



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

LIVIA PONTES FARIAS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE UM COMPLEXO DE
RUTÊNIO LIGADO A ANTRACENO CONTRA BACTÉRIAS ENVOLVIDAS EM
INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE**

FORTALEZA
2022

LIVIA PONTES FARIAS

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE UM COMPLEXO DE
RUTÊNIO LIGADO A ANTRACENO CONTRA BACTÉRIAS ENVOLVIDAS EM
INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Monografia apresentada ao Curso de
Biotecnologia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F238a Farias, Livia Pontes.

Atividade antibacteriana e antibiofilme de um complexo de rutênio ligado a antraceno contra bactérias envolvidas em infecções relacionadas à assistência à saúde / Livia Pontes Farias. – 2022.
48 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.

1. IRAS. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Biofilmes. 4. Complexo de Rutênio. I. Título.

CDD 661

LIVIA PONTES FARIAS

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE UM COMPLEXO DE
RUTÊNIO LIGADO A ANTRACENO CONTRA BACTÉRIAS ENVOLVIDAS EM
INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia
da Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira

Aprovada em: 04/02/2022

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos
Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG)

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

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por sempre terem dado o conforto de me permitirem optar somente pelos estudos, além do apoio incondicional.

À minha família, por me incentivarem, desde criança a focar em meus estudos e me defender quando necessário.

Aos meus amigos, que nunca hesitaram em ouvir meus lamúrios e incertezas sobre o curso, aos que entendiam exatamente como eu me sentia e aos que não entendiam, por muitas vezes, a confusão dentro da minha cabeça, somente pela presença, mesmo não física, e pelo apoio, que sempre foi o suficiente.

À minha segunda família, LIBS, que sempre me acolheu e também incentivou e instigou meu gosto pela ciência. Com ênfase aos doutorandos e doutores do LIBS, que sempre me ajudaram e sanaram minhas dúvidas. E sem contar os ICs, os quais tive prazer de trabalhar e crescer junto.

Ao Prof. Me. Alexandre Lopes Andrade por todo amparo e auxílio, sempre se mostrando disposto a ajudar quando possível.

Ao Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira, por me permitir fazer parte desse grupo de pesquisa maravilhoso e sempre incentivar a fazer o meu melhor.

À minha turma, T8, que sem ela também não seria possível passar por tanta coisa sem o apoio deles, mesmo que em algumas vezes só restasse dúvida entre a gente.

À todos que estiveram direta ou indiretamente nessa jornada agradeço imensamente, pois hoje sei que para chegar até aqui e ter me tornado o que sou hoje, foi por conta de cada pessoa que passou por mim, mesmo que já tenha partido ou permanece.

“Conhecer os segredos é o primeiro passo para desmistificá-los”

Eduardo Spohr

RESUMO

A resistência antimicrobiana é um problema crescente que vem se tornando uma das maiores ameaças à saúde global, principalmente em relação à ineficiência das terapias antimicrobianas. No âmbito hospitalar, esse fato se torna ainda mais preocupante, visto que muitas mortes são causadas por Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), provocadas, muitas vezes, por bactérias resistentes. Diante este cenário, complexos de rutênio se destacam como uma alternativa aos medicamentos atuais, visto que trabalhos anteriores mostraram a atividade antibacteriana desses compostos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ contra as bactérias de importância clínica *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC700698 (SARM), *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 e *Escherichia coli* ATCC11303. Para avaliação da atividade antimicrobiana, analisou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). A atividade antibiofilme foi testada através do método de coloração com cristal violeta (CV) da biomassa, para posterior quantificação, e enumeração de células viáveis, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). As bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis* mostraram-se mais susceptíveis ao composto quando comparadas à bactéria Gram-negativa *E. coli*. Os resultados de CIM variaram entre 7,8 a 125 µg/mL, já em relação a CBM, foram obtidas concentrações bactericidas de 15,6 a 250 µg/mL. Na quantificação de biomassa as reduções variaram entre 6,3 a 99,9% para todas as cepas testadas, já na enumeração de células viáveis, as diminuições foram de 0,01 logs até a redução total de UFCs. Em conclusão, verificou-se o potencial do complexo de rutênio no controle do crescimento microbiano como também na inibição da formação de biofilmes.

Palavras-chave: IRAS. Resistência antimicrobiana. Biofilmes. Complexo de Rutênio.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is an increasing problem which has become one of the biggest threats to global health, especially in relation to the inefficiency of antimicrobial therapies. In the hospital context, this fact becomes even more worrying, since many deaths are caused by Healthcare-Associated Infections (HAI), often caused by resistant bacteria. Given this scenario, ruthenium complexes stand out as an alternative to current drugs, since previous works showed the antibacterial activity of these compounds. The present study aimed to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of the $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ complex against the clinically important bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC700698 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 and *Escherichia coli* ATCC11303. To evaluate the antimicrobial activity, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were analyzed. Antibiofilm activity was tested using the crystal violet (CV) staining method of the biomass, for subsequent quantification and enumeration of viable cells, by counting colony forming units (CFU). Gram-positive bacteria *S. aureus* and *S. epidermidis* were more susceptible to the compound when compared to Gram-negative bacteria *E. coli*. The MIC results ranged from 7.8 to 125 $\mu\text{g/mL}$, whereas in relation to CBM, bactericidal concentrations of 15.6 to 250 $\mu\text{g/mL}$ were obtained. In the quantification of biomass, the reductions ranged from 6.3 to 99.9% for all strains tested, while in the enumeration of viable cells, the decreases were 0.01 logs until the total reduction of CFUs. In conclusion, the potential of the ruthenium complex to control microbial growth as well as to inhibit the formation of biofilms was verified.

Keywords: HAI. Antimicrobial resistance. Biofilms. Ruthenium complex.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estágios de desenvolvimento de Biofilmes	15
Figura 2 – Fórmula estrutural do complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$	19
Figura 3 – Efeito do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ sobre a formação de biofilmes de <i>S. aureus</i>, <i>S. epidermidis</i> e <i>E. coli</i>	25
Figura 4 – Efeito do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ sobre a enumeração de células viaáveis de <i>S. aureus</i>, <i>S. epidermidis</i> e <i>E. coli</i>	27

LISTA DE GRÁFICOS

Tabela 1 – Espécies de bactérias envolvidas em infecções associadas a biofilmes.....	16
Tabela 2 – Efeito antimicrobiano do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ sobre o crescimento planctônico de <i>S. aureus</i>, <i>S. epidermidis</i> e <i>E. coli</i>	23

LISTA DE ABEVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CV	Cristal Violeta
ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças
EPS	Matriz Polimérica Extracelular
IRAS	Infecções Relacionadas À Assistência À Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PSMs	Modulinas Fenol-Solúveis
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
TSA	Triptona de Soja com Ágar
TSB	Caldo de Triptona de Soja
UFC	Unidades formadoras de colônias
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
µL	Microlitro
µM	Micrômetro
Log	Logaritmo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 METODOLOGIA.....	19
3.1 Obtenção, síntese e caracterização do complexo de rutênio	19
3.2 Microorganismos utilizados	19
3.3 Condições de cultivo	20
3.4 Determinação da atividade de [Ru(bpy)₂(bpy-ant)]²⁺	20
3.4.1 Determinação da atividade antimicrobiana	20
3.4.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	20
3.4.1.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)	21
3.4.2 Determinação da atividade antibiofilme.....	21
3.4.2.1 Quantificação de biomassa.....	21
3.4.2.2 Contagem de células viáveis.....	22
3.4.3 Análise estatística.....	22
4 RESULTADOS	23
4.1 Atividade antibacteriana	23
4.2 Atividade antibiofilme	24
4.2.1 Quantificação da biomassa.....	24
4.2.2 Enumeração de células viáveis	26
5 DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUÇÃO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) acometem pacientes sob cuidados médicos, sendo alvos para microrganismos oportunistas, como fungos e bactérias. As IRAS constituem um problema global que afeta milhares de pessoas anualmente. Estas infecções são adquiridas a partir de 48 horas de admissão no hospital ou após 30 dias de alta do paciente (DUCEL; FABRY; NICOLLE, 2002; REVELAS, 2012). Os tipos de IRAS mais comuns são aqueles relacionados a dispositivos médicos, como infecções da corrente sanguínea associadas ao cateter; do trato urinário associadas ao cateter; sítio cirúrgico e pneumonia associada a ventilação mecânica (AL-TAWFIQ; TAMBYAH, 2014; KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017). Dentre os fatores de riscos associados ao surgimento dessas infecções destacam-se: o longo período de hospitalização do paciente, procedimentos invasivos, comorbidades, fatores imunológicos, além da resistência antimicrobiana (KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017; ZHAO *et al.*, 2019), o que acaba por dificultar o tratamento dessas doenças. Em relação a recorrência das IRAS, a Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que a cada 100 pacientes hospitalizados, 7, em países desenvolvidos, e 10 em países em desenvolvimento, irão adquirir IRAS (WHO, 2011). De acordo com o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC), em 2017, 8,3% dos pacientes que permaneceram em UTIs por mais de dois dias, adquiriram pelo menos uma IRAS (ECDC, 2019). No Brasil, a prevalência de IRAS em macrorregiões foi de 10,8% entre os anos de 2011 e 2013 (FORTALEZA *et al.*, 2017).

A resistência antimicrobiana é caracterizada pela ineficiência de medicamentos utilizados contra certos microrganismos. Como citado anteriormente, esse problema, além de ser um percalço para as terapias com antibióticos, é determinante para o aumento de mortes por IRAS (LIU; DICKTER, 2020). Essa resistência se dá por diversas causas, sendo algumas delas: o uso indiscriminado de antimicrobianos, como também o acesso irrestrito a esses medicamentos, além da prescrição incorreta de antibióticos; falta de higiene e de saneamento básico (ASLAM *et al.*, 2018). Outro ponto muito preocupante gira em torno da necessidade de novas classes de antibióticos, uma vez que o ritmo de descoberta destas não acompanha o surgimento de resistência antimicrobiana, dessa forma, os medicamentos existentes tornam-se obsoletos mais rapidamente, sendo necessária a descoberta de novos compostos que possam superar esse obstáculo. (SENGUPTA; CHATTOPADHYAY; GROSSART, 2013; LAXMINARAYAN *et al.*, 2013). De acordo com o relatório da OMS, até 2050 a resistência antimicrobiana resultará na morte de 10 milhões de pessoas por ano, ultrapassando até mesmo

o câncer em relação à quantidade de óbitos, o que causaria um impacto econômico de 100 trilhões de dólares mundialmente (O'NEILL, 2014).

Dentre as principais bactérias Gram-positivas relacionadas a IRAS, estão aquelas que pertencem gênero *Staphylococcus*, sendo as espécies *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* frequentemente encontradas neste cenário (NNIS, 2004; OTTO, 2009; OTTO, 2010). *S. epidermidis* é uma bactéria comensal que consegue se adaptar e se desenvolver em diferentes microambientes da pele, onde está presente de forma natural e abundante (ZIEBUHR *et al.*, 2006; COGEN; NIZET; GALLO, 2008; BROWN; HORSWILL, 2020). Essa bactéria apresenta uma diversidade de linhagens em um mesmo hospedeiro, além disso, isolados de ambientes hospitalares dessa espécie se diferem das cepas obtidas fora dessas instalações, mostrando uma alta flexibilidade genômica, o que pode explicar sua resistência a antimicrobianos dentro do contexto de IRAS (ZIEBUHR *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2020).

S. aureus pode ser encontrada naturalmente na microbiota humana, estando presente em pele e mucosas de humanos saudáveis (SANTOS *et al.*, 2007), e é a causa mais comum de infecções de pele e tecidos moles (BOUVET *et al.*, 2017). Essa espécie é conhecida por ser mais agressiva quando comparada a *S. epidermidis*, pois, ao contrário desta última, possui uma produção mais focada em modulinas fenol-solúveis (PSMs) com maior potencial citolítico, e assim, contribui de forma significativa para lise de neutrófilos, o que pode explicar a diferença na virulência entre esses estafilococos (WANG *et al.*, 2007; OTTO, 2009; CHEUNG *et al.*, 2010). A faceta mais preocupante dessa espécie é a *S. aureus* resistente à meticilina (SARM), uma vez que é mais prevalente em pacientes que estão na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) por apresentar uma maior resistência a antibióticos largamente utilizados na clínica (MAHMOOD *et al.*, 2010).

