



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA  
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE FARMÁCIA

**INGRID ANDRADE DE ARAÚJO PEREIRA**

**EFEITO DE CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE NIMESULIDA SOBRE A  
VIRULÊNCIA DE *STAPHYLOCOCCUS SPP.***

Barreiras – BA

2022

**INGRID ANDRADE DE ARAÚJO PEREIRA**

**EFEITO DE CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE NIMESULIDA SOBRE A  
VIRULÊNCIA DE *STAPHYLOCOCCUS SPP.***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal do Oeste da Bahia, como  
requisito parcial para obtenção do Diploma de  
Graduação no Curso de Farmácia.

Orientador: Profa. Dra. Mary Hellen Fabres Klein

Coorientador: Prof. Dr. Raphael Contelli Klein

Barreiras – BA

2022

## FICHA CATALOGRÁFICA

---

P436 Pereira, Ingrid Andrade de Araújo.

Efeito de concentrações plasmáticas de nimesulida sobre a virulência de *staphylococcus spp.*/ Ingrid Andrade de Araújo Pereira. – 2022.

53f.

Orientador: Profa. Dra. Mary Hellen Fabres Klein.

TCC (Graduação) – Bacharelado em Farmácia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2022.

1. AINE. 2. Biofilme. 3. Staphylococcus. I. Klein, Mary Hellen Fabres. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 615.32

---

**Biblioteca Universitária de Barreiras - UFOB**

**INGRID ANDRADE DE ARAÚJO PEREIRA**

**EFEITO DE CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE NIMESULIDA SOBRE A  
VIRULÊNCIA DE *STAPHYLOCOCCUS SPP.***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal do Oeste da Bahia, como requisito  
parcial para obtenção do Diploma de Graduação no  
Curso de Farmácia.

Aprovado em 7 de julho de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente  
 MARY HELLEN FABRES KLEIN  
Data: 01/08/2022 11:20:55-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Profa. Dra. Mary Hellen Fabres Klein.  
(Orientadora)

Documento assinado digitalmente  
 Raphael Contelli Klein  
Data: 01/08/2022 11:17:53-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

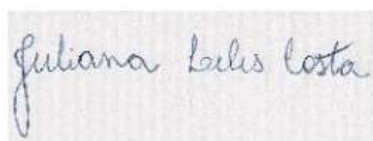
---

Prof. Dr. Raphael Contelli Klein.  
(Coorientadora)

Documento assinado digitalmente  
 JAMILLE SOUZA FERNANDES  
Data: 01/08/2022 12:03:47-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Profa. Dra. Jamille Souza Fernandes  
(Membro)



---

Profa. Dra. Juliana Leles Costa  
(Membro)

***Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos.***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar minha vida todos os dias e me dá forças para enfrentar todos os momentos difíceis durante essa jornada.

Agradeço a minha mãe Lourdes e meu pai Gilson, por me apoiar quando decidi ir morar em uma cidade em que não conhecia ninguém para conseguir o meu tão sonhado diploma e nos meus momentos de incerteza. Por trabalhar incansavelmente e pelos sacrifícios para que não me falte nada, vocês são a minha base, fonte de inspiração, meu porto seguro e meu exemplo de força e honestidade, espero retribuir em dobro tudo que vocês fazem por mim.

Aos meus irmãos Mirla, Nirla e Eduardo, por me apoiar, pelo carinho e por atender todas as minhas ligações e preencher minhas noites de solidão aqui em barreiras.

Ao meu melhor amigo Samuel, que sempre me incentivou a fazer uma faculdade, nunca deixou eu desistir e ao longo dessa jornada acabou virando meu namorado, obrigada por sempre acreditar em mim.

A minha prima Pâmela, a pessoa mais apaixonada que eu conheço pela profissão farmacêutica, que acabou me inspirando e incentivando.

A meu coorientador Raphael Klein, por compartilhar seus conhecimentos.

A minha orientadora Mary Hellen, por compartilhar seus conhecimentos, pela paciência principalmente quando eu cometia erros, por estar sempre presente, pela aprendizagem ao longo desses anos de parceria desde a iniciação científica, a ela toda a minha admiração.

Aos meus amigos, com quem dividir todos os meus desesperos, tristezas, frustrações, choros e felicidades, vocês tornaram minha jornada durante a faculdade bem mais leve.

A Universidade Federal do Oeste da Bahia por possibilitar a minha formação. A todos os professores que contribuíram direto e indiretamente no profissional que vou me tornar.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Ao grupo de Pesquisa Virulência pelo acolhimento e ao Núcleo de Estudos de Agentes Infeciosos e Vetores (NAIVE) por ceder o laboratório e os equipamentos.

Por fim, quero agradecer as professoras Jamille Souza Fernandes, Juliana Leles Costa, ao professor Jonilson Berlink Lima, que aceitaram participar da banca de avaliação da minha monografia.

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota. ”*

*Theodore Roosevelt*

## RESUMO

O sucesso de uma infecção bacteriana depende da expressão dos fatores de virulência que irão contribuir com a patogenicidade do microrganismo. A produção de biofilme, resistência a espécies reativas de oxigênio, secreção de proteases e resistência a antibióticos são exemplos desses fatores que contribuem com a virulência de espécies de *Staphylococcus* e falha do tratamento. A busca por compostos para combater infecções causadas por bactérias resistentes ainda é prioridade. Estudos têm mostrado que os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) podem ter atividade antimicrobiana, exercer influência sobre a virulência e biofilme bacteriano e apresentam efeitos sinérgicos quando associados à antibióticos. Dessa forma, este projeto avaliou a interferência das concentrações plasmáticas de nimesulida na virulência de *Staphylococcus spp.*, por meio de testes de crescimento, proteólise, formação de biofilme, biofilme pré-formado, espalhamento das colônias e tolerância a estresse oxidativo. Foi observado que a nimesulida não tem ação antimicrobiana, mas foi capaz de reduzir a velocidade de crescimento ( $\mu$ ) dos isolados testados. A nimesulida na concentração de 0,002 $\mu$ g/ $\mu$ L aboliu a atividade proteolítica de *Staphylococcus warneri*. Não foram observados efeitos significativos da nimesulida sobre o biofilme, espalhamento das colônias e tolerância a estresse oxidativo, que pode ser devido às baixas concentrações testadas. Estes resultados abrem as portas para investigações futuras do efeito de nimesulida sobre a virulência bacteriana.

**Palavras-chave:** AINE, biofilme, *Staphylococcus*, estresse oxidativo, espalhamento de colônias, atividade proteolítica.

## ABSTRACT

The bacterial infection success depends on the expression of virulence factors that will contribute to the microorganisms' pathogenicity. Biofilm production, resistance to reactive oxygen species, secretion of proteases and antibiotic resistance are examples of these factors that contribute to the virulence of *Staphylococcus* species and treatment failure. The search for compounds to fight infections caused by resistant bacteria is still a priority. Studies have shown that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) may have antimicrobial activity, exert an influence on virulence and bacterial biofilm and have synergistic effects when associated with antibiotics. In this way, this project evaluated the interference of nimesulide plasma concentrations on the virulence of *Staphylococcus spp.*, by measurements of growth curves, proteolysis, biofilm formation, preformed biofilm, colony spreading and tolerance to oxidative stress. It was observed that nimesulide has no antimicrobial activity, but was able to reduce the growth rate ( $\mu$ ) of the tested isolates. Nimesulide at a concentration of 0.002 $\mu$ g/ $\mu$ L abolished the proteolytic activity of *Staphylococcus warneri*. No significant effects of nimesulide on biofilm, colony spread and tolerance to oxidative stress were observed, which may be due to the low concentrations tested. These results open the door for future investigations of the effect of nimesulide on bacterial virulence.

**Keywords:** NSAIDs, biofilm, *Staphylococcus*, oxidative stress, colony spreading, proteolytic activity.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |                                                                    |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>Agr</b>      | Gene regulador acessório <i>agr</i>                                |
| <b>AhpC</b>     | Alquil hidroperóxido redutase C                                    |
| <b>AINES</b>    | Anti-inflamatórios não esteroidais                                 |
| <b>ANVISA</b>   | Agência de Vigilância Sanitária                                    |
| <b>Aur</b>      | Metaloprotease aureolisina                                         |
| <b>ATCC</b>     | American Type Culture Collection                                   |
| <b>Bbp</b>      | Proteína de ligação a sialoproteína óssea                          |
| <b>blaZ</b>     | Gene que codifica a $\beta$ -lactamase                             |
| <b>B.O.D.</b>   | Demanda biológica de oxigênio                                      |
| <b>CIM</b>      | Concentração Inibitória Mínima                                     |
| <b>Cna</b>      | Proteína de ligação ao colágeno                                    |
| <b>COVID-19</b> | Doença do Coronavírus 2019                                         |
| <b>COX1</b>     | Ciclo-oxigenase-1                                                  |
| <b>COX2</b>     | Ciclo-oxigenase-2                                                  |
| <b>C1q</b>      | Componente do sistema complemento                                  |
| <b>CWA</b>      | Cell wall anchored protein – Proteínas ancoradas na parede celular |
| <b>DMSO</b>     | Dimetilsulfóxido                                                   |
| <b>DNA</b>      | Ácido desoxirribonucleico                                          |
| <b>DNAe</b>     | Ácido desoxirribonucleico extracelular                             |
| <b>DO</b>       | Densidade Óptica                                                   |
| <b>eDNA</b>     | Ácido desoxirribonucleico extracelular                             |
| <b>EPS</b>      | Polissacarídeos extracelulares                                     |
| <b>EROS</b>     | Espécie reativa de oxigênio                                        |

|                                   |                                                      |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>FDA</b>                        | Food and Drug Administration                         |
| <b>FnBPs</b>                      | Proteína de ligação a fibronectina                   |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Peróxido de Hidrogênio                               |
| <b>KatA</b>                       | Catalase                                             |
| <b>MARS</b>                       | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina |
| <b>mg</b>                         | Miligrama                                            |
| <b>mL</b>                         | Mililitro                                            |
| <b>NaCl</b>                       | Cloreto de sódio                                     |
| <b>O<sub>2</sub></b>              | Oxigênio                                             |
| <b>OMS</b>                        | Organização Mundial da Saúde                         |
| <b>PBS</b>                        | Tampão salina fosfato                                |
| <b>pH</b>                         | Potencial hidrogeniônico                             |
| <b>PIA</b>                        | Polissacarídeo de adesão intercelular                |
| <b>PSM</b>                        | Phenol soluble modulins                              |
| <b>SarA</b>                       | Gene regulatório SarA                                |
| <b><i>S. aureus</i></b>           | <i>Staphylococcus aureus</i>                         |
| <b>ScpA</b>                       | Cisteíno-protease A                                  |
| <b>ScpB</b>                       | Cisteíno-protease B                                  |
| <b>SdrC</b>                       | Serine-aspartate repeat-containing protein E         |
| <b>Sod</b>                        | superóxido dismutase                                 |
| <b>SspA</b>                       | Serino-protease ou protease V8                       |
| <b><i>S. warneri</i></b>          | <i>Staphylococcus warneri</i>                        |
| <b>TSA</b>                        | Ágar soja tripticaseína                              |
| <b>TSB</b>                        | Caldo soja tripticaseína                             |

|                         |                                      |
|-------------------------|--------------------------------------|
| <b>UFV</b>              | Universidade Federal de Viçosa       |
| <b><math>\mu</math></b> | Velocidade de crescimento bacteriano |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Etapas principais de formação de biofilme em *Staphylococcus spp.* Inicialmente ocorre a adesão à superfície, mediado por adesinas, em seguida há a fase de maturação, onde ocorre a produção de polissacarídeo de adesão intercelular (PIA) e liberação de eDNA que regula as interações intercelulares. Na terceira etapa ocorre a produção e liberação de proteases responsáveis pela dispersão do biofilme.....pág. 22
- Figura 2** – Efeito das concentrações plasmáticas de 0,002µg/µL, 0,004µg/µL e 0,008µg/µL de nimesulida sobre a curva de crescimento dos isolados **(A)** *S. aureus* NRS133, **(B)** *S. warneri*, **(C)** USA300, **(D)** *S. aureus* ATCC 29213, **(E)** *S. epidermidis* NRS101, **(F)** *S. aureus* Mu50.....pág. 34
- Figura 3** – Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre espalhamento de colônia de *Staphylococcus aureus* NRS133. **(A)** ágar TSB, **(B)** ágar TSB + DMSO, **(C)** ágar TSB + Nimesulida 0,002µg/µL, **(D)** ágar TSB + Nimesulida 0,004µg/µL, **(E)** ágar TSB + Nimesulida 0,008µg/µL.....pág. 36
- Figura 4** – Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre espalhamento de colônia de *Staphylococcus warneri* **(A)** ágar TSB, **(B)** ágar TSB + DMSO 0,008µg/µL, **(C)** ágar TSB + Nimesulida 0,002µg/µL, **(D)** ágar TSB + Nimesulida 0,004µg/µL, **(E)** ágar TSB + Nimesulida 0,008µg/µL.....pág. 36
- Figura 5** – Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre espalhamento de colônia de *Staphylococcus aureus* USA300 **(A)** ágar TSB, **(B)** ágar TSB + DMSO 0,008µg/µL, **(C)** ágar TSB + Nimesulida 0,002µg/µL, **(D)** ágar TSB + Nimesulida 0,004µg/µL, **(E)** ágar TSB + Nimesulida 0,008µg/µL.....pág. 36
- Figura 6** – Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre espalhamento de colônia de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 **(A)** ágar TSB, **(B)** ágar TSB + DMSO 0,008µg/µL, **(C)** ágar TSB + Nimesulida 0,002µg/µL, **(D)** ágar TSB + Nimesulida 0,004µg/µL, **(E)** ágar TSB + Nimesulida 0,008µg/µL.....pág. 37
- Figura 7** – Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre espalhamento de colônia de *Staphylococcus aureus* Mu50 **(A)** ágar TSB, **(B)** ágar TSB + DMSO 0,008µg/µL, **(C)** ágar TSB + Nimesulida 0,002µg/µL, **(D)** ágar TSB + Nimesulida 0,004µg/µL, **(E)** ágar TSB + Nimesulida 0,008µg/µL.....pág. 37

