



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

GABRIELI SOBRAL MONTEIRO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO COMPLEXO DE RUTÊNIO [Ru(phen)₂(bpy-
ant)]²⁺ CONTRA BACTÉRIAS ENVOLVIDAS EM INFECÇÕES RELACIONADAS À
ASSISTÊNCIA À SAÚDE**

FORTALEZA

2022

GABRIELI SOBRAL MONTEIRO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO COMPLEXO DE RUTÊNIO $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$
CONTRA BACTÉRIAS ENVOLVIDAS EM INFECÇÕES RELACIONADAS À
ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências 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)

M776a Monteiro, Gabrieli Sobral.

Atividade antimicrobiana do complexo de rutênio [Ru(phen)₂(bpy-ant)]²⁺ contra bactérias envolvidas em infecções relacionadas à assistência à saúde / Gabrieli Sobral Monteiro. – 2022. 52 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

GABRIELI SOBRAL MONTEIRO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO COMPLEXO DE RUTÊNIO [Ru(phen)₂(bpy-ant)]²⁺
CONTRA BACTÉRIAS ENVOLVIDAS EM INFECÇÕES RELACIONADAS À
ASSISTÊNCIA À SAÚDE

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira

Aprovada em: 14/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Me. Leonardo Silva de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guiou até aqui, que sempre esteve presente para mim e que me deu forças para continuar.

Aos meus pais, que sempre me compreenderam e me apoiaram em todas as minhas decisões e que também me dedicaram todo o amor e carinho que um pai e mãe poderiam dedicar a uma filha. Agradeço por estarem presentes em todos os momentos que precisei.

Ao meu irmão que, mesmo sem saber, é um dos pilares da minha vida, e que também sempre esteve disposto a me ajudar à sua maneira.

À minha família, que jamais deixou de me apoiar e acreditar em mim e sempre me incentivou a atingir o meu melhor.

Aos meus amigos, que são a minha segunda família, por terem me ajudado na minha caminhada, seja ela profissional ou pessoal, desde que nos conhecemos. Agradeço por existirem na minha vida, pois sem eles eu não seria quem sou e nem chegaria aonde cheguei.

Ao LIBS, a minha terceira família, que auxiliou na minha jornada na Ciência com conhecimento mas, acima de tudo, com muito acolhimento e compreensão. A todos os doutorandos, doutores, mestres e mestrandos do LIBS, agradeço não só como aluna mas como amiga, pois jamais esquecerei o quanto me ajudaram no meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço também aos ICs, com quem cresci junto, ensinei, e aprendi muita coisa. Me lembrarei sempre de todos eles.

Ao Prof. Me. Alexandre Lopes Andrade, por sempre se fazer presente e disposto a ajudar não só a mim mas todas as pessoas ao nosso redor, e por ser um verdadeiro exemplo para mim.

Ao Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira, por ter me permitido trabalhar junto a ele neste grupo de pesquisa incrível, por ter sido um orientador também incrível e por ter sido um grande mestre para mim.

À minha turma do curso de Biotecnologia, T8, que foram, são e sempre serão parte de mim e da minha trajetória de vida.

À todos que fizeram parte da minha trajetória de forma direta ou indireta, que me ajudaram seja com uma simples carona ou seja com todo um amparo emocional, pois todos agora fazem parte da minha história.

RESUMO

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) têm se tornado um grave problema nos últimos anos em razão da elevada morbidade e mortalidade atribuídas a estas, e um fator agravante disso é a crescente resistência antimicrobiana dos microrganismos que estão associados a tais infecções. Diante disso, os complexos de rutênio, cuja atividade antimicrobiana já foi relatada na literatura, se tornam uma alternativa aos medicamentos atuais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ contra as bactérias de importância clínica *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 (SARM), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e *Escherichia coli* ATCC 11303. Para avaliação da atividade antimicrobiana, analisou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), enquanto a atividade antibiofilme foi testada através do método de coloração com cristal violeta (CV) da biomassa para quantificação e através da enumeração de células viáveis, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os testes foram realizados em placas de microtitulação em concentrações que variaram de 1,9 $\mu\text{g/mL}$ a 125 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados de CIM e CBM variaram de 7,8 a 125 $\mu\text{g/mL}$. *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentou os menores valores de CIM e CBM dentre todas as cepas, seguida por *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984, tendo estas duas últimas apresentado o mesmo valor de CBM. *E. coli* ATCC 11303 apresentou valor de CIM igual a *S. aureus* ATCC 25923, e não apresentou valor de CBM. Na quantificação de biomassa, as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis* obtiveram valores maiores de porcentagem de redução de biomassa (77 a 100%) quando comparadas à bactéria Gram-negativa *E. coli* (21 a 67%). Já na enumeração de células viáveis, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentaram uma maior redução do número de células viáveis quando comparadas a *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984, as quais apresentaram maior redução que *E. coli* ATCC 11303. Além das concentrações em que não houve redução do número de células viáveis, os valores de redução variaram de 0,2 a 7,71 logs, incluindo as concentrações mais altas em que não houve crescimento de UFCs. Logo, foi comprovado o potencial do complexo de rutênio no controle do crescimento microbiano e na inibição da formação de biofilmes.

Palavras-chave: IRAS; resistência antimicrobiana; biofilmes; complexo de rutênio.

ABSTRACT

Healthcare-associated infections (HAI) have become a serious problem in recent years due to the high morbidity and mortality attributed to them, and an aggravating factor is the increasing antimicrobial resistance of microorganisms that are associated with those infections. Given this scenario, ruthenium complexes, whose antimicrobial activity has already been reported in the literature, become an alternative to current drugs. The present study aimed to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of the $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ complex against the clinically important bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 and *Escherichia coli* ATCC 11303. To evaluate the antimicrobial activity, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were analyzed, while the antibiofilm activity was tested using the crystal violet (CV) staining method of the biomass for quantification and the enumeration of viable cells method by counting colony forming units (CFU). The tests were performed in microtiter plates at concentrations ranging from 1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Both MIC and MBC results ranged from 7.8 to 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *S. epidermidis* ATCC 12228 had the lowest values of MIC and MBC among all strains, followed by *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 and *S. epidermidis* ATCC 35984, and these last two presented the same value of MBC. *E. coli* ATCC 11303 presented MIC value equal to *S. aureus* ATCC 25923 and did not present MBC value. In the quantification of biomass, the Gram-positive bacteria *S. aureus* and *S. epidermidis* obtained higher values of percentage of biomass reduction (77 to 100%) when compared to the Gram-negative bacteria *E. coli* (21 to 67%). In the enumeration of viable cells, *S. aureus* ATCC 25923 and *S. epidermidis* ATCC 12228 presented a higher reduction in the number of viable cells when compared to *S. aureus* ATCC 700698 and *S. epidermidis* ATCC 35984, which presented higher values than *E. coli* ATCC 11303. In addition to concentrations in which there was no reduction in the number of viable cells, the values of reduction ranged from 0.2 to 7.71 logs, including the highest concentrations in which there was no growth of CFUs. Therefore, the potential of the ruthenium complex to control microbial growth and to inhibit the growth of biofilms was proven.

Keywords: HAI; antimicrobial resistance; biofilms; ruthenium complex.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estágios de desenvolvimento de biofilmes	18
Figura 2 – Estrutura química da 1,10-fenantrolina	20
Figura 3 – Fórmula estrutural do complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$	22
Figura 4 – Efeito do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ sobre a formação de biofilmes de <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>E. coli</i>	29
Figura 5 – Efeito do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ sobre as células viáveis no biofilme de <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>E. coli</i>	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito antimicrobiano do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ sobre o crescimento planctônico de <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>E. coli</i>	26
---	----

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
EPS	Extracellular Polymeric Substance
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
HAI	Healthcare-Associated Infections
ICSAC	Infecções da Corrente Sanguínea Associadas à Linha Central
CLABSI	Central Line-Associated Bloodstream Infections
ITUAC	Infecções do Trato Urinário Associadas a Cateteres
CAUTI	Catheter-Associated Urinary Tract Infections
PAVM	Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
VAP	Ventilator-Associated Pneumonia
ISC	Infecções de Sítio Cirúrgico
SSI	Surgical Site Infections
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
OMS	Organização Mundial da Saúde
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
MDRO	Multidrug-Resistant Organisms
RA	Resistência Antimicrobiana
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
eDNA	DNA extracelular
FEN	1,10-fenantrolina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
µg	Micrograma
nm	Nanômetro
µL	Microlitro
Log	Logaritmo
α	Alfa
δ	Delta
Ru	Rutênio
G	Força gravitacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS)	12
1.2	Resistência antimicrobiana	12
1.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14
1.5	<i>Escherichia coli</i>	15
1.6	Biofilmes	16
1.7	Complexos de rutênio	18
1.8	1,10-fenantrolina	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	METODOLOGIA	22
3.1	Obtenção, síntese e caracterização do complexo de rutênio	22
3.2	Microrganismos utilizados	22
3.3	Condições de cultivo	22
3.4	Determinação da atividade de [Ru(phen)₂(bpy-ant)]²⁺	23
3.4.1	<i>Determinação da atividade antimicrobiana</i>	23
3.4.1.1	<i>Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	23
3.4.1.2	<i>Concentração Bactericida Mínima (CBM)</i>	24
3.4.2	<i>Determinação da atividade antibiofilme</i>	24
3.4.2.1	<i>Quantificação de biomassa</i>	25
3.4.2.2	<i>Contagem de células viáveis</i>	25
3.4.3	<i>Análise estatística</i>	25
4	RESULTADOS	26
4.1	Atividade antimicrobiana	26
4.2	Atividade antibiofilme	27
4.2.1	<i>Inibição da formação de biofilmes</i>	27
4.2.2	<i>Enumeração de células viáveis</i>	29
5	DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÃO	41

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
---	-----------

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS)

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), do termo em inglês *healthcare-associated infections* (HAI), são também chamadas de infecções adquiridas em hospitais ou, mais comumente, de infecções nosocomiais. Estas infecções são adquiridas pelos pacientes em estabelecimentos de saúde, como hospitais e ambientes ambulatoriais, durante o processo de recebimento de cuidados da saúde, ou seja, são infecções que estavam ausentes no momento da admissão (SIKORA; ZARA, 2022). Alguns dispositivos médicos internos, como cateteres e ventiladores, geralmente estão associados a estas infecções, as quais incluem infecções da corrente sanguínea associadas à linha central (ICSAC, do inglês *central line-associated bloodstream infections* - CLABSI), infecções do trato urinário associadas a cateteres (ITUAC, do inglês *catheter-associated urinary tract infections* - CAUTI), pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM, do inglês *ventilator-associated pneumonia* - VAP) e infecções de sítio cirúrgico (ISC, do inglês *surgical site infections* - SSI) (CDC, 2014). Os pacientes com maior risco são os que estão em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), em unidades de queimados, os que estão submetidos a transplante de órgãos e os neonatos (KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017); especialmente, os pacientes de UTI são afetados de forma desproporcional em razão de comorbidades crônicas, de tratamentos intervencionistas mais agressivos e da frequente e intensa exposição a antibióticos (LIU; DICKTER, 2020). As IRAS têm se tornado um grave problema nos últimos anos em razão da elevada morbidade e mortalidade, além dos altos custos provenientes do longo período de hospitalização (KHAN; AHMAD; MEHBOOB, 2015). No Brasil, a prevalência dessas infecções em macrorregiões foi de 10,8% entre os anos de 2011 e 2013 (FORTALEZA *et al.*, 2017). A ocorrência de tais infecções foi ainda seriamente afetada pela pandemia de COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*), pois esta gerou um considerável aumento na incidência de IRAS (FRAM *et al.*, 2021; ADVANI *et al.*, 2021), principalmente de ICSACs (ADVANI *et al.*, 2021), e uma mudança do seu perfil microbiológico (FRAM *et al.*, 2021), com uma consequente contribuição destas infecções para os óbitos atribuídos a COVID-19 (BAKER *et al.*, 2021; VIEIRA, *et al.*, 2022).

1.2 Resistência antimicrobiana

As IRAS são relacionadas, de forma recorrente, a infecções resistentes a múltiplos antimicrobianos (MONEGRO; MUPPIDI; REGUNATH, 2022), que são infecções causadas por microrganismos resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDRO, sigla do inglês *multidrug-resistant organisms*). Essa resistência geralmente advém do uso indiscriminado de antibióticos como pesticidas para controlar doenças nas culturas e no tratamento de animais na pecuária, além da prescrição inadequada (CDC, 2019). Uma vez que os microrganismos estão sempre em evolução, eles eventualmente desenvolvem mecanismos de resistência que, conseqüentemente, os permitem sobreviver à exposição aos antibióticos, transmitindo assim os traços de resistência para as próximas gerações ou passando entre microrganismos por meio de elementos genéticos móveis e outros processos (CDC, 2019). Estes organismos são um fator significativo no aumento da mortalidade de infecções nosocomiais já que podem tornar as classes de antibióticos ineficazes no tratamento (JERNIGAN *et al.*, 2020; LIU; DICKTER, 2020). Mais de 2,8 milhões de infecções causadas por microrganismos resistentes a antibióticos ocorrem nos Estados Unidos a cada ano, acarretando a morte de mais de 35 mil pessoas por ano (CDC, 2019). Uma lista publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2017 apresentou quais microrganismos resistentes a antibióticos representam maior periculosidade à saúde humana, a fim de orientar e promover a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos; são alguns deles: *Enterobacteriales*, ou *Enterobacteriaceae* na antiga nomenclatura (resistente a carbapenem, de prioridade 1 - crítica), como *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* (resistente à metilina/ intermediário e resistente à vancomicina, de prioridade 2 - alta). Destes microrganismos, os causadores mais comuns de ICSAC são *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus aureus* (NOVOSAD *et al.*, 2020). Já o mais conhecido por causar CAUTI e PAVM é *Staphylococcus aureus* (BABCOCK *et al.*, 2003; FLORES-MEIRELES; HREHA; HUNSTAD, 2019), enquanto os responsáveis pelas ISCs incluem *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (SIEVERT *et al.*, 2013). Em 2019, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*) publicou um Relatório de Ameaças de Resistência Antimicrobiana (RA) com as últimas estimativas de morte e infecção para algumas bactérias e fungos resistentes a antibióticos nos EUA, incluindo também uma lista categorizada de microrganismos com base no nível de preocupação com a saúde; dos organismos citados anteriormente, os *Enterobacteriales* resistentes aos carbapenêmicos encontram-se como ameaça urgente, enquanto *Staphylococcus aureus* resistente à metilina é listada como ameaça séria.

