: Elaborado pela autora.

Meio sintético com aspartato (retângulo branco) e meio sintético sem aspartato (retângulo preto). Para efeito de comparação, adesão em superfície de poliestireno contendo caldo BHI (retângulo cinza), considerado meio complexo rico, foi avaliada. ANOVA seguido de Teste de Tukey 95%. Letras diferentes significam diferença significativa para $p < 0,05$.

Superfícies plásticas como aquelas fabricadas a partir dos polímeros poliestireno e polipropileno e superfícies metálicas como as de aço inoxidável são comuns na indústria de alimentos. Neste tipo de indústria, há grande preocupação na adesão microbiana e formação de biofilmes uma vez que estas comunidades microbianas se tornam fontes de contaminação dos alimentos que, além de gerarem prejuízos econômicos pela deterioração dos produtos, podem representar riscos à saúde dos consumidores quando esta contaminação ocorre por bactérias patogênicas (CHAVANT *et al.*, 2007).

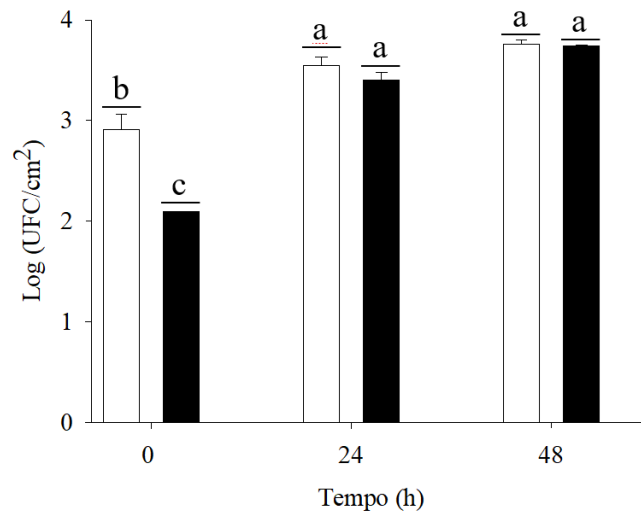
Assim, a interferência do aspartato na adesão celular em cupons de aço inoxidável foi avaliada em meio sintético adicionado ou não do aminoácido. A adesão de células aos cupons submersos em meio contendo 1 mM de aspartato foi significativamente maior ($p=0,003$) no tempo 0 h (Figura 7). Sabe-se que o preparo celular para inoculação, que envolve transferência de meios, provoca um estresse celular e que a adesão celular pode ser iniciada por situações de estresse enfrentadas pelos microrganismos (PARSEK; FUQUA, 2004). Pode-se pressupor, então, que o aspartato, apesar de não influenciar na formação de biofilme, é capaz de intensificar a etapa de adesão inicial, embora ainda seja uma adesão reversível. Ela se dá por interações químicas, tais como atração de Van der Waals, interações hidrofóbicas e forças eletrostáticas, que são removidas facilmente com forças mínimas (WATNICK; KOLTER., 2000). Além disso, existem características da própria célula que auxilia nessa adesão, pode-se citar flagelos, fímbrias, pili, entre outros (TRACHOO, 2003).

A adesão de células à superfície de aço inoxidável após 24 h de cultivo foi significativamente maior ($p<0,05$) quando comparada aos resultados obtidos no tempo 0 h porém, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre o cultivo na presença e ausência de 1 mM de aspartato. Após 48 h de cultivo, não houve aumento substancial de massa celular aderida aos cupons bem como não parece haver diferença na adesão estafilocócica independente da presença do aminoácido (Figura 7).

A multiplicação microbiana torna o interior do biofilme um ambiente anaeróbico, além de acumular ácidos e gases insolúveis, levando à etapa de desprendimento de células planctônicas (TRACHOO, 2003). Segundo Cheng *et al.* (2007), essa última etapa em que o biofilme se torna maduro pode levar até 10 dias. Entretanto, no experimento, esse processo foi mais rápido, uma vez que a superfície de contato utilizada é pequena em relação à quantidade de inóculo que é relativamente elevada. Devido a isso, pode-se deduzir que após o tempo 24 h,

a massa crítica foi atingida, apresentando, então, adesão celular significativamente igual ($p>0,05$) no tempo 48 h (Figura 7).

Figura 7. Adesão de *Staphylococcus aureus* em superfície de aço inoxidável.



Fonte: Elaborado pela autora.