**Figura 8** – Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre espalhamento de colônia de *Staphylococcus epidermidis* NRS 101 (A) ágar TSB, (B) ágar TSB + DMSO 0,008µg/µL, (C) ágar TSB + Nimesulida 0,002µg/µL, (D) ágar TSB + Nimesulida 0,004µg/µL, (E) ágar TSB + Nimesulida 0,008µg/µL..... pág. 37

**Figura 9** – Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre formação do biofilme dos isolados *Staphylococcus aureus* ATCC29219, *Staphylococcus aureus* NRS133, *S. aureus* USA300, *S. aureus* Mu50, *S. epidermidis* NRS 101 e *S. warneri*..... pág. 39

**Figura 10** – Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre biofilme pré-formado dos isolados *Staphylococcus aureus* ATCC29219, *Staphylococcus aureus* NRS133, *S. aureus* USA300, *S. aureus* Mu50, *S. epidermidis* NRS 101 e *S. warneri*..... pág. 39

**Figura 11** – Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre a atividade proteolítica dos isolados *Staphylococcus aureus* NRS133, *S. aureus* USA300, *S. aureus* Mu50, *S. epidermidis* NRS 101 e *S. warneri*.....pág. 40

**Figura 12** – Atividade proteolítica do isolado *S. aureus* NRS 133 exposto ou não a nimesulida. (A) ágar milk 1%, (B) ágar milk 1% + DMSO 0,008µg/µL, (C) ágar milk 1% + Nimesulida 0,002µg/µL, (D) ágar milk 1% + Nimesulida 0,004µg/µL, (E) ágar milk 1%+ Nimesulida 0,008µg/µL..... pág. 41

**Figura 13** – Atividade proteolítica do isolado *S. warneri* exposto ou não a nimesulida. (A) ágar milk 1%, (B) ágar milk 1% + DMSO 0,008µg/µL, (C) ágar milk 1% + Nimesulida 0,002µg/µL, (D) ágar milk 1% + Nimesulida 0,004µg/µL, (E) ágar milk 1%+ Nimesulida 0,008µg/µL.....pág. 41

**Figura 14** – Atividade proteolítica do isolado *S. aureus* USA300 exposto ou não a nimesulida. (A) ágar milk 1%, (B) ágar milk 1% + DMSO 0,008µg/µL, (C) ágar milk 1% + Nimesulida 0,002µg/µL, (D) ágar milk 1% + Nimesulida 0,004µg/µL, (E) ágar milk 1%+ Nimesulida 0,008µg/µL..... pág. 41

**Figura 15** – Atividade proteolítica do isolado *S. aureus* ATCC 29213 exposto ou não a nimesulida. (A) ágar milk 1%, (B) ágar milk 1% + DMSO 0,008µg/µL, (C) ágar milk 1% + Nimesulida 0,002µg/µL, (D) ágar milk 1% + Nimesulida 0,004µg/µL, (E) ágar milk 1%+ Nimesulida 0,008µg/µL.....pág. 42

**Figura 16.** Atividade proteolítica do isolado *S. aureus* Mu50 exposto ou não a nimesulida. (A) ágar milk 1%, (B) ágar milk 1% + DMSO 0,008µg/µL, (C) ágar milk 1 + Nimesulida

0,002µg/µL, **(D)** ágar milk 1% + Nimesulida 0,004µg/µL, **(E)** ágar milk 1%+ Nimesulida 0,008µg/µL.....pág. 42

**Figura 17** – Atividade proteolítica do isolado *S. epidermidis* NRS101 exposto ou não a nimesulida. **(A)** ágar milk 1%, **(B)** ágar milk 1% + DMSO 0,008µg/µL, **(C)** ágar milk 1% + Nimesulida 0,002µg/µL, **(D)** ágar milk 1% + Nimesulida 0,004µg/µL, **(E)** ágar milk 1%+ Nimesulida 0,008µg/µL.....pág. 42

**Figura 18** – Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre a tolerância ao estresse oxidativo dos isolados *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Staphylococcus aureus* NRS133, *S. aureus* USA300, *S. aureus* Mu50, *S. epidermidis* NRS 101 e *S. warneri*.....pág. 43

## LISTA DE SÍMBOLOS

|          |                   |
|----------|-------------------|
| °C       | Graus centígrados |
| %        | Porcentagem       |
| $\beta$  | Beta              |
| $\mu$    | Micro             |
| $\alpha$ | Alfa              |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                        |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>Tabela 1</b> – Velocidade de crescimento ( $\mu$ ) de <i>Staphylococcus</i> expostos à concentrações plasmáticas de nimesulida..... | pag. 33 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|

## SUMÁRIO

|                                                                                             |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                   | <b>18</b>  |
| <b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>                                                         | <b>20</b>  |
| <b>3 OBJETIVOS .....</b>                                                                    | <b>26</b>  |
| 3.1 OBJETIVO GERAL .....                                                                    | 26         |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                             | 26         |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                          | <b>27</b>  |
| 4.1 MATERIAIS .....                                                                         | 27         |
| 4.2 MÉTODOS .....                                                                           | 28         |
| 4.2.1 Micro-organismo e condição de cultivo. ....                                           | 28         |
| 4.2.2 Preparo da Nimesulida.....                                                            | 28         |
| 4.2.3 Concentração inibitória mínima da nimesulida. ....                                    | 28         |
| 4.2.4 Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre crescimento bacteriano. .... | 29         |
| 4.2.5 Efeito da nimesulida sobre a tolerância ao estresse oxidativo.....                    | 29         |
| 4.2.6 Efeito da nimesulida sobre a atividade proteolítica dos isolados. ....                | 30         |
| 4.2.7 Efeito da nimesulida sobre o espalhamento das colônias.....                           | 30         |
| 4.2.8 Efeito da nimesulida sobre a formação de biofilme. ....                               | 30         |
| 4.2.9 Efeito da nimesulida sobre o biofilme pré-formado.....                                | 31         |
| 4.2.10 Análises estatísticas.....                                                           | 31         |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                        | <b>32</b>  |
| <b>6 CONCLUSÃO.....</b>                                                                     | <b>455</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                     | <b>466</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

No ano de 2019, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considerou a resistência bacteriana entre um dos dez maiores problemas de saúde pública do mundo. Se nada for feito para reverter essa situação, a OMS estima que até 2050 cerca de 10 milhões de pessoas irão morrer por ano em todo o mundo por infecções causadas por bactérias resistentes, custando aos cofres públicos cerca de 100 trilhões de dólares (ANVISA, 2019). Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos em tratamentos experimentais durante a pandemia da COVID-19 irá agravar ainda mais o problema da resistência bacteriana (GETAHUN et al., 2020).

Além da resistência, outro fator que dificulta o tratamento de infecções crônicas é a formação do biofilme bacteriano. O biofilme é uma barreira física contra o sistema imune e os antibióticos levando a redução da sua eficácia, pois as bactérias sésseis são protegidas pela matriz extracelular de polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. Outros fatores de virulência como expressão de proteases, resistência a espécies reativas de oxigênio, expressão de adesinas também contribuem de sobremaneira para o sucesso das infecções, especialmente as estafilocócicas (LISTER et al., 2014; HALL; MAH, 2017).

A OMS publicou uma lista de bactérias que devem ser prioridade nas pesquisas para o desenvolvimento de novos antibióticos e tratamentos. Nessa lista, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MARS) foi classificado como microrganismo de alta prioridade na busca desses novos fármacos (ANVISA, 2017). Sabe-se que o desenvolvimento e a aprovação de novos antibióticos duram em média 20 anos, mas em pouco tempo começam a surgir cepas resistentes de *S. aureus*. Na tentativa de se evitar a resistência bacteriana, tem sido proposto o uso de fármacos com ação inibitória sobre a virulência, combinados ou não com antibióticos. Os compostos com atividade antipatogênica interferem na ação de toxinas, modulam a expressão gênica, degradam biofilme e/ou inibem a comunicação bacteriana, reduzindo a patogenicidade sem promover a morte bacteriana, gerando uma pressão mais branda no desenvolvimento da resistência.

Alguns anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) como ibuprofeno, diclofenaco, ácido acetilsalicílico já foram testados e apresentaram redução ou aumento da virulência em *S. aureus* (OLIVEIRA et al., 2019). Dessa forma, a investigação dos efeitos de AINES sobre a virulência se faz necessária, uma vez que estes medicamentos são amplamente utilizados em associação a antibióticos para o tratamento de infecções. A nimesulida é amplamente utilizada no Brasil para tratar inflamações em geral, seu mecanismo de ação é elucidado e possui um preço acessível,

mas ainda não teve seu efeito avaliado sobre a virulência de *Staphylococcus spp.* Dessa forma, este trabalho visa avaliar o efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida a virulência de isolados padrão de *Staphylococcus spp.*

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

*Staphylococcus spp.* são cocos gram-positivos de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, anaeróbios facultativos, imóveis, não esporulados que podem se apresentar de diferentes formas podendo ser isoladas, em pares, cadeias curtas e em conjuntos irregulares que se espalham clonalmente (SANTOS et al., 2007). Crescem em ágar nutriente ou em caldo simples, são mesófilos com temperatura de crescimento entre 7 a 47,8°C no ambiente, sua temperatura ótima é de 37°C e pH 7 a 7,5, o tempo de incubação varia de 18 a 24 horas. (ALTAF et al., 2019; PRADO et al., 2015). As espécies de *Staphylococcus* são divididas em dois grupos: os *Staphylococcus* coagulase negativa, subdividido em dez espécies, e os coagulase positiva que são subdivididos em quatro espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hycus* e *Staphylococcus delphinie*. Os *Staphylococcus* coagulase positiva podem ser diferenciados a partir da fermentação de carboidrato, presença de termonuclease, produção de pigmento, acetoína e hemolisina (PRADO et al., 2015).

*Staphylococcus*, em especial *S. aureus*, podem colonizar naturalmente as mucosas, narinas e pele de indivíduos saudáveis. Há uma estimativa que cerca de 30% da população humana seja colonizada, assintomaticamente, por *S. aureus* na sua cavidade nasal (SAKR et al., 2018). Entretanto, são patógenos oportunistas com capacidade de causar infecções superficiais e brandas à mais invasivas e graves (SANTOS et al., 2007). O processo infeccioso estafilocócico se inicia com a invasão do tecido a partir da ruptura epitelial ou pela expressão de toxinas que rompem a barreira epitelial e permite a entrada do microrganismo (INOSHIMA et al., 2012). Outra rota de infecção, que é frequente em ambiente hospitalar, é por meio de dispositivos médicos contaminados (ZHENG et al., 2018). Assim que o tecido é invadido, a bactéria inicia a expressão de diversos fatores de virulência que auxiliam na colonização do tecido, captação de nutrientes, formação de biofilme e na defesa contra o sistema imune do hospedeiro (CHEUNG et al., 2021).

A colonização dos tecidos, bem como o início da infecção, é realizada pela ação de adesinas que são proteínas de superfície ancoradas na parede celular (CWA - cell wall anchored) estafilocócica (FOSTER, 2019; FOSTER, 2020). As adesinas agem fixando a bactéria no tecido por meio da ligação aos componentes da matriz extracelular do hospedeiro, incluindo colágeno, fibrinogênio e fibronectina (FOSTER, 2019). As adesinas também são importantes na formação de biofilme e na evasão do sistema imune, uma vez que são capazes de inibir a ativação do sistema do complemento do hospedeiro (FOSTER, 2019; FOSTER, 2020).

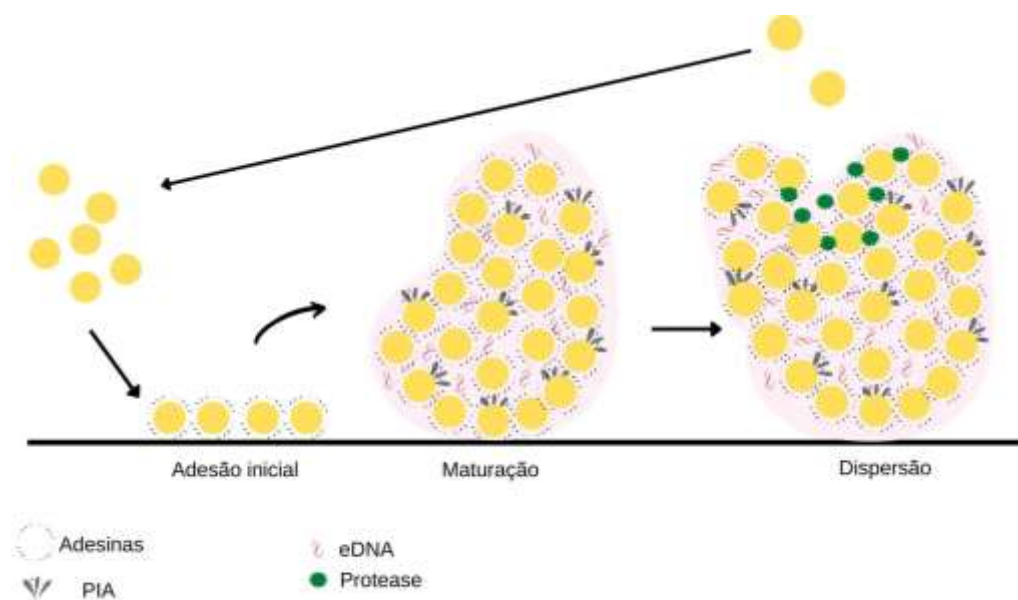
O organismo do hospedeiro ao sofrer uma invasão por patógeno inicia a resposta imunológica que é controlada tanto pela imunidade inata, quanto pela adquirida (FREITAS et al., 2013). A imunidade inata, por meio do sistema do complemento, é a primeira linha de defesa que o *Staphylococcus* encontra durante o curso da infecção. A cascata proteolítica que é ativada promove a opsonização da bactéria e fagocitose por neutrófilos e macrófagos (JONG et al., 2019). Para enfrentar o sistema imune do hospedeiro, estafilococos desenvolveram inúmeros mecanismos de proteção. Para escapar da fagocitose, por exemplo, *S. aureus* expressa diversas proteínas que interferem na ativação do complemento. A proteína de ligação ao colágeno (Cna), além de atuar como molécula de adesão, pode inibir a ativação da via clássica do complemento por se ligar C1q, e a proteína SdrC (Serine-aspartate repeat-containing protein E) é capaz de se ligar ao fator H, podendo impedir a via alternativa (KANG et al., 2013; ZHANG et al., 2017). Há, também a liberação de diversas proteases, como metaloprotease e cisteíno-proteases, que causam a degradação das proteínas do complemento (JUSKO et al., 2014).