1.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva coagulase-positiva (PINHEIRO, 2018) que possui forma de cocos, se organiza em aglomerados e apresenta colônias geralmente douradas ou amarelas, condição que faz alusão à sua nomenclatura (“aureus” significa dourado ou amarelo) (TAYLOR; UNAKAL, 2022). *S. aureus* é considerado um dos patógenos mais importantes e relevantes responsável por infecções hospitalares (KHAN; AHMAD; MEHBOOB, 2015), cujo tratamento se torna desafiador devido ao surgimento de cepas multirresistentes, como SARM (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - MRSA) (BOUCHER; COREY, 2008; WENZEL, 2007), a qual também apresenta uma maior virulência (WENZEL, 2007). Primeiramente relatada em meados de 1960 (JEVONS; COE; PARKER, 1963), a resistência à meticilina em cepas de *S. aureus* tornou-se bastante presente nas infecções hospitalares ao longo dos anos, sendo a SARM relacionada com mais de 60% dos isolados de infecções por *S. aureus* associadas aos cuidados de saúde que ocorreram em UTIs dos Estados Unidos em 2003, uma porcentagem maior quando comparada com anos anteriores (KLEVENS *et al.*, 2006). Já no ano de 2017, foram relatados cerca de 323.700 casos de infecções por SARM em pacientes hospitalizados nos Estados Unidos, com uma estimativa de 10.600 mortes, totalizando um custo equivalente a 1.7 bilhões de dólares (CDC, 2019). Além de ser causadora de infecções que estão envolvidas em uma maior morbidade e mortalidade (COSGROVE *et al.*, 2003), vale destacar que a *S. aureus* resistente à meticilina é resistente também a outros antibióticos, como oxacilina, penicilina e amoxicilina (CDC, 2019). *Staphylococcus aureus* também apresenta resistência a outros antibióticos, como resistência à vancomicina (CDC, 2019).

1.4 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis é uma bactéria Gram-positiva coagulase-negativa em forma de cocos que forma aglomerados (LEE; ANJUM, 2022). Este microrganismo costumava ser considerado apenas como um comensal inócuo na pele humana, porém atualmente ele é apresentado como um importante patógeno oportunista; investigações mais recentes identificaram determinantes moleculares específicos de *S. epidermidis* que facilitam sua evasão imune e a sua capacidade de causar doença crônica, sendo alguns destes determinantes muito provavelmente detentores de funções originais que estão associadas ao estilo de vida comensal não infeccioso desta bactéria (OTTO, 2009). Apesar de possuir poucos fatores de virulência, a atração

eletrostática a superfícies, como dispositivos médicos (RODRIGUES, 2013), é um fator extremamente pertinente pois, desta forma, o aumento do uso de dispositivos conduziu este microrganismo a emergir como um agente patogênico nosocomial considerável, principalmente em pacientes imunocomprometidos e hospitalizados por longos períodos de tempo, sendo capaz de causar infecções com significativa morbidade e mortalidade (MARTIN; PFALLER; WENZEL, 1989). É estimado que as infecções da corrente sanguínea causadas por microorganismos coagulase-negativos e originadas de infecções de cateter intravascular atinjam 250.000 casos por ano nos Estados Unidos, com uma taxa de mortalidade de 1 a 25% (OTTO, 2011). Um dos fatores cruciais que permite que *S. epidermidis* sobreviva em um ambiente hostil é a produção do biofilme (LEE; ANJUM, 2022), que está ligada a sua virulência (POTTER *et al.*, 2009) e desempenha papel central na capacidade de causar doenças por proteger a bactéria contra os efeitos de drogas antibacterianas e do sistema imunológico, estando associado à resistência dessa bactéria a múltiplas drogas (BÜTTNER; MACK; ROHDE, 2015; KLEINSCHMIDT *et al.*, 2015). Isolados de *Staphylococcus epidermidis* já exibiram resistência a diversos antibióticos conhecidos como meticilina, penicilina, cefalosporinas, eritromicina, entre outros (NNIS, 1999; UÇKAY *et al.*, 2009). Além disso, a capacidade de transferência lateral de genes e seu grande potencial de recombinação permitem que *S. epidermidis* seja capaz de evoluir e apresentar novas características de virulência e resistência (ZIEBUHR *et al.*, 2006).

1.5 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa Gram-negativa e oxidase-negativa (LIM; YOON; HOVDE, 2010), da família *Enterobacteriaceae* e da ordem *Enterobacterales* (CDC, 2019), responsável por várias doenças, como infecção do trato urinário, septicemia, pneumonia, meningite neonatal, peritonite e gastroenterite (KHAN; AHMAD; MEHBOOB, 2015). A maioria das cepas de *E. coli* coloniza de forma inofensiva o trato gastrointestinal de humanos como uma microbiota normal, porém algumas cepas evoluíram para *E. coli* patogênica ao adquirir fatores de virulência por meio de plasmídeos, transposons, bacteriófagos e/ou ilhas de patogenicidade (LIM; YOON; HOVDE, 2010), fato que condiz com estudos do pangenoma de *E. coli*, que indicam uma enorme capacidade de evolução deste microrganismo por aquisição de genes e modificação genética (BRAZ; MELCHIOR; MOREIRA, 2020). *E. coli* é a bactéria Gram-negativa que mais causa bacteremia (RODRIGUES, 2013); existem centenas de cepas de *E. coli* identificadas e apenas as combinações mais bem-sucedidas

de fatores de virulência persistiram para originar “patótipos” específicos de *E. coli*, ou seja, cepas de *E. coli* patogênica, que são capazes de causar doenças (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). As taxas de resistência reportadas para este organismo são de 55% para amoxicilina e ampicilina, 8% para cefuroxima 2% para cefotaxima, 6% para ciprofloxacina e 3% para gentamicina (RODRIGUES, 2013). Além disso, os *Enterobacteriales* também são resistentes a carbapenêmicos, um dos melhores antibióticos disponíveis para o tratamento de bactérias multirresistentes, sendo considerado a última linha de defesa para tratar infecções bacterianas multirresistentes (CDC, 2019; KHAN; AHMAD; MEHBOOB, 2015). De acordo com o Relatório de Ameaças de RA de 2019 elaborado pelo CDC, as infecções causadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamase de espectro estendido aumentaram em 50% em 2018 em comparação com 2015, com uma estimativa de cerca de 197.400 casos de infecção e 9.100 mortes em 2017 e custos de saúde atribuíveis estimado de 1.2 bilhões de dólares; já em relação às *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos, 13.100 casos de infecção e 1.100 mortes foram documentadas entre 2012 a 2017, gerando 130 milhões de dólares em custos de saúde, aproximadamente (CDC, 2019). Infelizmente, poucos antibióticos estão disponíveis ou em desenvolvimento para tratar as infecções causadas por bactérias Gram-negativas (CDC, 2019).

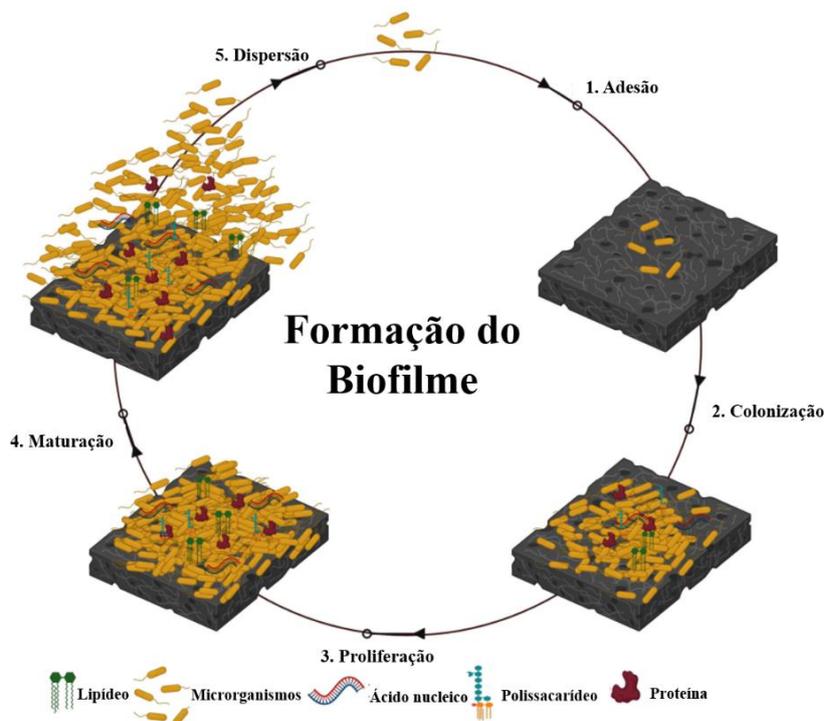
1.6 Biofilmes

Biofilme é uma comunidade de células microbianas (como bactérias) agregadas e organizadas como microcolônias que estão aderidas a uma superfície e/ou umas às outras e incorporadas (embebidas) em uma matriz autoproduzida (VESTBY *et al.*, 2020), a qual consiste em um conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros, conhecidos como substâncias poliméricas extracelulares (*Extracellular Polymeric Substances* - EPS) (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007; FLEMMING; WINGENDER, 2010; SRINIVASAN *et al.*, 2021), composto por uma grande variedade de proteínas, glicoproteínas, glicolipídios e DNA extracelular (eDNA) (DI MARTINO, 2018; VESTBY *et al.*, 2020). Os biofilmes possuem cinco etapas de formação (Figura 1), são elas: fixação (ou aderência), colonização, proliferação (ou desenvolvimento), maturação e dispersão, nessa ordem (YIN *et al.*, 2019; SRINIVASAN *et al.*, 2021). Na fixação, o estágio inicial, as células planctônicas se ligam reversivelmente às superfícies bióticas ou abióticas por meio de interações fracas (ácido-base, hidrofóbica, van der Waals e forças eletrostáticas) para depois, na fase de colonização, se ligar irreversivelmente à superfície por meio de interações mais fortes, através de interações hidrofílicas/hidrofóbicas por proteínas adesivas de ligação ao

colágeno, lipopolissacarídeos, flagelos ou pili (YIN *et al.*, 2019; SRINIVASAN *et al.*, 2021). Na fase três, de proliferação, as células bacterianas multicamadas são profundamente acumuladas e uma enorme quantidade de EPS é produzida (SRINIVASAN *et al.*, 2021). Posteriormente, na maturação, as células anexas crescem no biofilme amadurecido com a estrutura típica de biofilme 3D e, após o desenvolvimento completo do biofilme, na dispersão, este é desmontado ou disperso por processos mecânicos e ativos (SRINIVASAN *et al.*, 2021). Dentro do biofilme, há a difusão de nutrientes e oxigênio através de canais de água (DONLAN, 2002), além da conservação de todos os componentes das células lisadas disponíveis, incluindo DNA (FLEMMING; WINGENDER, 2010), o que torna biofilme um local ideal para troca de material genético e manutenção de um grande e acessível *pool* de genes, em que a transferência horizontal de genes é facilitada (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007; FLEMMING; WINGENDER, 2010). Uma característica marcante dos biofilmes diz respeito à sua heterogeneidade, sendo uma comunidade biológica que se adapta às mudanças nas condições ambientais e na sua própria composição (DONLAN, 2002). A matriz do biofilme fornece proteção aos microrganismos contra diversos fatores, como dessecação, biocidas oxidantes ou carregados, radiação ultravioleta, defesas imunológicas do hospedeiro e antibióticos (FLEMMING; WINGENDER, 2010). As células bacterianas envolvidas no biofilme são até 1000 vezes mais resistentes a agentes antibióticos (SRINIVASAN *et al.*, 2021), isso devido às adaptações pelas quais passam, como transmissão de marcadores de resistência (KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2013). As doenças relacionadas ao biofilme são geralmente infecções persistentes que se desenvolvem de forma lenta; raramente são resolvidas pelo sistema imunológico e respondem de forma inconsistente aos tratamentos com antimicrobianos (VESTBY *et al.*, 2020). Devido à natureza dos biofilmes, as infecções que os envolvem são mais frequentemente associadas à colonização microbiana da superfície de dispositivos médicos e outros materiais, como lentes de contato, cateteres venosos centrais, válvulas cardíacas mecânicas, articulações protéticas, marca-passos e cateteres urinários (DAROUICHE, 2004; DONLAN, 2001; DONLAN; COSTERTON, 2002; JAMAL *et al.*, 2018; LYNCH; ROBERTSON, 2008). De uma forma geral, os biofilmes estão envolvidos em cerca de 80% de uma ampla variedade de infecções microbianas (CHANDKI; BANTHIA P.; BANTHIA R., 2011), e vários patógenos bacterianos conhecidos já mostraram serem capazes de produzir e crescer em biofilmes, como *Staphylococcus aureus* (DONLAN, 2002; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000), *Escherichia coli* (DONLAN, 2002; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000), e bactérias coagulase-negativas, como

Staphylococcus epidermidis (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; KLEINSCHMIDT *et al.*, 2015; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; YAO; STURDEVANT; OTTO, 2009).