Meio sintético com 1 mM de aspartato (retângulo branco) e meio sintético sem aspartato (retângulo preto). ANOVA seguido de Teste de Tukey 95%. Letras diferentes significam diferença significativa para $p<0,05$.

Como forma de avaliar o efeito de aspartato no perfil de resistência à nisina por *S. aureus*, foi determinada a CMI em meio sintético adicionado ou não de aspartato. A CMI foi de 1,6 μM de nisina quando *S. aureus* foi cultivado na presença de aspartato e de 1,4 μM na ausência do aminoácido. Este resultado demonstra que a bactéria parece ser mais resistente à nisina na presença de aspartato reforçando a ideia de que o aminoácido tem papel importante na resistência microbiana.

Segundo Pimentel-Filho *et al.* (2014), a CMI de nisina necessária é de 1,4 μM para inibir o crescimento de *S. aureus*, inclusive as estirpes super-resistentes. Nisina é um peptídeo termoestável produzido por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e é pertencente ao subgrupo dos lantibióticos lineares (BANERJEE; HANSEN, 1998). É permitido pela Legislação Brasileira (DETEN/MS nº 29, de 22 de janeiro de 1996) para ser usado como um conservante natural de produtos alimentícios, sendo o único aprovado para uso pela *Food and Drug Administration* (FDA). É considerado um antimicrobiano devido ao seu potencial de inibir a multiplicação de bactérias gram-positivas e impedir que esporos germinem. Na presença de agentes quelantes, as bactérias gram-negativas tornam-se sensíveis à ação deste antimicrobiano (JOZALA, 2005). Sua síntese é dividida em duas fases. Inicialmente, um peptídeo precursor é sintetizado pelo

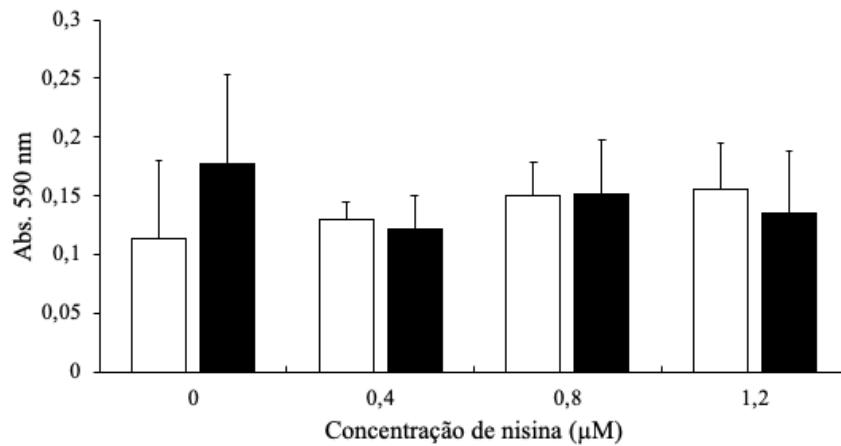
ribossomo e, posteriormente, ocorre a pós-translocação enzimática, que transforma esse precursor em peptídeo bioativo (VUYST; VANDAMME, 1992).

Segundo Sahl e Bierbaum (1998), o principal mecanismo de ação dos lantibióticos é a formação de poros na membrana bacteriana, que permite a saída de ATP e aminoácidos. A perda de energia somada à de compostos essenciais faz com que haja falhas na síntese de macromoléculas, levando à morte celular que, muitas vezes, pode ocorrer por lise celular. A ação da nisina sobre células gram-positivas pode ser dividida em duas etapas, onde a primeira é a adsorção da mesma na parede celular. Essa fase é reversível, porém totalmente depende de pH (entre 3,0 e 6,5) e da concentração utilizada. Posteriormente, a nisina torna-se resistente às proteases, causando alterações não reversíveis na célula. Isso se dá pela forte atração pelos fosfolipídios e lisossomos presentes na membrana da célula, formando os poros que têm diâmetro de 0,2 a 1,0 nm. (JACK; TAG; RAY, 1995; CHEN; LUDESCHER; MONTVILLE, 1997a; CHEN; LUDESCHER; MONTVILLE, 1997b; MORENO *et al.*, 1999a). Para impedir a germinação de esporos, a nisina interage com grupos sulfidril que são vitais para os esporos recém germinados, impedindo que as etapas posteriores ocorram, formando novas células (MORENO *et al.*, 1999b).