Ao fagocitarem as bactérias que não escaparam na opsonização, os neutrófilos ativam mecanismos bactericidas que levam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como superóxido e peróxido de hidrogênio (KLEBANOFF et al., 2013; XEU et al., 2019). As espécies de estafilococos possuem mecanismos que os tornam mais resistentes aos efeitos nocivos das EROs. Dentre eles é possível destacar a produção de estafilocoxantinas, um pigmento laranja que possui uma série de ligações duplas conjugadas com a capacidade de sequestrar radicais livres originados de espécies reativas de oxigênios (FANG, 2004; PELZ et al., 2005). Outro mecanismo é a produção de superóxido dismutase (Sod) que converte o radical superóxido em uma espécie menos tóxica, o  $H_2O_2$  (Peróxido de hidrogênio), em seguida a catalase (KatA) e alquil hidroperóxido redutase C (AhpC) desintoxicam o  $H_2O_2$ , transformando-o em água e oxigênio (COSGROVE et al., 2007).

Outro fator de virulência importante na proteção contra o sistema imune do hospedeiro é o biofilme, produzido principalmente por *S. aureus* e *S. epidermidis* (HALL; MAH, 2017; OTTO, 2018). O biofilme é definido com uma matriz extracelular polimérica protetora que recobre uma comunidade bacteriana que está aderida a uma superfície biótica ou abiótica, que auxilia a bactéria na aderência e colonização tecido, protege da ação de antibióticos e contribui para o desenvolvimento de infecções crônicas (LISTER et al., 2014; HALL; MAH, 2017).

A formação do biofilme envolve três etapas principais, a adesão ou fixação inicial, maturação e a dispersão do biofilme (Figura 1). A primeira etapa é iniciada com a adesão das células plancônicas que se ligam à superfície, que pode ser biótica ou abiótica (CHEUNG et al., 2021). Essa ligação inicial é mediada pelas adesinas, como Bbp (proteína de ligação a

sialoproteína óssea), Cna (proteína de adesão ao colágeno), FnBPs (proteínas de ligação a fibronectina) (CARDILE et al., 2014; CHEUNG et al., 2021; FOSTER, 2019). Após a adesão inicial, as células começam a proliferar levando a formação de microcolônias que iniciam a produção e secreção de polissacarídeos extracelulares (EPS) que formam a matriz que recobre as bactérias (SCHILCHER; HORSWILL, 2020). A EPS madura consiste em DNA extracelular (eDNA), polissacarídeos (PIA) e/ou proteínas (SCHILCHER; HORSWILL, 2020).



**Figura 1.** Etapas principais de formação de biofilme em *Staphylococcus spp.* Inicialmente ocorre a adesão à superfície, mediado por adesinas, em seguida há a fase de maturação, onde ocorre a produção de polissacarídeo de adesão intercelular (PIA) e liberação de eDNA que regula as interações intercelulares. Na terceira etapa ocorre a produção e liberação de proteases responsáveis pela dispersão do biofilme.

O crescimento do biofilme de estafilococos não é uniforme, sua estrutura é similar a torres que são intercaladas por canais onde ocorre o transporte de fluidos, essas estruturas são moldadas pela atividade de diferentes exoenzimas como as proteases, nucleases que degradam componentes específicos do biofilme (OTTO, 2013). As bactérias constituintes do biofilme também apresentam estágios metabólicos diferentes da forma planctônica, pode incluir crescimento aeróbio, crescimento fermentativo e diminuição do metabolismo (SCHILCHER; HORSWILL, 2020; OTTO, 2018).

A dispersão do biofilme estafilocócico para outros tecidos ocorre pela ação de enzimas produzidas por *Staphylococcus spp.* capazes de desfazer as interações covalentes que mantêm o biofilme estruturado levando ao agravamento da infecção (OTTO, 2018). Os biofilmes compostos por matriz rica em proteínas são mais suscetíveis à dispersão mediada por proteases, os *S. aureus* produzem e secretam proteases que atuam na defesa contra o sistema complemento e na dispersão do biofilme, são elas: serino-protease SspA ou protease V8, metaloprotease aureolisina (Aur) e as cisteíno-proteases ScpB e ScpA (CHEUNG et al., 2021; RICE et al., 2001; ROHDE et al., 2005;). Com a dispersão, as bactérias podem se desprender e alcançar outros sítios anatômicos, o que leva ao agravamento do caso (MONACO et al., 2017).

O tratamento de infecções estafilocócicas consiste no uso da antibioticoterapia, mas as espécies deste gênero, principalmente *S. aureus*, além de produzirem biofilme, também possuem a facilidade em adquirir resistência à antibióticos (VESTERGAARD et al., 2019). A primeira forma de resistência de *S. aureus* foi descrita na década de 40 em pacientes hospitalizados (MONACO et al., 2017). A resistência era devida a presença de genes *blaZ* que codificava a enzima  $\beta$ -lactamase que possuía a capacidade de desativar a ação das penicilinas (DAYAN et al., 2016). Em seguida foram identificados *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (MONACO et al., 2017). *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) se tornou um dos principais patógenos causadores de infecções hospitalares que elevam a mortalidade, tempo de internação e aumentam os gastos com o tratamento de infecções (GALATTI et al., 2009).

O número de antibióticos disponíveis atualmente para o tratamento de MRSA é baixo, inclui um agente tópico o mupirocina, fármacos para infusão venosa e um número pequeno de medicamentos orais, entre eles a tetraciclina, rifampicina e clindamicina que são utilizados em terapias combinadas (LUNA, 2010). Devido às bactérias multidrogas resistentes, a OMS emitiu uma lista de bactérias, incluindo a MRSA, como prioridade na pesquisas e desenvolvimento de novas alternativas para tratamentos dessas infecções (LUNA, 2010; ANVISA, 2017).

O uso de moléculas antivirulência vem sendo estudada como uma estratégia terapêutica para reduzir o uso de antibióticos e facilitar o tratamento de infecções persistentes (RASKO; SPERANDIO et al., 2010). Compostos antivirulência interferem na ação de toxinas, modulam a expressão gênica, degradam biofilme e/ou inibem a comunicação bacteriana (WU et al., 2019), reduzindo a patogenicidade sem promover a morte bacteriana, gerando uma pressão mais branda no desenvolvimento da resistência ao composto (RASKO; SPERANDIO, 2010). A busca por substâncias antivirulência e antibiofilme vem sendo realizada nas mais variadas fontes, dentre eles os metabólitos secundários de plantas medicinais, medicamentos não

antibióticos, agentes quelantes, enzimas e peptídeos antimicrobianos (RAJPUT et al., 2018). Mas a descoberta de novos medicamentos é um processo difícil e prolongado, portanto reposicionar os fármacos previamente usados e aprovados por agências reguladoras e com ação antivirulência ou antibiofilme pode ser uma estratégia mais fácil e rápida (HEMMATI et al., 2021).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são amplamente prescritos para o tratamento de inflamações, febre e dor em doenças crônicas e agudas. O mecanismo de ação dos AINEs se baseia na inibição da enzima ciclooxygenase (COX) que catalisa a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos (BACCHI et al., 2012; CAIAZZO et al., 2019). Estudos recentes vêm mostrando que AINEs podem exercer influência sobre a virulência e biofilme bacteriano (CHAN et al., 2017; HANNACHI et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019).

Um estudo avaliou a capacidade do ibuprofeno em controlar biofilme de isolados clínicos de *S. aureus*, incluindo cepas resistentes a antibióticos (OLIVEIRA et al., 2019). Foi observado que em 24 horas todas as concentrações testadas inibiram o crescimento, aumentaram consideravelmente a permeabilidade de membrana e promoveram alteração das propriedades físico-químicas de superfície de *S. aureus*. Os resultados também mostraram que houve uma redução de biomassa do biofilme inversamente proporcional à dose em todas as condições estudadas, principalmente nos tempos de 6 e 24 horas (OLIVEIRA et al., 2019). Em outro trabalho, o ibuprofeno, aspirina e diclofenaco foram testados separadamente e apresentam de modo geral efeito antibacteriano contra bactérias Gram positivas (CHAN et al., 2017). Além disso, quando testadas em associação com cloranfenicol e cefuroxima, esses fármacos apresentam efeitos sinérgicos bactericidas e bacteriostáticos contra as cepas clínicas de MRSA, demonstrando grande potencial para serem utilizados como adjuvantes por aumentarem a sensibilidade do *S. aureus* aos antibióticos (CHAN et al., 2017).

Embora alguns medicamentos apresentam atividade antipatogênica, outros podem agir de forma contrária ao esperado e favorecer a virulência bacteriana auxiliando na infecção. O ácido acetilsalicílico ao ser metabolizado sofre desacetilação e forma o ácido salicílico. Um estudo realizado por HANNACHI e colaboradores (2019) investigou o efeito do ácido salicílico sobre a expressão dos genes regulatório *sarA* e *agr*. Os autores observaram que o ácido salicílico causa a diminuição da expressão de  $\alpha$ -toxina, aumenta a produção PIA e promove a formação e estabilização do biofilme (HANNACHI et al., 2019). Todos esses fatores de virulência contribuem significativamente com a persistência bacteriana e falha no tratamento terapêutico (DOTTO et al., 2017).

A nimesulida (N-(4- nitro-2-fenoxifenil) metasulfonamida) é um AINE que foi desenvolvido no início da década de 70, é considerada umas das primeiras sulfonilidas com seletividade inibitória preferencial para COX 2 (RAINSFORD, 2007). Esse medicamento é indicado como anti-inflamatório, com efeito analgésico e antipirético para o tratamento de dores, inflamações, osteoartrite e artrite reumatoide (MOORE et al., 2019). A nimesulida possui baixos efeitos adversos relacionado ao sistema gastrointestinal e cardiovascular ao contrário de outros COX 2 seletivos, e seu efeito hepatotóxico é considerado raro, mas não pode ser descartado (BACCHI et al., 2012; MOORE et al., 2019). Mas em 2012 a Agência Europeia de Medicamentos concluiu estudos de biossegurança que apoiam o uso da nimesulida como anti-inflamatório (CAIAZZO et al., 2019).

Trabalhos recentes têm sugerido novas aplicações da nimesulida em tratamento de doenças, incluindo ação anticâncer, antidiabética e antifúngica (MATOS et al., 2015; CAIAZZO et al., 2019). Embora estudos tenham sugerido novas aplicações para a nimesulida, não foi encontrado na literatura trabalhos que avaliem o efeito deste fármaco sobre a virulência e biofilme de *Staphylococcus*. Apenas um trabalho realizado por Matos (2015) avaliou a atividade da nimesulida sobre a virulência de fungos dermatófitos. No estudo a nimesulida apresentou atividade antifúngica frente a cepa ATCC 9533 no qual o mecanismo de ação foi dependente de prostaglandina E2, porém, não houve interferência da nimesulida na produção de urease, fator de virulência que facilita a evasão do sistema imune.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a influência das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre a virulência de *Staphylococcus spp.*

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da nimesulida sobre crescimento de *Staphylococcus spp.*;
- Testar a influência da nimesulida sobre o espalhamento de colônias e a tolerância ao estresse oxidativo de *Staphylococcus spp.*;
- Determinar o efeito da nimesulida sobre a atividade proteolítica de *Staphylococcus spp.*;
- Avaliar a ação da nimesulida sobre a formação de biofilme e sobre biofilme pré-formado de *Staphylococcus spp.*;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

- Alça bacteriológica
- Alça de Drigalski
- Algodão
- Ágar bacteriológico (HiMedia, Mumbai, India)
- Álcool em gel 70°
- Cabine de Segurança Biológica
- Cristal violeta P.A. (Synth, São Paulo, Brasil)
- Dextrose P.A. (Synth, São Paulo, Brasil)
- Detergente
- Dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, São Paulo, Brasil)
- Etanol 96° e 70°
- Estufa incubadora B.O.D
- Fosfato monossódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Synth, São Paulo, Brasil)
- Fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Synth, São Paulo, Brasil)
- Hipoclorito de sódio
- Luvas de látex
- Micropipeta monocal automatic 100-1000uL
- Micropipeta monocal automatic 20-200uL
- Micropipeta monocal automatic 0,5-20uL
- Microplaca de 96 poços com fundo chato
- Microtubo
- Mueller-Hinton (HiMedia, Mumbai, India)
- NaCl P.A. (Synth, São Paulo, Brasil)
- Nimesulida
- Peróxido de Hidrogênio 30% ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , AlphaTec, São Paulo, Brasil)
- Papel toalha
- Placa de petri
- Saco plástico resistente a calor
- Tubo de ensaio

- Tubo Falcon
- Tubo criogênico
- TSB (Tryptic Soy broth, HiMedia, Mumbai, India)
- Ultra freezer

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Micro-organismo e condição de cultivo.

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas as cepas referências de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213, NRS133 sensível a meticilina, USA300 e Mu50 ambas resistente a meticilina), *Staphylococcus epidermidis* (NRS 101) e a cepa *Staphylococcus warneri* que foram gentilmente doadas pela professora Andrea de Oliveira Barros Ribon (UFV) e utilizados em todos os experimentos. As bactérias foram cultivadas em meio TSA (HiMedia, Mumbai, Índia) a 37°C. Para avaliar a produção de biofilme foi utilizado TSB (HiMedia, Mumbai, India) suplementado com 0,25% de glicose (TSBg). O meio Mueller-Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia) foi utilizado nos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM). Os estoques foram feitos com TSB acrescentado 30% de glicerol e mantidos a -20°C e a -80°C os estoques dos microrganismos.