Dentre as bactérias Gram-negativas relacionadas a IRAS, uma das mais comuns é a espécie *Escherichia coli*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. As bactérias pertencentes a essa família que são resistentes a carbapenema e que produzem ESBL estão dentro da lista de patógenos prioritários para novos antibióticos, incluindo *E. coli* (WHO, 2017). Apesar da *E. coli* estar presente na microbiota intestinal humana, é também um microrganismo oportunista capaz de abrigar vários genes de virulência, permitindo sua patogenicidade (DUCCEL; FABRY; NICOLLE, 2002; NAGARJUNA *et al.*, 2015). Além disso, essa bactéria é comumente a causa de infecções no sangue e no trato urinário (PELEG; HOOPER, 2010). Em um estudo recente realizado em isolados clínicos de UTI, *E. coli* aparece, dentre várias cepas isoladas, com uma prevalência maior de resistência aos antibióticos testados (NOURI *et al.*, 2020).

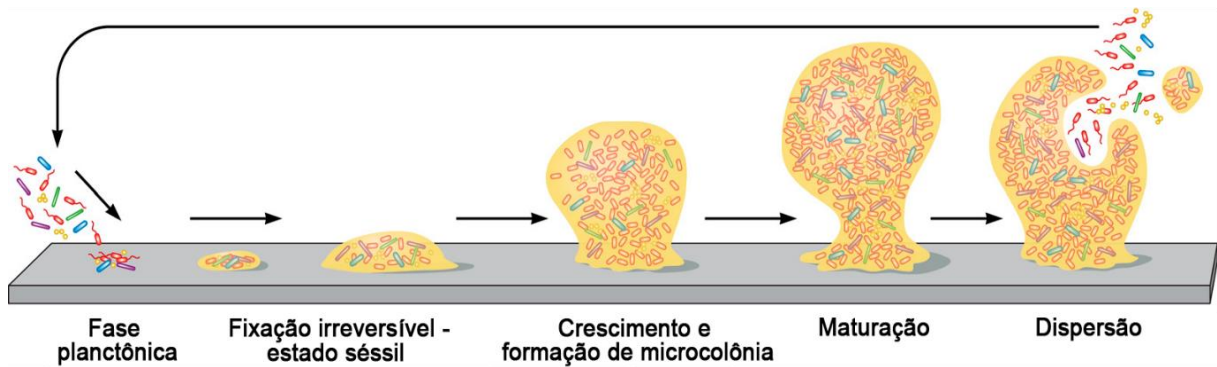
Um dos fatores fortemente relacionados a resistência antimicrobiana é a capacidade que os microrganismos possuem de formar biofilmes, dificultando ainda mais a erradicação de IRAS por atuarem como uma barreira física, além de desenvolverem tolerância através de dormência metabólica ou de programas de persistência molecular (KOO *et al.*, 2017). Biofilmes podem ser definidos como uma comunidade de microrganismos inseridos em uma matriz polimérica extracelular (EPS) autoproduzida, os quais estão aderidos entre si e/ou agregados a uma superfície biótica ou abiótica (VERT *et al.*, 2012).

Os biofilmes podem apresentar tolerância de cem a mil vezes maior a antibióticos quando comparados a células planctônicas (CERI *et al.*, 1999; WALTERS *et al.*, 2003). Nessa matriz há uma variedade de moléculas orgânicas e inorgânicas que contribuem diretamente para a adaptação e defesa desse microconsórcio, algumas delas são: exopolissacarídeos; proteínas extracelulares; enzimas, sendo a maioria envolvida na degradação de biopolímeros; DNA extracelular; água; surfactantes e lipídios (FLEMMING; WINGENDER, 2010). O biofilme funciona como um microambiente para as células inseridas nesse meio e o EPS mantém a proximidade entre as bactérias, permitindo a comunicação entre elas, além de evitar a dessecação e a oxidação. Com isso, os antibióticos não possuem o mesmo desempenho, pois não conseguem penetrar tão facilmente nas células inseridas em biofilmes quanto em células que não estão presentes nesse meio. Dentre os vários fatores que contribuem para essa resistência estão: enzimas degradantes de antibióticos acumuladas na matriz; defesa antioxidante; *quorum-sensing*; transferência genética; células dormentes/persistentes, além de uma alta densidade dessas células no biofilme (LEWIS, 2005; RÖMLING; BALSALOBRE, 2012; OLSEN, 2015).

Conforme mostrado na figura 1, o desenvolvimento do biofilme se dá inicialmente pela adesão reversível de células de vida livre a superfície. Neste estágio as bactérias podem se desprender e voltar ao estilo de vida planctônico (PETROVA; SAUER, 2012; TOYOFUKU *et al.*, 2015). Estruturas como flagelos e pili estão envolvidos nesse processo (TOYOFUKU *et al.*, 2015). A produção de algumas proteínas específicas ajuda no processo de transição para a adesão irreversível (HINSA *et al.*, 2003; CAIAZZA; O'TOOLE, 2004). A fixação irreversível ocorre quando essas bactérias mantêm uma aderência firme na superfície, resistindo as forças de cisalhamento (KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2013). Após esse processo, as bactérias passam por uma adaptação para viver em um biofilme, entrando na fase de maturação; neste momento as microcolônias se proliferam e sintetizam EPS (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; TOYOFUKU *et al.*, 2015). A partir desse biofilme maduro, algumas células inseridas nesse meio são transferidas para o crescimento planctônico, as quais

saem para colonizar outros ambientes, dessa forma, o último estágio, de dispersão, dá continuidade ao ciclo de formação de biofilme (TOYOFUKU *et al.*, 2015).

Figura 1 – Estágios de desenvolvimento de Biofilmes



Fonte: Magana *et al.* (2018) adaptado pelo autor

Biofilmes podem se desenvolver em tecidos e dispositivos médicos como lentes de contato, cateteres venosos centrais, válvulas, marcapassos, cateteres urinários, entre outros (COSTERTON *et al.*, 1999; DONLAN, 2001; LEBEAUX; GHIGO; BELOIN, 2014). Quando estão presentes nesses locais, os biofilmes podem acarretar no desenvolvimento de doenças e infecções, como: periodontite, pneumonia, Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde, otite crônica, prostatite bacteriana e melioidose (COSTERTON *et al.*, 1999; LEBEAUX *et al.*, 2013). Muitas infecções causadas por biofilme são mais difíceis de erradicar, pois comumente se manifestam como infecção crônica ou recorrente (BRYERS, 2008). Quando o biofilme causa a falha do implante, há limitadas opções para a sua erradicação, as quais levam a um grande risco por envolver cirurgia de revisão, podendo, por exemplo, levar à morte do paciente em alguns casos (DEVA; ADAMS; VICKERY, 2013). De acordo com Donlan (2001), dentre os microrganismos mais comuns isolados em dispositivos médicos estão: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. A tabela 1 mostra algumas espécies formadoras de biofilme e as infecções as quais estão comumente envolvidas. Bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são a causa mais comum de infecções associadas a biofilmes, incluindo as espécies anteriormente citadas (*S. aureus* e *S. epidermidis*), que comumente apresentam isolados resistentes a meticilina (RAAD; ALRAHWAN; ROLSTON, 1998; OLIVEIRA; TOMASZ; de LENCASTRE 2002; OTTO, 2017; TURNER *et al.*, 2019). Biofilmes de *Enterobacteriaceae* isolados de pacientes pré ou pós-transplantados apresentaram genes em comum, como um amplo espectro de β -lactamases e carbapenemases,

incluindo *E. coli* (RAMOS-VIVAS *et al.*, 2019). Além disso, esta espécie também demonstrou possuir uma alta capacidade de formação de biofilme (KOVACS *et al.*, 2013).

Tabela 1 – Espécies de bactérias envolvidas em infecções associadas a biofilmes

Espécies	Infecções/Doenças	Referências
<i>Enterococcus faecalis</i>	Endocardite Infecção do canal radicular	Minardi <i>et al.</i> (2012)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pneumonia Infecção do trato respiratório Infecção do trato urinário Abscesso hepático piogênico	Chung (2012)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde Inflamação na orelha Fibrose cística	Huse <i>et al.</i> (2013); Werner <i>et al.</i> (2004); Wiley <i>et al.</i> (2012)
<i>Staphylococcus</i> sp (<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i>)	Infecções relacionadas à Assistência à Saúde Feridas crônicas Endocardite Músculo esquelético Infecções Inflamação na orelha	Arciola <i>et al.</i> (2012); Qu <i>et al.</i> (2010)
<i>Escherichia coli</i>	Prostatite bacteriana Infecção do trato urinário Inflamação na orelha	Jackson <i>et al.</i> (2002)

Fonte: adaptado de Sharma; Misba; Khan (2019)

Com as problemáticas apontadas, devido à resistência antimicrobiana e a formação de biofilmes, é necessária a descoberta de novas opções de tratamento, utilizando-se de novos medicamentos no combate de tais microrganismos. Dessa forma, complexos de rutênio, por serem compostos farmacologicamente ativos de eficácia promissora, tornam-se uma alternativa cada vez mais viável em contraste as terapias utilizadas atualmente. Na literatura, a atividade antimicrobiana de complexos de rutênio foi apontada pela primeira vez nos artigos de Dwyer *et al.* (1952) e de Shulmar e Dwyer (1964). Atualmente, muitos estudos comprovam essa atividade, revelando, assim, o potencial desses compostos no combate de bactérias multirresistentes (MUNTEANU; UIVAROSI, 2021), incluindo das espécies supracitadas, tanto

na sua forma planctônica (LI *et al.*, 2011; GORLE *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2020), quanto em biofilme (GHOSH *et al.* 2021; ANDRADE, 2018). Por apresentarem estruturas diversificadas e pela possibilidade de variar os ligantes de acordo com a necessidade, os complexos de rutênio podem manifestar diferentes atividades antimicrobianas, sendo importantes para a interação com moléculas biológicas (LI *et al.*, 2015).

O antraceno é uma importante matéria-prima utilizada na produção de corantes, estrutura que consiste em um hidrocarboneto aromático policíclico. Em estudos anteriores, esse composto demonstrou atividade antimicrobiana contra bactérias intestinais (KIM; JEONG; LEE, 2009), contra *S. aureus* SARM e contra *E. coli* com derivados de antraceno (DEBBAB *et al.*, 2012; DARDEER; TAHA; ELAMARY, 2020). Dessa forma, uma molécula contendo rutênio e antraceno pode apresentar atividade antimicrobiana, visto que separados ambos são farmacologicamente ativos contra bactérias patogênicas. Este fenômeno pode ser observado no trabalho de Oliveira e colaboradores (2020), no qual foi demonstrado que um complexo de rutênio com antraceno apresentou atividade contra *S. aureus* e *S. epidermidis*, mas não houve efeito sobre bactérias gram-negativas.

Diante o exposto, vê-se a necessidade de encontrar novos compostos que consigam combater a resistência bacteriana. Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ em bactérias relacionadas a IRAS.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Testar a atividade antimicrobiana do composto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ sobre células planctônicas e biofilmes de bactérias patogênicas relacionadas a Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde.

2.2 Objetivos específicos

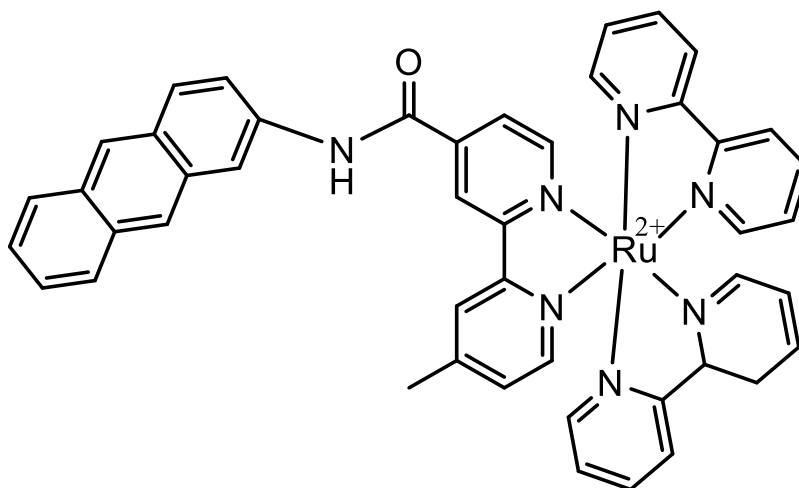
- Avaliar a atividade antibacteriana através das atividades bactericida (CBM) e bacteriostática (CIM) do complexo sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 (SARM), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Escherichia coli* ATCC 11303;
- Avaliar o efeito antibiofilme através das metodologias da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e coloração da biomassa com cristal violeta (CV) sobre as bactérias alvo dessa proposta.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção, síntese e caracterização do complexo de rutênio

O complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$, mostrado na figura 2, foi cedido pelo Prof. Dr. Eduardo Henrique Sousa, do Laboratório de Bioinorgânica do Departamento de Química Orgânica Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. A obtenção, a síntese e a caracterização do composto estão de acordo com a metodologia de Oliveira *et al.*, (2020).