O comportamento de *S. aureus* na presença e ausência de aspartato também foi avaliado sobre sua capacidade de formar biofilmes em meio sintético suplementado com concentrações subinibitórias de nisina (variando de 0 a 1,2 μM). O experimento demonstrou que não há uma relação direta entre a massa de células e a presença de aspartato na concentração 1 mM ($p=0,075$).

Cabo *et al.* (2009) verificaram que concentração de nisina de 250 UI/mL é suficiente para reduzir em 99% as células viáveis de *S. aureus* em superfícies de polipropileno. Efeito inibidor também foi observado em *Alicyclobacillus acidoterrestris* quando nisina estava presente no meio em concentração de 400 $\mu\text{g/L}$ (GIROLDO; NASCIMENTO; FERREIRA, 2014).

Figura 8. Adesão de *Staphylococcus aureus* em superfície de poliestireno adicionado de diferentes concentrações de nisina.



Fonte: Elaborado pela autora.

Meio sintético com aspartato (retângulo branco) e meio sintético sem aspartato (retângulo preto) suplementado com concentrações subinibitórias de nisina.

De modo geral, é uma resposta interessante, uma vez que para inibir o crescimento de *S. aureus* seriam necessários 1,4 µM de nisina (PIMENTEL-FILHO *et al.*, 2014). Concentrações abaixo deste valor podem causar estresse celular e acionar mecanismos de defesa, explicando o porquê de as adesões ocorrerem, independente da presença ou não do aspartato (KASNOWSKI *et al.*, 2010).

5 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos foi possível observar que aspartato parece não ter grande efeito sobre a adesão em superfícies de poliestireno, sendo importante avaliar diferentes concentrações do aminoácido. Entretanto, uma vez a presença do aminoácido indicou favorecer a adesão inicial (t=0 h) em aço inoxidável, faz-se necessário o melhor entendimento dos efeitos e benefícios de seu uso a fim de utilizá-lo como estratégia para controlar a formação de biofilme por *S. aureus*. Por outro lado, na presença do aminoácido, a bactéria foi mais resistente à presença de nisina. A presença de nisina, em concentrações subinibitórias, tende a aumentar a adesão celular à superfície plástica devido ao estresse causado. Para se confirmar o papel do aminoácido sobre a resistência à nisina, novos experimentos devem ser realizados utilizando-se outras estirpes do patógenos oportunista.

REFERÊNCIAS

- ALHASHIMI, H. M. M.; AHMED, M. M.; MUSTAFA, J. M. Nasal carriage of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* among food handlers in Karbala city. **Karbala International Journal of Modern Science**. Karbala, n. 3, p. 69-74, 10 fev. 2017.
- ANDERL, J.N.; FRANKLIN, M.J.; STEWART, P.S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Bozeman, v. 44, n. 7, p. 1818-1824, 5 abr. 2000.
- ANTUNES, L. C. M. *et al.* *Quorum sensing* in bacterial virulence. **Microbiology**. Vancouver, v. 156, n. 8, p. 2271–2282, 1 ago. 2010.
- APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**. Salvador, v. 12, n. 6, p. 526–530, 28 dez. 2008.
- AZERÊDO, G.A. **Potencial de aplicação dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como sanitizantes naturais em hortaliças minimamente processadas**. 2011. Dissertação (Doutorado em Nutrição), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oil: a review. **Food Chem Toxicol**. Morocco, v. 46, p. 446-475, fev. 2008.
- BANERJEE, S.; HANSEN, J.N. Structure and expression. Of a gene encoding the precursors of subtilin, a small protein antibiotic. **The Journal of Biological Chemistry**. Maryland, vol. 263, n.19, p. 9508-9514, 5 jul. 1998.
- BARROS, F. F. C. *et al.* Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**. Campinas, v. 30, n. 2, p. 409-414, 19 jan. 2007.
- BOSWIHI, S. S.; UDO, E. E. Resistente à metilina *Staphylococcus aureus*: An update on a epidemiologia, tratamento opções e infecção controlo. **Current Medicine Research and Practice**. Rio de Janeiro, v. 8, n.1, p.18-24, jan. 2018.
- BRAMHACHARI, P. V. Introduction to *Quorum Sensing* Research in Diverse Microbial Systems. In: Pallaval Veera Bramhachari (eds), chapter: Implication of *Quorum Sensing*

System in Biofilm Formation and Virulence. **Springer Nature Singapore**. Singapura, n.1, p.3-6., 2018.