Figura 1 – Estágios de desenvolvimento de Biofilmes



Fonte: Srinivasan *et al.* (2021) adaptado pelo autor

1.7 Complexos de rutênio

Drogas à base de metais e metalóides desempenham um papel importante na história da química medicinal e se tornam uma alternativa frente ao aumento da resistência aos antimicrobianos (LI; COLLINS; KEENE, 2015). Um dos primeiros compostos baseados em metais descritos foi a cisplatina, utilizada como agente quimioterápico (WONG; GIANDOMENICO; 1999). Com o passar dos anos, uma variedade de complexos metálicos com diferentes centros metálicos (principalmente elementos de metais de transição) e ligantes de diversas estruturas foram sintetizados e estudados quanto à sua atividade biológica em razão da variabilidade estereoquímica proveniente das diversas geometrias de coordenação, além de introduzirem novos elementos de quiralidade que podem ser importantes para o reconhecimento e interação de moléculas biológicas (LI; COLLINS; KEENE, 2015); desta forma, foi relatado que

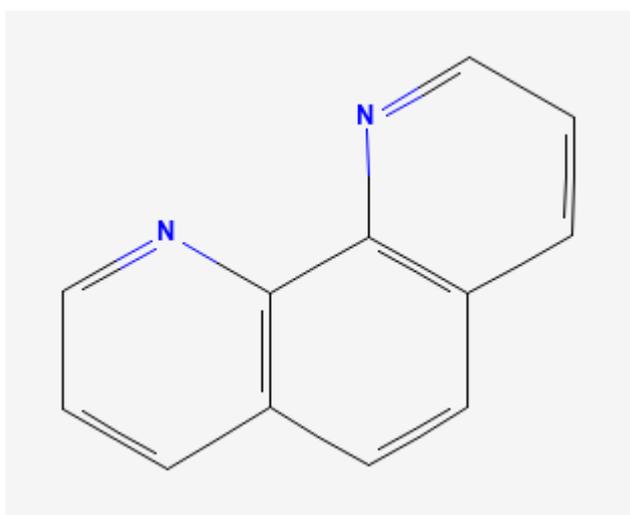
muitos complexos de metais de transição apresentaram atividade antimicrobiana (BU *et al.*, 2020). Dentre os complexos de metais de transição, os complexos à base de rutênio têm sido amplamente estudados e alguns apresentaram atividade anticancerígena (MUNTEANU, 2020), antiparasitária (SILVA *et al.*, 2010) e antimicrobiana (ANDRADE *et al.*, 2020; BOLHUIS *et al.*, 2011; BU *et al.*, 2020; SOUSA *et al.*, 2020) significativas. O rutênio (símbolo atômico Ru) é um metal raro, duro, denso e que está presente no grupo da platina juntamente com o ródio, paládio, ósmio, irídio e platina (SOUTHAM *et al.*, 2017). Os complexos de rutênio apresentam propriedades únicas, como a cinética de troca de ligantes semelhante a de seus equivalentes de platina (o que permite a exploração de diferentes atividades biológicas), a faixa de estados de oxidação biologicamente acessíveis (II e III), a capacidade do rutênio de mimetizar o ferro na ligação a certos alvos biológicos (ALLARDYCE, 2001; LI; COLLINS; KEENE, 2015) e capacidade de se ligar fortemente a ácidos nucleicos e proteínas (GILL; THOMAS, 2012; LI; COLLINS; KEENE, 2015; LIANG *et al.*, 2014; ZENG *et al.*, 2017). Os compostos antimicrobianos de rutênio podem ser divididos em cinco classes com base em seu mecanismo de ação, sendo elas: 1) estrutural, em que o Ru possui função estrutural, como dar forma ao composto ativo através de uma esfera de coordenação de ligantes; 2) carreador, em que o(s) íon(s) Ru funciona(m) como carreador(es) para o fármaco ativo; 3) funcional, em que o íon Ru tem uma função funcional, como quando a atividade antimicrobiana do composto é mediada pelo íon Ru coordenando diretamente aos alvos biológicos; 4) fotoativado, em que o composto Ru é ativo somente sob iluminação, podendo atuar como fotossensibilizador (SOUTHAM *et al.*, 2017); e 5) catalisador, em que o complexo metálico tem função catalisadora, onde o complexo inerte pode catalisar um ciclo redox para a oxidação da glutatona a dissulfeto de glutatona, aumentando as espécies reativas de oxigênio e sendo altamente citotóxico contra algumas linhagens celulares (DOUGAN *et al.*, 2008; YANG; LIAO; FU, 2018).

1.8 1,10-fenantrolina

De acordo com Bencini e Lippolis, “a 1,10-fenantrolina (phen/fen) é uma molécula bioativa e um bloco de construção versátil, e como ligante produz complexos com propriedades biológicas e fisiológicas interessantes” (2010 apud NUNES *et al.*, 2020); desta forma, este composto orgânico heterocíclico e seus derivados têm sido objeto de interesse de pesquisa nos últimos anos em razão das suas potenciais aplicações como agentes de clivagem de DNA e sondas de ácidos nucleicos não radioativos (KHAN; AHMAD; AATIF, 2011). A 1,10-fenantrolina

(Figura 2) e vários complexos de metais de transição que incorporam este ligante quelante já se mostraram extremamente ativos a 37 °C, *in vitro* (DWYER *et al.*, 1969). A fenantrolina e seus derivados, como a fendiona, demonstraram apresentar atividades antimicrobianas (ABEBE; HAILEMARIAM, 2016; EFTHIMIADOU *et al.*, 2008) e antibiofilme (TAY *et al.*, 2015; VIGANOR *et al.*, 2015). A ações biológicas dos complexos metálicos com 1,10 - fenantrolina já havia começado a ser documentada entre 1950 e 1970, e com o passar dos anos seus efeitos antimicrobianos foram amplamente estudados (CHANDRALEKA *et al.*, 2014; DWYER *et al.*, 1952; DWYER *et al.*, 1969; KALIA *et al.*, 2009; PARADA *et al.*, 2017; PEREGRINO *et al.*, 2021), incluindo a ação antimicrobiana desta molécula quando ligada ao Rutênio (GORLE *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2011).

Figura 2 – Estrutura química da 1,10-fenantrolina



Fonte: Pubchem (2022)

Desta forma, a partir da problemática apresentada em relação às bactérias resistentes a antibióticos, seus biofilmes associados e a frequente relação de ambos com infecções nosocomiais graves, é demonstrada a necessidade da busca por novos antimicrobianos. Isso, juntamente com as evidências de trabalhos relatados na literatura envolvendo o potencial antimicrobiano de complexos de rutênio e o potencial antimicrobiano da molécula fenantrolina, delinea o objetivo principal deste trabalho, que foi testar a atividade antimicrobiana contra bactérias planctônicas e bactérias presentes no biofilme e a inibição da produção de biofilme de um complexo de rutênio ligado à fenantrolina contra cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito antimicrobiano do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$, ou RuP, sobre bactérias patogênicas relacionadas a Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde.

2.2 Objetivos específicos

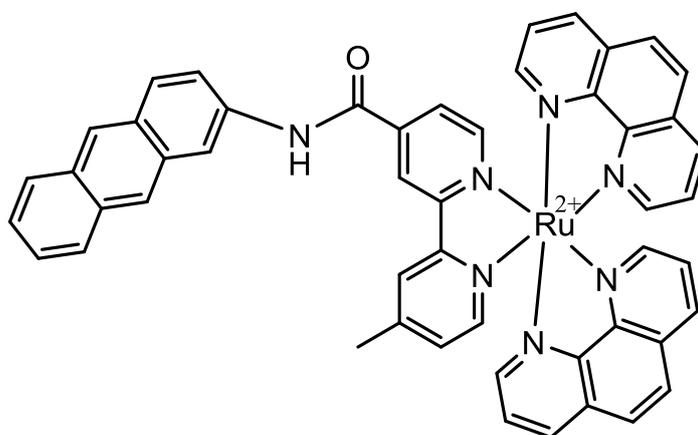
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do complexo sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 (SARM), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e *Escherichia coli* ATCC 11303;
- Avaliar o efeito antibiofilme do complexo através das metodologias de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e de 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 $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$, ou RuP, (Figura 3) 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, síntese e caracterização do composto foram feitas como em Oliveira *et al.* (2020).

Figura 3 – Fórmula estrutural do complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$



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

3.2 Microrganismos utilizados

Neste trabalho foram utilizadas cepas padrão, de interesse clínico, que fazem parte do acervo da American Type Culture Collection (ATCC), sendo as seguintes: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 (SARM), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e *Escherichia coli* ATCC 11303.

3.3 Condições de cultivo

As bactérias foram inicialmente retiradas do freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, descongeladas e transferidas para o meio de cultura Triptona de Soja (TSB; Liofilchem, Itália) adicionado de Ágar (Liofilchem, Itália), ou seja, para o meio Triptona de Soja com Ágar (TSA), em placas de Petri e estriadas para obtenção de isolados; posteriormente, as placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24

horas para crescimento. Após este tempo, colônias isoladas foram removidas das placas e inoculadas em tubos de vidro contendo 5 mL de meio de cultura Triptona de Soja (TSB; Liofilchem, Itália) em caldo e incubadas a 37 °C por cerca de 18 a 24 horas. Em sequência, a cultura foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL e foi centrifugada a 8.603 G a 4°C por 5 minutos; o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 5 mL em meio de cultura Triptona de Soja (TSB; Liofilchem, Itália) em caldo. A concentração de células de cada inóculo foi, em seguida, ajustada para 2×10^6 células/mL através de turbidimetria (comprimento de onda de 620 nm) e curvas de calibração previamente determinadas para cada bactéria.

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

O efeito do complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ sobre o crescimento de células planctônicas e células presentes no biofilme e sobre a formação de biofilmes foi determinado através do método de microdiluição em caldo em placas de poliestireno de 96 poços. Os ensaios foram feitos em triplicata. Para dar prosseguimento aos testes, o composto foi primeiramente pesado e solubilizado em uma emulsão contendo TSB e dimetilsulfóxido 4%. A diluição foi realizada de forma seriada, com concentrações na placa variando de 1,9 a 125 µg/mL, sendo a última linha designada ao controle do experimento (poços contendo somente meio de cultura e bactérias).

3.4.1 Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade do composto sobre o crescimento das células na forma planctônica foi avaliada por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM).

3.4.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A metodologia de CIM está de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Inicialmente, foram adicionados 200 µL do complexo de rutênio já solubilizado na concentração de 250 µg/mL nos poços da primeira linha horizontal da placa; em seguida, foram acrescentados 100 µL do meio TSB em todos os poços restantes, com exceção dos poços anteriormente mencionados da primeira linha, contendo o composto. Na sequência, foram

retirados 100 μL dos poços da primeira linha horizontal e acrescentados nos poços da linha logo abaixo, e assim sucessivamente, repetindo-se o mesmo processo em série, de cima para abaixo, de forma que a concentração do composto nos poços caísse pela metade. Este procedimento seguiu-se apenas até a penúltima linha, sendo a última linha reservada para o controle. O resultado dessa diluição seriada originou concentrações que variaram de 1,9 a 125 $\mu\text{g/mL}$. Após isso, foram adicionados 100 μL , separadamente, de cada uma das bactérias previamente ajustadas com concentração de 2×10^6 células/mL, a qual decaiu pela metade para 1×10^6 células/mL. As placas preparadas foram então incubadas a 37 °C durante 24 horas. O crescimento dos microrganismos foi mensurado através da leitura do conteúdo de cada poço por densidade óptica no comprimento de onda de 620 nm, por meio do leitor de microplacas SpectraMax i3. A CIM foi considerada a menor diluição do composto que não apresentou crescimento visível (observado pelo nível de turbidez) dos microrganismos, ou seja, a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano.

3.4.1.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A metodologia de CBM se deu como em Das *et al.* (2016). Para a determinação do CBM, foram retiradas alíquotas de 10 μL dos poços que foram positivos para o teste de CIM, ou seja, em que não houve crescimento microbiano visível. As alíquotas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura Triptona de Soja (TSB; Liofilchem, Itália) com Ágar (Liofilchem, Itália) e as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Após as 24 horas, o CBM foi analisado por meio da leitura visual das placas, observando-se o crescimento ou não de colônias na superfície da placa. O CBM foi considerado como a menor concentração do complexo que causou 100% de morte celular, ou seja, onde houve ausência de crescimento bacteriano visível na superfície do ágar.