Figura 2 – Fórmula estrutural do complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$



Fonte: Imagem cedida pelo Prof. Dr. Eduardo Henrique Sousa – Universidade Federal do Ceará

3.2 Microrganismos utilizados

Neste estudo foram utilizadas cepas padrão que fazem parte do acervo da American Type Culture Collection (ATCC), sendo elas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 (SARM), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Escherichia coli* ATCC 11303.

As cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 (SARM) e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 foram utilizadas como controles positivos para formação de biofilme, enquanto as estirpes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foram usadas como controles negativos para formação de biofilme, para suas respectivas espécies.

3.3 Condições de cultivo

As bactérias foram retiradas do freezer -80 °C, descongeladas e transferidas para meio Triptona de Soja adicionado de Ágar (TSA; Liofilchem, Itália) em placas de Petri, onde foi realizado o estriamento das mesmas para obtenção de isolados bacterianos. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Após isso, as colônias isoladas foram retiradas das placas e inoculadas em tubos de vidro contendo 5 mL de Caldo de Triptona de Soja (TSB; Liofilchem, Itália) e incubadas por 18-24 horas a 37 °C. Posteriormente, a cultura foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL para centrifugação a 8.603 G a 4°C por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 5 mL de novo meio TSB. Em seguida, a concentração de cada inóculo foi ajustada para 2×10^6 células/mL, através de turbidimetria. O comprimento de onda utilizado foi de 620 nm, com curvas de calibração determinadas previamente para cada bactéria.

3.4 Determinação da atividade de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$

O efeito do complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ tanto sobre o crescimento planctônico, como sobre a formação de biofilmes foi determinado através do método de microdiluição em caldo, utilizando placas de poliestireno de 96 poços, realizado em triplicata. Anteriormente ao ensaio, o composto foi pesado e solubilizado em uma emulsão contendo TSB juntamente com dimetilsulfóxido 4%. Após a diluição seriada, as concentrações na placa variaram de 125 a 1,9 µg/mL. A última linha foi designada ao controle do experimento, onde foram acrescentados nos poços somente meio de cultura e bactérias.

3.4.1 Determinação da atividade antimicrobiana

3.4.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A metodologia de CIM foi baseada em Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). Primeiramente, foram adicionados 200 µL do complexo de rutênio na concentração de 250 µg/mL na primeira linha horizontal da placa. Depois, 100 µL do meio Caldo Mueller Hinton foi acrescentado em todos os poços, com exceção a primeira linha. A partir da primeira linha horizontal, foi retirado 100 µL dos poços e acrescentados nas linhas dos poços subsequentes, de cima para abaixo, de forma que a concentração caísse pela metade. O mesmo

processo foi repetido até a penúltima linha. A última linha representava o controle. O resultado dessa diluição seriada originou concentrações que variaram de 125 a 1,9 µg/mL. Por fim, adicionou-se 100 µL de cada um dos microrganismos separadamente com a concentração ajustada anteriormente, a qual decaiu pela metade, passando de 2×10^6 células/mL para 1×10^6 células/mL. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. A mensuração do crescimento bacteriano se deu pela leitura do conteúdo das microplacas, por densidade óptica, com o comprimento de onda de 620 nm, através do equipamento SpectraMax i3. Foi considerado CIM a menor diluição do composto que não apresentou crescimento bacteriano, ou seja, a menor concentração em que o poço não apresentou turbidez.

3.4.1.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

No ensaio de CBM, foi utilizada a metodologia de Das *et al.* (2016). Inicialmente, alíquotas de 10 µL foram retiradas das suspensões nos poços em que foram positivos para CIM, ou seja, onde não havia crescimento visível. As alíquotas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio TSA e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após as 24 horas, foi realizada leitura visual das placas. A menor concentração do complexo que causou 100% de morte celular, ou seja, onde houve ausência de crescimento bacteriano visível na superfície do ágar, foi considerado CBM.

3.4.2 Determinação da atividade antibiofilme

A partir das placas montadas e incubadas como descrito no tópico 3.4.1.1 foi determinada a atividade do composto sobre a formação de biofilmes das bactérias usadas.

3.4.2.1 Quantificação de biomassa

Este teste foi baseado na metodologia de Stepanović *et al.* (2000). Após montagem e incubação, o conteúdo dos poços foi removido e lavou-se a placa três vezes com água destilada autoclavada, que depois foi retirada de todos os poços. Em seguida, acrescentou-se metanol puro a fim de desidratar o biofilme, e, após 5 minutos, o metanol foi retirado. Posteriormente, a biomassa foi pigmentada com cristal violeta a 3%. Decorridos 5 minutos, a placa foi lavada para remover o excesso do corante e acrescentou-se ácido acético para desprender o cristal

violeta do biofilme, de maneira a ser possível fazer leitura da placa no leitor através da densidade óptica. O comprimento de onda utilizado foi de 490 nm.

3.4.2.2 Contagem de células viáveis

A metodologia de contagem de células viáveis foi feita de acordo com Vasconcelos *et al.* (2014). Da mesma forma do tópico anterior, 3.4.2.1, utilizou-se a placa após a montagem e incubação. A placa foi também lavada três vezes com água destilada autoclavada, porém mantendo a água da terceira lavagem nos poços. Em sequência, a placa foi selada e levada ao banho sônico para desprender o biofilme dos poços. Após isso, o conteúdo dos poços de cada concentração foi reunido em seu eppendorf correspondente. Em seguida, utilizou-se outra placa de 96 poços para fazer a diluição decimal, em que foi acrescentado 180 µL de água destilada autoclavada em cada poço. Subsequentemente, 20 µL de cada eppendorf foi retirado e colocado na primeira linha da placa em sua concentração correspondente, e fez-se a diluição decimal. Por fim, cada diluição foi plaqueada em um quadrante de uma placa de Petri com meio TSA e incubada a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas foram contadas visualmente. O número de UFCs foi determinado e expresso em termos de Log₁₀ UFC/mL.

3.4.2 Análise estatística

Os dados de todos os ensaios foram categorizados no Microsoft Excel® (Versão 2010 para Windows). Foi utilizado o teste One-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, executados com o auxílio do software GraphPad Prism® (versão 5.0 para Microsoft Windows®) para analisar a diferença entre as médias das repetições em triplicatas utilizadas nos testes. Ressalta-se a consideração dos valores de $p < 0,001$ como estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade antibacteriana

Em linhas gerais, o composto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ exibiu ação bacteriostática (CIM) e bactericida (CBM) para todas as cepas testadas, conforme mostrado na tabela 2. Os valores variaram entre 7,8 a 125 $\mu\text{g/mL}$ para CIM e os resultados variaram entre 15,6 a 250 $\mu\text{g/mL}$ para CBM.

Tabela 2 – Efeito antibacteriano do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ sobre o crescimento planctônico de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*.

Bactérias	$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ ($\mu\text{g/mL}$)	
	CIM	CBM
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7,8	15,6
<i>S. aureus</i> ATCC 700698 (SARM)	31,2	31,2
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	15,6	15,6
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	62,5	125
<i>E. coli</i> ATCC 11303	125	250

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

No tocante a bactéria Gram-negativa *E. coli*, as concentrações do composto em que apresentaram atividade bacteriostática e bactericida foram maiores quando comparadas as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis*. A cepa *E. coli* ATCC 11303 apresentou valores de 125 $\mu\text{g/mL}$ para CIM e de 250 $\mu\text{g/mL}$ para CBM.

As estirpes de *S. aureus* se mostraram mais sensíveis ao composto dentro do grupo das Gram-positivas, obtendo valores a partir de 7,8 $\mu\text{g/mL}$ para CIM e 15,6 $\mu\text{g/mL}$ para CBM. A *S. aureus* ATCC 25923 apresentou a maior suscetibilidade, com CIM de 7,8 $\mu\text{g/mL}$ e CBM de 15,6 $\mu\text{g/mL}$, enquanto os valores de CIM e CBM para *S. aureus* ATCC 700698 foram de 31,2 $\mu\text{g/mL}$.

Em relação às estirpes de *S. epidermidis*, foram obtidos resultados a partir de 15,6 $\mu\text{g/mL}$ para CIM e CBM, sendo *S. epidermidis* ATCC 12228 mais sensível ao composto (com 15,6 $\mu\text{g/mL}$ de CIM e CBM) do que *S. epidermidis* ATCC 35984, que apresentou valores de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para CIM e 125 $\mu\text{g/mL}$ para CBM.

4.2 Atividade antibiofilme

De modo geral, o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ demonstrou atividade antibiofilme contra todas as bactérias testadas, exibindo efeito sobre a formação da biomassa do biofilme (CV) e na redução no número de células viáveis (UFCs), como pode ser observado nas figuras 3 e 4.

4.2.1 Quantificação da biomassa

Conforme mostrado na figura 3, o composto conseguiu reduzir a biomassa de todas as cepas testadas, com percentuais de reduções entre 41,3 a 99,9% para todas as concentrações, com exceção das concentrações de 1,9 e 7,8 $\mu\text{g/mL}$ em *S. epidermidis* ATCC 35984, as quais obtiveram diminuições de 6,3 e 12,4%, respectivamente.

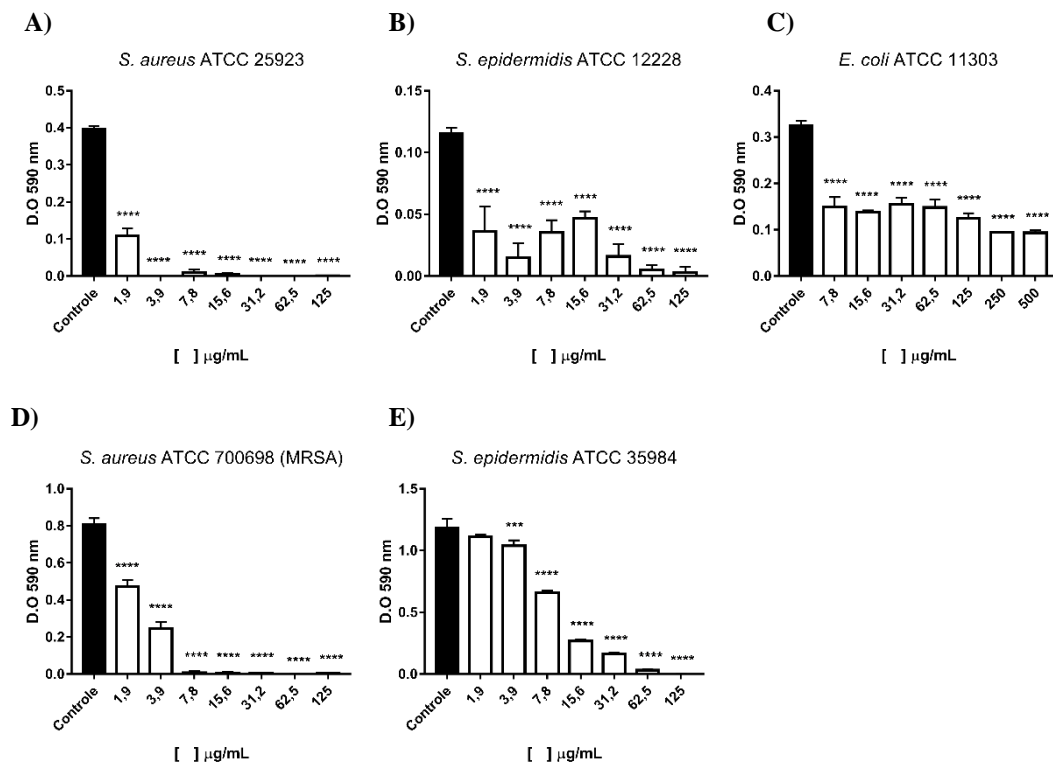
E. coli ATCC 11303 se mostrou mais resistente ao tratamento com o complexo dentre todas as bactérias testadas (Figura 3C). As maiores reduções na formação de biofilme foram nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$, com percentuais de diminuição da biomassa por volta de 71%. Nas demais concentrações, essa redução variou entre 52,2 a 61,5%. Nas concentrações de 31,2 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$, as reduções foram menores (52,2 e 54,4%, respectivamente) quando comparadas às duas menores concentrações do complexo (7,8 e 15,6 $\mu\text{g/mL}$), em que as reduções foram de 53,9 e 57,5%, respectivamente.

Em relação às Gram-positivas, as cepas de *S. aureus* foram as mais sensíveis ao composto, sendo a *S. aureus* ATCC 700698 mais resistente que a *S. aureus* ATCC 25923. Esta última foi a cepa mais sensível dentre todas as bactérias testadas e apresentou redução de biomassa em 72,3% na menor concentração do complexo de rutênio, de 1,9 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3A). Nas demais concentrações houve diminuição a partir de 97,7%. Ainda sobre essa estirpe, as concentrações de 7,8 e 15,6 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram menores reduções, 97,7 e 98,9%, respectivamente, quando comparados à concentração de 3,9 $\mu\text{g/mL}$, com diminuição da biomassa de 99,9%. A cepa *S. aureus* ATCC 700698 apresentou redução de 99,1% a partir de 7,8 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3D). Nas concentrações de 1,9 e 3,9 $\mu\text{g/mL}$, foram obtidas diminuições de 41,3 e 69,5%, respectivamente. A maior concentração do composto (125 $\mu\text{g/mL}$) obteve uma menor redução em comparação à concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$, apesar de ser uma diferença mínima, com valores de 99,5 e 99,9%, respectivamente.