BRANDA, S. S. *et al.* A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. **Molecular Microbiology**. Cambridge, v. 59, n. 4, p.1229–1238, 24 nov. 2006.

BREUKINK, E. *et al.* Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, p. 19898-19903, mai. 2003.

BUCK, A.W. *et al.* **Bonds between Fibronectin and Fibronectin-Binding Proteins**. *Langmuir*, v. 26, n.13, 10 mar. 2010.

BUZÓN-DURÁN, L. *et al.* Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. **Food Microbiology**. Leon, v.65, p.294–301, 7 jan. 2017.

CABO, M.L. *et al.* Comparison among the effectiveness of ozone, nisin and benzalkonium chloride for the elimination of planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* CECT4459 on polypropylene. **Food Control**. Pontevedra, v.6, p.521-525, 2009.

CEGELSKI, L. *et al.* The biology and future prospects of antivirulence therapies. **Nature Reviews Microbiology**. Saint Louis, v. 6, n.1, p. 17-27, jan. 2008.

CEGELSKI, L. *et al.* Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. **National Institutes of Health**. Saint Louis, v. 5, n. 12, p. 913– 919, 25 out. 2009.

CHACÓN, O. *et al.* Effect of *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera*) associated with betalactam antibiotics on the occurrence of resistance in strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis*. **European Journal of Integrative Medicine**. Santa Rosa, v.32, p.1-30, 22 out. 2019.

CHAVANT, P. *et al.* A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. Saint-Beauzire, v.68, p.605-612, 9 jan. 2007.

CHEN, W.C.; JUANG, R.S.; WEI, Y.H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**. Taipei, n. 103, p. 158-169, 15 nov. 2015.

CHEN, Y.; LUDESCHER, R.D.; MONTVILLE, T.J. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-I and its fragments to phospholipids vesicles. **Applied and Environmental Microbiology**. Nova Brunswick, v.63, n.12, p.4770-4777, dez. 1997b.

CHEN, Y.; LUDESCHER, R.D.; MONTVILLE, T.J. Functional characterization of pediocin PA-I binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. **Applied and Environmental Microbiology**. Nova Brunswick, v.63, n.2, p.524-531, fev. 1997a.

CHENG, G. *et al.* Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**. Seattle, v.28, n.29, p.4192-4199, out. 2007.

CLAUSEN, T.; SOUTHAN, C.; EHRMANN, M. The HtrA Family of Proteases: Implications for Protein Composition and Cell Fate. **Molecular Cell**. Abingdon, v.10, p.443-455, set. 2002.

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

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. Iowa, v. 284, n. 5418, p.1318–1322, 21 mai. 1999.

COSTERTON, J.W.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C.R. Bacterial communications in implant infections: A target for na intelligence war. **International Journal of Artificial Organs**. California, v. 30, n. 9, p. 757-763, 2007.

COSTERTON, W. *et al.* The application of biofilme Science to the study and control of chronic bacterial infections. **The Journal of clinical Investigation**. Bezevan, v.112, n.10, p.12, nov. 2003.

CRUZEIRO, M.E.S. Produção e quantificação do biofilme de *Candida albicans* em resinas acrílicas tratadas com extratos vegetais. 2013. Dissertação (Doutorado em Veterinária), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

CUCARELLA, C. *et al.* Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**. Pamplona, v.183, n. 9, p. 2888-2896, mai. 2001.

- CUCARELLA, C. *et al.* Role of biofilme-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**. Zaragoza, v. 72, n. 4, p. 2177-2185, abr. 2004.
- CURI, R. *et al.* Molecular mechanisms of glutamine action. **Journal of Cellular Physiology**. São Paulo, v.204, p.392-401, 2005.
- DADASHI, M. *et al.* Mupirocin Resistance in *Staphylococcus aureus*: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. Karaj, v.20, p. 238-247, jul. 2019.
- DARWISH, S.F.; ASFOUR, H.A. Investigation of biofilme formind ability in Staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. **The Scientific World Journal**. Giza, v.2013, p. 1-9, 2 nov. 2013.
- DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agentes. **Nature Reviews Drug Discovery**. Bringhamton, v. 2, n. 2, p. 114-122, 2003.
- DAVISON, W. M.; PITTS, B.; STEWART, P. S. Spatial and temporal patterns of biocide action against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Bozeman, v. 54, p. 2920-2927, 2010.
- DEEGAN, L.H. *et al.* Bacteriocin: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**. Cork, v. 16, p. 1058-1071, 2006.
- DEINHARDT-EMMER, S. *et al.* Virulence patterns of *Staphylococcus aureus* strains from nasopharyngeal colonization. **Journal of Hospital Infection**. Jena, v.100, p.309-315, 1 nov. 2018.
- DIGGLE, S. P. *et al.* The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**. Nottingham, v.8, n.6, p.1095–1104, 2006.
- DONG, D. *et al.* Distribution and Inhibition of Liposomes on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. **PLOS One**. Adelaide, v.10, p.1-16, 30 jun. 2015.
- DOWNER, R. *et al.* The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as na integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. **Journal of Biological Chemistry**. Saint Louis, v. 277, n. 1, p. 243-250, 4 jan. 2002.