3.4.2 Determinação da atividade antibiofilme

A partir das placas montadas e incubadas como descrito no tópico relacionado ao teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi possível determinar a atividade do composto sobre a formação de biofilmes por meio da quantificação de biomassa e sobre as células nos biofilmes por meio da contagem de células viáveis.

3.4.2.1 Quantificação de biomassa

Finalizado o processo de montagem e incubação, o conteúdo dos poços foi removido e a placa foi lavada com água destilada estéril três vezes. Com os poços vazios, adicionaram-se 200 μ L de metanol puro para a desidratação do biofilme, que foi retirado após 5 minutos. Em sequência, foram adicionados 200 μ L do corante cristal violeta 1% para pigmentação da biomassa, que também foi retirado após 5 minutos. A placa foi lavada com água destilada para remover o excesso do corante. Por fim, 200 μ L de ácido acético foram acrescentados visando desprender o corante cristal violeta do biofilme para ser feita a leitura da placa no leitor de microplacas SpectraMax i3, através da densidade óptica. O comprimento de onda utilizado foi de 590 nm.

3.4.2.2 Contagem de células viáveis

Finalizado o processo de montagem e incubação, tal qual o tópico do teste de quantificação de biomassa, a placa foi também lavada três vezes com água destilada estéril. Com os poços contendo a água da terceira lavagem (200 μ L), a placa foi selada e levada ao banho sônico por 8 minutos para desprender o biofilme dos poços e liberar as bactérias do interior do biofilme. O conteúdo dos poços de cada concentração foi reunido em um eppendorf correspondente, devidamente identificado. Posteriormente, utilizou-se uma nova placa de 96 poços para ser feita a diluição decimal, onde foram adicionados 180 μ L de água destilada estéril em todos os poços. Em seguida, 20 μ L de cada eppendorf foram retirados e colocados nos poços da primeira linha da placa em sua concentração correspondente e, logo após, foi feita a diluição decimal. Cada diluição foi plaqueada em um quadrante (previamente desenhado) de uma placa de Petri com meio TSA e incubada por 24h a 37°C. Após o período de incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas foram contadas visualmente e os resultados expressos em termos de Log_{10} UFC/mL.

3.4.3 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. Os valores de $p < 0,001$ são considerados como estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana do complexo de rutênio sobre o crescimento planctônico dos microrganismos foi feita através dos ensaios de determinação de CIM e CBM. O complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ exibiu ação bacteriostática e bactericida para todas as cepas, exceto *E.coli*, para o qual não apresentou atividade bactericida, ou seja, não foi capaz de causar a morte celular deste microrganismo na forma planctônica (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito antimicrobiano do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ sobre o crescimento planctônico de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*.

Bactérias	$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ ($\mu\text{g/mL}$)	
	CIM	CBM
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	15,6	62,5
<i>S. aureus</i> ATCC 700698 (SARM)	62,5	125,0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	7,8	7,8
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	125,0	125,0
<i>E. coli</i> ATCC 11303	15,6	ND

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

Observou-se que o complexo apresentou valores de CIM e CBM variando de 7,8 a 125 $\mu\text{g/mL}$. A cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentou os menores valores de CIM e CBM, seguida por *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984, tendo estas duas últimas apresentado o mesmo valor de CBM. *E. coli* ATCC11303 apresentou valor de CIM igual a *S. aureus* ATCC 25923, e não apresentou valor de CBM.

Em relação às cepas de *S. epidermidis*, os valores de CIM foram bem distantes um do outro, sendo de 7,8 $\mu\text{g/mL}$ para *S. epidermidis* ATCC 12228 e 125 $\mu\text{g/mL}$ para *S. epidermidis* ATCC 35984. Para cepas de *S. aureus*, os valores também foram diferentes: 15,6 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* ATCC 25923 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* ATCC 700698. Já para a cepa de *E. coli*, o valor da CIM foi 15,6 $\mu\text{g/mL}$, semelhante a *S. aureus* ATCC 25923. Os valores de CBM foram

semelhantes aos valores de CIM para as cepas de *S. epidermidis*, enquanto que para a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 foi de 62,5 µg/mL e para a cepa de *S. aureus* ATCC 700698 foi de 125 µg/mL, maiores que seus respectivos valores de CIM. Dentro das Gram-positivas, *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentou menores valores de CIM e CBM, enquanto *S. epidermidis* ATCC 35984 apresentou os maiores valores. *E. coli* não apresentou resultados de CBM.

4.2 Atividade antibiofilme

A avaliação da atividade antibiofilme do complexo de rutênio foi feita através dos ensaios de determinação de quantificação de biomassa e contagem de células viáveis, cujos resultados foram expressos em termos de inibição da formação de biofilmes e da enumeração do número de células viáveis do biofilme, respectivamente. O complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ demonstrou atividade antibiofilme contra todas as bactérias testadas, exibindo efeito sobre a formação da biomassa do biofilme (Figura 4) e na redução no número de células viáveis (Figura 5).

4.2.1 Inibição da formação de biofilmes

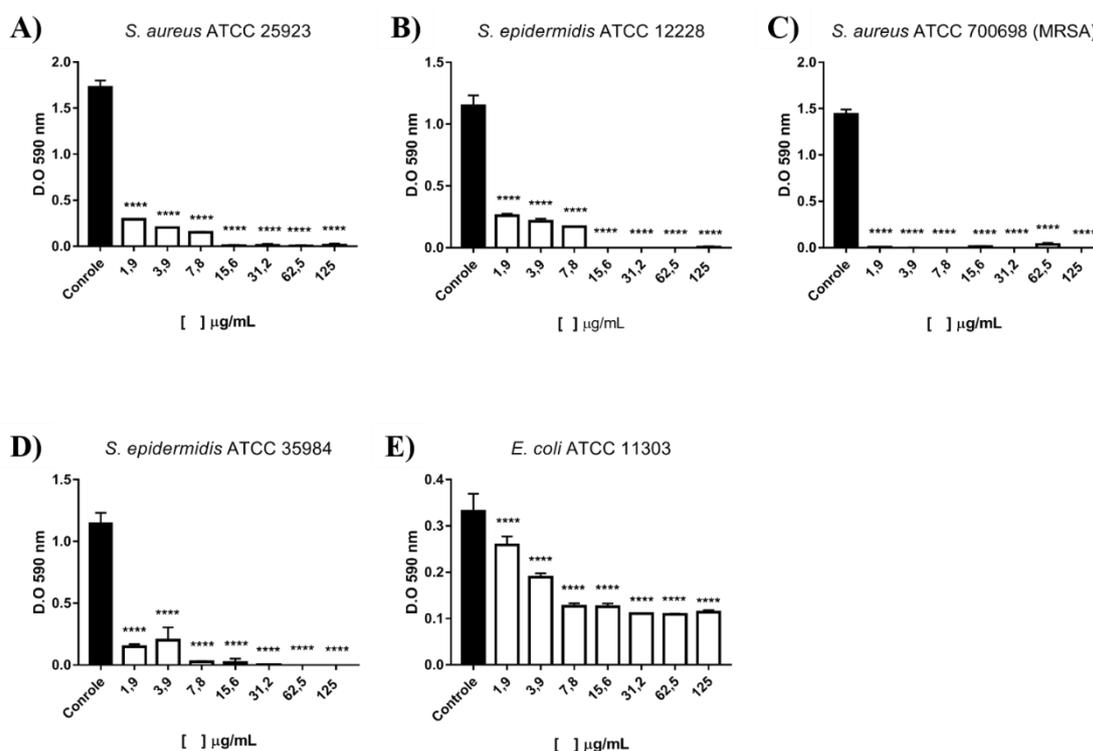
O complexo apresentou percentuais de inibição de produção de biomassa em torno de 77 a 100% para todas bactérias Gram-positivas (Figura 4A, 4B, 4C e 4D). Já em relação a bactéria Gram-negativa *E. coli* (Figura 4E), esta se mostrou menos suscetível, pois a variação da porcentagem de inibição foi a menor, de 21 a 67%. *S. aureus* ATCC 700698 (Figura 4C) se destacou mais em questão de suscetibilidade ao apresentar maiores porcentagens de inibição de produção de biomassa que todas as cepas, exibindo 100% de inibição nas concentrações de composto de 125 µg/mL, 31,2 µg/mL e 7,8 µg/mL e quase 100% de inibição em todas as concentrações restantes (97-99%) do composto. Os valores de inibição das concentrações de 1,9 µg/mL (99,55%), de 3,9 µg/mL (99,93%) e de 15,6 µg/mL (99,14%) foram inesperadamente maiores que o valor de inibição para a concentração de 62,5 µg/mL (97,45%). Para *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 4A), as concentrações acima de 15,6 µg/mL exibiram inibição de 99% para mais, e as concentrações de 1,9 µg/mL, 3,9 µg/mL e 7,8 µg/mL exibiram 82,99%, 88,15% e 91,16%, respectivamente.

S. aureus ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentaram taxas de inibição próximas para as mesmas concentrações (Figura 4A e 4B). A *S. epidermidis* ATCC 12228

apresentou inibição de 100% da produção de biomassa nas concentrações de 15,6 µg/mL a 62,5 µg/mL. A maior concentração, de 125 µg/mL, apresentou uma porcentagem de inibição um pouco menor que as anteriores, de 99,63%. As concentrações de 1,9 µg/mL, 3,9 µg/mL e 7,8 µg/mL apresentaram porcentagens de 77,39%, 81,49% e 85,19%, respectivamente. Já a *S. epidermidis* ATCC 35984 (Figura 4D) apresentou uma inibição próxima de 100% nas concentrações de 7,8 a 31,2 µg/mL (97-99%) e inibição de 100% nas duas maiores concentrações, enquanto nas duas menores a redução foi um pouco abaixo das demais, de 82,42% para 3,9 µg/mL e de 87,13% para 1,9 µg/mL.

Dentre todas as cepas estudadas, a *E. coli* expressou as menores porcentagens de inibição: na faixa de concentração de 7,8 µg/mL a 62,5 µg/mL, a porcentagem variou entre 61-67%, sendo de 61,83% para 7,8 µg/mL, de 62,09% para 15,6 µg/mL, de 66,60% para 31,2 µg/mL e de 67,13% para 62,5 µg/mL; na maior concentração, a porcentagem de inibição documentada foi de 65,70%. Além disso, a faixa dos menores valores de concentração (1,9-7,8 µg/mL) exibiram valores com uma diferença de cerca de 20% entre um valor e outro, sendo 21,93% para 1,9 µg/mL, 42,83% para 3,9 µg/mL e 61,83% para 7,8 µg/mL.

Figura 4 – Efeito do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ 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 $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$. ***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 as bactérias testadas. Dentre todas as cepas, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228 se mostraram mais suscetíveis ao complexo (Figuras 5A e 5B), com destaque para *S. epidermidis* ATCC 12228, enquanto *E. coli*, assim como nos resultados prévios de inibição da formação do biofilme, foi a mais resistente (Figura 5E).

S. epidermidis ATCC 35984 (Figura 5D) apresentou uma redução das células viáveis em torno de 4 logs na concentração de 31,2 µg/mL até a concentração de 125 µg/mL. Já em relação à redução das demais concentrações, a concentração de 7,8 µg/mL exibiu maior redução do que 15,6 µg/mL (3,95 e 3,65 logs, respectivamente); as duas menores concentrações, no entanto,

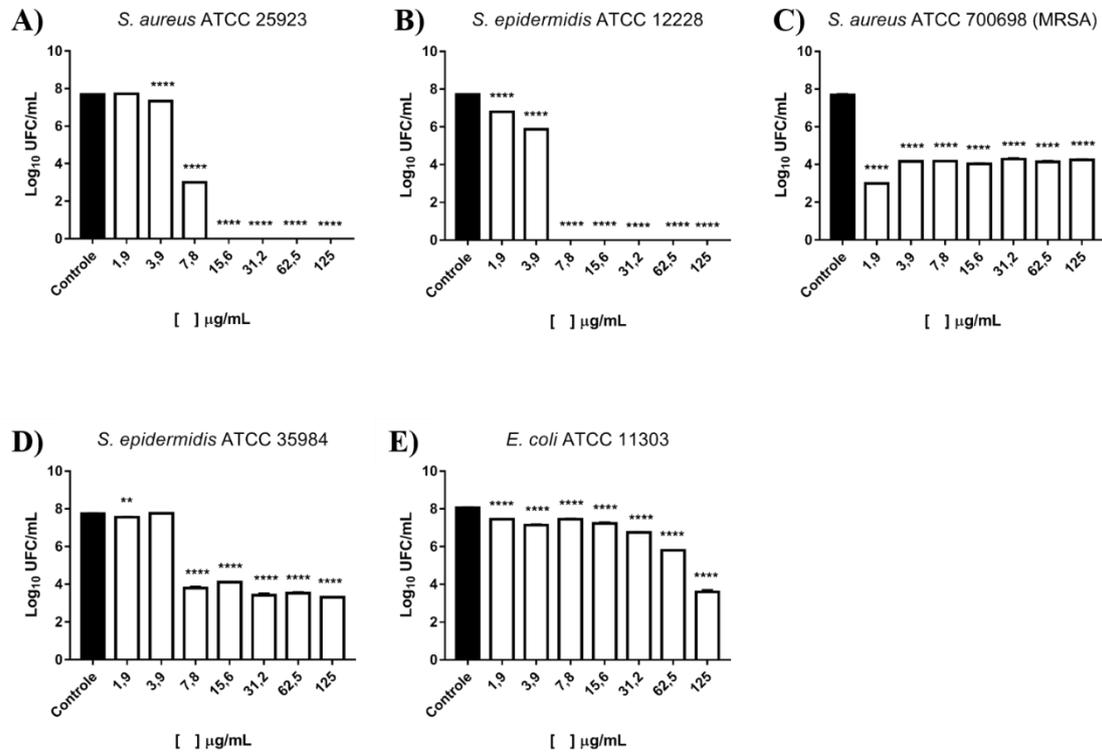
apresentaram pouca redução do número de células (1,9 µg/mL com 0,2 logs) ou nenhuma redução (3,9 µg/mL).