No que diz respeito às cepas de *S. epidermidis*, a cepa menos suscetível ao composto foi a *S. epidermidis* ATCC 35984 dentre as Gram-positivas testadas. Esta cepa apresentou

reduções de mais de 90% nas concentrações 62,5 e 125 µg/mL, com valores de 97,3 e 99,9%, respectivamente (Figura 3E). Nas demais concentrações, de 1,9 a 31,2 µg/mL, a inibição do crescimento da biomassa foi entre 6,3 a 86,2%. Já para *S. epidermidis* ATCC 12228, houve reduções de mais de 90% nas duas últimas concentrações, de 62,5 e 125 µg/mL, com valores de 95,8 e 97,5%, respectivamente (Figura 3B). Nas demais concentrações, houve reduções variando entre 59,7 a 87%. Ainda sobre esta estirpe, houveram menores porcentagens de inibição (69,5 e 59,7%) nas concentrações de 7,8 e 15,6 µg/mL, respectivamente, do que nas concentrações de 1,9 e 3,9 µg/mL, que apresentaram diminuições de 68,7 e 87%.

Figura 3 – Efeito do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ sobre a formação de biofilmes de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*.



Fonte: elaborado pelo autor. Quantificação de biomassa (A, B, C, D, E) de cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Barras pretas representam bactérias sem tratamento, barras brancas representam bactérias tratadas com $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$. ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

4.2.2 Enumeração de células viáveis

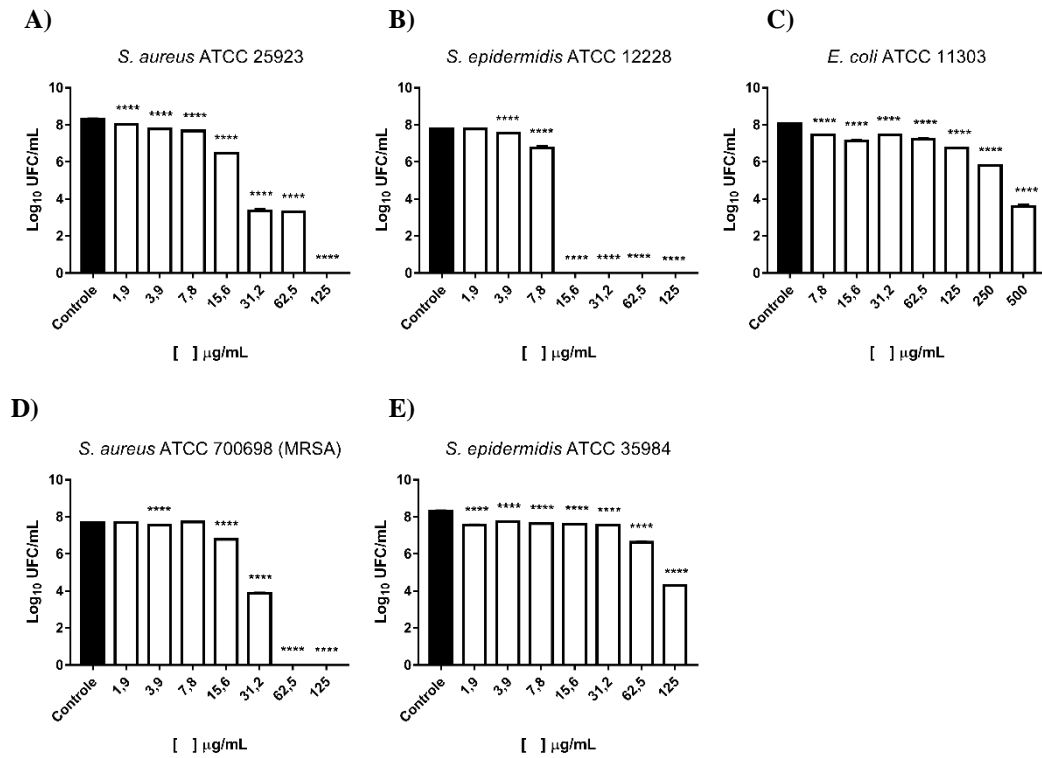
O complexo de rutênio testado apresentou atividade de redução das UFCs contra todas as bactérias testadas, com reduções de 0,82 logs até a diminuição total de UFCs nas concentrações mais altas (a partir de 62,5 µg/mL). Nas demais concentrações houveram reduções entre 0,01 a 4,95 logs, como mostrado na figura 4.

A Gram-negativa *E. coli* ATCC 11303 foi a menos suscetível ao composto dentre as bactérias testadas, não havendo redução total de UFCs em nenhum dos tratamentos (Figura 4C). Na maior concentração, de 500 µg/mL, houve diminuição de 4,46 logs. Nas demais concentrações, foram obtidas reduções entre 0,59 e 2,25 logs. Para esta estirpe, a menor redução (0,59 logs) foi na concentração de 31,2 µg/mL. Inesperadamente, nas concentrações 7,8 e 15,6 µg/mL, com reduções de 0,6 logs e de 0,91 logs, essa bactéria apresentou valores maiores do que o visto em 31,2 e 62,5 µg/mL, sendo de 0,59 logs e de 0,82 logs, respectivamente.

Em relação as *S. aureus*, para *S. aureus* ATCC 25923, a concentração de 125 µg/mL apresentou diminuição total de UFCs (Figura 4A). Nas demais concentrações, as reduções variaram entre 0,28 a 5 logs, sendo encontrada menor redução na menor concentração (1,9 µg/mL). Em *S. aureus* ATCC 700698, foi obtida redução total de UFCs nas concentrações de 62,5 e 125 µg/mL (Figura 4D). Nas concentrações subsequentes, as reduções variaram entre 0,01 a 3,82 logs, porém, na concentração de 7,8 µg/mL, a quantidade de UFCs foi um pouco maior do que no controle.

Sobre as *S. epidermidis*, para *S. epidermidis* ATCC 12228, não houve crescimento de UFCs desde a concentração 15,6 até 125 µg/mL, sendo a cepa mais sensível ao composto dentre bactérias testadas (Figura 4B). Nas demais concentrações, de 7,8 até 1,9 µg/mL, a redução variou entre 0,02 a 1,03 logs. *S. epidermidis* ATCC 35984 foi a bactéria mais resistente ao composto em relação as Gram-positivas (Figura 4E). A maior redução de células viáveis dessa estirpe foi observada na maior concentração (125 µg/mL), apesar de não ter reduzido a quantidade total de UFCs, houve uma redução de 4 logs nessa concentração. Nas demais concentrações a diminuição de UFCs variou entre 0,56 a 1,68 logs, com menor redução em 3,9 µg/mL. Na menor concentração (1,9 µg/mL), a diminuição foi de 0,75 logs, sendo maior que nas concentrações de 3,9 a 15,6 µg/mL (0,56 e 0,7 logs).

Figura 4 – Efeito do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ sobre a enumeração de células viáveis de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*.



Fonte: elaborado pelo autor. Contagem de unidades formadoras de colônia (A, B, C, D, E) de cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Barras pretas representam bactérias sem tratamento, barras brancas representam bactérias tratadas com $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi testada a ação antimicrobiana e antibiofilme do complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. Conforme visto anteriormente na tabela 2 e nas figuras 3 e 4, o composto em questão obteve efeito sobre todas as cepas utilizadas.

A efetividade da ação do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ foi maior nas bactérias Gram-positivas do que nas Gram-negativas, visto que a *E. coli* se mostrou mais resistente ao composto testado em todas as metodologias (CIM, CBM, CV, UFC). Esses resultados podem ser explicados por vários fatores, mas principalmente pela diferença morfológica entre as paredes celulares das bactérias testadas. Ao contrário das Gram-negativas, as bactérias Gram-positivas não possuem membrana externa, que atua como uma barreira para a entrada de diversas substâncias, sendo essa diferença estrutural o principal motivo para as Gram-negativas apresentarem uma maior resistência a diferentes classes de antibióticos em comparação as Gram-positivas (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010; KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017; BREIJYEH; JUBEH; KARAMAN, 2020). A permeabilidade seletiva da membrana externa pode se dar, dentre vários fatores, pelos canais de porina, visto que pequenas moléculas atravessam a membrana externa através desses canais (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010; KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017). Estudos demonstram a relação das porinas com a passagem de antibióticos, uma vez que, se houver uma diminuição na quantidade dessas porinas, há também uma diminuição na entrada de antibióticos como β -lactâmicos e fluoroquinolonas, se caracterizando como um tipo de resistência a esses antibacterianos (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

Os resultados em relação a atividade antimicrobiana apresentados nesse trabalho corroboram com outros estudos na literatura os quais mostraram maiores concentrações de CIM e CBM de complexos de rutênio contra *E. coli* (quando houve alguma atividade) em comparação com *S. aureus* e *S. epidermidis* (LIU *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2020; BURMEISTER *et al.*, 2021; KLAIMANEE *et al.*, 2021). E em relação ao teste antibiofilme, neste estudo foi demonstrado que a bactéria Gram-negativa também foi mais resistente ao complexo de rutênio em comparação as bactérias Gram-positivas utilizadas. Indo contra as tendências encontradas nesse trabalho, no estudo de Awoke, Kassa, Teshager (2019), em que foram utilizados isolados de pacientes internados, 80% dos isolados de *S. aureus* eram formadores de biofilmes, enquanto 77,8% dos isolados de *E. coli* formavam biofilmes. Já para Ghotaslou e colaboradores (2017), em que foi testada a atividade antibiofilme de nanopartículas

de prata, *E. coli* apresentou uma menor porcentagem de inibição de biofilme (44%) em comparação a *S. aureus*, com inibição de 58%. Esse resultado corrobora com os valores encontrados, visto que a bactéria *E. coli* também se mostrou mais resistente em comparação a *S. aureus*.

Dentre as *S. aureus* testadas, a cepa *S. aureus* ATCC 700698 se mostrou mais resistente em comparação a estirpe *S. aureus* ATCC 25923. Isso pode ser explicado por conta desta última ser *mecA* negativa (CLSI, 2015), ou seja, é sensível à meticilina, devido à resistência desse antibiótico ser determinada pelo gene *mecA* (UTSUI; YOKOTA, 1985). Além disso, a cepa *S. aureus* ATCC 25923 também é utilizada como controle negativo para formação de biofilmes, já que é uma produtora fraca, como foi mostrado em Neopane *et al.* (2018). Comparativamente, a estirpe *S. aureus* ATCC 700698 é conhecida na literatura por ser SARM e também é heteroresistente à vancomicina (HIRAMATSU *et al.*, 1997), em que subpopulações dessa cepa possuem mutação em que conseguem resistir a esse antibiótico (HIRAMATSU *et al.*, 1997; EL-HALFAWY; VALVANO, 2015). Além dessa mesma cepa ter sido usada como controle positivo para o gene *mecA* em Benites *et al.* (2021) e para a formação de biofilme em Neopane *et al.* (2018). Logo, o esperado é que a cepa SARM seja mais resistente ao composto do que a *S. aureus* ATCC 25923.

Um melhor desempenho do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ sobre a estirpe *S. epidermidis* ATCC 12228, ao contrário de *S. epidermidis* ATCC 35984, pode ter se dado pelo perfil resistente desta última, que é resistente a meticilina e é uma boa formadora de biofilme (CHRISTENSEN *et al.*, 1985; BOCÉ *et al.*, 2019) apresentando, assim, uma maior tolerância a muitas formas de tratamentos, pois seu biofilme funciona como uma barreira que atua na defesa da bactéria a antimicrobianos (MALONE *et al.*, 2016; DODOU, 2017). Em contrapartida, a *S. epidermidis* ATCC 12228 é suscetível à meticilina e não forma biofilme (HANSEN; KJELDSEN; SOLLID, 2003; ZHANG *et al.*, 2003). Em Lazzarotto (2010) as estirpes *S. epidermidis* ATCC 35984 e *S. epidermidis* ATCC 12228 foram utilizadas como controle positivo e negativo para formação de biofilmes, respectivamente.