- ENNAHAR, S. *et al.* Class IIa bacteriocins: biosynthesis. Structure and activity. **FEMS Microbiology**. Fukuoka, v. 24, n. 1, p. 85-106, 2000.
- FEITOSA, A. C. *et al.* *Staphylococcus aureus* in food. **Revista Desafios**. Tocantins, v.04, n.4, p.1-17, 3 out. 2017.
- FERRASSO, M. M.; GONZALEZ, H. L.; TIMM, C. D. *Staphylococcus hyicus*. **Instituto Biológico**. São Paulo, vol.82, p.1-6, 03 nov. 2015.
- FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. Duisburgo, v. 8, n. 9, p. 623–33, 2010.
- FOSTER, T.J.; HÖÖK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**. Houston, v.6, n.12, p. 484-488, dez. 1998.
- FRANCOLINI, I. *et al.* Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Pittsburgh, v.48, n.11, p.4360–4365, nov. 2004.
- FRANCOLINI, I.; DONELLI, G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. **FEMS Immunol Med Microbiol**. Santa Lucia, v.59, p.227–238, abr. 2010.
- FRANK, K. L. *et al.* In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Rochester, v. 51, n. 3, p. 888–895, 2007.
- GABAI, V.L.; SHERMAN, M.Y. Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. **Journal of Applied Physiology**. Massachusetts, v.92, p.1743-1748, 2002.
- GEOGHEGAN, J.A. *et al.* Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**. Hestington, v. 192, n. 21, p. 5663-73, ago. 2010.
- GEORGE, E.A.; MUIR, T.W. Molecular mechanisms of agr quorum sensing in virulent staphylococci. **ChemBiochem**. Nova York, v. 8, n. 8, p. 847-855, 2007.

GERTZ, S. *et al.* Regulation of sigmaB-dependent transcription of *sigB* and *asp23* in two diferente *Staphylococcus aureus* strains. **Molecular and General Genetics**. Greifswald, v. 261, p. 558 – 566, 1999.

GIROLDO, J.O.; NASCIMENTO, M.S.; FERREIRA, J.S. Estudo da aplicação de nisina para a inativação de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA INICIAÇÃO CIENTÍFICA. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**. Vassouras, v.1, p.1–6, 2014.

GJERMANSEN, M. *et al.* Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. **Environ Microbiol**. Denmark, v. 7, n. 6, p. 894–906, 2005.

GOLDMANN, O.; MEDINA, E. *Staphylococcus aureus* strategies to evade the host acquired immune response. **International Journal of Medical Microbiology**. Braunschweig, v.308, n.6, p.625-630, ago. 2018.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Staphylococcus* spp.** [Porto Alegre], 2013.

GOMES, M.Z.V.; NITSCHKE, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilmes of individual and mixed cltures of food pathogenic bactéria. **Food Control**. São Carlos, v. 25, p. 441-447, 2012.

GRUSZKA, D.T. *et al.* Staphylococcal biofilme-forming protein has a contiguous rod-like structure. **Porceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Nova York, v. 109, n. 17, p. 1011-1018, 2012.

GUITON, P. S. *et al.* Contribution of autolysin and sortase A during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development. **Infection and Immunity**. Saint Louis, v.77, n.9, p.3626–3638, 2009.

HALL, J. E; GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 13 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

HAQUE, S. *et al.* Developments in strategies for *Quorum Sensing* virulence factor inhibition to combat bacterial drug resistance. **Microbial Pathogenesis**. Saudi, v.121, p.293–302, 2018.

HOIBY, N. *et al.* Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Denmark, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.

HOOGAN, D.; KOLTER, R. Why are bacteria refractory to antimicrobials? **Current Opinion in Microbiology**. Massachusetts, v. 5, n.5, p. 472-477, 2002.