Para *S. aureus* ATCC 700698, surpreendentemente, a maior redução de UFCs foi de 4,67 logs para a menor concentração de complexo (1,9 µg/mL), enquanto uma redução de 3,42 e pôde ser vista na maior concentração, de 125 µg/mL (Figura 5C). A redução associada às demais concentrações foram de 3,5 para as concentrações de 3,9 µg/mL e 7,8 µg/mL, de 3,63 logs para a concentração de 15,6 µg/mL e de 3,38 logs para a concentração de 31,2 µg/mL e 62,5 µg/mL.

A redução total das UFCs ocorreu na faixa de concentração de 7,8 µg/mL a 125 µg/mL para *S. aureus* 25923 (redução de 7,69 logs) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (redução de 7,71 logs), com exceção da concentração de 7,8 µg/mL de *S. aureus* 25923, cuja redução associada foi de 4,69 logs (Figuras 5A e 5B). Nas concentrações mais baixas, o desempenho foi diferente: para a concentração de 3,9 µg/mL de composto para estas duas bactérias, a redução exibida foi de 0,37 logs (*S. aureus* 25923) e 1,84 logs (*S. epidermidis* ATCC 12228); já para a concentração de 1,9 µg/mL, a redução foi de 0,92 logs para *S. epidermidis* ATCC 12228, enquanto *S. aureus* 25923 não apresentou redução nesta concentração.

Em *E. coli* ATCC 11303, para a maior concentração (125 µg/mL), a redução foi de 4,46 logs, sendo a maior redução de UFCs para esta bactéria (Figura 5E). Nas demais concentrações, foram obtidas reduções entre 0,59 e 1,3 logs. A menor redução (0,59 logs) foi exibida na concentração de 7,8 µg/mL, enquanto nas concentrações 1,9 e 3,9 µg/mL foram exibidas reduções de 0,6 logs e de 0,91 logs, sendo esta última maior que o observado em 7,8 µg/mL e, também, do que o observado em 15,6 µg/mL (0,82 logs). As duas outras concentrações de composto (31,2 µg/mL e 62,5 µg/mL) expressaram reduções de células viáveis de 1,3 logs.

Figura 5 – Efeito do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ sobre as células viáveis no biofilme 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 $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$. ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi testada a ação antimicrobiana e antibiofilme do complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. Conforme visto anteriormente na Tabela 1 e nas figuras 4 e 5, o composto em questão obteve efeito sobre todas as cepas utilizadas. A efetividade da ação antimicrobiana do complexo foi maior nas bactérias Gram-positivas do que na Gram-negativa de uma forma geral, visto que a *E. coli* se mostrou mais resistente ao composto testado em quase todas as metodologias, com exceção no teste de CIM, em que ela apresentou uma concentração inibitória mínima menor que *S. aureus* ATCC 700698 (SARM) e que *S. epidermidis* ATCC 35984 e igual à *S. aureus* ATCC 25923. No teste de CBM o complexo não exibiu efeito bactericida em *E. coli*.

O que poderia explicar essa diferença de suscetibilidade seria a morfologia das paredes celulares das bactérias testadas. As bactérias Gram-negativas diferem das bactérias Gram-positivas no que diz respeito à estrutura da parede celular: o envelope das bactérias Gram-negativas consiste em três camadas, sendo elas a membrana externa (contendo lipopolissacarídeo/endotoxina), a parede celular de peptidoglicano e a membrana citoplasmática; já o envelope das bactérias Gram-positivas não possui a membrana externa (EXNER *et al.*, 2017). Essa membrana externa funciona como uma barreira de permeabilidade, permitindo a passagem seletiva de moléculas externas e impedindo que compostos com potencial destrutivo, como antibióticos, penetrem na célula (EXNER *et al.*, 2017). A bicamada lipídica da membrana externa contém proteínas formadoras de canais (como as porinas) com o objetivo de permitir o influxo de nutrientes e extrusão de resíduos; assim, uma diminuição na permeabilidade mediada por porina associada à diminuição na quantidade desta proteína pode aumentar o nível de resistência a agentes antimicrobianos, que potencialmente atravessam a membrana externa por meio delas (NIKAIDO, 2003). Na literatura, já foram relatadas cepas de *E. coli* mutante apresentando fenótipo de resistência a alguns compostos beta-lactâmicos e tetraciclinas devido à ausência da porina *ompF* (DUVAL; NICOLOFF; LEVY, 2009; HARDER; NIKAIDO; MATSUHASHI, 1981). Portanto, bactérias Gram-negativas, por possuírem essa membrana externa que funciona como uma “barreira de proteção” contra elementos externos, apresentam uma maior resistência a moléculas, diferentemente das bactérias Gram-positivas. Adicionalmente, é importante pontuar a preferência do complexo em agir sobre cepas de bactérias Gram-positivas. As camadas de peptidoglicano de microrganismos Gram-positivos são compostos por polímeros aniônicos longos (ácidos teicóicos) que representam mais de 60% da massa da parede celular Gram-positiva (SILHAVY; KAHNE;

WALKER, 2010) e contribuem amplamente para uma carga superficial negativa bacteriana (MALANOVIC; LOHNER, 2016). Portanto, um fator que pode estar relacionado com uma maior suscetibilidade de bactérias Gram-positivas em relação às bactérias Gram-negativas é o fato de que uma das características dos complexos de rutênio é geralmente serem carregados positivamente (em razão da presença do íon rutênio), o que pode contribuir para um maior direcionamento da molécula à parede celular e uma maior interação desta com esses componentes carregados negativamente da parede de bactérias Gram-positivas (ANDRADE, 2018; MUNTEANU; UIVAROSI, 2021).

Andrade (2018) teoriza que os complexos de rutênio (RuNN, RuNNF e RuNN-Br) testados em seu estudo agem nas bactérias de acordo com as características catiônicas que apresentam. Andrade (2018) propõe que os complexos são absorvidos pelas células das bactérias Gram-positivas e acumulados no citoplasma, podendo “interagir de forma reversível com alvos intracelulares como DNA, RNA, proteínas, membranas ou outros metabólitos, agindo sobre o metabolismo bacteriano, de modo a exercer uma atividade bacteriostática ou bactericida”, à medida que permanecem inalterados *in vivo*.

A partir dos resultados expostos na tabela em relação às concentrações de CIM e CBM, é possível afirmar que o composto testado foi efetivo contra as duas cepas de *S. aureus* trabalhadas, com destaque para a *S. aureus* ATCC 25923, apresentando valores de CIM e CBM de 15,6 µg/mL e 62,2 µg/mL, respectivamente. Os valores são menores do que os observados para a cepa resistente *S. aureus* ATCC 700698, de 62,5 µg/mL (CIM) e 125 µg/mL (CBM). A diferença de suscetibilidade é esperada, uma vez que *S. aureus*, com exceção de cepas resistentes, como a cepa *S. aureus* SARM, é suscetível a uma ampla gama de antibióticos, de acordo com os resultados obtidos por Matynia *et al.* (2005). *S. aureus* ATCC 25923 é *mecA* negativa (CLSI, 2015), ou seja, é suscetível à meticilina, já que a resistência desse antibiótico é determinada pelo gene *mecA* (UTSUI; YOKOTA, 1985). Os resultados deste estudo diferem dos resultados encontrados em Liu *et al.* (2018), em que a cepa de SARM apresentou valores de CIM e CBM menores e/ou iguais aos valores de *S. aureus* suscetível no tratamento com complexos de rutênio. Neste mesmo trabalho, as cepas de *E. coli* apresentaram valores de CIM e CBM maiores que os das cepas de *S. aureus*.

O maior potencial antimicrobiano relatado do composto foi contra a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, com os valores de CIM e CBM sendo de 7,8 µg/mL. Em contrapartida, a cepa de *S. epidermidis* ATCC 35984 apresentou os maiores valores para CIM e CBM, de 125 µg/mL. Isto pode ter se dado pelo perfil resistente desta última, que é resistente a meticilina, além de ser também uma boa formadora de biofilme (BOCÉ *et al.*, 2019; CHRISTENSEN *et al.*, 1985;

OKAJIMA *et al.*, 2016), o que dificulta a penetração do composto na matriz de polissacarídeos e, consequentemente, prejudica a sua atividade.

A cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentou maior suscetibilidade em comparação com a cepa *S. aureus* ATCC 25923. Isto pode ser devido a uma provável maior virulência apresentada por *S. aureus* em consequência de moléculas denominadas modulinas fenol-solúveis (PSMs). Estas moléculas estão presentes em ambas as bactérias (MEHLIN; HEADLEY; KLEBANOFF, 1999; OTTO, 2017; WANG *et al.*, 2007), e em *S. aureus* (PSM α 3) são responsáveis por uma forte resposta pró-inflamatória, que contribui para sua patogênese (WANG *et al.*, 2007); em *S. epidermidis*, essa molécula (PSM δ) possui uma atividade citolítica muito parecida com a PSM de *S. aureus* (PSM α 3), porém apresenta produção relativamente baixa desta molécula (CHEUNG *et al.*, 2010; OTTO, 2017; WANG *et al.*, 2007). Os resultados deste estudo corroboram em partes com os resultados de Sousa *et al.* (2018), em que a cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentou valores de CIM menores que a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 para dois dos três complexos de rutênio testados (na ausência de luz).

Em relação aos resultados da atividade antimicrobiana em testes de CIM e CBM contra três complexos de rutênio (RuNN, RuNN-F e RuNN-Br) no estudo de Andrade (2018), o valor de CIM para a bactéria *S. aureus* ATCC 25923, quando exposta ao complexo RuNN, foi igual ao do presente estudo, enquanto o valor de CBM diferiu, sendo maior (de 125 $\mu\text{g/mL}$) em comparação ao trabalho em questão (62,5 $\mu\text{g/mL}$); sobre RuNN-F, os valores para CIM e CBM foram menores (de 7,8 e 31,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) em comparação a este estudo, enquanto o complexo RuNN-Br apresentou os mesmos valores do presente estudo. Sobre a cepa *S. aureus* ATCC 700698, contra RuNN os valores de CIM e CBM foram os mesmos encontrados neste estudo; já para RuNN-F (CIM de 7,8 $\mu\text{g/mL}$; CBM de 31,2 $\mu\text{g/mL}$) e para RuNN-Br (CIM de 31,2 $\mu\text{g/mL}$; CBM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$) foram obtidos valores menores do que os obtidos no presente trabalho. Para *S. epidermidis* ATCC 12228, todos os complexos de rutênio testados no estudo de Andrade (2018) obtiveram valores maiores de CIM e CBM em comparação aos resultados encontrados no presente estudo. Em relação a estirpe *S. epidermidis* ATCC 35984, os valores de CIM foram menores para os três complexos testados em relação ao complexo do presente trabalho; sobre CBM para a mesma cepa, RuNN e RuNN-Br obtiveram o mesmo valor de 125 $\mu\text{g/mL}$ encontrando neste estudo, enquanto somente RuNN-F teve um valor de CBM menor, de 62,5 $\mu\text{g/mL}$. E por fim, *E. coli* ATCC 11303, quando em contato com os três compostos testados no estudo de Andrade (2018), não obteve nenhum resultado para CIM e CBM; já o complexo testado no presente estudo apresentou ação bacteriostática (CIM) para esta bactéria.

Em Sousa *et al.* (2020), foi testado um complexo bidentado de metionina rutênio (II) contra duas bactérias Gram-negativas, uma delas sendo *E. coli* ATCC 11303, e duas bactérias Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228), na ausência e na presença de luz. Na ausência de luz, *S. aureus* exibiu maior suscetibilidade que *S. epidermidis*, que por sua vez exibiu maior suscetibilidade que *E. coli* ATCC 11303, com os valores de CIM de 125 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente. Em relação aos valores de CBM, para *S. aureus* e *S. epidermidis* os valores foram os mesmos dos de CIM para cada uma, enquanto *E. coli* não apresentou resultados de CBM. Observa-se, portanto, que estes resultados divergiram dos resultados apresentados neste estudo, já que no presente estudo *S. aureus* ATCC 25923 apresentou valor de CIM e CBM maior que os de *S. epidermidis* ATCC 12228, enquanto o valor de CIM de *E. coli* se igualou ao valor de CIM de *S. aureus* ATCC 25923; contudo, em relação ao valor de CBM de *E. coli*, o complexo testado por Sousa *et al.* não apresentou efeito bactericida, assim como o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ testado neste estudo. Em resumo, é possível observar que os valores apresentados de CIM e CBM foram menores no tratamento com o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ testado neste trabalho do que com o complexo testado por Sousa *et al.* na ausência de luz.