Na clínica, a expressão heterogênea de genes é tipicamente observada em estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis* (ZIEBUHR *et al.*, 2006), ambas apresentam moléculas denominadas modulinas fenol-solúveis (PSMs) (MEHLIN; HEADLEY; KLEBANOFF, 1999; WANG *et al.*, 2007). Em *S. aureus* essas moléculas são responsáveis por uma forte resposta pró-inflamatória, contribuindo para a patogênese dessa bactéria (WANG *et al.*, 2007). *S. epidermidis* tem uma PSM particular, PSM δ , a qual possui uma atividade citolítica muito parecida com a PSM de *S. aureus* (PSM α 3), porém apresenta produção relativamente baixa

desta molécula (WANG *et al.*, 2007; CHEUNG *et al.*, 2010; OTTO, 2017), podendo ser um fator que explica uma maior virulência de *S. aureus* em comparação a *S. epidermidis*.

No trabalho em questão, as cepas de *S. aureus* se mostraram mais sensíveis que as estirpes de *S. epidermidis* na formação de biofilmes, e geralmente é observado o oposto na literatura. Esse resultado pode ser explicado devido à esta última cepa apresentar uma alta flexibilidade genômica, o que pode explicar sua resistência a antimicrobianos e, em razão da existência de genes móveis, é possível inferir diferenças funcionais nessa bactéria dependendo do microbioma em que se encontra (ZHOU *et al.*, 2020). O estudo de Rahmani e colaboradores (2021), mostrou que na cidade de El Bouaghi, Algeria, há uma prevalência maior em infecções por *S. epidermidis* do que por *S. aureus* com alto nível de resistência a antibióticos comumente utilizados, com exceção para vancomicina. Já em Singh *et al.* (2010), *S. aureus* mostrou uma maior resistência, ou seja, menor inibição na formação de biofilmes em comparação a *S. epidermidis* para os mesmos antibióticos. No estudo de Águila-Arcos e colaboradores (2018), isolados de *S. epidermidis* obtiveram uma maior capacidade de formação de biofilme do que os isolados de *S. aureus*.

Os resultados divergem da literatura quando se compara os valores de CIM e CBM obtidos entre as duas cepas de *S. aureus* e a estirpe *S. epidermidis* ATCC 35984, pois esta última se mostrou mais resistente ao composto testado, contrariando o estudo de Cecil e colaboradores (2015). Nesse estudo, foram testados dois análogos sintéticos de isoquinolinas (IQ-143 e IQ-238), que apresentaram melhores resultados de CIM contra *S. epidermidis*, com concentrações de 0,63 e 0,16 μM , respectivamente, do que contra *S. aureus*, cujas concentrações obtidas foram de 5 e 2,5 μM , demonstrando, assim, maior resistência de *S. aureus*.

No trabalho de Namiecińska *et al.*, (2019), os complexos de areno-rutênio (II) com derivados de carbotioamidopirazol obtiveram forte atividade para *S. aureus* e *S. epidermidis*. Esta última cepa obteve os menores valores de CIM e CBM, sendo, portanto, mais suscetível aos complexos testados. Os resultados supracitados corroboram com as tendências encontradas do presente estudo, uma vez que *S. epidermidis* ATCC 12228 exibiu maior susceptibilidade em comparação a *S. aureus* ATCC 700698. O estudo de Belmehdi *et al.* (2021) mostrou que a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 obteve maior CIM que duas cepas de *S. aureus* testadas, entre elas a *S. aureus* ATCC 25923, reforçando os resultados encontrados neste estudo, já que esta última estirpe se mostrou mais sensível à ação bacteriostática do complexo de rutênio testado. Entretanto, no estudo de Appelt (2017), essas mesmas duas espécies mostraram desempenhos diferentes contra complexos de rutênio, pois *S. aureus* ATCC 25923 apresentou maior CIM que

S. epidermidis ATCC 12228, tanto para $[\text{Ru}(\text{mctz})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{mcbtz})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, como para o ligante mcbtz.

Em Liao e colaboradores (2021), o complexo Ru(II)-2 conseguiu reduzir a biomassa em 11,51 e 21,17% nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para a cepa *S. aureus* Newman. Isto está de acordo com os resultados obtidos neste estudo, pois, embora outros valores de concentrações terem sido aplicados, ambos complexos de rutênio conseguiram reduzir a biomassa de *S. aureus*. No presente estudo, em uma concentração inferior do composto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ em relação as concentrações supracitadas, houve uma maior redução da biomassa em 1,9 $\mu\text{g/mL}$, as quais as reduções para as cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *S. aureus* ATCC 25923 foram de 41,3 e 72,3%, respectivamente. Em Andrade (2018), em que foram utilizadas as mesmas cepas Gram-positivas deste presente trabalho, o estudo mostrou que o complexo RuNN obteve redução de 30 a 99% na formação de biomassa para todas as concentrações, sendo *S. aureus* ATCC 700698 a mais sensível ao composto testado. Além disso, as cepas de *S. epidermidis* se mostraram mais resistentes, com uma média de 40% de redução, corroborando com os resultados aqui encontrados, pois as cepas de *S. aureus* utilizadas se mostraram mais suscetíveis a ação do composto do que as estirpes de *S. epidermidis*, no que é tocante a quantificação de biomassa. Os resultados da redução da formação da biomassa encontrados neste estudo foram maiores quando comparados ao estudo de Andrade (2018), pois para as estirpes de *S. aureus*, neste estudo, variaram entre 41,3 a 99,9% para todas as concentrações, enquanto que, para as cepas de *S. epidermidis*, os valores de diminuição foram entre 6,3 a 99,9%, com diminuição média de 70,6%.

No trabalho de Khelissa *et al.* (2021), foi utilizado o complexo $\{\text{RuCl}[(\text{Para-Cymene})][\text{Aminooxime L3}]\} + \text{Cl}^-$ (RuL3), não-microencapsulado e microencapsulado, contra diversas cepas, incluindo *E. coli* e *S. aureus*, as quais tiveram reduções de UFCs no valor de CIM. Para *E. coli*, o tratamento foi realizado nas concentrações de CIM de 0,4 mg/mL para RuL3 não-microencapsulado e 0,1 mg/mL para microencapsulado, de forma que as diminuições foram, nesta ordem, de 2,6 e 4,4 logs UFC/cm². No presente estudo, reduções de 1,3 a 4,46 logs foram obtidas nas concentrações de 125 e 500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente para *E. coli* apresentando assim um desempenho menor em comparação ao RuL3 microencapsulado e não-microencapsulado, visto que neste trabalho a redução de UFCs foi menor mesmo em concentrações maiores do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$. Para *S. aureus*, o tratamento foi realizado com as mesmas concentrações para *E. coli* para RuL3 não-microencapsulado e microencapsulado e foram obtidas reduções de 3,3 e 5,5 logs UFC/cm², respectivamente. Esses valores são parecidos com as reduções de UFCs nas concentrações de 31,2 $\mu\text{g/mL}$ (redução de

3,82 logs) e 62,5 µg/mL (redução de 5 logs), para *S. aureus* ATCC 700698 e *S. aureus* ATCC 25923, respectivamente. Neste presente estudo também se obteve diminuição de UFC, com redução total para ambas as cepas de *S. aureus* testadas na concentração de 125 µg/mL, sendo uma menor concentração utilizada do que em Khelissa e colaboradores (2021), além de reduzir totalmente as UFCs.

Em Ghosh *et al.* (2021), o complexo $[\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}_2]_n$ foi utilizado em diferentes concentrações em ng/mL contra cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Para esta última, a concentração de 33 ng/mL sob irradiação (inverno-outono, L (+) e verão-primavera, L (++)) apresentou completa inibição de formação de UFCs, enquanto que sem irradiação não houve inibição total, apenas uma redução maior que 5 logs a partir da concentração de 6,6 ng/mL para os tratamentos com luz e para o tratamento sem luz a partir de 33 ng/mL. Já para a Gram-positiva, houve redução completa sob L(++) em 166 ng/mL e sob L(+) em 333 ng/mL. Houve, ainda, redução maior que 5 logs a partir da concentração de 6,6 ng/mL em todos tratamentos com ou sem luz para esse composto. Os resultados do estudo de Ghosh e colaboradores (2021) mostram um maior desempenho do complexo de rutênio testado ($[\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}_2]_n$) em detrimento do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ utilizado no presente trabalho.

Em Andrade (2018), as quais foram utilizadas as mesmas cepas do presente trabalho, o complexo RuNN-F foi testado contra essas bactérias Gram-positivas e obteve redução da quantidade de células viáveis entre 1,2 a 4,9 logs, sendo *S. aureus* ATCC 700698 mais suscetível ao composto, com redução de 3 logs na concentração de 7,8 µg/mL e 4,9 logs na concentração de 500 µg/mL. O autor também aponta que em 31,2 µg/mL foi obtida uma diminuição acima de 2,4 logs no número de células viáveis para todas as cepas utilizadas no trabalho. No presente estudo, a cepa mais suscetível foi *S. epidermidis* ATCC 12228, dentre as Gram-positivas testadas, diferindo dos resultados de Andrade (2018). Porém, dentre as *S. aureus*, a cepa *S. aureus* ATCC 700698 foi mais sensível nas concentrações de 62,5 e 125 µg/mL, em que não houve nenhum crescimento de UFCs, mostrando que o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ conseguiu ser mais eficaz nesse sentido.

Além do exposto, em algumas concentrações utilizadas do composto foi observada uma produção maior de UFCs ou de biomassa, como na quantificação de biomassa da cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 em que nas concentrações de 7,8 e 15,6 µg/mL foram obtidas menores porcentagens de inibição em comparação com as concentrações de 1,9 e 3,9 µg/mL. Isso pode ser devido a um estresse bacteriano, que também ocorreu em outras cepas supracitadas em algumas concentrações, principalmente de 7,8 e 15,6 µg/mL. O que possivelmente é explicado pela suscetibilidade dose-dependente (SDD) ao composto testado,

em que a suscetibilidade bacteriana depende da dosagem administrada, ou seja, doses abaixo do necessário podem não ser tão eficazes. Portanto, é importante o uso da dosagem máxima ideal para que haja uma cobertura adequada naquele isolado (CLSI, 2015). Além disso, se a célula receptora possuir o determinante de resistência ao antibiótico em questão, essa bactéria terá uma sensibilidade menor ao composto. Dessa forma, o dano dessa interação entre o antimicrobiano com a célula será menor do que o esperado (BERNIER; SURETTE, 2013). Com isso, é possível compreender que em situações de estresse, como alteração de pH, a expressão gênica é adaptada de forma a compensar aquela perturbação para que as bactérias naquele meio consigam sobreviver (HOMMAIS *et al.*, 2001). Visto que o metabolismo bacteriano tende a se ajustar em frente a efeitos negativos, como em concentrações subinibitórias de antibióticos, as mudanças transcricionais não podem ser desconsideradas nesses casos (GOH *et al.*, 2002).

O antraceno é utilizado de várias formas, como em sua oxidação para a formação de antraquinona que, por sua vez, é um intermediário na produção de corantes, no desenvolvimento de diodos orgânicos emissores de luz e de polímeros para detectores (CONOVER; GIBBS, 1919; HUANG; SU; TIAN, 2012; DAMME; PREZ, 2018). Entretanto, este composto por si só não tem efeito antimicrobiano em *E. coli*, como apontado em Kim, Jeong e Lee (2009). Em contrapartida, no estudo de Prakash e colaboradores (2018), compostos baseados em antraceno apresentaram CIM tanto contra *E. coli*, com menor concentração de 6,25 µg/mL, como contra *S. aureus*, com valores de até 3,12 µg/mL. Em Dardeer, Taha e Elamary (2020), com derivados heterocíclicos de antraceno, os menores valores para CIM e CBM em *E. coli* foram de 0,636 mg/mL; e para *S. aureus* de 0,159 mg/mL.

As classificações dos complexos de rutênios se baseiam na função que o íon rutênio pode assumir, e estão divididos da seguinte forma: estrutural, em que o rutênio da forma ao composto ativo; carreador, em que os íons de rutênio funcionam como carreador para o fármaco ativo; funcional, em que a atividade antimicrobiana do composto é mediada pelos íons de rutênio diretamente aos alvos biológicos; fotoativado, em que o composto é ativado somente sob iluminação e pode atuar como fotossensibilizador (SOUTHAM *et al.*, 2017); e catalisador, em que o complexo metálico se comporta como um agente catalítico (SOLDEVILA-BARREDA; METZLER-NOLTE, 2019; ANTHONY *et al.*, 2020). Dentre os mecanismos de ação propriamente ditos, alguns exemplos são: ligação de forma reversível ou irreversível ao DNA e RNA por intercalação (ZEGLIS; PIERRE; BARTON, 2007; GILL; THOMAS, 2012), ativação do complexo via hidrólise, ativação redox (geração de espécies reativas de oxigênio), troca de ligantes (ANTHONY *et al.*, 2020; MUNTEANU; UIVAROSI, 2021), entre outros.