### 4.2.2 Preparo da Nimesulida.

A nimesulida foi obtida a partir de uma farmácia de manipulação da cidade de Barreiras - BA, sendo preparada em Dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, São Paulo, Brasil) na concentração de 0,5 mg/mL. A faixa de concentração de nimesulida utilizada para o ensaio de concentração mínima inibitória foi de 8,192 µg/µL até 0,25µL. Nos outros ensaios foram utilizadas as concentrações de 0,002µg/µL, 0,004µg/µL e 0,008µg/µL que estão dentro da faixa da concentração plasmática de nimesulida em seres humanos (KIM et al., 2012).

### 4.2.3 Concentração inibitória mínima da nimesulida.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da nimesulida foi realizada pelo método de microdiluição em caldo (WEINSTEIN et al., 2019). Neste ensaio, colônias

isoladas crescidas em TSA foram diluídas até densidade ótica correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Os poços da placa foram preenchidos com 100µL de caldo Müeller-Hinton que continham concentrações de nimesulida variando de 8,192 µg/µL até 0,25µL e a suspensão bacteriana. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, o crescimento foi observado por meio da turvação do caldo. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.

#### 4.2.4 Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre crescimento bacteriano.

A avaliação do efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre o crescimento bacteriano foi avaliada em microplacas de poliestireno de 96 poços com fundo chato. Um volume de 20 µL de suspensão bacteriana padrão 0,5 McFarland foi adicionado em cada poço da microplaca, seguido da adição de 100 µL de caldo TSB e 80 µL de água destilada contendo ou não nimesulida nas concentrações de 0,002µg/µL, 0,004µg/µL e 0,008µg/µL. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela leitura da densidade ótica à 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) utilizando o leitor de microplacas Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific). O equipamento foi programado para realizar 25 leituras com intervalos de 30 minutos durante 12 horas, com agitação pulsada de 120rpm ligada por 15 segundos entre as leituras a uma temperatura de 37°C. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica, cada um com três replicatas técnicas.

#### 4.2.5 Efeito da nimesulida sobre a tolerância ao estresse oxidativo.

O efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre a tolerância ao estresse oxidativo foi avaliado por meio da técnica de difusão em disco (FABRES- KLEIN, 2010). Para isso, 200 µL de suspensão bacteriana padrão 0,5 McFarland foi espalhada sobre a superfície do meio TSA contendo ou não nimesulida. Em seguida, um disco de papel de filtro de 6mm de diâmetro foi posicionado sobre o meio, onde foi adicionado 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (AlphaTec, São Paulo, Brasil). Após 24 horas de incubação a 37°C, os halos foram medidos com o auxílio de um paquímetro. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica, cada um com quatro repetições técnicas.

#### 4.2.6 Efeito da nimesulida sobre a atividade proteolítica dos isolados.

O efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre a atividade proteolítica dos isolados foi avaliado em TSB e suplementado com 1% de leite desnatado contendo ou não nimesulida nas concentrações de 0,002µg/µL, 0,004µg/µL e 0,008µg/µL. Um volume de 5 µl de cultivo bacteriano foi pipetado sobre a placa. A capacidade proteolítica foi determinada pela medida dos halos de proteólise após 72 horas de incubação no B.O.D a 37°C (HAMDANI et al., 2021). Os ensaios foram realizados em triplicata biológica, cada um com três repetições técnicas.

#### 4.2.7 Efeito da nimesulida sobre o espalhamento das colônias.

A partir de 5 µl de uma cultura cultivada em caldo TSB foram pipetadas em placas de TSA contendo ou não nimesulida nas concentrações de 0,002µg/µL, 0,004µg/µL e 0,008µg/µL. Após 24 horas de incubação em B.O.D a 37°C, o espalhamento das colônias foi avaliado visualmente a fim de verificar mudanças no tamanho e na forma de crescimento das colônias. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica, cada um com duas repetições técnicas.

#### 4.2.8 Efeito da nimesulida sobre a formação de biofilme.

A avaliação do efeito da nimesulida sobre a produção de biofilme foi avaliada em microplacas de poliestireno de 96 poços com fundo chato conforme descrito (FABRES-KLEIN et al., 2014). Um volume de 20 µL de suspensão bacteriana padrão 0,5 McFarland foi adicionado em cada poço da microplaca, seguido da adição de 100 µL de TSBg contendo ou não nimesulida nas concentrações de 0,002µg/µL, 0,004µg/µL e 0,008µg/µL. As micro-placas foram incubadas a 37 °C por 22 h. Após esse período, os poços foram lavados com tampão salina fosfato (PBS) três vezes, secos em capela de exaustão e corados com solução aquosa de cristal violeta 0,1% por 30 min, em seguida lavados com salina 0,9% três vezes e adicionado o 100 µL de etanol comercial e mantido à temperatura ambiente por 15 min. Após este período, foi realizada a leitura da densidade óptica (DO<sub>560nm</sub>) em leitor de microplacas Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific). Os ensaios foram realizados em triplicata biológica, cada um com cinco repetições técnicas.

#### 4.2.9 Efeito da nimesulida sobre o biofilme pré-formado.

O efeito da nimesulida sobre o biofilme pré-formado foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços. As placas contendo meio líquido TSBg e 20  $\mu$ L de suspensão bacteriana de 0,5 McFarland foram incubadas a 37°C por 22 horas sem agitação. Após este período, o sobrenadante foi removido e adicionado nos poços NaCl 0,9% contendo ou não a nimesulida. As placas foram novamente incubadas 37°C por um período de 4h. O biofilme foi quantificado utilizando a metodologia descrita conforme item anterior. Os ensaios foram feitos em triplicata biológica com cinco repetições técnicas cada.

#### 4.2.10 Análises estatísticas.

As análises estatísticas e os gráficos apresentados foram feitos utilizando o software Graphpad (v6.0 GraphPad Prism). Os dados foram analisados utilizando-se o teste ANOVA Two-way seguido pelo pós-teste Bonferroni para comparação entre os grupos tratados em relação ao grupo controle com DMSO.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A virulência bacteriana é fundamental para a colonização e o sucesso de uma infecção. Aliado a isso, a resistência à antibióticos e a formação de biofilme tem dificultado o tratamento das infecções (CHEUNG et al., 2021). Por isso tem se buscado alternativas que possam auxiliar no tratamento, principalmente de infecções crônicas e persistentes, como o uso de drogas capazes de regular negativamente a virulência bacteriana sem afetar o crescimento, reduzindo as chances do surgimento de resistência a esses medicamentos (RASKO et al., 2010; DALY et al., 2015; MUNGUIA; NIZET, 2017). Estudos vêm mostrando que os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) podem exercer influência sobre a virulência e biofilme bacteriano, abrindo portas para o reposicionamento dessas drogas para auxiliar no tratamento das infecções bacterianas resistentes a antibióticos (DEFOIRDT, 2017; OLIVEIRA et al., 2019).

A nimesulida é um AINEs com ação anti-inflamatória, antipirética e analgésica, além disso também já foi descrita sua ação farmacológica, anticâncer e antidiabética (CAIAZZO et al., 2019). Mas estudos sobre a ação da nimesulida sobre a virulência de espécies estafilocócicas ainda são escassos. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade da nimesulida sobre a virulência de diferentes espécies de *Staphylococcus* causadores de infecções em humanos. Para isso, foi testado o efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre o espalhamento de colônias, tolerância ao estresse oxidativo, atividade proteolítica, formação de biofilme e sobre o biofilme pré-formado de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* sensível a meticilina NRS133, *S. aureus* resistente à meticilina USA300, *S. aureus* resistente à meticilina Mu50, *S. epidermidis* NRS 101 e *S. warneri*.

Inicialmente foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) da nimesulida sobre o crescimento dos isolados ATCC 29213, NRS133, USA300, Mu50, NRS 101 e *S. warneri*. Foram testadas concentrações que variavam de 8,192 µg/µL até 0,25µg/µL, mas em nenhuma das concentrações foi observado a inibição do crescimento dos isolados. Embora a nimesulida não tenha causado a inibição do crescimento de *Staphylococcus*, outros AINEs, como ibuprofeno e diclofenaco, possuem atividade antimicrobiana (CHAN et al., 2017; Oliveira et al., 2019; ZHANG et al., 2021). Em estudo conduzido por Oliveira e colaboradores (2019), o ibuprofeno apresentou uma CIM de 0,5 mg/mL para isolados de *S. aureus* sensíveis a meticilina e CIM de 2 mg/mL para *S. aureus* resistente a macrolídeos. Em outro estudo utilizando isolados que incluíam bactérias Gram-negativas, como *P. aeruginosa* e *Escherichia coli*, e bactérias Gram positivas como *Bacillus cereus*, MSSA e MRSA, o ibuprofeno apresentou atividade antimicrobiana somente contra bactérias Gram-positivas e a CIM

observada variou de 0,625 mg/mL a 2,5 mg/mL (CHAN et al., 2017). Em trabalho realizado com o diclofenaco a concentração de 125µg/mL foi capaz de inibir o crescimento dos isolados MRSA ATCC 25923, MSSA ATCC 43300 e *S. epidermidis* ATCC 35984 resistente a metilicina (ZHANG et al., 2021).

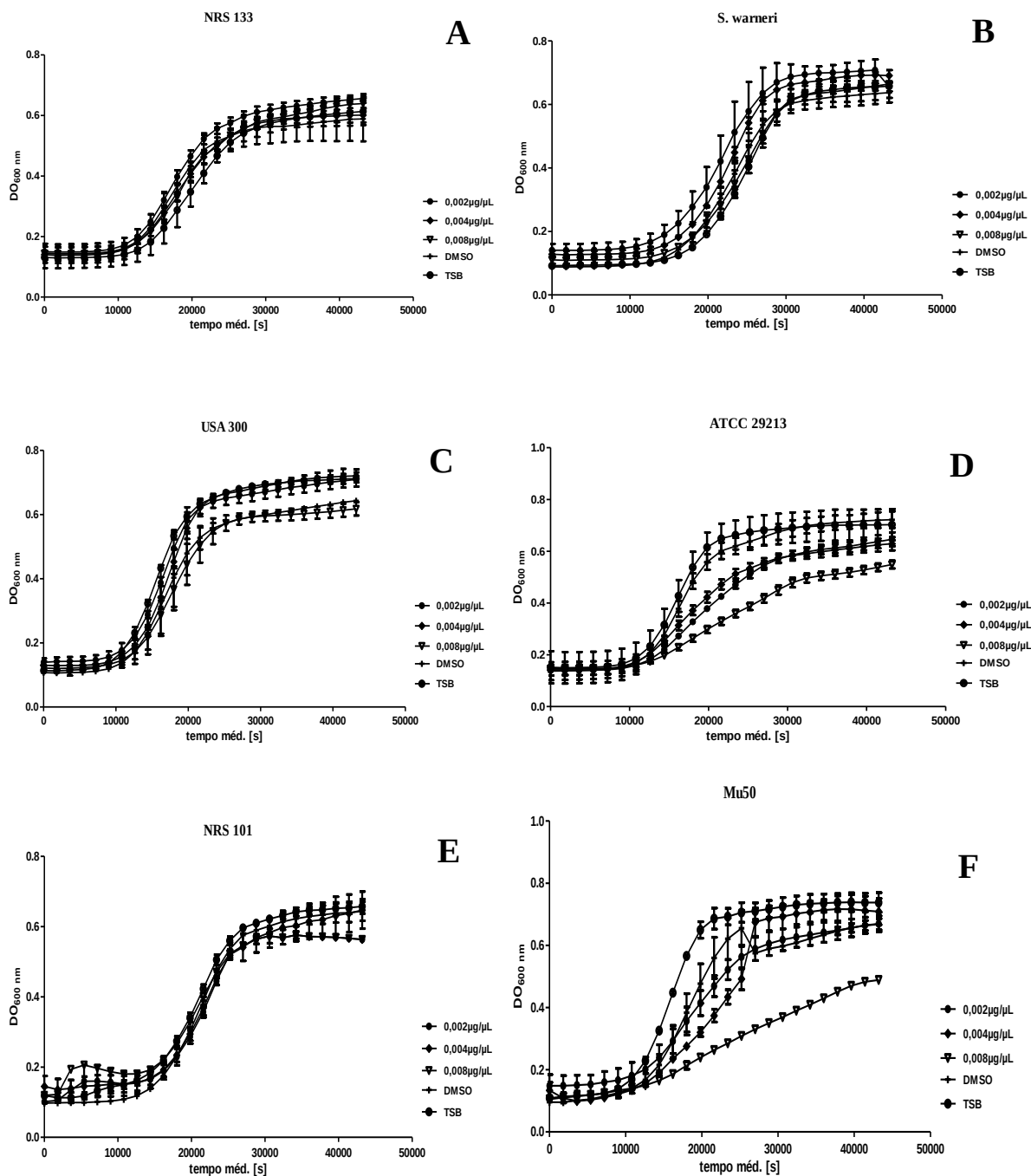
Neste estudo não foram observados valores de CIM que pudessem servir de base para a escolha das concentrações de nimesulida a serem testadas. Então, foi utilizado o estudo cinético realizado por Kim e colaboradores (2012) onde foi determinado que a concentração de nimesulida circulante no plasma de seres humanos é em torno de 0,004µg/µL. Dessa forma, as concentrações de nimesulida definidas para os experimentos subsequentes foram 0,002µg/µL (metade da concentração plasmática), 0,004µg/µL e 0,008µg/µL (dobro da concentração plasmática).

As concentrações plasmáticas de nimesulida foram então utilizadas para verificar se haveria alguma alteração na curva ou na velocidade de crescimento ( $\mu$ ) dos isolados (Figura 2 e tabela 1). Os resultados mostraram que a nimesulida promove uma redução estatisticamente significativa da velocidade de crescimento dos isolados ATCC, Mu50 e NRS101 (Tabela 1). Também foi observado que há uma diminuição dos valores de  $\mu$  em *S. warneri*, mas não apresentou diferença estatística. A nimesulida em todas concentrações testadas promoveu uma redução da absorbância máxima na fase estacionária de ATCC e USA300 (Figura 2C e 2D), alterando a curva de crescimento destes isolados. Efeito mais discreto da nimesulida também foi observado em *S. warneri* (Figura 2B). Já a concentração de 0,008µg/µL de nimesulida causou uma redução de quase 50% na DO<sub>600</sub> máxima da fase estacionária de *S. aureus* resistente à metilicina Mu50 (Figura 2F).