A ação antibacteriana *in vitro* da 1,10-fenantrolina (phen/fen) foi demonstrada em várias espécies de bactérias, e os complexos metálicos de fenantrolina podem ser bacteriostáticos e bactericidas para muitas bactérias Gram-positivas, sendo relativamente ineficazes contra organismos Gram-negativos (CHANDRALEKA *et al.*, 2014; McCANN *et al.*, 2012). Em Abebe e Hailemariam (2016), dois complexos de rutênio ligados a fenantrolina foram testados contra algumas cepas bacterianas, dentre elas *S. aureus* (ATCC 25923), SARM (isolado clínico) e *E. coli*. Em relação às cepas de *S. aureus*, os resultados corroboram com os obtidos neste estudo, uma vez que os pesquisadores também constataram valores de CIM de *S. aureus* suscetível menores que os de SARM. Já o valor que eles obtiveram para a CIM de *E. coli* foi menor do que o obtido para a cepa de *S. aureus* suscetível, enquanto neste estudo a CIM de *E. coli* se igualou a CIM de *S. aureus* ATCC 25923.

Gorle *et al.* (2014) testou uma série de complexos de rutênio que possuíam a fenantrolina como ligante contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo SARM, *S. aureus* suscetível e *E. coli*. Seis dos catorze complexos, Rubb₁₂, Rubb₁₆, Rubb₁₀-tri, Rubb₁₀-tetra, Rubb₁₂-tetra-nl e Rubb₁₀-Cl₂, apresentaram valores de CIM para SARM maiores que para *S. aureus* suscetível, o que vai de encontro aos resultados de CIM para cepas de *S. aureus* apresentados neste estudo; em especial, Rubb₁₀-Cl₂ apresentou valor de CIM para *E. coli* igual ao

valor de CIM para *S. aureus* suscetível, tal qual o obtido neste trabalho. Em contraste com o presente estudo, os demais complexos apresentaram valores de CIM para *E. coli* maiores que ambas as cepas de *S. aureus*, enquanto que para SARM todos apresentaram valores de CIM iguais a *S. aureus* suscetível, exceto o complexo $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})^{2+}$, que apresentou um valor menor, e $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dpq})^{2+}$, que apresentou um valor maior, este último resultado corroborando com o presente estudo. Em relação a CBM, apenas alguns compostos foram utilizados para esse teste, sendo $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})^{2+}$ o único que apresentou um valor de CBM para SARM maior que para *S. aureus* suscetível, resultado que vai de acordo com os encontrados neste estudo. CBMs de *E. coli* mostraram-se maiores que os CBMs de ambas as cepas de *S. aureus*, enquanto o complexo $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})^{2+}$ testado no trabalho em questão não apresentou efeito bactericida contra *E. coli*. Em outro estudo de Gorle *et al.* (2015), foi demonstrado que todos os complexos de rutênio ligados a fenantrolina testados contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas apresentaram a seguinte ordem de suscetibilidade para o teste de CIM: *S. aureus* suscetível > SARM > *E. coli*, o que corrobora em partes com o presente estudo.

Em Bolhuis *et al.* (2011), três complexos de Ru (II) foram testados quanto à sua atividade antimicrobiana, sendo dois deles ligados à fenantrolina: $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dpq})^{2+}$ e $\text{Ru}(\text{2,9-Me}_2\text{phen})_2(\text{dppz})^{2+}$. Nenhum dos compostos foi ativo contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*, divergindo em partes dos resultados do presente estudo, em que o complexo apresentou valor de CIM contra *E. coli*, mas não apresentou valores de CBM. Para a cepa de *S. aureus* suscetível e cepas SARM, $\text{Ru}(\text{2,9-Me}_2\text{phen})_2(\text{dppz})^{2+}$ se mostrou o mais ativo e $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dpq})^{2+}$ o menos ativo. Os valores de CIM e CBM de $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dpq})^{2+}$ contra a cepa de *S. aureus* suscetível foram maiores que os apresentadas neste estudo; o mesmo composto não foi capaz de apresentar atividade bacteriostática ou bactericida contra as cepas de SARM, diferentemente do presente estudo, em que o complexo apresentou efeito bactericida e bacteriostático contra todas as bactérias, exceto *E. coli*, para o qual não apresentou valores de CBM, como já mencionado. $\text{Ru}(\text{2,9-Me}_2\text{phen})_2(\text{dppz})^{2+}$ apresentou todos os valores de CIM e CBM para as cepas testadas maiores que o deste estudo.

Em relação aos testes de inibição de formação de biofilme e de redução no número de células viáveis no biofilme, o complexo de rutênio $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})^{2+}$ apresentou efeito contra todas as cepas testadas, tendo demonstrado maior efeito contra bactérias Gram-positivas do que contra a bactéria Gram-negativa, seguindo o padrão dos testes de atividade antimicrobiana contra células planctônicas.

Nos testes de quantificação de biomassa, *S. aureus* ATCC 700698 se destacou por apresentar uma maior porcentagem de inibição de produção biomassa, exibindo 100% de inibição em pelo menos três concentrações (125 µg/mL, 31,2 µg/mL e 7,8 µg/mL). *S. aureus* ATCC 25923 exibiu inibições de 99% para mais, porém, de uma forma geral, esta se mostrou levemente mais resistente que *S. aureus* ATCC 700698. *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentou taxas de inibição próximas de *S. aureus* ATCC 25923 para as mesmas concentrações, além de ter apresentado inibição de 100% da produção de biomassa em três concentrações, semelhante a *S. aureus* ATCC 700698. *S. epidermidis* ATCC 35984 também apresentou taxas de inibição altas e inibição de 100% nas duas maiores concentrações. Dentre todas as cepas estudadas, a *E. coli* expressou as menores porcentagens de inibição: na maior concentração, a porcentagem de inibição documentada foi de 65,70%, enquanto na menor foi de 21,93%.

Em relação aos testes de redução do número de células viáveis, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228 se mostraram mais suscetíveis ao complexo dentre todas as cepas, com destaque para *S. epidermidis* ATCC 12228, enquanto *E. coli*, assim como nos resultados de inibição da formação do biofilme, foi a mais resistente. *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984 apresentaram menor suscetibilidade nos testes de redução do número de células viáveis que suas contrapartes suscetíveis. Surpreendentemente, a maior redução de UFCs para *S. aureus* ATCC 700698 foi na menor concentração de complexo. *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentaram redução total das UFCs na concentração de 7,8 µg/mL (15,6 µg/mL para *S. aureus* 25923) e acima. Contudo, nas concentrações mais baixas, observou-se uma diferença brusca de redução no número de células viáveis, que foi muito menor quando comparada com a redução atrelada às concentrações mais altas. Em *S. epidermidis* ATCC 35984, as menores concentrações apresentaram menor redução, em destaque para a concentração de 3,9 µg/mL, que não apresentou nenhuma redução, enquanto a concentração de 1,9 µg/mL apresentou redução de 0,2 log. Isso pode ter se dado pela suscetibilidade dose-dependente (SDD) das cepas ao complexo testado, em que a suscetibilidade bacteriana depende da dosagem administrada, tornando doses de antimicrobianos abaixo da dose necessária/ideal não tão eficazes; logo, é importante o uso da dosagem máxima ideal para que haja uma cobertura adequada do composto naquele isolado (CLSI, 2015). Como o metabolismo bacteriano tende a se ajustar em frente a efeitos negativos, como em concentrações subinibitórias de antibióticos, as mudanças transcricionais devem ser consideradas (Goh *et al.*, 2002).

De uma forma geral, nos testes envolvendo biofilmes e células do biofilme, foi possível observar que as cepas Gram-positivas *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC

35984, apresentaram maiores porcentagens de inibição da formação de biofilme em diversas concentrações quando comparadas às demais cepas e se mostraram mais resistentes no que tange à redução do número de células viáveis no biofilme (exceto quando comparadas à *E. coli*). O estresse bacteriano causado por causas externas é capaz de desencadear diversas respostas adaptativas e protetoras, além de alterar os padrões de expressão gênica e a fisiologia celular de maneiras que podem influenciar a suscetibilidade antimicrobiana (POOLE *et al.*, 2012). Logo, estes resultados podem ser consequência do estresse bacteriano causado pelo complexo, que pode ter originado uma mudança de comportamento no perfil da célula, induzindo-a a dar enfoque à manutenção das células no biofilme ao invés da sua produção.

Em Andrade (2018), os complexos RuNN, RuNN-F e RuNN-Br foram testados para atividade de inibição da formação de biofilme e redução do número de células viáveis contra as mesmas cepas testadas neste estudo. Os complexos inibiram o acúmulo de biomassa em todas as concentrações testadas para as Gram-positivas. Assim como neste estudo, a cepa de *S. aureus* ATCC 700698 foi altamente sensível aos complexos, e apresentou uma porcentagem de redução de 99,8% na maior concentração, de 500 µg/mL, para RuNN, e uma porcentagem de redução de acima de 99,8% para RuNN-FF na mesma concentração. No estudo em questão, as porcentagens de inibição para *S. aureus* ATCC 700698 chegaram a 100% mesmo em uma concentração 4 vezes menor (125 µg/mL). As demais concentrações do presente estudo também se sobressaíram em questão de efeito de inibição frente a RuNN para *S. aureus* ATCC 700698, pois a redução de sua biomassa na concentração de 7,8 µg/mL foi de 68%, enquanto no presente estudo foi de 100%. Já para RuNN-FF, a concentração de 7,8 µg/mL mostrou uma porcentagem de 99,8%, também menor ao valor encontrado neste estudo para a mesma cepa. Para *S. aureus* ATCC 25923, o complexo RuNN-Br foi capaz de inibir a formação de biomassa entre 91 e 100% desde a menor (7,8 µg/mL) até a maior concentração (500 µg/mL), faixa de redução que se aproxima às apresentadas neste estudo para esta cepa.

As cepas de *S. epidermidis* mostraram uma maior resistência ao contato com o complexo RuNN em relação a atividade antibiofilme. Isso foi diferente do que foi apresentado neste estudo pois, de uma forma geral, as cepas *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. epidermidis* ATCC 35984 foram bastante sensíveis. Para RuNN-Br e RuNN-F, a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 também se mostrou menos suscetível. Em relação a RuNN-F, *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentou redução da biomassa de 45,7% para a concentração de 7,8 µg/mL e de 95,6% para a concentração de 500 µg/mL; em relação a RuNN-Br *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentou redução da biomassa de 53% para a concentração de 7,8 µg/mL e de 91% para a concentração de

500 µg/mL; já no presente estudo, *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentou maiores porcentagens de inibição para as concentrações de 7,8 µg/mL e 125 µg/mL, sendo respectivamente 85,19% e 99,63% de inibição. Um fato interessante observado pelo autor sobre RuNN-F foi que concentrações a partir de 15 µg/mL reduziram a produção da biomassa entre 93-100%, e algo semelhante ocorreu neste estudo para esta cepa.

Ainda em Andrade (2018), atestou-se que RuNN reduziu significativamente o número de UFCs dos biofilmes de cepas de *Staphylococcus* spp., assim como ocorreu na maioria das cepas deste presente estudo. O biofilme de *S. aureus* ATCC 25923 mostrou uma redução nas suas células viáveis de 0,8 logs e 3,2 logs a 7,8 e 500 µg/mL, respectivamente. Isto contrasta com os resultados deste estudo pois, para a mesma cepa, a redução UFCs foi maior para a mesma concentração de 7,8 µg/mL (4,69 logs), enquanto a maior concentração testada, de 125 µg/mL, apresentou redução total. Para as demais cepas, a redução no número de células viáveis também foi da ordem de 2,0 a 3,0 logs acima da concentração de 62,5 µg/mL, enquanto neste estudo, para as concentrações de 62,5 µg/mL e 125 µg/mL, as mesmas cepas apresentaram redução no número de células viáveis da ordem de 3 e 4 logs de redução para *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984, respectivamente, e redução total para *S. epidermidis* ATCC 12228.

No ensaio sobre a quantificação de células viáveis contra RuNN-F, todas as cepas testadas mostraram-se suscetíveis. Dentre as cepas usadas neste ensaio, *S. aureus* ATCC 700698, já relatada na literatura como resistente a meticilina (SARM), chamou a atenção do autor por ter apresentado os melhores resultados em relação a redução do número de células viáveis, algo levemente semelhante ao observado neste estudo. Contra esta cepa, o complexo RuNN-F foi capaz de reduzir em 3 logs o número de células viáveis na concentração de 7,8 µg/mL e, para a concentração de 500 µg/mL, a maior usada no ensaio, a redução foi de 4,9 logs. No presente estudo, para as concentrações de 7,8 µg/mL e 125 µg/mL (a maior concentração utilizada neste trabalho), a redução datada foi de 3,4 logs, valor que se aproxima dos resultados apresentados pelo autor. Os efeitos do complexo RuNN-Br também reduziram o número de células viáveis nos biofilmes das cepas de *Staphylococcus* spp., sendo a cepa *S. aureus* ATCC 25923 mais sensível, tendo a redução do número de células viáveis na ordem de 2,0 logs na concentração de 7,8 µg/mL e 3,4 logs na concentração de 500 µg/mL. Neste presente trabalho, *S. aureus* ATCC 25923, na concentração de 7,8 µg/mL, apresentou um valor de log de 4,69, maior do que o datado por Andrade (2018). Sobre as demais cepas, também houve uma considerável redução no número de UFCs nas concentrações acima de 62,5 µg/mL que variaram de 2,4 a 2,8 logs, enquanto neste

estudo, para as mesmas cepas, a redução acima de 62,5 µg/mL foi acima de 3 logs, tendo *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentado redução total.