No tocante atividade antibacteriana dos complexos de rutênio, na literatura relata atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas testadas no estudo em questão, exceto *E. coli* ATCC 11303, com valores que variam de 0,5 até valores maiores que 500 µg/mL (LI *et al.*, 2011; LI; COLLINS; KEENE, 2015; SOUSA, 2019; SOUSA *et al.*, 2020). Dessa forma, como tanto o antraceno e os complexos de rutênio tem atividade antimicrobiana comprovadas na literatura, a presença de antraceno na estrutura química do complexo contribuiu para o efeito antibacteriano do composto, visto que o mesmo teve efeito sobre bactérias Gram-positivas e, também, para Gram-negativa.

O estudo de Oliveira *et al.* (2020) em que foi utilizado um complexo de rutênio ligado a antraceno, apresentou valores diferentes de CBM sob a ação de luz UV (7,8 µg/mL) e sem ação da luz UV (15,5 µg/mL) para *S. aureus* ATCC 25923, e ambos mostraram resultados menores que o encontrado neste trabalho (15,6 µg/mL). Oliveira e colaboradores (2020), obtiveram valores de CIM e CBM de 125 µg/mL sem luz UV e de 31,25 µg/mL com luz UV, diferindo dos resultados deste presente estudo, que apresentou valores de 62,5 e 125 µg/mL para CIM e CBM, respectivamente. Dessa forma, os valores para o teste com UV foram menores, ou seja, a cepa de *S. epidermidis* em questão se mostrou mais sensível ao composto sob luz UV do que sem, mostrando que o complexo de rutênio com antraceno de Oliveira *et al.* (2020) foi mais eficaz nesse sentido. Além disso, no estudo supracitado, não houve atividade antimicrobiana contra *E. coli* ATCC 11303, enquanto que neste presente trabalho o complexo utilizado contra esta mesma cepa apresentou atividade antimicrobiana, ou seja, CIM e CBM, de 125 e 250 µg/mL, respectivamente.

No estudo de Abreu *et al.* (2017), em que também foi utilizado um complexo de rutênio ligado ao antraceno, os resultados de CIM e de CBM para *S. aureus* ATCC 25923 foram de 6,4 µg/mL para ambos sob a ação de luz ultravioleta (UV). Sem a ação da luz UV, o resultado de CBM foi maior (12,8 µg/mL). Ainda assim, os resultados foram menores em comparação aos apresentados neste trabalho: 7,8 µg/mL para CIM e 15,6 µg/mL para CBM. Em relação a *S. epidermidis* ATCC 12228, os valores para CIM e CBM com luz UV foi de 25,6 µg/mL para ambos, e 102 µg/mL sem luz UV para ambos, sendo valores maiores do que os encontrados para a mesma cepa neste estudo, que foi de 15,6 µg/mL para CIM e CBM. O estudo anteriormente citado também não encontrou atividade contra *E. coli* ATCC 11303, ao contrário deste presente trabalho, em que o complexo testado apresentou ação antibacteriana, como também antibiofilme, contra a cepa em questão.

6 CONCLUSÃO

Através dos resultados, foi demonstrado que o composto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ teve tanto atividade antimicrobiana quanto antibiofilme para todas as cepas testadas. Desta forma, presume-se que este complexo pode vir a ser uma molécula potencial, visando sua utilização como agente antimicrobiano, tendo seu efeito sobre a forma planctônica, e também a formação de biofilmes bacterianos de *Staphylococcus* e *E. coli*, o composto poderia, ainda, auxiliar a síntese de novos agentes antimicrobianos de interesse clínico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. D.; PAULO, T. F.; GEHLEN, M. H.; ANDO, R. A.; LOPES, L. G. F.; GONDIM, A. C. S.; VASCONCELOS, M. A.; TEIXEIRA, E. H.; SOUSA, E. H. S.; de CARVALHO, I. M. M. Aryl-Substituted Ruthenium(II) Complexes: A Strategy for Enhanced Photocleavage and Efficient DNA Binding. **Inorganic Chemistry**, p. 56, n. 15, p. 9084-9096, ago. 2017. DOI 10.1021/acs.inorgchem.7b01108.

ÁGUILA-ARCOS, S.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, I.; GARAIYURREBASO, O.; GARBISU, C.; GROHMANN, E.; ALKORTA, I. Biofilm-Forming Clinical *Staphylococcus* Isolates Harbor Horizontal Transfer and Antibiotic Resistance Genes. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2018, p. 1-12, out. 2017. DOI 10.3389/fmicb.2017.02018.

AL-TAWFIQ, J. A.; TAMBYAH, P. A. Healthcare associated infections (HAI) perspectives. **Journal of Infection and Public Health**, v. 7, n. 4, p. 339-344, jul-ago. 2014. DOI 10.1016/j.jiph.2014.04.003.

ANDRADE, A. L. **Atividade antibacteriana, antibiofilme e o efeito combinado a antibióticos de complexos de rutênio do tipo cis-[RuCl₂(dppb)(NN-R)]²⁺ sobre bactérias resistentes e o efeito destes combinados aos antibióticos ampicilina e tetraciclina.** 2018. 102 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

ANTHONY, E. J.; BOLITHO, E. M.; BRIDGEWATER, H. E.; CARTER, O. W. L.; DONNELLY, J. M.; IMBERTI, C.; LANT, E. C.; LERMYTE, F.; NEEDHAM, R. J.; PALAU, M.; SADLER, P. J.; SHI, H.; WANG, F.; ZHANG, W.; ZHANG, Z. Metallodrugs are unique: opportunities and challenges of discovery and development. **Chemical Science**, v. 11, n. 48, p. 12888-12917, dez. 2020. DOI 10.1039/d0sc04082g.

APPELT, P. **Síntese, caracterização e atividade biológica de complexos de rutênio (II) contendo ligantes tiazolinas.** 2017. 235 p. Tese. (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P.; MONTANARO, L.; COSTERTON, J. W. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 5967-5982, set. 2012. DOI 10.1016/j.biomaterials.2012.05.031.

ASLAM, B.; WANG, W.; ARSHAD, M. I.; KHURSHID, M.; MUZAMMIL, S.; RASOOL, M. H.; NISAR, M. A.; ALVI, R. F.; ASLAM, M. A.; QAMAR, M. U.; SALAMAT, M.; BALOCH, Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 1645-1658, out. 2018. DOI 10.2147/IDR.S173867.

AWOKE, N.; KASSA, T.; TESHAGER, L. Magnitude of Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance Pattern of Bacteria Isolated from Urinary Catheterized Inpatients of Jimma University Medical Center, Southwest Ethiopia. **International Journal of Microbiology**, v. 2019, n. 5729568, p. 1-9, feb. 2019. DOI 10.1155/2019/5729568.

BELMEHDI, O.; BOUYAHYA, A.; JEKŐ, J.; CZIÁKY, Z.; ZENGİN, G.; SOTKÓ, G.; EL BAABOUA, A.; SENHAJI, N. S.; ABRINI, J. Synergistic interaction between propolis extract, essential oils, and antibiotics against *Staphylococcus epidermidis* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Secondary Metabolite**, v. 8, n. 3, p. 195-213, set. 2021. DOI 10.21448/ijsm.947033.

BENITES, N. R.; HORA, A. S.; MELLO, P. L.; LAES, M. A.; BRANDAO, P. E.; MELVILLE, P. A.; ZUNIGA, E. Genotypic evaluation of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine clinical mastitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, n. 02, p. 302-310, mar-abr. 2021. DOI 10.1590/1678-4162-11984.

BERNIER, S. P.; SURETTE, M. G. Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 20, p. 1-14, fev. 2013. DOI 10.3389/fmicb.2013.00020.

BOCÉ, M.; TASSÉ, M.; MALLET-LADEIRA, S.; PILLET, F.; DA SILVA, C.; VICENDO, P.; LACROIX, P. G.; MALFANT, I.; ROLS, M.-P. Effect of *trans*(NO, OH)-[RuFT(Cl)(OH)NO](PF₆) ruthenium nitrosyl complex on methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **Scientific Reports**, v. 9, p. 4867, mar. 2019. DOI 10.1038/s41598-019-41222-0.

BOUVET, C.; GJONI, S.; ZENELAJ, B.; LIPSKY, B. A.; HAKKO, E.; UÇKAY, I. *Staphylococcus aureus* soft tissue infection may increase the risk of subsequent staphylococcal soft tissue infections. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 60, p. 44-48, jul. 2017. DOI 10.1016/j.ijid.2017.05.002.

BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1340, mar. 2020. DOI 10.3390/molecules25061340.

BROWN, M. M.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus epidermidis*—Skin friend or foe?. **Plos Pathogens**, v. 16, n. 11, p. e1009026, 12 nov. 2020. DOI 10.1371/journal.ppat.1009026.

BRYERS, J. D. Medical Biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 1-18, mai, 2008. DOI 10.1002/bit.21838.

BURMEISTER, H.; DIETZE, P.; PREU, L.; BANDOW, J. E.; OTT, I. Evaluation of Ruthenium(II) N-Heterocyclic Carbene Complexes as Antibacterial Agents and Inhibitors of Bacterial Thioredoxin Reductase. **Molecules**, v. 26, n. 14, p. 4282, 15 jul. 2021. DOI 10.3390/molecules26144282.

CAIAZZA, N. C.; O'TOOLE, G. A. SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 14, p. 4476-85, jul. 2004. DOI 10.1128/JB.186.14.4476-4485.2004.

CECIL, A.; OHLSSEN, K.; MENZEL, T.; FRANÇOIS, P.; SCHRENZEL, J.; FISCHER, A.; DÖRRIES, K.; SELLE, M.; LALK, M.; HANTZSCHMANN, J.; DITTRICH, M.; LIANG, C.; BERNHARDT, J.; ÖLSCHLÄGER, T. A.; BRINGMANN, G.; BRUHN, H.; UNGER, M.; PONTE-SUCRE, A.; LEHMANN, L.; DANDEKAR, T. Modelling antibiotic and

cytotoxic isoquinoline effects in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and mammalian cells. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 1, p. 96-109, jan. 2015. DOI 10.1016/j.ijmm.2014.11.006.

CERI, H.; OLSON, M. E.; STREMICK, C.; READ, R. R.; MORCK, D.; BURET, A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1771-1776, jun. 1999. DOI 10.1128/JCM.37.6.1771-1776.1999.

CHEUNG, G. Y. C.; RIGBY, K.; WANG, R.; QUECK, S. Y.; BRAUGHTON, K. R.; WHITNEY, A. R.; TEINTZE, M.; DELEO, F. R.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* Strategies to Avoid Killing by Human Neutrophils. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 10, p. e1001133, out. 2010. DOI 10.1371/journal.ppat.1001133.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRETT, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of clinical microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, dez. 1985. DOI 10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985.

CHUNG, P. Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. **FEMS Microbiol Letters**, v. 363, n. 20, p. fnw219, out. 2016. DOI 10.1093/femsle/fnw219.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Method for Dilution Antibacterial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**: Approved Standard – 10th ed., M07-A10, Pennsylvania 19087 USA, 2015.

COGEN, A. L.; NIZET, V.; GALLO, R. L. Skin microbiota: a source of disease or defence? **British Journal of Dermatology**, v. 158, n. 3, p. 442-455, mar. 2008. DOI 10.1111/j.1365-2133.2008.08437.x.

CONOVER, C.; GIBBS, H. D. **Process for the Manufacture of Anthraquinone**. Depositante: United States Patent Office. U. S. Patent 1,303,168. Depósito: 7 junho 1917. Concessão: 6 maio 1919. Disponível em: <<https://patentimages.storage.googleapis.com/35/ff/f7/6f90c842f18c49/US1303168.pdf>>. Acesso em: 21 dez. 2021.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, mai. 1999. DOI 10.1126/science.284.5418.1318.

DAMME, J. V; DU PREZ, F. D. Anthracene-containing polymers toward high-end applications. **Progress in Polymer Science**, v. 82, p. 92-119, jul. 2018. DOI 10.1016/j.progpolymsci.2018.02.002.

DARDEER, H. M.; TAHA, A. G.; ELAMARY, R. B. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Evaluation of Some Novel Anthracene Heterocycles Derivatives. Journal of Heterocyclic Chemistry. **Journal of Molecular Structure**, v. 57, n. 11, p. 3951-3930, nov. 2020. DOI 10.1080/00397911.2011.580199.

DAS, B.; MANDAL, D.; DASH, S. K.; CHATTOPADHYAY, S.; TRIPATHY, S.; DOLAI, D. P.; DEY, S. K.; ROY, S. Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage-Associated Antibacterial Activity Against Clinically Isolated Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Infectious diseases**, v. 9, p. 11-19. 2016. DOI 10.4137/IDRT.S31741.

DEBBAB, A.; ALY, A. H.; EDRADA-EBEL, R.; WRAY, V.; PRETSCH, A.; PESCIPELLI, G.; KURTAN, T.; PROKSCH, P. New Anthracene Derivatives - Structure Elucidation and Antimicrobial Activity. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2012, n. 7, p. 1351-1359, mar. 2012. DOI 10.1002/ejoc.201101442.