HOUSTON, P. *et al.* Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. **Infection and Immunity**. Dublin, v. 79, p.1153-1165, 2011.

ITO, A. *et al.* Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**. Sapporo, v. 75, n. 12, p. 4093-4100, 2009.

IWASE, T.; *et al.* Analysis method and b-lactam antibiotic resistance evaluation method. **Patent Application Aug. 15, 2019 Sheet 1 of US 2019 / 0250162 A1**.

JACK, R.W.; TAGG, J.R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological Review**. Dunedin, v. 59, p.171-200, 1995.

JAHID, I.K.; S.D. A review of microbial biofilms of produce: future challenge to food safety. **Food Science and Biotechnology**. Gyeonggi, v. 21, p. 299-316, 2012.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**. Boston, v. 236, n. 2, p. 163–173, 2004.

JIN, L. *et al.* Interaction of a biosurfactant, Surfactin with a catiônica Gemini surfactante in aqueous solution. **Journal of Colloid and Interface Science**. Shanghai, v. 481, p. 201-209, 2016.

JOZALA, A.F. **Produção de nisina por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 utilizando meio sintético e leite desnatado, com ou sem suplementação, como meio de cultivo**. 93 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

KASNOWSKI, M. C. *et al.* Formação de Biofilme na Indústria de Alimentos e Métodos de Validação de Superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, n.15, 2010.

KIEVIT, T.R.; INGLEWSKI, B.H. Bacterial *quorum sensing* in pathogenic relationships. **Infection and Immunity**. Rochester, v. 68, n. 9, p. 4839-4849, set. 2000.

KOLODKIN-GAL, I. *et al.* D-Amino acids trigger biofilm disassembly. **Science**. Massachusetts, v. 328, p. 627–629, 2010.

KUDA, T.; YANO, T.; KUDA, M.T. Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. **LWT – Food Science and Technology**. Ishikawa, v. 41, p. 988-993, 2008.

LAVERTY, G.; GORMAN, S.P.; GILMORE, B.F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. **Future Microbiology**. Belfast, v. 8, n. 4, p. 509-524, 2013.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**. Saint Briec, p. 63-76, 2003.

LE SCORNET, A.; REDDER, P. Post-transcriptional control of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. **BBA - Gene Regulatory Mechanisms**. Toulouse, p.734–741, 2018.

LEBERT, I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiol**. Saint Gene, v. 24, p. 281-287, 2007.

LEID, J. G. *et al.* Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. **Infection and immunity**. Bozeman, v. 70, n. 11, p. 6339–6345, 2002.

LEIMAN, S.A. *et al.* D-Amino Acids Indirectly Inhibit Biofilm Formation in *Bacillus subtilis* by Interfering with Porein Synthesis. **Journal of Bacteriology**. Duesseldorf, v.193, n.23, p.5391-5395, 2013.

LI, Q. *et al.* Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus argenteus* in chicken from retail markets in China. **Food control**. Denmark, v.96, p.158-164, fev. 2019.

LI, Y. *et al.* High flux isothermal assays on pathogenic, virulent and toxic genetics from various pathogens. **Microbial Pathogenesis**. Guangzhou, v.116, p.68-72, mar. 2018.

MACEDO, A. J.; ABRAHAM, W.R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Medicinal chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))**. Braunschweig, v.5, n.6, p.517–528, 2009.

MAGNUSSON, J.; SCHNÜRER, J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. **Applied and Environmental Microbiology**. Sweden, v. 67, p.1-5, 2001.

MALACHOWA, N. *et al.* Contribution of *Staphylococcus aureus* coagulases and clumping factor A to abscesso formation in a rabbit model of skin and soft tissue infection. **PLOS One**. Illinois, v. 11, n. 6, p.1-14, 2016.

MALEKI, D. T. *et al.* Molecular analysis of accessory gene regulator functionality and virulence genes in *Staphylococcus aureus* derived from pediatric wound infections. **Infection, Genetics and Evolution**. Tehran, v.73, p.255–260, set. 2019.

MARQUES, S. C. *et al.* Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 38, p. 538-543, 2007.

MARQUES, V.F. *et al.* Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 33, n. 2, p. 160-170, 2013.

MAUKONEN, J. *et al.* Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.30, p. 327-356, 2003.

MEIRA, Q.G.S. *et al.* Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. **Food Control**. João Pessoa, v. 25, p. 469-475, 2012.