**Tabela 1.** Velocidade de crescimento ( $\mu$ ) de *Staphylococcus* expostos à concentrações plasmáticas de nimesulida.

|            | NRS 133     | <i>S. warneri</i> | USA300      | ATCC 29213  | Mu50        | NRS 101     |
|------------|-------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|            | $\mu$ médio | $\mu$ médio       | $\mu$ médio | $\mu$ médio | $\mu$ médio | $\mu$ médio |
| TSB        | 0,393       | 0,479             | 0,582       | 0,583       | 0,573       | 0,417       |
| DMSO       | 0,443       | 0,479             | 0,545       | 0,514       | 0,535       | 0,504       |
| 0,002µg/µL | 0,434       | 0,401             | 0,526       | 0,384*      | 0,375*      | 0,395*      |
| 0,004µg/µL | 0,418       | 0,447             | 0,550       | 0,370*      | 0,362*      | 0,404*      |
| 0,008µg/µL | 0,433       | 0,428             | 0,484       | 0,273*      | 0,236*      | 0,375*      |

\* Redução estatisticamente significante ( $p < 0,05$ )



**Figura 2.** Efeito das concentrações plasmáticas de 0,002µg/µL, 0,004µg/µL e 0,008µg/µL de nimesulida sobre a curva de crescimento dos isolados (A) *S. aureus* NRS133, (B) *S. warneri*, (C) USA300, (D) *S. aureus* ATCC 29213, (E) *S. epidermidis* NRS101, (F) *S. aureus* Mu50.

Outros AINEs, como diclofenaco e ácido acetilsalicílico, já tiveram seu efeito sobre o crescimento de *S. aureus* e *Escherichia coli* descrito na literatura (LEÃO et al., 2020). Concentrações de 1000, 2000 e 2500 µg/mL de diclofenaco foram capazes de reduzir em 2,50, 3,86 e 5,68 log CFU/mL a quantidade final de *S. aureus* viáveis na fase estacionária de

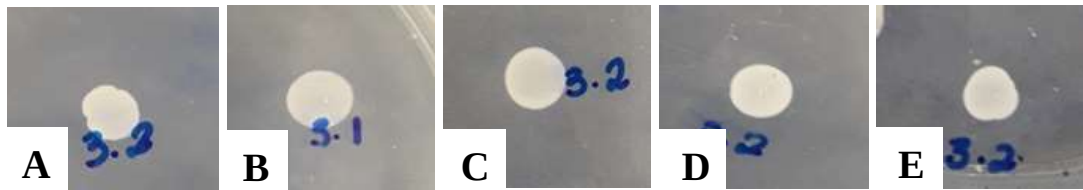
crescimento quando comparada com o controle de DMSO. Já no ácido acetilsalicílico o efeito foi menos pronunciado, foi observada uma redução de 0,92 e 1,06 log CFU/mL quando se utilizou as concentrações de 2000 e 2500 µg/mL (LEÃO et al., 2020).

Durante a fase estacionária de crescimento há o aumento de uma subpopulação de células persistentes que são muito mais resistentes à ação de antibióticos e podem causar infecções recalcitrantes de difícil tratamento (CHANG et al., 2020). O uso de substâncias que interferem na fase estacionária em combinação com antimicrobianos tem se mostrado uma opção para a erradicação de células persistentes (XIAO et al., 2019; XIAO et al., 2020.). A ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre *S. aureus* na fase estacionária de crescimento foi investigada de maneira isolada e em combinação com antibióticos (XIAO et al., 2019). Observou-se que o óleo essencial de orégano tinha um bom efeito antimicrobiano sobre as células na fase estacionária, mas que a combinação deste óleo com quinolonas ou rifampicina tinham efeito potencializado na erradicação das células persistentes (XIAO et al., 2019).

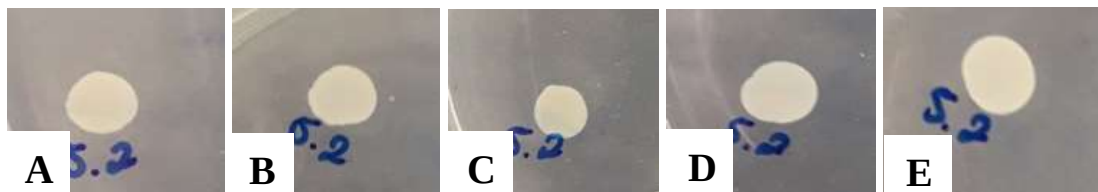
Nos experimentos realizados com aspirina, foi observado que a variabilidade de *S. xylosus* tratado com o medicamento foi semelhante ao grupo não tratado, a fase estacionária foi atingida em ambos os grupos após 20 horas de incubação a 37°C (XU et al., 2017). Além disso, foi analisado os efeitos da nicotina no princípio ativo do tabaco, sobre o crescimento da cepa USA300 em resposta a diferentes concentrações (0,1 mg/mL, 0,2mg/mL, 0,5mg/mL, 1mg/mL e 2 mg/mL) e foi observado que em concentrações mais altas a taxa de crescimento é mais lenta na fase exponencial (LE et al., 2019).

Em *S. aureus*, o espalhamento de colônias contribui com a virulência, pois facilita a colonização sobre superfícies úmidas e tecidos animais (KAITO; SEKIMIZU, 2006). Este fenômeno é facilitado pelas propriedades surfactantes de modulinas solúveis em fenol (PSM-phenol soluble modulins) (KIZAKI et al., 2016). As PSM são toxinas anfipáticas que promovem a lise de neutrófilos e facilitam o escape de *S. aureus* após a fagocitose, favorecendo a colonização de tecidos ou formação de biofilme (OTTO, 2014). Neste trabalho, o efeito da nimesulida sobre a atividade de espalhamento de colônias também foi testado, e os resultados estão apresentados nas figuras 3-8. Apesar de não se observar alteração na dispersão das colônias em nenhuma das concentrações de nimesulida testadas, esta foi a primeira vez que este efeito foi avaliado. A ação de compostos sobre a capacidade de espalhamento de colônia ainda é pouco estudada, apenas um estudo de 2018 testou o efeito de ácido ascórbico sobre a virulência de *S. aureus* resistentes à meticilina (ALI MIRANI et al., 2018). Observou-se que concentrações sub-inibitórias de ácido ascórbico isolado ou em combinação com oxacilina

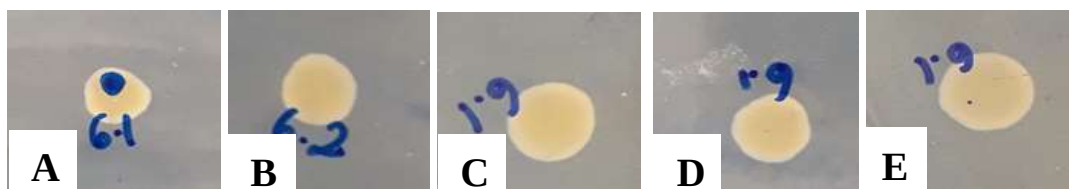
promovem aumento do espalhamento de colônias e reduz a formação de biofilme por meio da regulação da expressão do sistema de quorum sensing *agr* (ALI MIRANI et al., 2018).



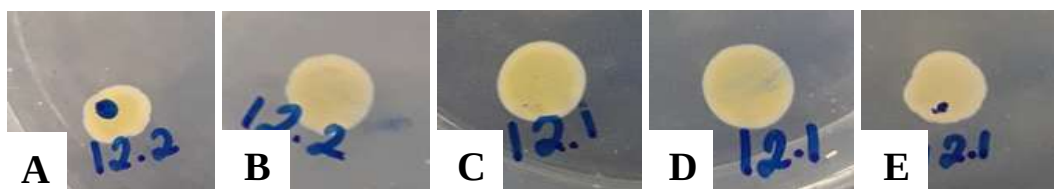
**Figura 3.** Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre espalhamento de colônia de *Staphylococcus aureus* NRS133. (A) ágar TSB, (B) ágar TSB + DMSO, (C) ágar TSB + Nimesulida 0,002µg/µL, (D) ágar TSB + Nimesulida 0,004µg/µL, (E) ágar TSB + Nimesulida 0,008µg/µL.



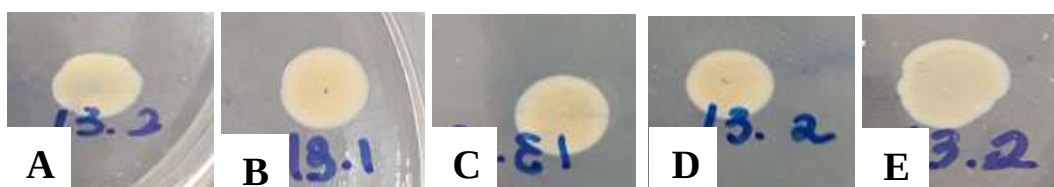
**Figura 4.** Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre espalhamento de colônia de *Staphylococcus warneri* (A) ágar TSB, (B) ágar TSB + DMSO 0,008µg/µL, (C) ágar TSB + Nimesulida 0,002µg/µL, (D) ágar TSB + Nimesulida 0,004µg/µL, (E) ágar TSB + Nimesulida 0,008µg/µL.



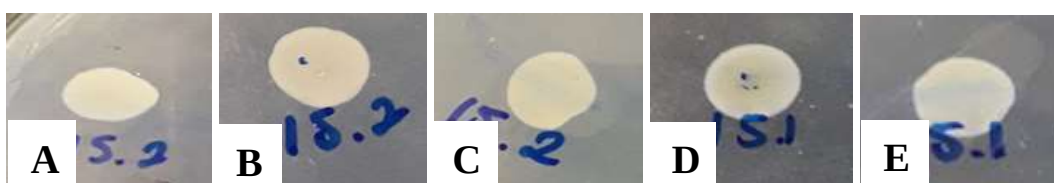
**Figura 5.** Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre espalhamento de colônia de *Staphylococcus aureus* USA300 (A) ágar TSB, (B) ágar TSB + DMSO 0,008µg/µL, (C) ágar TSB + Nimesulida 0,002µg/µL, (D) ágar TSB + Nimesulida 0,004µg/µL, (E) ágar TSB + Nimesulida 0,008µg/µL.



**Figura 6.** Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre espalhamento de colônia de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (A) ágar TSB, (B) ágar TSB + DMSO 0,008µg/µL, (C) ágar TSB + Nimesulida 0,002µg/µL, (D) ágar TSB + Nimesulida 0,004µg/µL, (E) ágar TSB + Nimesulida 0,008µg/µL.



**Figura 7.** Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre espalhamento de colônia de *Staphylococcus aureus* Mu50 (A) ágar TSB, (B) ágar TSB + DMSO 0,008µg/µL, (C) ágar TSB + Nimesulida 0,002µg/µL, (D) ágar TSB + Nimesulida 0,004µg/µL, (E) ágar TSB + Nimesulida 0,008µg/µL.



**Figura 8.** Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre espalhamento de colônia de *Staphylococcus epidermidis* NRS 101 (A) ágar TSB, (B) ágar TSB + DMSO 0,008µg/µL, (C) ágar TSB + Nimesulida 0,002µg/µL, (D) ágar TSB + Nimesulida 0,004µg/µL, (E) ágar TSB + Nimesulida 0,008µg/µL.

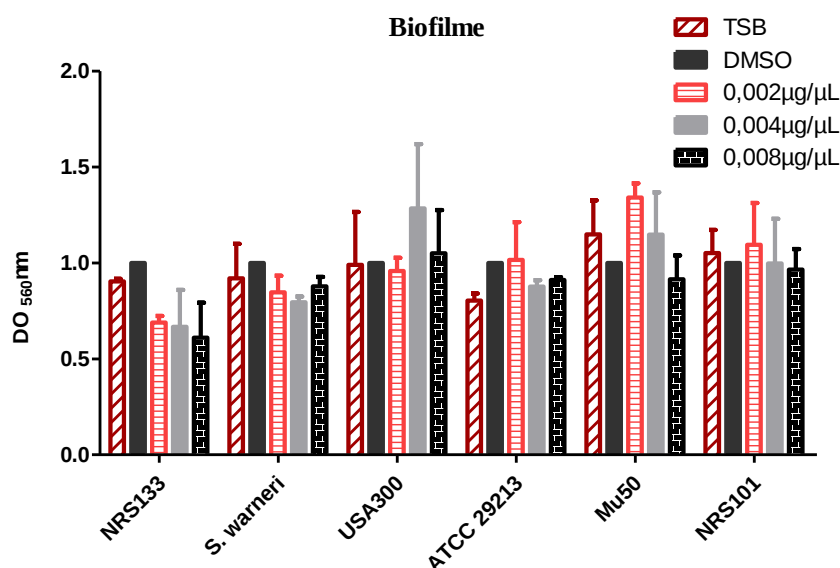
Um dos fatores de virulência mais estudados é o biofilme formado por espécies estafilocócicas, principalmente por *S. aureus* e *S. epidermidis* (OTTO, 2018). Biofilmes são sistemas biológicos dinâmicos e complexos que são importantes para a sobrevivência e persistência durante as infecções e também se tornam reservatórios de bactérias que irão disseminar para novos sítios de infecção (SCHILCHER; HORSWILL, 2020). Além disso, o biofilme estafilocócico forma um ambiente que protege a bactéria da ação de antibióticos e do sistema imune do hospedeiro (SCHILCHER; HORSWILL, 2020). A formação de biofilme impõe desafios terapêuticos no tratamento das infecções estafilocócicas crônicas e persistentes,

por isso a busca de substâncias antibiofilme tem ganhando destaque. A fim de avaliar a ação da nimesulida como agente antibiofilme, neste trabalho foi testada a atividade tanto sobre a formação do biofilme quanto sobre a dispersão do biofilme.