DEVA, A. K.; ADAMS, W. P.; VICKERY, K. The Role of Bacterial Biofilms in Device-Associated Infection. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 132, n. 5, p. 1319-1328, nov. 2013. DOI 10.1097/PRS.0b013e3182a3c105.

DODOU, H. V. **Atividade antimicrobiana da violaceína sobre *Staphylococcus epidermidis***. 2017. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 277-281, mar-abr. 2001. DOI 10.3201/eid0702.010226.

DUCEL, G.; FABRY, J.; NICOLLE, L.; (Ed.). **Prevention of hospital-acquired infections: a practical guide**. 2 ed. [S.l]: [s.n], p. 72. 2002. Disponível em: < <https://www.who.int/csr/resources/publications/whocdscsreph200212.pdf> >. Acesso em: 4 dez. 2021.

DWYER, F.P.; GYARFAS, E.C.; ROGERS, W.P.; KOCH, J.H. Biological Activity of Complex Ions. **Nature**, v. 170, p. 190-191, ago. 1952. DOI 10.1038/170190a0.

EL-HALFAWY, O. M.; VALVANO, M. A. Antimicrobial Heteroresistance: an Emerging Field in Need of Clarity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 191207, jan. 2015. DOI 10.1128/cmr.00058-14.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). **Healthcare-associated infections acquired in intensive care units: annual epidemiological report for 2017**. Stockholm: ECDC, 2019. 13 p.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623-633, ago. 2010. DOI 10.1038/nrmicro2415.

FORTALEZA, C. M. C. B.; PADOVEZE, M. C.; KIFFER, C. R. V.; BARTH, A. L.; CARNEIRO, I. C. R. S.; GIAMBERARDINO, H. I. G.; RODRIGUES, J. L. N.; SANTOS FILHO, L.; DE MELLO, M. J. G.; PEREIRA, M. S.; GONTIJO FILHO, P.; DE MEDEIROS, E. A. S.; ROCHA, M.; PIGNATARI, A. C. C. Multistate survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 96, n. 2, p. 139-144, jun. 2017. DOI 10.1016/j.jhin.2017.03.024.

GHOSH, S.; AMARIEI, G.; MOSQUERA, M. E. G.; ROSAL, R. Polymeric Ruthenium Precursor as a Photoactivated Antimicrobial Agent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402, p. 123788, jan. 2021. DOI 10.1016/j.jhazmat.2020.123788.

GHOTASLOU, R.; BAHARI, Z.; ALILOO, A.; GHOLIZADEH, P.; ESHLAGHI, B. S. The in vitro effects of silver nanoparticles on bacterial biofilms. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 6, n. 4, p. 1077-1080, fev-mar. 2017. DOI 10.15414/jmbfs.2017.6.4.1077-1080.

GILL, M. R.; THOMAS, J. A. Ruthenium(ii) polypyridyl complexes and DNA—from structural probes to cellular imaging and therapeutics. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 8, p. 3179-3192, abr. 2012. DOI 10.1039/c2cs15299a.

GOH, E. B.; YIM, G.; TSUI, W.; MCCLURE, J.; SURETTE, M. G.; DAVIES, J. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 26, p. 17025-30, dez. 2002. DOI 10.1073/pnas.252607699.

GORLE, A. K.; FETERL, M.; WARNER, J. M.; PRIMROSE, S.; CONSTANTINOIU, C. C.; KEENE, F. R.; COLLINS, J. G. Mononuclear Polypyridylruthenium(II) Complexes with High Membrane Permeability in Gram-Negative Bacteria - in particular *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemistry - A European Journal**, v. 21, n. 29, p. 10472-10481, jul. 2015. DOI 10.1002/chem.201500385.

HANSEN, A. M.; KJELDSEN, G.; SOLLID, J. U. Local variants of Staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer?. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 285-296, jan. 2004. DOI 10.1128/AAC.48.1.285-296.2004.

HINSA, S. M.; ESPINOSA-URGEL, M.; RAMOS, J. L.; O'TOOLE, G. A. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 905-918, ago. 2003. DOI 10.1046/j.1365-2958.2003.03615.x.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S.; FUKUCHI, Y.; KOBAYASHI, I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **The Lancet**, v. 350, n. 9092, p. 1670-1673, dez. 1997. DOI 10.1016/S0140-6736(97)07324-8.

HOMMAIS, F.; KRIN, E.; LAURENT-WINTER, C.; SOUTOURINA, O.; MALPERTUY, A.; LE CAER, J. P.; DANCHIN, A.; BERTIN, P. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. **Molecular Microbiology**, v. 40, n.1, p. 20-36, abr. 2001. DOI 10.1046/j.1365-2958.2001.02358.x.

HUANG, J.; SU, J.-H.; TIAN, H. The development of anthracene derivatives for organic light-emitting diodes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 10977-10989, jun. 2012. DOI 10.1039/C2JM16855C.

- HUSE, H. K.; KWON, T.; ZLOSIK, J. E.; SPEERT, D. P.; MARCOTTE, E. M.; WHITELEY, M. *Pseudomonas aeruginosa* enhances production of a non-alginate exopolysaccharide during long-term colonization of the cystic fibrosis lung. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82621, dez. 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0082621.
- JACKSON, D. W.; SUZUKI, K.; OAKFORD, L.; SIMECKA, J. W.; HART, M. E.; ROMEO, T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 1, p. 290-301, jan. 2002. DOI 10.1128/JB.184.1.290-301.2002.
- KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: a guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300-305, jul-set. 2017. DOI 10.4103/joacp.JOACP_349_15.
- KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 478-482, mai 2017. DOI 10.1016/j.apjtb.2017.01.019.
- KHELISSA, S.; EL FANNASSI, Y.; MECHMECHANI, S.; ALHUTHALI, S.; EL AMRANI, M. A.; GHARSALLAOUI, A.; BARRAS, A.; CHIHIB, N-E. Water-Soluble Ruthenium (II) Complex Derived From Optically Pure Limonene and Its Microencapsulation Are Efficient Tools Against Bacterial Food Pathogen Biofilms: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, and *Listeria monocytogenes*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. 711326, p. 1-12, nov. 2021. DOI 10.3389/fmicb.2021.711326.
- KIM, M. G.; JEONG, E. Y.; LEE, H. S. Antimicrobial effects of anthracene and its derivatives against intestinal bacteria. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, p. 52, p. 327-330, ago. 2009. DOI 10.3839/jksabc.2009.058.
- KLAIMANEE, E.; NHUKEAW, T.; SAITHONG, S.; RATANAPHAN, A.; PHONGPAICHIT, S.; TANTIRUNGROTECHAI, Y.; LEESAKUL, N. Half-sandwich ruthenium (II) p-cymene complexes based on organophosphorus ligands: structure determination, computational investigation, in vitro antiproliferative effect in breast cancer cells and antimicrobial activity. **Polyhedron**, v. 204, p. 115244, ago. 2021. DOI 10.1016/j.poly.2021.115244.
- KOO, H.; ALLAN, R. N.; HOWLIN, R. P.; STOODLEY, P.; HALL-STOODLEY, L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 740-755, dez. 2017. DOI 10.1038/nrmicro.2017.99.
- KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial Biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, p. a010306, 1 abr. 2013. DOI 10.1101/cshperspect.a010306.
- KOVACS, B.; LE GALL-DAVID, S.; VINCENT, P.; LE BARS, H.; BUFFET-BATAILLON, S.; BONNAURE-MALLET, M.; JOLIVET-GOUGEON, A. Is biofilm formation related to the hypermutator phenotype in clinical *Enterobacteriaceae* isolates?. **FEMS Microbiology Letters**, v. 347, n. 2, p. 116-122, out. 2013. DOI 10.1111/1574-6968.12229.

LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, A. K. M.; WERTHEIM, H. F. L.; SUMPRADIT, N.; VLIEGHE, E.; HARA, G. L.; GOULD, I. M.; GOOSSENS, H. Antibiotic resistance—the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, dez. 2013. DOI 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.

LAZZAROTTO, C. **Formação de biofilme de Staphylococcus epidermidis isolado de cateter venoso central através de métodos fenotípicos e genotípicos**. 2010. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LEBEAUX, D.; CHAUHAN, A.; RENDUELES, O.; BELOIN, C. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. **Pathogens**, v. 2, n. 2, p. 288-356, jun. 2013. DOI 10.3390/pathogens2020288.

LEBEAUX, D.; GHIGO, J-M.; BELOIN, C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 3, p. 510-543, set. 2014. DOI 10.1128/MMBR.00013-14.

LEWIS, K. Persister Cells and the Riddle of Biofilm Survival. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 2, 2005, p. 267-274, fev. 2005. DOI 10.1007/s10541-005-0111-6.

LIAO, X.; HUANG, B.; JIANG, G.; JIANG, G.; LIN, X.; XIONG, Y.; DUAN, X.; WANG, J. Investigation of Antibacterial Activity Against *Staphylococcus Aureus* Of Ruthenium(II) Complexes Containing Furan-Substituted Ligands. **Social Science Research Network**, fev. 2021. DOI 10.2139/ssrn.3782143.

LI, F.; COLLINS, J. G.; KEENE, F. R. Ruthenium complexes as antimicrobial agents. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 8, p. 2529-2542, abr. 2015. DOI 10.1039/c4cs00343h.

LI, F.; MULYANA, Y.; FETERL, M.; WARNER, J. M.; COLLINS, J. G.; KEENE, F. R. The antimicrobial activity of inert oligonuclear polypyridylruthenium(ii) complexes against pathogenic bacteria, including MRSA. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 18, p. 5032, mai. 2011. DOI 10.1039/c1dt10250h.

LIU, J-Y.; DICKTER, J. K. Nosocomial Infections. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 637-652, out. 2020. DOI 10.1016/j.giec.2020.06.001.

LIU, X.; SUN, B.; KELL, R. E. M.; SOUTHAM, H. M.; BUTLER, J. A.; LI, X.; POOLE, R. K.; KEENE, F. R.; COLLINS, J. G. The Antimicrobial Activity of Mononuclear Ruthenium(II) Complexes Containing the dpdz Ligand. **Chempluschem**, v. 83, n. 7, p. 643-650, jul. 2018. DOI 10.1002/cplu.201800042.

MAGANA, M.; SERETI, C.; IOANNIDIS, A.; MITCHELL, C. A.; BALL, A. R.; MAGIORKINIS, E.; CHATZIPANAGIOTOU, S.; HAMBLIN, M. R.; HADJIFRANGISKOU, M.; TEGOS, G. P. Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 3, p. e00084-16, jul. 2018. DOI 10.1128/CMR.00084-16.

MAHMOOD, K.; TAHIR, M.; JAMEEL, T.; ZIAUDDIN, A.; ASLAM, H. F. Incidence of Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Causing Nosocomial Infection in a Tertiary Care Hospital. **Annals of King Edward Medical University**, v. 16, n. 2, p. 91, out. 2010. DOI 10.21649/akemu.v16i2.188.

MALONE, M.; GOERES, D. M.; GOSBELL, I.; VICKERY, K.; JENSEN, S.; STOODLEY, P. Approaches to biofilm-associated infections: the need for standardized and relevant biofilm methods for clinical applications. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 15, n. 2, p. 147-156, fev. 2017. DOI 10.1080/14787210.2017.1262257.

MEHLIN, C.; HEADLEY, C. M.; KLEBANOFF, S. J. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 6, p. 907-918, mar. 1999. DOI 10.1084/jem.189.6.907.

MINARDI, D.; CIRIONI, O.; GHISELLI, R.; SILVESTRI, C.; MOCCHEGIANI, F.; GABRIELLI, E.; D'ANZEO, G.; CONTI, A.; ORLANDO, F.; RIMINI, M.; BRESCINI, L. Efficacy of tigecycline and rifampin alone and in combination against *Enterococcus faecalis* biofilm infection in a rat model of ureteral stent. **Journal of Surgical Research**, v. 176, n. 1, p. 1-6, jul. 2012. DOI 10.1016/j.jss.2011.05.002.

MUNTEANU, A.-C.; UIVAROSI, V. Ruthenium Complexes in the Fight against Pathogenic Microorganisms. An Extensive Review. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 874, jun. 2021. DOI 10.3390/pharmaceutics13060874.

NAGARJUNA, D.; MITTAL, G.; DHANDA, R. S.; VERMA, P. K.; GAIND, R.; YADAV, M. Faecal *Escherichia coli* isolates show potential to cause endogenous infection in patients admitted to the ICU in a tertiary care hospital. **New Microbes and New Infections**, v. 7, p. 57-66, set. 2015. DOI 10.1016/j.nmni.2015.05.006.