Complexos de rutênio associados fenantrolina são bem datados como potenciais agentes antimicrobianos *in vitro* contra cepas de *E. coli* e *S. aureus* (GORLE *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2018), porém poucos estudos sobre atividade antibiofilme desses complexos são encontrados na literatura, principalmente para as cepas mencionadas. Contudo, complexos metálicos ligados à fenantrolina demonstraram ter atividades antibiofilme contra outros microrganismos, como em Viganor *et al.*, 2015, em que complexos de cobre e prata ligados à fendiona (1,10-fenantrolina-5,6-diona) exibiram atividade antibiofilme contra *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, a capacidade antibiofilme de complexos de cobre ligados à fenantrolina contra SARM foram demonstrados recentemente (BEETON; ALDRICH-WRIGHT; BOLHUIS, 2014).

6 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, foi demonstrado que o composto $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ apresentou atividade antimicrobiana (contra células planctônicas, contra células no biofilme e na inibição da formação do biofilme) para todas as cepas testadas. Logo, presume-se que este complexo tem potencial para utilização como agente antimicrobiano. O complexo poderia, também, auxiliar a síntese de novos agentes antimicrobianos de interesse clínico. Faz-se necessário, ainda, a realização de novos testes envolvendo o complexo, como testes para determinar o tempo de morte das bactérias, para avaliar a atividade do complexo sobre biofilmes pré-formados, para avaliar modificações morfológicas e estruturais na formação de biofilmes através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e para avaliar a citotoxicidade do complexo sobre células eucariontes saudáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEBE, A.; HAILEMARIAM, T. Synthesis and Assessment of Antibacterial Activities of Ruthenium(III) Mixed Ligand Complexes Containing 1,10-Phenanthroline and Guanide. **Bioinorganic Chemistry And Applications**, v. 2016, p. 1-9, 2016. DOI 10.1155/2016/3607924.

ADVANI, S.D.; SICKBERT-BENNETT, E.; ADVANI, S.D.; ASHLEY, E.D.; CROMER, A.; LOKHNYGINA, Y.; NELSON, A.; AKINBOYO, I.; DIBIASE, L.; WEBER, D.J.; ANDERSON, D.J. Impact of COVID-19 Pandemic on Healthcare-associated Infections (HAIs) in a Large Network of Hospitals. *In*: IDWEEK 2021, 2021, Evento Virtual. **Anais [...]**. [S. l.]: Open Forum Infectious Diseases, 2021. p. S103–S104. DOI <https://doi.org/10.1093/ofide/ofab466.172>. Disponível em: https://academic.oup.com/ofid/article/8/Supplement_1/S103/6449683. Acesso em: 4 abr. 2022.

ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J.. Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects. **Johnson Matthey Technology Review: Platinum Metals Rev.**, [S. L.], v. 45, n. 2, p. 62-69, 2001. Disponível em: <https://www.technology.matthey.com/article/45/2/62-69/>. Acesso em: 04 abr. 2022.

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.

ANDRADE, A. L.; VASCONCELOS, M. A. de; ARRUDA, F. V. de S.; NETO, L. G. do N.; CARVALHO, J. M. da S.; GONDIM, A. C. S.; LOPES, L. G. de F.; SOUSA, E. H. S.; TEIXEIRA, E. H. Antimicrobial activity and antibiotic synergy of a biphosphinic ruthenium complex against clinically relevant bacteria. **Biofouling**, v. 36, n. 4, p. 442-454, abr. 2020. DOI 10.1080/08927014.2020.1771317.

BABCOCK, H. M.; ZACK, J. E.; GARRISON, T.; TROVILLION, E.; KOLLEF, M. H.; FRASER, V. J. Ventilator-Associated Pneumonia in a Multi-Hospital System Differences in Microbiology by Location. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [S.L.], v. 24, n. 11, p. 853-858, nov. 2003. DOI 10.1086/502149.

BAKER, M. A.; SANDS, K. E.; HUANG, S. S.; KLEINMAN, K.; SEPTIMUS, E. J.; VARMA, N.; BLANCHARD, J.; POLAND, R. E.; COADY, M. H.; YOKOE, D. S. The Impact of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) on Healthcare-Associated Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 74, n. 10, p. 1748-1754, ago. 2021. DOI 10.1093/cid/ciab688.

BANTHIA, R.; CHANDKI, R.; BANTHIA, P. Biofilms: a microbial home. **Journal Of Indian Society Of Periodontology**, v. 15, n. 2, p. 111, 2011. DOI 10.4103/0972-124x.84377.

BEETON, Michael L.; ALDRICH-WRIGHT, Janice R.; BOLHUIS, Albert. The antimicrobial and antibiofilm activities of copper(II) complexes. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, v. 140, p. 167-172, nov. 2014. DOI 10.1016/j.jinorgbio.2014.07.012.

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**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 4867, 19 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-41222-0>.

BOLHUIS, A.; HAND, L.; MARSHALL, J. E.; RICHARDS, A. D.; RODGER, A.; ALDRICH-WRIGHT, J. Antimicrobial activity of ruthenium-based intercalators. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 313-317, mar. 2011. DOI 10.1016/j.ejps.2010.12.004.

BOUCHER, H. W.; COREY, G. R. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 5, p. S344-S349, jun. 2008. DOI 10.1086/533590.

BRAZ, V. S.; MELCHIOR, K.; MOREIRA, C. G. *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 548492, 21 dez. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2020.548492>.

BU, S.; JIANG, G.; JIANG, G.; LIU, J.; LIN, X.; SHEN, J.; XIONG, Y.; DUAN, X.; WANG, J.; LIAO, X. Antibacterial activity of ruthenium polypyridyl complexes against *Staphylococcus aureus* and biofilms. **Jbic Journal Of Biological Inorganic Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 747-757, jun. 2020. DOI 10.1007/s00775-020-01797-w.

BUTTNER, H.; MACK, D.; ROHDE, H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 5, p. 5-14, 17 fev. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2015.00014>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019**. Atlanta, GA: U.S: Department of Health and Human Services, CDC, 2019. Disponível em: www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html. Acesso em: 4 abr. 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Carbapenem-resistant Enterobacteriales (CRE)**. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/index.html>. Acesso em: 04 abr. 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Diseases and Organisms in Healthcare Settings**. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/organisms.html>. Acesso em: 04 abr. 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Patients: Information about CRE**. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/cre-patients.html>. Acesso em: 04 abr. 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Types of healthcare-associated infections**. 2014. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/infectiontypes.html>. Acesso em: 04 abr. 2022.

CHANDRALEKA, S.; RAMYA, K.; CHANDRAMOHAN, G.; DHANASEKARAN, D.; PRIYADHARSHINI, A.; PANNEERSELVAM, A. Antimicrobial mechanism of copper

(II) 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridyl complex on bacterial and fungal pathogens. **Journal Of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 6, p. 953-962, dez. 2014. DOI 10.1016/j.jscs.2011.11.020.

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, 7 out. 2010. DOI 10.1371/journal.ppat.1001133.

CHRISTENSEN, G D; A SIMPSON, W; 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**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 996-1006, dez. 1985. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>.

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.

COSGROVE, S. E.; SAKOULAS, G.; PERENCEVICH, E. N.; SCHWABER, M. J.; KARCHMER, A. W.; CARMELI, Y. Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Bacteremia: a meta analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 53-59, jan. 2003. DOI 10.1086/345476.

COYLE, .; KAVANAGH, K.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M.; GERAGHTY, M. Mode of anti-fungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu(II), Mn(II) and Ag(I) complexes. **Biometals**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 321-329, 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1020695923788>.

DAROUICHE, R. O. Treatment of Infections Associated with Surgical Implants. **New England Journal Of Medicine**, v. 350, n. 14, p. 1422-1429, abr. 2004. DOI 10.1056/nejmra035415.

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: Research and Treatment**, [S.L.], v. 9, p. 11-19, jan. 2016. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.4137/idrt.s31741>.

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

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-890, set. 2002. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). DOI 10.3201/eid0809.020063.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, abr. 2002. DOI 10.1128/cmr.15.2.167-193.2002.

DOUGAN, S. J.; HABTEMARIAM, A.; MCHALE, S. E.; PARSONS, S.; SADLER, P. J. Catalytic organometallic anticancer complexes. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 105, n. 33, p. 11628-11633, ago. 2008. DOI 10.1073/pnas.0800076105.

DUVAL, V.; NICOLOFF, H.; LEVY, S. B. Combined Inactivation of Ion and ycgE Decreases Multidrug Susceptibility by Reducing the Amount of OmpF Porin in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, n. 11, p. 4944-4948, nov. 2009. DOI doi.org/10.1128/aac.00787-09.

DWYER, F. P.; GYARFAS, E. C.; ROGERS, W. P.; KOCH, J. H. Biological Activity of Complex Ions. **Nature**, [S.L.], v. 170, n. 4318, p. 190-191, ago. 1952. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/170190a0>.

DWYER, F.; REID, I.; SHULMAN, A.; LAYCOCK, G. M.; DIXSON, S. THE BIOLOGICAL ACTIONS OF 1,10-PHENANTHROLINE AND 2,2'-BIPYRIDINE HYDROCHLORIDES, QUATERNARY SALTS AND METAL CHELATES AND RELATED COMPOUNDS. **Australian Journal Of Experimental Biology And Medical Science**, v. 47, n. 2, p. 203-218, abr. 1969. DOI 10.1038/icb.1969.21.

EFTHIMIADOU, E. K.; KATSAROU, M. E.; KARALIOTA, A.; PSOMAS, G. Copper(II) complexes with sparfloxacin and nitrogen-donor heterocyclic ligands: structure activity relationship. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [S.L.], v. 102, n. 4, p. 910-920, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.12.011>.

EXNER, M.; BHATTACHARYA, S.; CHRISTIANSEN, B.; GEBEL, J.; GORONCY-BERMES, P.; HARTEMANN, P.; HEEG, P.; ILSCHNER, C.; KRAMER, A.; LARSON, E. Antibiotic resistance: what is so special about multidrug-resistant gram-negative bacteria?. **Gms Hygiene And Infection Control**, 12: Doc05, p. 910-920, 10 abr. 2017. DOI 10.3205/DGKH000290.

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

FLEMMING, H-C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS Matrix: the “house of biofilm cells”. **Journal Of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 7945-7947, nov. 2007. DOI 10.1128/jb.00858-07.

FLORES-MIRELES, A.; HREHA, T. N.; HUNSTAD, D. A. Pathophysiology, Treatment, and Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infection. **Topics In Spinal Cord Injury Rehabilitation**, v. 25, n. 3, p. 228-240, jun. 2019. DOI 10.1310/sci2503-228.

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. Multi-state survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. **Journal Of Hospital Infection**, [S.L.], v. 96, n. 2, p. 139-144, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2017.03.024>.

FRAM, D.S.; FERREIRA, D.B.; MATIAS, L. de O.; COELHO, W.E.; ESCUDERO, D.V.; ANTONELLI, T.S.; MEDEIRO, E.A. Perfil epidemiológico das IRAs notificadas em um hospital universitário durante a pandemia da COVID-19. *In*: 12º CONGRESSO PAULISTA DE INFECTOLOGIA, 12º., 2021, São Paulo. **Anais [...]**. [S. l.]: The Brazilian

- Journal of Infectious Diseases, 2021. Tema: Livre, DOI 10.1016/j.bjid.2020.101063. Disponível em: <https://www.bjid.org.br/en-perfil-epidemiologico-das-iras-notificadas-articulo-S1413867020301902>. Acesso em: 4 abr. 2022.
- 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, 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**, [S.L.], v. 99, n. 26, p. 17025-17030, 13 dez. 2002. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/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**, [S.L.], v. 21, n. 29, p. 10472-10481, 3 jun. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201500385>.
- GORLE, A. K.; FETERL, M.; WARNER, J. M.; WALLACE, L.; KEENE, F. R.; COLLINS, J. G.. Tri- and tetra-nuclear polypyridyl ruthenium(ii) complexes as antimicrobial agents. **Dalton Trans.**, [S.L.], v. 43, n. 44, p. 16713-16725, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c4dt02139h>.
- GORLE, A. K.; LI, X.; PRIMROSE, S.; LI, F.; FETERL, M.; KINOBE, R. T.; HEIMANN, K.; WARNER, J. M.; KEENE, F. R.; COLLINS, J. G.. Oligonuclear polypyridylruthenium(II) complexes: selectivity between bacteria and eukaryotic cells. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 71, n. 6, p. 1547-1555, 5 mar. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkw026>.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95-108, fev. 2004. DOI 10.1038/nrmicro821.
- HARDER, K. J.; NIKAIDO, H.; MATSUHASHI, M. Mutants of *Escherichia coli* That Are Resistant to Certain Beta-Lactam Compounds Lack the ompF Porin. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 549-552, out. 1981. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.20.4.549>.
- JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALIL, F.; IMRAN, M.; NAWAZ, M. A.; HUSSAIN, T.; ALI, M.; RAFIQ, M.; KAMIL, M. A. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal Of The Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 7-11, jan. 2018. DOI 10.1016/j.jcma.2017.07.012.
- JERNIGAN, J. A.; HATFIELD, K. M.; WOLFORD, H.; NELSON, R. E.; OLUBAJO, B.; REDDY, S. C.; MCCARTHY, N.; PAUL, P.; MCDONALD, L. C.; KALLEN, A. Multidrug-Resistant Bacterial Infections in U.S. Hospitalized Patients, 2012–2017. **New England Journal Of Medicine**, v. 382, n. 14, p. 1309-1319, abr. 2020. DOI 10.1056/nejmoa1914433
- JEVONS, M. METHICILLIN RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCI. **The Lancet**, v. 281, n. 7287, p. 904-907, abr. 1963. DOI 10.1016/s0140-6736(63)91687-8.