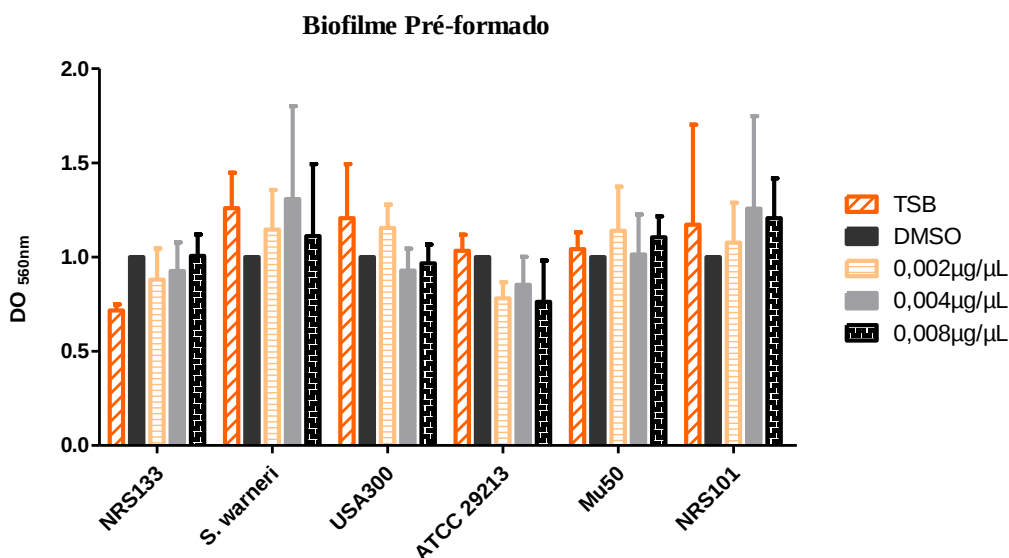
Os ensaios foram realizados utilizando a metodologia de cristal Violeta 1% e os resultados estão apresentados nas figuras 9 e 10. Todos os isolados foram considerados ótimos produtores de biofilme uma vez que a absorbância em  $DO_{560nm}$  foi maior que 0,50 (CHEN et al., 2020). Em relação ao efeito da nimesulida sobre o biofilme, nenhuma das concentrações testadas foram, estatisticamente, capazes de modular a formação e dispersão do biofilme estafilocócico (figuras 9 e 10). Mas na análise da figura 9 pode-se observar que NRS133 e *S. warneri* apresentaram uma redução da produção de biofilme nas três concentrações de nimesulida avaliada, quando comparada ao grupo controle com DMSO. Já USA300 apresentou um aumento do biofilme nas concentrações de 0,004 $\mu$ g/ $\mu$ L e 0,008 $\mu$ g/ $\mu$ L. O *S. aureus* Mu50 aumentou a formação de biofilme de maneira inversamente proporcional às doses. *S. epidermidis* NRS101 não apresentou alteração na produtividade de biofilme quando exposto a nimesulida. Todavia, os resultados encontrados não são considerados estatisticamente significativos.

Na figura 10 pode ser observado os resultados da ação na nimesulida sobre dispersão do biofilme pré-formado. No isolado NRS 133 foi observado uma redução da matriz do biofilme nas concentrações de 0,002 $\mu$ g/ $\mu$ L, 0,004 $\mu$ g/ $\mu$ L de nimesulida em comparação ao controle tratado com DMSO. *S. aureus* ATCC 29213 apresentou dispersão do biofilme nas três concentrações testadas de nimesulida. Já no isolado NRS 101, a nimesulida favoreceu um aumento do biofilme em todas as concentrações testadas. Contudo esses resultados não apresentaram significância estatística.

Estudos têm mostrado que AINEs podem modular tanto a formação quanto a dispersão do biofilme (DOTTO et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019; ABBAS et al., 2020). O uso de diclofenaco em ensaios *in vitro* vem se mostrando promissor para a inibição da formação do biofilme de isolados clínicos de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina. Foi observado que  $\frac{1}{4}$  CIM de diclofenaco (62,5  $\mu$ g/mL) causa uma redução do biofilme formado em até 70% em todas as cepas testadas (ABBAS et al., 2020).



**Figura 9.** Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre formação do biofilme dos isolados *Staphylococcus aureus* ATCC29219, *Staphylococcus aureus* NRS133, *S. aureus* USA300, *S. aureus* Mu50, *S. epidermidis* NRS 101 e *S. warneri*.

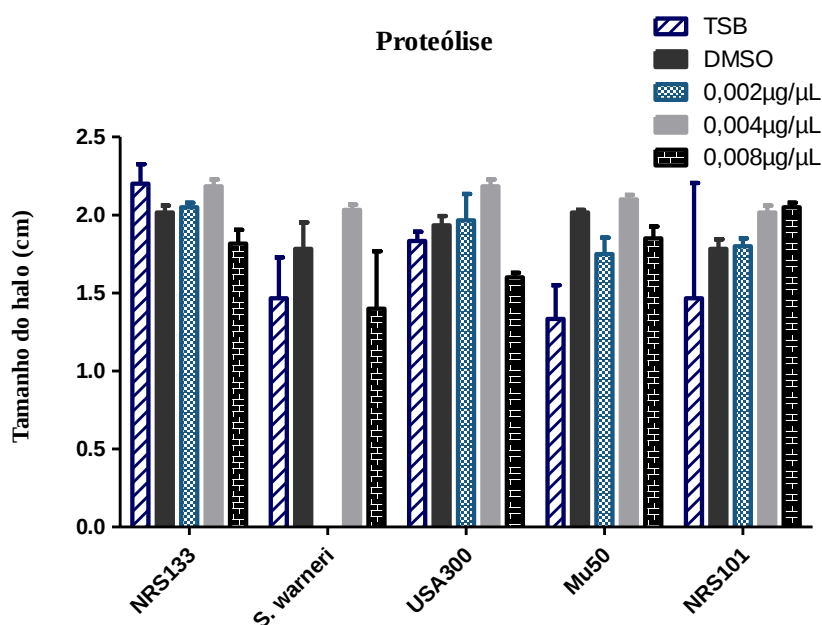


**Figura 10.** Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre biofilme pré-formado dos isolados *Staphylococcus aureus* ATCC29219, *Staphylococcus aureus* NRS133, *S. aureus* USA300, *S. aureus* Mu50, *S. epidermidis* NRS 101 e *S. warneri*.

Por outro lado, os AINEs podem também causar o aumento da formação de biofilme, como é observado ácido salicílico, produto metabólico do ácido acetilsalicílico. Concentrações de 0,36µg/mL de ácido salicílico pode aumentar significativamente a biomassa do biofilme formados por isolados de *S. aureus* (MRSA e MSSA) após 24 ou 48 horas de crescimento

(DOTTO et al., 2017). Alguns AINEs, como o ibuprofeno, podem não apresentar efeito significativo quando testado sobre a formação do biofilme. Entretanto, pode apresentar atividade sobre a remoção do biofilme (OLIVEIRA et al., 2019). No estudo conduzido por Oliveira e colaboradores (2019) mostraram que o ibuprofeno causa uma redução de 40% na biomassa do biofilme de *S. aureus* e causa uma redução metabólica de 80% das bactérias aderidas.

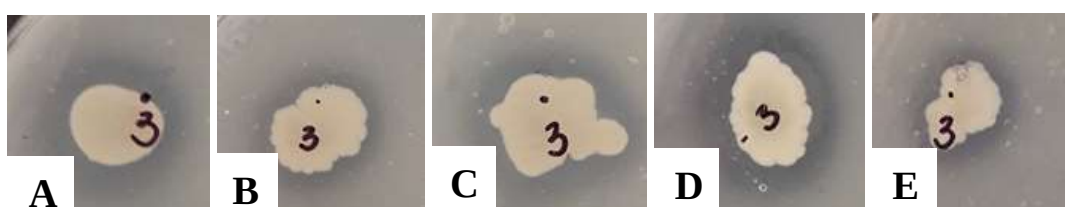
Para verificar o efeito da nimesulida sobre a capacidade proteolítica, os isolados ATCC 29213, NRS133, USA300, Mu50, NRS 101 e *S. warneri* foram crescidos ágar milk 1% na presença ou ausência de nimesulida durante 72 horas de incubação. Os resultados das medidas dos halos de proteólise estão presentes no gráfico da figura 11 e também podem ser observados nas figuras 12-17.



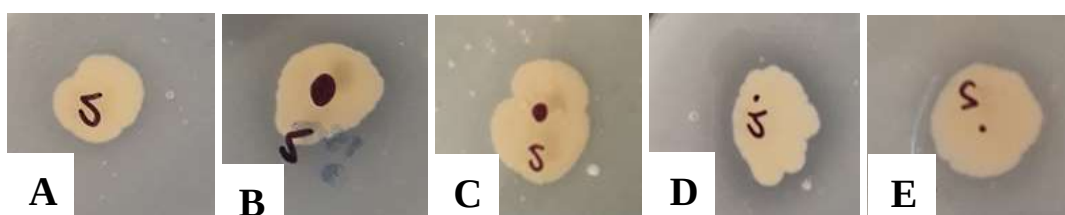
**Figura 11.** Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre a atividade proteolítica dos isolados *Staphylococcus aureus* NRS133, *S. aureus* USA300, *S. aureus* Mu50, *S. epidermidis* NRS 101 e *S. warneri*.

Foi possível observar que *S. warneri* não apresentou o halo proteolítico quando crescida em 0,002µg/µL de nimesulida (Figura 11 e 13C), resultado estatisticamente significante ( $p < 0,001$ ). O *S. warneri* é um dos poucos estafilococos coagulase negativo que secreta aureolisina, uma protease extracelular que participa da formação do biofilme (YOKOI et al., 2016; TSANG et al., 2008). *S. aureus* ATCC 29213 não se observou atividade de proteolítica em nenhuma das condições testadas (figura 14). Algumas observações, embora não

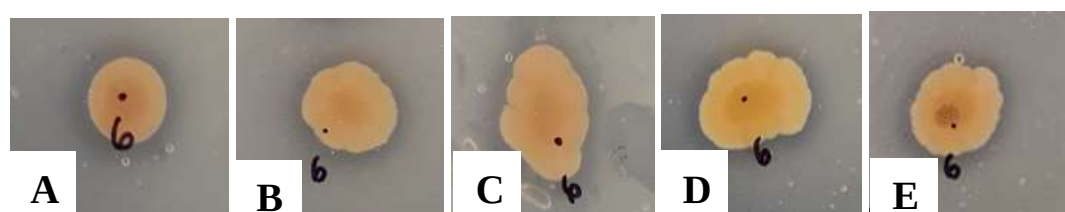
significativas estatisticamente, valem ser evidenciadas. As bactérias NRS133 e USA300 quando expostas a concentração de 0,004 $\mu$ g/ $\mu$ L de nimesulida apresentaram um discreto aumento na atividade proteolítica, enquanto a maior concentração (0,008 $\mu$ g/ $\mu$ L) causou uma redução do halo de proteólise (Figuras 11 e 12). A nimesulida na concentração de 0,004 $\mu$ g/ $\mu$ L também promoveu um leve aumento na atividade proteolítica em *S. warneri*, Mu50 e NRS101 (Figura 11).



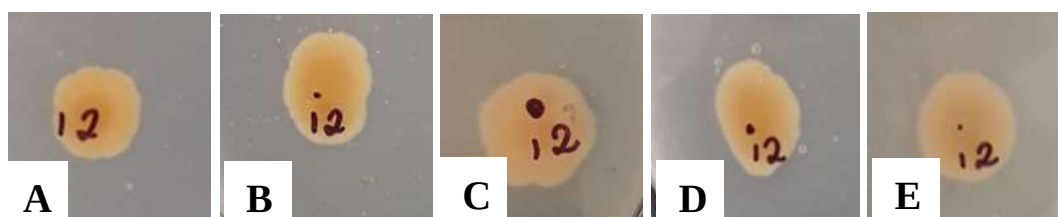
**Figura 12.** Atividade proteolítica do isolado *S. aureus* NRS 133 exposto ou não a nimesulida. (A) ágar milk 1%, (B) ágar milk 1% + DMSO 0,008 $\mu$ g/ $\mu$ L, (C) ágar milk 1% + Nimesulida 0,002 $\mu$ g/ $\mu$ L, (D) ágar milk 1% + Nimesulida 0,004 $\mu$ g/ $\mu$ L, (E) ágar milk 1%+ Nimesulida 0,008 $\mu$ g/ $\mu$ L.



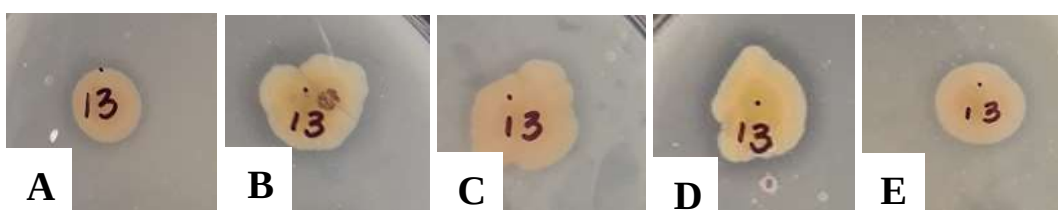
**Figura 13.** Atividade proteolítica do isolado *S. warneri* exposto ou não a nimesulida. (A) ágar milk 1%, (B) ágar milk 1% + DMSO 0,008 $\mu$ g/ $\mu$ L, (C) ágar milk 1% + Nimesulida 0,002 $\mu$ g/ $\mu$ L, (D) ágar milk 1% + Nimesulida 0,004 $\mu$ g/ $\mu$ L, (E) ágar milk 1%+ Nimesulida 0,008 $\mu$ g/ $\mu$ L.