MELO, P.C. *et al.* Análise fenotípica molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 94-99, 2012.

MIQUEL, S. *et al.* Anti-biofilm Activity as a Health Issue. **Frontiers in Microbiology**, Washington, v. 7, n. 592, p. 1-14, 2016.

MOHAMMED, Y. E. E.; *et al.* Vision for medicine: *Staphylococcus aureus* biofilm war and unlocking key's for anti-biofilm drug development. **Microbial Pathogenesis**, v. 123 p. 339–347, 2018.

MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends Microbiol**, v. 17, n. 2, p. 73–87, 2009.

- MOREIRA, A. *et al.* Nutritional modulation of exercise-induced immunodepression in athletes: a systematic review and meta-analysis. **Eur J Clin Nutr**, v. 61, n. 4, p. 443-460, 2007.
- MORENO, I. *et al.* Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 23-8, 1999a.
- MORENO, I. *et al.* Nisina no controle de bactérias esporogênicas em produtos lácteos. **Associação Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 4215-4228, 1999b.
- NEWELL, P.D. *et al.* A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. **PLoS Biology**, v. 9, n.2, 2011.
- NEWSHOLME, P. *et al.* Glutamine and glutamate – their central role in cell metabolism and function. **Cell Biochem Funct**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2003.
- NOGUEIRA, H. S. *et al.* Antibacterianos: principais classes, mecanismos de ação e resistência. **Montes Claros**, v.18, n.2, p.96-108, 2016.
- O’GARA, J.P. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, n. 2, p. 179-188, 2007.
- OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; PICCOLI, R.H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revisão do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 277-284, 2010.
- OTTO, M. “*Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental’ pathogen”. **Nat Ver Microbiol**, v. 7, n. 8, p. 555-567, 2009.
- OTTO, M. Staphylococcal biofilmes. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 207-228, 2008.
- PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 6, p. 465-499, 2003.

PARIZZI, S.Q.F. *et al.* Bacterial adherence to diferente inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 47, n. 1, p. 77 – 83, 2004.

PARSEK, M.R.; FUQUA, C. Biofilmes 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n.14, p.4427-4440, 2004.

PIMENTEL-FILHO, N.J. *et al.* Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. **International Journal of Food Microbiology**, v. 190, p. 1-8, 2014.

PINKNER, J. S. *et al.* Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 47, p. 17897–17902, 2006.

QUERIDO, M. M.; *et al.* Self-disinfecting surfaces and infection control. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, p. 8-21, 2019.

R Development Core Team. 2013. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 20 Abr. 2021.

ROCHA, C.R. *et al.* Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. como sanitizante natural para controle de bactérias sésseis em superfície utilizada para corte de alimentos. **Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, p. 338-344, 2014.

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. O. Considerações nutricionais e bioquímicas da suplementação de glutamina em atletas: controvérsias e aspectos atuais. **J Metab Nutr**, v. 7, p. 106-117, 2003.

ROHDE, H. *et al.* Polysaccharide intercellular adhesin or protein factor in biofilme accumulation of *Saphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. **Biomaterials**, v. 28, n. 9, p. 1711-1720, 2007.

ROWBOTTOM, D.G.; KEAST, D.; MORTON, A.R. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. **Sports Med.**, v. 21, n. 2, p. 80-97, 1996.

- SAHL, H.G.; BIERBAUM, G. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. **Annu. Ver. Microbiol.**, vol. 52, p. 41-79, 1998.
- SAMADI, N.; KLEMS, M.; UNTERSMEYER, E. M. D. The role of gastrointestinal permeability in food allergy. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 121, n. 2, p. 168-173, 2008.
- SANTANA, A. Sanitização e desinfecção: diferenças, benefícios, cuidados e os principais químicos. **Food Safety Brazil: Segurança de Alimentos**. 2016. Disponível em: <http://foodsafetybrazil.org/sanitizacao-e-desinfeccao-diferencas-beneficios-cuidados-e-os-principais-quimicos/#ixzz501IGLnLf>. Acesso em: 01 fev. 2021.
- SANTOS, R.V.T.; CAPERUTO, E.C.; COSTA ROSA, L.F.B.P. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. **Life Science**, v. 80, n. 6, p. 573-578, 2007.
- SAUER, K. *et al.* Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm. **Journal of bacteriology**. Nova York, v. 186, n. 21, p. 7312–7326, 2004.
- SCALI, F. *et al.* Which are important targets in development of *S. aureus* mastitis vaccine? Mastitis vaccine? **Research in Veterinary Science**. v. 100, p. 88-99, 2015.
- SCHOMMER, N. N. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. **Infection and Immunity**. Hamburg, v. 79, n. 6, p. 2267–2276, 2011.
- SCHROEDER, K. *et al.* Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. **PLOS One**. v. 4, n. 10, p. e7567, 2009.
- SEIER-PETERSEN, M. A. *et al.* Biocide Susceptibility of *Staphylococcus aureus* CC398 and CC30 Isolates from Pigs and Identification of the Biocide Resistance Genes, *qacG* and *qacC*. **Microb Drug Resist**. Denmark, v.21, n5, p.527-536, 2015.
- SHI, J.; MAO, N. F.; WANG, L.; Efficacy of Combined Vancomycin and Fosfomycin against Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* in Biofilm in VIVO. **PLOS One**. v. 9, p.1-14, 2014.