NAMIECIŃSKA, E.; SADOWSKA, B.; WIĘCKOWSKA-SZAKIEL, M.; DOŁĘGA, A.; PASTERNAK, B.; GRAZUL, M.; & BUDZISZ, E. Anticancer and antimicrobial properties of novel η^6 -p-cymene ruthenium(ii) complexes containing a N,S-type ligand, their structural and theoretical characterization. **RSC Advances**, v. 9, n. 66, p. 38629-38645, nov. 2019. DOI 10.1039/C9RA08736B.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. **American Journal of Infection Control**, v. 32, n. 8, p. 470-485, dez. 2004. DOI 10.1016/j.ajic.2004.10.001.

NEOPANE, P.; NEPAL, H. P.; SHRESTHA, R.; UEHARA, O.; ABIKO, Y. In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. **International Journal of General Medicine**, v. 11, p. 25-32, jan. 2018. DOI 10.2147/IJGM.S153268.

NOURI, F.; KARAMI, P.; ZAREI, O.; KOSARI, F.; ALIKHANI, M. Y.; ZANDKARIMI, E.; REZAZADEH ZARANDI, E.; TAHERI, M. Prevalence of Common Nosocomial Infections and Evaluation of Antibiotic Resistance Patterns in Patients with Secondary Infections in

Hamadan, Iran. **Infection and drug resistance**, v. 13, p. 2365-2374, jul. 2020. DOI 10.2147/IDR.S259252.

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

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm Formation as Microbial Development. **Annual Review of Microbiology**, p. 54, n. 1, p. 49-79, out. 2000. DOI 10.1146/annurev.micro.54.1.49.

OLIVEIRA, D. C., TOMASZ, A., de LENCASTRE, H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infectious diseases**, v. 2, n. 3, p. 180-189, mar. 2002. DOI 10.1016/s1473-3099(02)00227-x.

OLIVEIRA, G. de F. S.; GOUVEIA, F. S.; PINHEIRO, A. de A.; NETO, L. G. do N.; de VASCONCELOS, M. A.; TEIXEIRA, E. H.; GONDIM, A. C. S.; LOPES, L. G. de F.; CARVALHO, I. M. M. de; SOUSA, E. H. S. An anthracene-pendant ruthenium(ii) complex conjugated to a biotin anchor, an essential handle for photo-induced anti-cancer activity. **New Journal of Chemistry**, v. 44, n. 16, p. 6610-6622, abr. 2020. DOI 10.1039/D0NJ00209G.

OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 877-886, mai. 2015. DOI 10.1007/s10096-015-2323-z.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis*: a major player in bacterial sepsis?. **Future Microbiology**, v. 12, n. 12, p. 1031-1033, set. 2017. DOI 10.2217/fmb-2017-0143.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. **Nature reviews Microbiology** v. 7, n. 8, p. 555-67, ago. 2009. DOI 10.1038/nrmicro2182.

OTTO, Michael. *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. **Expert Review of Dermatology**, v. 5, n. 2, p. 183-195, abr. 2010. DOI 10.1586/edm.10.6.

PELEG, Anton Y.; HOOPER, David C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804-1813, mai. 2010. DOI 10.1056/Nejmra0904124.

PETROVA, O. E.; SAUER, K. Sticky Situations: key components that control bacterial surface attachment. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 10, p. 2413-2425, mai. 2012. DOI 10.1128/JB.00003-12.

PRAKASH, G.; BOOPATHY, M.; SELVAM, R.; JOHNSANTHOSH KUMAR, S.; SUBRAMANIAN, K. The effect of anthracene-based chalcone derivatives in the resazurin dye reduction assay mechanisms for the investigation of Gram-positive and Gram-negative bacterial and fungal infection. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 1037-1045, jan. 2018. DOI 10.1039/C7NJ04125J.

QU, Y.; DALEY, A. J.; ISTIVAN, T. S.; ROUCH, D. A.; DEIGHTON, M. A. Densely adherent growth mode, rather than extracellular polymer substance matrix build-up ability,

contributes to high resistance of *Staphylococcus epidermidis* biofilms to antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 7, p. 1405-1411, jul. 2010. DOI 10.1093/jac/dkq119.

RAAD, I., ALRAHWAN, A., ROLSTON, K. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. **Clinical infectious diseases**, v. 26, n. 5, p. 1182-1187, mai. 1998. DOI 10.1086/520285.

RAHMANI, A.; MERADI, L.; MALAWI, K.; KHANFOUF, F. Phenotypic characterization of antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* strains isolated from various community infections in Oum El Bouaghi city, Algeria. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 22, n. 5, p. 2665-2671, mai. 2021. DOI 10.13057/biodiv/d220526.

RAMOS-VIVAS, J.; CHAPARTEGUI-GONZÁLEZ, I.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, M; *et al.* Biofilm formation by multidrug resistant *Enterobacteriaceae* strains isolated from solid organ transplant recipients. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 8928, 20 jun. 2019. DOI 10.1038/s41598-019-45060-y.

REVELAS, A. Healthcare - associated infections: A public health problem. **Journal of the Nigeria Medical Association**, v. 53, n. 2, p. 59-64, abr-jun. 2012. DOI 10.4103/0300-1652.103543.

RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**, v. 272, n. 6, p. 541-561, dez. 2012. DOI 10.1111/joim.12004.

SANTOS, A. L. dos; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C. de; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007. DOI 10.1590/S1676-24442007000600005.

SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M. K.; GROSSART, H-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Front Microbiol**, v. 4, n. 47, p. 1-13, mar. 2013. DOI 10.3389/fmicb.2013.00047.

SHARMA, D.; MISBA, L.; KHAN, A. U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 76, p. 1-10, mai. 2019. DOI 10.1186/s13756-019-0533-3.

SHULMAN, A.; DWYER, F. P. Metal chelates in biological systems. In: DWYER, F. P.; MELLOR, D. P. (Eds.). **Chelating Agents and Metal Chelates**. New York/London: Academic Press Inc., 1964. p. 383-435.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 5, p. a000414, 14 abr. 2010. DOI 10.1101/cshperspect.a000414.

SINGH, R.; RAY, P.; DAS, A.; & SHARMA, M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 9, p. 1955-1958, set. 2010. DOI 10.1093/jac/dkq257.

SOLDEVILA-BARREDA, J. J.; METZLER-NOLTE, N. Intracellular Catalysis with Selected Metal Complexes and Metallic Nanoparticles: Advances toward the Development of Catalytic Metallodrugs. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 2, p. 829-869, jan. 2019. DOI 10.1021/acs.chemrev.8b00493.

SOUSA, A. P. de; ELLENA, J.; GONDIM, A. C. S.; LOPES, L. G. F.; SOUSA, E. H. S.; VASCONCELOS, M. A. de; TEIXEIRA, E. H.; FORD, P. C.; HOLANDA, A. K. M. Antimicrobial activity of cis-[Ru(bpy)₂(L)(L')]ⁿ⁺ complexes, where L = 4-(4-chlorobenzoyl)pyridine or 4-(benzoyl)pyridine and L' = Cl⁻ or CO. **Polyhedron**, v. 144, p. 88-94, abr. 2018. DOI 10.1016/j.poly.2018.01.002.

SOUSA, A. P. de; GONDIM, A. C. S.; SOUSA, E. H. S.; VASCONCELOS, M. A. de; TEIXEIRA, E. H.; BEZERRA, B. P.; AYALA, A. P.; MARTINS, P. H. R.; LOPES, L. G. de F.; HOLANDA, A. K. M. An unusual bidentate methionine ruthenium(II) complex: photocaging and antimicrobial activity. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 419-428, 14 mar. 2020. DOI 10.1007/s00775-020-01772-5.

SOUSA, T. M. de. **Desenvolvimento e reatividade de Nitrosilo Complexos de Rutênio com possível ação antibacteriana**. 2019. 112 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

SOUTHAM, H. M.; BUTLER, J. A.; CHAPMAN, J. A.; POOLE, R. K. The Microbiology of Ruthenium Complexes. **Advances in Microbial Physiology**, v. 71, p. 1-96. 2017. DOI 10.1016/bs.ampbs.2017.03.001.

STEPANOVIĆ, S., VUKOVIĆ, D., DAKIĆ, I., SAVIĆ, B., ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, abr. 2000. DOI 10.1016/S0167-7012(00)00122-6.

TOYOFUKU, M.; INABA, T.; KIYOKAWA, T.; OBANA, N.; YAWATA, Y.; NOMURA, N. Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 7-12, 2 jan. 2016. DOI 10.1080/09168451.2015.1058701.

TURNER, N. A.; SHARMA-KUINKEL, B. K.; MASKARINEC, S. A.; EICHENBERGER, E. M.; SHAH, P. P.; CARUGATI, M.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203-218, abr. 2019. DOI 10.1038/s41579-018-0147-4.

UTSUI, Y.; YOKOTA, T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, n. 3, p. 397-403, set. 1985. DOI 10.1128/aac.28.3.397.

VASCONCELOS, M. A.; ARRUDA, F. V. S.; DE ALENCAR, D. B.; SAKER-SAMPAIO, S.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; DOS SANTOS, H. S.; BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; CAVADA, B. S.; HENRIQUES, M.; PEREIRA, M. O.; TEIXEIRA, E. H. Antibacterial and Antioxidant Activities of Derriobtusone A Isolated from *Lonchocarpus*

obtusus. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-9, jun. 2014. DOI 10.1155/2014/248656.

VERT, M.; DOI, Y.; HELLWICH, K.-H.; HESS, M.; HODGE, P.; KUBISA, P.; RINAUDO, M.; SCHUÉ, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 377-410, 11 jan. 2012. DOI 10.1351/PAC-REC-10-12-04.

WALTERS, M. C.; ROE, F.; BUGNICOURT, A.; FRANKLIN, M. J.; STEWART, P. S. Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 317-323, jan. 2003. DOI 10.1128/AAC.47.1.317-323.2003.

WANG, R.; BRAUGHTON, K. R.; KRETSCHMER, D.; BACH, T. H.; QUECK, S. Y.; LI, M.; KENNEDY, A. D.; DORWARD, D. W.; KLEBANOFF, S. J.; PESCHEL, A.; DELEO, F. R.; OTTO, M. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. **Nature Medicine**, v. 13, n. 12, p. 1510-1514, dez. 2007. DOI 10.1038/nm1656.

WERNER, E.; ROE, F.; BUGNICOURT, A.; FRANKLIN, M. J.; HEYDORN, A.; MOLIN, S.; PITTS, B.; STEWART, P. S. Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 6188-6196, out. 2004. DOI 10.1128/AEM.70.10.6188-6196.2004.

WILEY, L.; BRIDGE, D. R.; WILEY, L. A.; ODOM, J. V.; ELLIOTT, T.; OLSON, J. C. Bacterial biofilm diversity in contact lens-related disease: emerging role of *Achromobacter*, *Stenotrophomonas*, and *Delftia* biofilm diversity in contact lens-related disease. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 53, n. 7, p. 3896-3905, jun. 2012. DOI 10.1167/iovs.11-8762.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. Geneva: [S.n]. 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>. Acesso em: 15 nov. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide**. Geneva: WHO, 2011. 40 p.

ZEGLIS, B. M.; PIERRE, V. C.; BARTON, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chemical Communications**, n. 44, p. 4565, nov. 2007. DOI 10.1039/b710949k.

ZHANG, Y. Q.; REN, S. X.; LI, H. L.; WANG, Y. X.; FU, G.; YANG, J.; QIN, Z. Q.; MIAO, Y. G.; WANG, W. Y.; CHEN, R. S.; SHEN, Y.; CHEN, Z.; YUAN, Z. H.; ZHAO, G. P.; QU, D.; DANCHIN, A.; WEN, Y. M. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 1577-93, set. 2003. DOI 10.1046/j.1365-2958.2003.03671.x.

ZHAO, X.; WANG, L.; WEI, N.; ZHANG, J.; MA, W.; ZHAO, H.; HAN, X. Risk factors of health care-associated infection in elderly patients: a retrospective cohort study performed at

a tertiary hospital in China. **BMC Geriatrics**, v. 19, n. 1, jul. 2019. DOI 10.1186/s12877-019-1208-x.

ZHOU, W.; SPOTO, M.; HARDY, R.; GUAN, C.; FLEMING, E.; LARSON, P. J.; BROWN, J. S.; OH, J. Host-Specific Evolutionary and Transmission Dynamics Shape the Functional Diversification of *Staphylococcus epidermidis* in Human Skin. **Cell**, v. 180, n. 3, p. 454-470.E18, fev. 2020. DOI 10.1016/j.cell.2020.01.006.

ZIEBUHR, W.; HENNIG, S.; ECKART, M.; KRÄNZLER, H.; BATZILLA, C.; & KOZITSKAYA, S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, p. 14-20, ago. 2006. Suplemento 1. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2006.05.012.