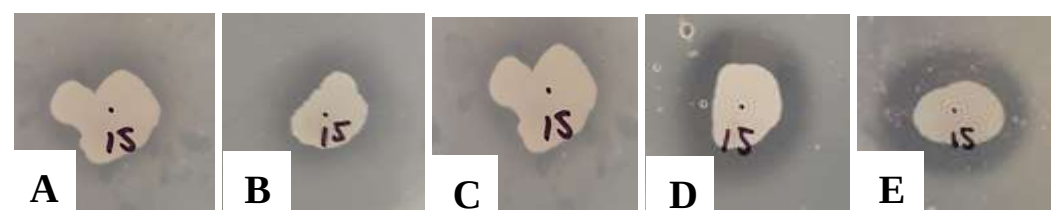
**Figura 14.** Atividade proteolítica do isolado *S. aureus* USA300 exposto ou não a nimesulida. (A) ágar milk 1%, (B) ágar milk 1% + DMSO 0,008 $\mu$ g/ $\mu$ L, (C) ágar milk 1% + Nimesulida 0,002 $\mu$ g/ $\mu$ L, (D) ágar milk 1% + Nimesulida 0,004 $\mu$ g/ $\mu$ L, (E) ágar milk 1%+ Nimesulida 0,008 $\mu$ g/ $\mu$ L.



**Figura 15.** Atividade proteolítica do isolado *S. aureus* ATCC 29213 exposto ou não a nimesulida. (A) ágar milk 1%, (B) ágar milk 1% + DMSO 0,008µg/µL, (C) ágar milk 1% + Nimesulida 0,002µg/µL, (D) ágar milk 1% + Nimesulida 0,004µg/µL, (E) ágar milk 1%+ Nimesulida 0,008µg/µL.



**Figura 16.** Atividade proteolítica do isolado *S. aureus* Mu50 exposto ou não a nimesulida. (A) ágar milk 1%, (B) ágar milk 1% + DMSO 0,008µg/µL, (C) ágar milk 1 + Nimesulida 0,002µg/µL, (D) ágar milk 1% + Nimesulida 0,004µg/µL, (E) ágar milk 1%+ Nimesulida 0,008µg/µL.

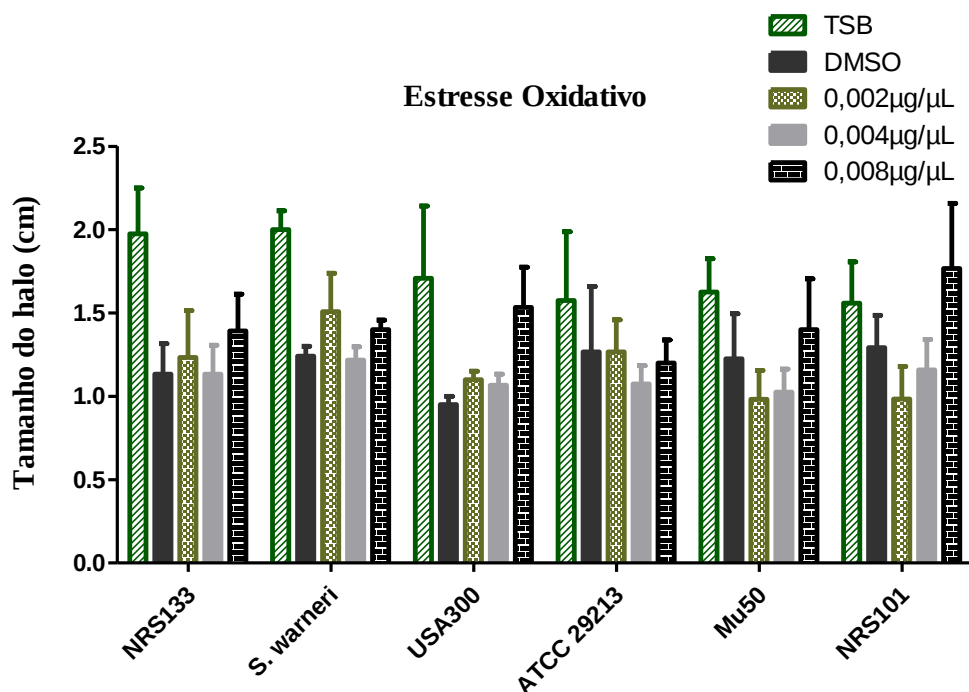


**Figura 17.** Atividade proteolítica do isolado *S. epidermidis* NRS101 exposto ou não a nimesulida. (A) ágar milk 1%, (B) ágar milk 1% + DMSO 0,008µg/µL, (C) ágar milk 1% + Nimesulida 0,002µg/µL, (D) ágar milk 1% + Nimesulida 0,004µg/µL, (E) ágar milk 1%+ Nimesulida 0,008µg/µL.

Importante fator de virulência que contribui com a defesa bacteriana contra a resposta imunológica do hospedeiro mediado por células fagocíticas, dentre elas os neutrófilos, macrófagos (MILLER et al., 2020). Para avaliar a resistência ao estresse oxidativo das diferentes espécies estafilocócicas, foi utilizada a metodologia de difusão em disco contendo

peróxido de hidrogênio. A Figura 18 apresenta os valores medidos do halo de inibição do crescimento causado pelo estresse oxidativo.

Apesar de não haver diferenças estatísticas nos resultados, é possível observar que a maior concentração de nimesulida promove um maior halo de inibição do crescimento em todos os isolados quando comparados com o controle de DMSO, exceto para *S. aureus* ATCC 29213 (Figura 18). O aumento do halo de inibição é indicativo da redução da tolerância ao estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio. Os principais mecanismos protetores contra o estresse oxidativo *Staphylococcus* estão a produção de estafiloxantinas e a expressão de superóxido dismutase e catalase (FANG, 2004; PELZ et al., 2005; COSGROVE et al., 2007). Timol é um monoterpene extraído de tomilho e orégano que reduz a resistência de *S. aureus* MRSA a EROs, reduzindo a capacidade da bactéria sobreviver dentro de neutrófilos após a fagocitose (VALLIAMMAI et al., 2021). O timol na concentração de 100 µg/mL foi capaz de diminuir em 90% a produção de estafiloxantina na cepa de *S. aureus* testada (VALLIAMMAI et al., 2021). Uma análise visual da coloração (presença de estafiloxantina) das colônias tratadas com nimesulida não indicou mudanças perceptíveis (dados não apresentados).



**Figura 18.** Efeito das concentrações plasmáticas de nimesulida sobre a tolerância ao estresse oxidativo dos isolados *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* NRS133, *S. aureus* USA300, *S. aureus* Mu50, *S. epidermidis* NRS 101 e *S. warneri*.

Outra observação importante é que o solvente, utilizado para dissolver a nimesulida, provoca uma redução dos halos em todos os ensaios. O DMSO é um solvente anfifílico com capacidade de solubilizar tanto compostos orgânicos quanto inorgânicos (HUANG et al., 2020). Em um estudo realizado em 2011 descreveu a capacidade antioxidante do DMSO como baixa, devendo ser utilizado em baixas concentrações nesses tipos de ensaios (SANMARTÍN-SUÁREZ et al. 2011). Em nossos ensaios de estresse oxidativo foi utilizado a proporção aproximada de 10% de DMSO (contendo ou não nimesulida) no meio nutriente, quantidade que pode ser significativa para exercer ação antioxidante.

## 6 CONCLUSÃO

Os estudos realizados com AINES têm mostrado a potencialidade desses fármacos como compostos antivirulência sobre espécies de *Staphylococcus*, principalmente como agentes antibiofilme. Neste trabalho, foi investigado pela primeira vez o efeito de concentrações plasmáticas de nimesulida sobre a virulência de diferentes espécies de *Staphylococcus*, incluindo cepas resistentes à metilicina. Foi observado que a nimesulida interfere de maneira significativa no crescimento estafilocócico, embora não tenha apresentado atividade antimicrobiana. A nimesulida também exerce ação sobre a atividade proteolítica de *Staphylococcus warneri*. Ainda que, não tenha sido observado efeitos significativos da nimesulida sobre o biofilme, espalhamento das colônias e tolerância a estresse oxidativo, algumas alterações chamam a atenção. Dentre elas temos, a redução da produção de biofilme em NRS133 e *S. warneri* e a redução da tolerância ao estresse oxidativo em quase todos os isolados testados quando expostos à maior concentração de nimesulida. Esses resultados abrem as portas para investigações futuras do efeito de concentrações mais elevadas de nimesulida sobre a virulência bacteriana.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. A. et al. Diclofenac mitigates virulence of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Arch Microbiol.** v. 202, n. 10, p. 2751-2760, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32737541/> Acesso em: 18 mai. 2022.
- ALI MIRANI, Z. et al. Ascorbic acid augments colony spreading by reducing biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Iranian journal of basic medical sciences.** v. 21, n. 2, p. 175–180, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5811756/> Acesso em: 9 mai. 2020.
- ALTAF, M. et al. Antibiotic susceptibility profile and synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on antibacterial activity of resistant antibiotics (Oxytetracycline and Gentamicin) against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Microbial Pathogenesis.** v.137, p. 103755, 2019. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/mdl-31542423> Acesso em: 09 fev. 2021.
- ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Notícias. **Resistência antimicrobiana é uma ameaça global, diz a OMS.** 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/resistencia-antimicrobiana-e-ameaca-global-diz-oms>. Acesso em: 08 jan. 2021.get
- ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Notícias. **Resistência microbiana, mecanismo e impacto clínico.** 2017. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo3/gramp\\_staphylo.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm) Acesso em: 02 jan. 2020.
- BACCHI, S. et al. Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.** v. 11, n. 1, p. 52-64, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22934743/> Acesso em: 10 fev. 2021.
- BELOIN, C. et al. Novel approaches to combat bacterial biofilms. **Current opinion in pharmacolog.** v. 18, p. 61-68, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1471489214001040> Acesso em: 05 fev. 2022.
- BERQUÓ, L. S. et al. Use of drugs to treat respiratory tract infections in the community. **Rev. Saúde Pública.** v. 38, n. 3, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/5L5cMgvtmmvvJM6S9sLjXDg/?lang=pt#> Acesso em: 27 mai. 2022.
- CAIAZZO, R.; IALENTI, A.; CICALA, C. The relatively selective cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide: What's going on?. **European Journal of Pharmacology.** v.848, p. 105-111, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30689999/> Acesso em: 19 fev. 2021.
- CARDILE, A. P. et al. Human plasma enhances the expression of Staphylococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules promoting biofilm formation and increases antimicrobial tolerance In Vitro. **BMC research notes.** v. 7, n. 1, p. 1-9, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1756-0500-7-457> Acesso em: 03 mai. 2022.

- CHAN, E. W. L. et al. Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Glob Antimicrob Resist**. v. 10, p. 70-74, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28673701/>> Acesso em: 14 mai. 2022.
- CHANG, J.; LEE, R. E.; LEE, W. A pursuit of *Staphylococcus aureus* continues: a role of persister cells. **Arch Pharm Res**. v. 43, n. 6, p. 630-638, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32627141/>> Acesso em: 25 jun. 2022.
- CHEN, Q. et al. Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. **Microbiologyopen**. v. 9, p. e00946. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6957440/>> Acesso em: 28 mai. 2022.
- CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**. v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7872022/>> Acesso em: 09 mai. 2022.
- COSGROVE, K. et al. Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**. v. 189, n. 3, p. 1025-1035. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1797328/>> Acesso em: 10 mai. 2022.
- DALY, S. M. et al.  $\omega$ -Hydroxyemodin limits *Staphylococcus aureus* quorum sensing-mediated pathogenesis and inflammation. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 59, n. 4, p. 2223-2235, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25645827/>> Acesso em: 29 mar. 2022.
- DAROUICHE, R. O. et al. Antimicrobial and antibiofilm efficacy of triclosan and DispersinB combination. **J Antimicrob Chemother**. v.64, n.1, p.88-93, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19447791/>> Acesso em: 01 mai. 2021.
- DAYAN, G. H. et al. *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. **Expert Review Of Vaccines**. v. 15, n. 11, p.1373-1392, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27118628/>> Acesso em: 16 jan. 2020.
- DEFOIRDT, T. Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. **Trends Microbiol**. v. 26, n. 4, p. 313-328. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29132819/>> Acesso em: 29 mar. 2022.
- DOTTO, C et al. The Active Component of Aspirin, Salicylic Acid, Promotes *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation in a PIA-dependent Manner. **Frontiers in Microbiology**. v.8, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5253544/>> Acesso em: 17 jan. 2020.
- DUBIN, G. Extracellular proteases of *Staphylococcus spp*. **Biol Chem**. v. 383, p. n. 7-8, p. 1075-1086, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12437090/>> Acesso em: 28 mai. 2022.
- EL-GANINY, A. M. et al. The promising anti-virulence activity of candesartan, domperidone, and miconazole on *Staphylococcus aureus*. **Braz J Microbiol**. v. 53, v. 1, p.1-18, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34773629/>> Acesso em: 28 jun. 2022.

FABRES- KLEIN, M. H. **Identification of immunogenic proteins expressed by *Staphylococcus aureus* of bovine origin**. 2010. 52 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia molecular de plantas; Bioquímica e Biologia molecular animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010. Disponível em:

<<https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/2462>> Acesso em: 27 jun. 2022.

FABRES- KLEIN, M. H. et al. Moving towards the immunodiagnosis of staphylococcal intramammary infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v. 33, n. 12, 2014. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/26332\\_2074](https://www.researchgate.net/publication/26332_2074)

Moving\_towards\_the\_immunodiagnosis\_of\_staphylococcal\_intramammary\_infections>Acesso em: 06 mai. 2021.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nat Rev Microbiol**. v. 2, n. 10, p. 820-832, 2004. Disponível em:<

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15378046/>> Acesso em: 15 mai. 2022.

FENG, X. et al. Inhibition of biofilm formation by chemical uncoupler, 3, 3', 4', 5-tetrachlorosalicylanilide (TCS): from the perspective of quorum sensing and biofilm related genes. **Biochemical Engineering Journal**. v. 137, p. 95-99, 2018. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X183015547>> Acesso em: 05 mai. 2022.

FOSTER, T. J. The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci. **Trends Microbiol**. v. 27, n. 11, p.927-941, 2019. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31375310/>>Acesso em: 15 mar. 2022.