SILVA, J. G.; ALCANTARA, A. M.; MOTA, R. A. Bovine mastitis caused by *Staphylococcus* spp. Methicillin-resistant: literature review. **Pesq. Vet. Bras.** Rio de Janeiro, v.38, n.2, p.1-5, fev. 2018.

SILVA, M.S.A. *et al.* Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 18, p. 236-243, 2008.

SILVA, S.S.; NITSCHKE, M. Potencial de uso de surfactina na dispersão de biofilme de *Staphylococcus aureus*. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer. Goiânia, v. 14, n. 25, p. 1386, 2017.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergente biofilm control strategies. **LWT – Food Science and Technology**. Braga, v. 43, p. 573-583, 2010.

SIMOJOKI, H. *et al.* Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection. **Veterinary Microbiology**. Kuopio, v. 158, n. 3, p. 344-352, 2012.

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.1-23, 2012.

SOUZA, E.L. *et al.* Biofilme formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. **Brasilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 45, p. 67-75, 2014.

SUDAGIDAN, M.; YEMENICIO, A. Effects of nisin and lysozyme on growth inhibition and biofilm formation capacity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk and cheese samples. **Journal of Food Protection**. Izmir, v. 75, p. 1627-1633, 2012.

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

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Songklanakarin J Sci and Technol**. Mahasarakham, v.25, n.6, p.807-815, 2003.

- VALERIANO, C. *et al.* The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. **Food Control**. v. 25, p. 673-677, 2012.
- VALLE, J. *et al.* SarA and not sigma Bis essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**. v. 48, n. 4, p. 1075-87, 2003.
- VUONG, C. *et al.* A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **Journal of Biological Chemistry**. Montana, v. 279, n. 52, p. 54881–54886, 2004.
- VUYST, L.; VANDAMME, E.J. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* batch fermentations. **Journal of General Microbiology**. Bélgica, v. 138, p. 571-578, 1992.
- WAGNER, C. *et al.* Host defence against *Staphylococcus aureus* biofilms: phagocytosis by polymorphonuclear neutrophils (pmn) and formation of neutrophil extracellular traps (NETs). **Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume**. Heidelberg, v. 91– B, n. SUPP II, p. 301, 2009.
- WALSH, E.J. *et al.* Identification of the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM clumping factor B (ClfB) (binding site in the α C-domain of human fibrinogen). **American Society for Microbiology**. Nova York, v. 154, n.2, p. 550-558, 2008.
- WALTERS, M.C. *et al.* Microarray Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Regulons: Effects of Growth Phase and Environment. **Journal of bacteriology**. Nova York, v. 185, n. 7, p. 2080-2095, 2003.
- WATER, C.M.; BASSLER, B.L. Quorum-Sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v.21, p. 319-46, 2005.
- WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview: biofilm, city of microbes. **J Bacteriol.** Massachusetts, v.182, n.10, mai. 2000.
- WELTE, T. *et al.* Ceftaroline fosamil as a potential treatment option for *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia in adults. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 54, n. 4, p.410-422, out. 2019.

WRAY, C.J.; MAMMEN, J.M.V.; HASSELGREN, P. Catabolic response to stress and potential benefits of nutrition support. **Nutrition**. Boston, v.18, n.11/12, p.971-977, 2002.

YANG, H. *et al.* Aspartate inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**. Hubei, v.362, n.7, p.1-7, 2015.

ZELL, C. *et al.* Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**. Stuttgart, v. 127, p. 246–251, 2008.