FOSTER, T. J. Surface Proteins of *Staphylococcus epidermidis*. **Front Microbiol**. v. 11, n. 1829, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7403478/>>

Acesso em: 28 mai. 2020

GALATTI, et al. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade \* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: emerging community dissemination. **An Bras Dermatol**. v.68, n.5, p. 501-506, 2009. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S036505962009000500009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S036505962009000500009)>

Acesso em: 06 fev. 2021

GETAHUN H, et al. Combatendo a resistência antimicrobiana na pandemia de COVID-19. **Boletim da Organização Mundial da Saúde**. v. 98, n.7, p.442-442A. 2020. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7375214/>>Acesso em: 07 jan 2020.

GIMZA, B. D. Unraveling the Impact of Secreted Proteases on Hypervirulence in *Staphylococcus aureus*. **mBio**. v. 12, p. e03288-20. 2020. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33622717/>> Acesso em: 18 jun. 2022.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**. v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010040422010000300035](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422010000300035)>

Acesso em 03 fev 2021.

HALL, C. W.; MAH, T.F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 41, n. 3, p. 276-301,

2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28369412/>> Acesso em: 31 jul. 2020.

HAMDANI, S. et al. Isolation and identification of proteolytic bacteria from pig sludge and protease activity determination. **IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sc.** v. 230. 2019. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/230/1/012095>> Acesso em: 14 mai. 2022.

HANNACHI, N. et al. Aspirin Effect on *Staphylococcus aureus*—Platelet Interactions During Infectious Endocarditis. **Frontiers in Medicine.** v. 6, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2019.00217/full>> Acesso em: 17 jan. 2020.

HEMMATI, F. et al. Novel strategies to combat bacterial biofilms. *Molecular Biotechnology*, v. 63, n. 7, p. 569-586, 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12033-021-00325-8>> Acesso em: 05 fev. 2022.

HUANG, S. H. et al. Immunomodulatory effects and potential clinical applications of dimethyl sulfoxide. **Immunobiology.** v. 225, n. 3, p. 151906, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31987604/>> Acesso em: 13 mai. 2022.

INOSHIMA, N. et al. Genetic requirement for ADAM10 in severe *Staphylococcus aureus* skin infection. **J Invest Dermatol.** v. 132, n. 5, p. 1513-6, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22377761/>> Acesso em: 06 mai. 2022.

JENUL, C.; HORSWILL, A. R. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. **Microbiol Spectr.** v. 7, n. 2, p. 03- 31, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30953424/>> Acesso em: 28 jun. 2022.

JONG, N. W. M.; KESSEL, V. K. P. M.; STRILP, J. A. G. Immune evasion by *Staphylococcus aureus*. **Microbiol. Spectr.** v. 7, p. 1–27, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30927347/>> Acesso em: 28 jun. 2022.

JUSKO, M. et al. Staphylococcal proteases aid in evasion of the human complement system. **J. Innate Immun.** v. 6, p. 31–46, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23838186/>> Acesso em: 28 jun. 2022.

KAITO, C.; SEKIMIZU, K. Colony spreading in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** v. 189, 6, p. 2553-2557, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17194792/>> Acesso em: 28 mai. 2022

KANG, M. et al. Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. **J. Biol. Chem.** v. 288, p. 20520–20531, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23720782/>> Acesso em: 28 jun. 2022.

KATSUKUNYA, J.; MAKURIRA, R.; MUKANGANYAMA, S. Ozoroa insignis reticulata (Baker f.) R. Fern. & A. Fern. Root Extract Inhibits the Production of Extracellular Proteases by *Staphylococcus aureus*. **Biochem Res Int.** v. 202, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8570894/>> Acesso em 28 jun. 2022.

KAUFFMANN, C. et al. Potencial antimicrobiano e antibiofilme in vitro de espécies do gênero eugenia, myrtaceae, nativas do sul do Brasil. **Caderno pedagógico**, v.14, n.2, p.110-

127, 2017. Disponível em:

<<http://www.univates.br/revistas/index.php/cadped/article/view/1512/1284>> Acesso em: 10 abr. 2021.

KIM, M. S. et al. Quantification of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detector (hplc-uv): application to pharmacokinetic studies in 28 healthy korean subjects. **J chromatogr sci.** v. 50, n. 5, p. 396-400, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22451531/>> acesso em: 13 mai. 2022.

KIZAKI, H. et al. Cell-Surface Phenol Soluble Modulins Regulate *Staphylococcus aureus* Colony Spreading. **PLoS One.** v. 11, n. 10, p. e0164523. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27723838/>> Acesso em: 17 mai. 2022.

KLEBANOFF SJ. Et al. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **J Leukoc Biol.** v. 93, n.2, p. 185-198. 2013. Disponível em: <[ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3545676/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3545676/)> Acesso em: 22 mai. 2022.

LEÃO, C.; BORGES, A.; SIMÕES, M. NSAIDs as a Drug Repurposing Strategy for Biofilm Control. **Antibiotics (Basel).** v. 9, n. 9, p. 591, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7558876/>> Acesso em: 25 jun. 2022

LE, S. et al. Effect of nicotine on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence factors. **Nature Scientific reports.** v. 9, p. 20243 ,2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-019-56627-0#:~:text=The%20results%20of%20this%20study,the%20virulence%20of%20this%20bacterium.>> Acesso em: 19 mai. 2022.

LI, X. H.; LEE, J. H. Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy. **Journal of Microbiology.** v. 55, n. 10, p. 753-766, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28956348/>> Acesso em: 03 mai. 2021.

LISTER, J.L.; HORSWILL, A.R. *Staphylococcus aureus* biofilms: Recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.** v. 4, n. 23, p. 1-9, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4275032/>> Acesso em: 09 fev. 2021.

LIU, X. et al. Protein-mediated anti-adhesion surface against oral bacteria. **Nanoscale.** v. 10, n. 6, p. 2711-2714. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29372229/4>> Acesso em: 05 mai. 2022.

LUNA, C.M. Tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina na marica latina. **Brazilian journal of infectious diseases.** v. 14, n. 2, 2010. Disponível em: <[https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-86702010000800007&script=sci\\_arttext&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-86702010000800007&script=sci_arttext&tlng=pt)> Acesso em: 09 abr. 2021.

MATOS, R. F. **Atividade antifúngica da nimesulida isolada ou em associação com terbinafina contra fungos dermatófitos e seu provável mecanismo de ação in vitro.** 2015. 78f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de farmácia, Universidade federal do Pará, Belém. 2015. Disponível em: <[http://repositorio.ufpa.br/jspui/bitstream/2011/7520/1/Dissertacao\\_AtividadeAntifungicaNimesulida.pdf](http://repositorio.ufpa.br/jspui/bitstream/2011/7520/1/Dissertacao_AtividadeAntifungicaNimesulida.pdf)> Acesso em: 05 mai. 2022.

MILLER, L. S. et al. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus* invasive infections: Evidence based on human immunity, genetics and bacterial evasion mechanisms. **FEMS Microbiol Rev.** v. 44, p. 123-153, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31841134/>> Acesso em: 06 mai. 2022.

MIMICA, M.J.; BEREZIN, N. *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina: um problema emergente. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med.** v.51, n.2, p. 52-58, 2006. Disponível em: <<http://arquivosmedicos.fcmsantacasasp.edu.br/index.php/AMSCSP/article/viewFile/475/551>> acesso em: 03 fev. 2021.

MONACO, M. et al. Worldwide Epidemiology and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus*. **Current Topics In Microbiology And Immunology.** p.21-56, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27025380/>> Acesso em: 16 jan. 2020.

MOORE, N. et al. Pharmacoeconomics of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Therapie.** v. 74, n. 2, p. 271-277, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30477749/>> Acesso em: 10 fev. 2021

MUNGUIA, J.; NIZET, V. Pharmacological Targeting of the Host-Pathogen Interaction: Alternatives to Classical Antibiotics to Combat Drug-Resistant Superbugs. **Trends Pharmacol Sci.** v. 38, n. 5, p. 473-488, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28283200/>> Acesso em: 29 mar. 2022.

OLIVEIRA, I. M. et al. Repurposing ibuprofen to control *Staphylococcus aureus* biofilms. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 166, p. 197-205, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523419300613?via%3Dihub>> Acesso em: 17 jan. 2020.

OTTO, M. Phenol-soluble modulins. **Int J Med Microbiol.** v. 304, n. 2, p.164-169, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24447915/>> Acesso em: 28 jun. 2022.

OTTO, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annu Rev Med.** v. 64, p. 175-188, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22906361/>> Acesso em: 15 mar. 2022.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Gram-Positive Pathogens.** v. 1, p. 699-711. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2777538/>> Acesso em: 02 set. 2020

PELZ, A. et al. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. **J Biol Chem.** v. 280, n. 37, p. 32493-32498, 2005 disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16020541/>> Acesso em: 22 mai. 2022.

PRADO, R. R. et al. *Staphylococcus spp.*: importantes riscos à saúde pública, **PubVet.** v. 9, n. 8, p. 363-368, 2015. Disponível em: <<https://www.pubvet.com.br/artigo/453/staphylococcus-spp-importantes-riscos-agrave-sauacutede-puacutepblica>> Acesso em: 09 abr. 2021.

RAHEEM, N; STRAUS, S.K. Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. **Front Microbiol.** v.10, p. 2866, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6927293/>> Acesso em: 01 mai. 2021.

RAINSFORD, K. D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. **Subcell Biochem.** v. 42, p. 3- 27, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17612044/>> Acesso em: 20 mar. 2021.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat-mediated disease. **Nat. Rev. Drug Discovery.** v. 9, n. 2, p. 117–128, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20081869/>> Acesso em: 28 jun. 2022.

RAJPUT, A. et al. Biofilm: a resource of anti-biofilm agents and their potential implications in targeting antibiotic drug resistance. **Nucleic acids research.** v. 46,p. 894-900. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5753393/>> Acesso em: 05 mai. 2022.

RICE, K. et al. Description of staphylococcus serine protease (ssp) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of sspA-encoded serine protease. **Infect Immun.** v. 69, n. 1, p. 159-69. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11119502/>> Acesso em: 15 mar. 2022.

ROHDE, H. et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. **Mol Microbiol.** v. 55, n. 6, p.1883-95. 2005. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15752207/>> Acesso em: 15 de mar. 2022.

ROY, R. et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence,** v.9, n.1, p.522–554, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5955472/#cit0121>> Acesso em : 10 abr. 2021.

SAKR, A, et al. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. **Front Microbiol.** v. 9, p. 2419. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30349525/>> Acesso em: 07 jun. 2021.

SANMARTÍN- SUÁREZ, C. et al. Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. **J Pharmacol Toxicol Methods.** v. 63, n. 2, p. 209-215, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21059397/>> Acesso em: 28 mai. 2022.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** v. 43, n. 6, p.413-423, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S167624442007000600005](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S167624442007000600005)> Acesso em: 26 dez. 2019.

SCHILCHER, K.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. **Microbiol Mol Biol Ver.** v. 84, n. 3, p. e00026-19, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32792334/>> Acesso em 12 abr. 2022.

SMIT, J. et al. *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Population-Based Study. **Open Forum Infectious Diseases.** 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ofid/article-abstract/6/9/ofz356/5572234>> Acesso em 17 jan 2020.

- STEWART, P. S. Prospects for Anti-Biofilm Pharmaceuticals. **Pharmaceuticals (Basel)**. v. 8, n. 3, p. 504-11, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4588180/>> Acesso em: 01 mai. 2021.
- VALLIAMMAI, A. et al. Staphyloxanthin inhibitory potential of thymol impairs antioxidant fitness, enhances neutrophil mediated killing and alters membrane fluidity of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Biomed Pharmacother**. v. 141, p. 1119-1133, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34328107/>> Acesso em: 28 mai. 2022.
- VESTERGAARD, M.; FREES, D.; INGMER, H. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. **Microbiol Spectr**. v. 7, n. 2, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30900543/>> Acesso em: 28 mai. 2022.
- WEINSTEIN, M. P. et al. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 29. ed. Wayne: CLSI, supplement M100, 2019. Disponível em: <[https://clsi.org/media/2663/m100ed29\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf)> Acesso em: 22 jun. 2022
- Wu, S. C. et al. Natural Products That Target Virulence Factors in Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*. **J Agric Food Chem**. v. 67, n. 48, p. 13195-13211, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31702908/>> Acesso em: 26 abr. 2022.
- XIAO, S. et al. Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. **BMC Complement Med Ther**. n. 20, p. 99, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32209108/>> Acesso em: 26 jun. 2020.
- XIAO, S. et al. Identification of essential oils with strong activity against stationary phase uropathogenic *Escherichia coli*. **Discov Med**. v. 28, n. 154, p. 179-188, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31926578/>> Acesso em: 26 jun. 2022.
- XU, C. G. et al. Comparative Proteomic Analysis Provides insight into the Key Proteins as Possible Targets Involved in Aspirin Inhibiting Biofilm Formation of *Staphylococcus xylosus*. **Frontiers in pharmacology**. v. 8, n. 543, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5566577/>> Acesso em: 14 mai. 2022.
- XUE, L. et al. Staphyloxanthin: a potential target for antivirulence therapy.” **Infection and drug resistance**. v. 12, p. 2151-2160. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6647007/#CIT0026>> Acesso em: 14 mai. 2022.
- ZHANG, S. et al. Diclofenac Resensitizes Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to  $\beta$ -Lactams and Prevents Implant Infections. **Adv Sci (Weinh)**. v. 8, n. 13, p. 2100681. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34258168/>> Acesso em: 18 mai. 2022.
- ZHANG, Y. et al. *Staphylococcus aureus* SdrE captures complement factor H's C-terminus via a novel 'close, dock, lock and latch' mechanism for complement evasion. **Biochem. J**. v. 474, p. 1619-1631, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5415847/>> Acesso em 28 jun. 2022.
- ZHENG, Y. et al. Colonization of medical devices by staphylococci. **Environ Microbiol**. v. 20, n. 9, p. 3141-3153, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29633455/>> Acesso em: 06 de mai. 2022.