- KALIA, S.B.; KAUSHAL, G.; KUMAR, M.; CAMEOTRA, S.s.; SHARMA, A.; VERMA, M. L.; KANWAR, S. S. Antimicrobial and toxicological studies of some metal complexes of 4-methylpiperazine-1-carbodithioate and phenanthroline mixed ligands. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 916-922, dez. 2009. DOI 10.1590/s1517-83822009000400024.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 123-140, fev. 2004. DOI 10.1038/nrmicro818.
- KHAN, H. A.; AHMAD, A.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 7, p. 509-514, jul. 2015. DOI 10.1016/j.apjtb.2015.05.001
- 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.
- KHAN, I. M., AHMAD, A.; AATIF, M. Synthesis, single-crystal characterization, antimicrobial activity and remarkable in vitro DNA interaction of hydrogen-bonded proton-transfer complex of 1,10-phenanthroline with 2,4,6-trinitrophenol. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 105, n. 1, p. 6-13, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.06.004>.
- KLEINSCHMIDT, S.; HUYGENS, F.; FAOAGALI, J.; RATHNAYAKE, I. u; HAFNER, L. M. Staphylococcus epidermidis as a cause of bacteremia. **Future Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1859-1879, nov. 2015. DOI 10.2217/fmb.15.98.
- KLEVENS, R. M.; EDWARDS, J. R.; TENOVER, F. C.; MCDONALD, L. C.; HORAN, T.; GAYNES, R.. Changes in the Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Intensive Care Units in US Hospitals, 1992-2003. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 3, p. 389-391, 1 fev. 2006. DOI 10.1086/499367.
- 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-a010306, abr. 2013. DOI 10.1101/cshperspect.a010306.
- LEE, E.; ANJUM, F. Staphylococcus Epidermidis. [S.L.]: In: Statpearls [Internet]. Treasure Island (Fl): Statpearls, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563240/>. Acesso em: 04 abr. 2022.
- 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**, [S.L.], v. 40, n. 18, p. 5032, 2011. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c1dt10250h>.
- 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, X.; HEIMANN, K.; LI, F.; WARNER, J. M.; KEENE, F. R.; COLLINS, J. G. Dinuclear ruthenium(ii) complexes containing one inert metal centre and one coordinatively-labile metal centre: syntheses and biological activities. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 9, p. 4017-4029, 2016. DOI 10.1039/c5dt04885k.

LIANG, R.; WEI, M.; EVANS, D. G.; DUAN, X. Inorganic nanomaterials for bioimaging, targeted drug delivery and therapeutics. **Chem. Commun.**, [S.L.], v. 50, n. 91, p. 14071-14081, 10 jun. 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c4cc03118k>.

LIM, J.Y.; YOON, J.; HOVDE, C.J. A Brief Overview of Escherichia Coli O157:H7 and Its Plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 20, no 1, janeiro de 2010, p. 5–14.

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 dppz Ligand. **Chempluschem**, v. 83, n. 7, p. 643-650, jul. 2018. DOI 10.1002/cplu.201800042

LYNCH, A. S.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and Fungal Biofilm Infections. **Annual Review Of Medicine**, [S.L.], v. 59, n. 1, p. 415-428, 1 fev. 2008. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.59.110106.132000>.

MALANOVIC, N.; LOHNER, K. Gram-positive bacterial cell envelopes: the impact on the activity of antimicrobial peptides. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes**, v. 1858, n. 5, p. 936-946, maio 2016. DOI 10.1016/j.bbamem.2015.11.004.

MARTIN, M. A. Coagulase-Negative Staphylococcal Bacteremia. **Annals Of Internal Medicine**, v. 110, n. 1, p. 9, jan. 1989. American College of Physicians. DOI 10.7326/0003-4819-110-1-9.

MARTINO, P. di. Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype. **Aims Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 274-288, 2018. DOI 10.3934/microbiol.2018.2.274.

MATYNIA, B.; MŁODZINSKA, E.; HRYNIEWICZ, W. Antimicrobial susceptibility patterns of Staphylococcus aureus in Poland obtained by the National Quality Assurance Programme. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 379-385, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01105.x>.

MCCANN, M.; KELLETT, A.; KAVANAGH, K.; DEVEREUX, M.; SANTOS, A. L. S. Deciphering the Antimicrobial Activity of Phenanthroline Chelators. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 17, p. 2703-2714, mai. 2012. DOI 10.2174/092986712800609733.

MEHLIN, C.; HEADLEY, C. M.; KLEBANOFF, S. J. An Inflammatory Polypeptide Complex from Staphylococcus epidermidis: isolation and characterization. **Journal Of Experimental Medicine**, v. 189, n. 6, p. 907-918, mar. 1999. DOI 10.1084/jem.189.6.907.

MONEGRO, A.F.; MUPPIDI V.; REGUNATH H. Hospital Acquired Infections. [S.L.]: In: Statpearls [Internet]. Treasure Island (FL): Statpearls, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441857/>. Acesso em: 04 abr. 2022.

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.

MUNTEANU, A-C.; NOTARO, A.; JAKUBASZEK, M.; COWELL, J.; THARAUD, M.I.; GOUD, B.; UIVAROSI, V.; GASSER, G. Synthesis, Characterization, Cytotoxic Activity, and Metabolic Studies of Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes Containing Flavonoid Ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 4424-4434, mar. 2020. DOI 10.1021/acs.inorgchem.9b03562.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **PubChem Compound Summary for CID 1318, 1,10-Phenanthroline**. [S. l.], [18-]. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_10-Phenanthroline. Acesso em: 4 abr. 2022

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.

NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 593-656, dez. 2003. DOI 10.1128/membr.67.4.593-656.2003.

NOVOSAD, S. A.; FIKE, L.; DUDECK, M. A.; ALLEN-BRIDSON, K.; EDWARDS, J. R.; EDENS, C.; SINKOWITZ-COCHRAN, R.; POWELL, K.; KUCHAR, D. Pathogens causing central-line-associated bloodstream infections in acute-care hospitals—United States, 2011–2017. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 41, n. 3, p. 313-319, 9 jan. 2020. DOI 10.1017/ice.2019.303.

NUNES, P.; CORREIA, I.; MARQUES, F.; MATOS, A. P.; SANTOS, M. M. C. dos; AZEVEDO, C. G.; CAPELO, J. L.; SANTOS, H. M.; GAMA, S.; PINHEIRO, T.; CAVACO, I.; PESSOA, J. C. Copper Complexes with 1,10-Phenanthroline Derivatives: underlying factors affecting their cytotoxicity. **Inorganic Chemistry**, [S.L.], v. 59, n. 13, p. 9116-9134, 24 jun. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c00925>.

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.

OKAJIMA, Y.; KOBAYAKAWA, S.; TSUJI, A.; TOCHIKUBO, T. Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis* on Intraocular Lens Material. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 7, p. 2971, jul. 2006. DOI 10.1167/iovs.05-1172.

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.

OTTO, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. **Seminars In Immunopathology**, v. 34, n. 2, p. 201-214, nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. DOI 10.1007/s00281-011-0296-2.

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.

PARADA, J.; ATRIA, A. M.; BAGGIO, R.; WIESE, G.; LAGOS, S.; PAVÓN, A.; RIVAS, E.; NAVARRO, L.; CORSINI, G. ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND HUMAN CELL CYTOTOXIC OF COBALT (III) COMPLEXES WITH 1,10-PHENANTHROLINE AND CARBOHYDRATE LIGANDS. **Journal Of The Chilean Chemical Society**, v. 62, n. 4, p. 3746-3751, dez. 2017. DOI 10.4067/s0717-97072017000403746.

PEREGRINO, I. V.; VENTURA, R. F.; BORGHI, M.; SCHUENCK, R. P.; DEVEREUX, M.; MCCANN, M.; SANTOS, A. L. S. dos; FERREIRANUNES, A. P. Antibacterial activity and carbapenem re-sensitizing ability of 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its metal complexes against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strains. **Letters In Applied Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 139-148, mai. 2021. DOI 10.1111/lam.13485.

PINHEIRO, L. **Caracterização de Estafilococos Coagulase-Negativa de origem hospitalar e comunitária quanto à diversidade clonal e a determinantes de resistência antimicrobiana**. 2018. 118 p. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada) - Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São Paulo, 2018.

POOLE, K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2069-2089, 22 maio 2012. DOI 10.1093/jac/dks196.

POTTER, A.; CEOTTO, H.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; SANTOS, K. R. N. dos; NES, I. F.; BASTOS, M. do C. de F. The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections. **The Journal Of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 319-326, jun. 2009. DOI 10.1007/s12275-009-0008-y.

RODRIGUES, C. M. Martins de Sousa. **Infecções Nosocomiais**. 2013. 113 p. Dissertação (Mestrado) - Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Portugal, 2013.

SIEVERT, D. M.; RICKS, P.; EDWARDS, J. R.; SCHNEIDER, A.; PATEL, J.; SRINIVASAN, A.; KALLEN, A.; LIMBAGO, B.; FRIDKIN, S. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 34, n. 1, p. 1-14, jan. 2013. DOI 10.1086/668770.

SIKORA, A.; ZAHRA, F. **Nosocomial Infections**. [S.L.]: In: Statpearls [Internet]. Treasure Island (FL): Statpearls, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559312/>. Acesso em: 04 abr. 2022.

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.

SILVA, J. J. N.; GUEDES, P. M. M.; ZOTTIS, A.; BALLIANO, T. L.; SILVA, F. O. N.; LOPES, L. Gonzaga F.; ELLENA, J.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; FRANCO, D. W. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition

and in vitro/in vivo trypanocidal activity. **British Journal Of Pharmacology**, v. 160, n. 2, p. 260-269, jan. 2010. DOI 10.1111/j.1476-5381.2009.00524.x.

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: photouncaging 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, Aurideia P. de; ELLENA, Javier; GONDIM, Ana C.s.; LOPES, Luiz G.F.; SOUSA, Eduardo H.s.; VASCONCELOS, Mayron A. de; TEIXEIRA, Edson H.; FORD, Peter C.; HOLANDA, Alda K.M.. Antimicrobial activity of cis-[Ru(bpy)₂(L)(L')]⁺ complexes, where L = 4-(4-chlorobenzoyl)pyridine or 4-(benzoyl)pyridine and L' = Cl⁻ or CO. **Polyhedron**, [S.L.], v. 144, p. 88-94, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2018.01.002>.

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

SRINIVASAN, R.; SANTHAKUMARI, S.; POONGUZHALI, P.; GEETHA, M.; DYAVAIHAH, M.; XIANGMIN, L. Bacterial Biofilm Inhibition: a focused review on recent therapeutic strategies for combating the biofilm mediated infections. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 12, p. 676458, 12 maio 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.676458>.

TAY, C. X.; QUAH, S. Y.; LUI, J. N.; YU, V. S. H.; TAN, K. S. Matrix Metalloproteinase Inhibitor as an Antimicrobial Agent to Eradicate Enterococcus faecalis Biofilm. **Journal Of Endodontics**, [S.L.], v. 41, n. 6, p. 858-863, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2015.01.032>.

TAYLOR, T.A.; UNAKAL, C.G. Staphylococcus aureus. [S.L.]: In: Statpearls [Internet]. Treasure Island (FL): Statpearls, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>. Acesso em: 04 abr. 2022.

UÇKAY, I.; PITTET, D.; VAUDAUX, P.; SAX, H.; LEW, D.; WALDVOGEL, F. Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis. **Annals Of Medicine**, v. 41, n. 2, p. 109-119, jan. 2009. DOI 10.1080/07853890802337045.

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.

VESTBY, L. K.; GRØNSETH, T.; SIMM, R.; NESSE, L. L. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 59, 3 fev. 2020. DOI 10.3390/antibiotics9020059.

VIEIRA, C. L. R.; MEDEIROS, S. G. G. B.; PINTO, F. S.; MACIEL, R. L.; CLEMENTE, W. T.; MIRANDA, N. R. R.; RIBEIRO, F. C. M.; SILVA, M. S. R. da; JESUS, L. A. de; RODRIGUES, C. L. Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e desfecho em pacientes de terapia intensiva com COVID-19. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, v. 26, p. 102249, jan. 2022. DOI 10.1016/j.bjid.2021.102249.

VIGANOR, L.; GALDINO, A. C. M.; NUNES, A. P. F.; SANTOS, K. R. N.; BRANQUINHA, M. H.; DEVEREUX, M.; KELLETT, A.; MCCANN, M.; SANTOS, A. L. S. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity of 1,10-phenanthroline-based drugs against both planktonic- and biofilm-growing cells. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 128-134, 27 set. 2015. DOI 10.1093/jac/dkv292.

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.

WENZEL, R. P. Health Care–Associated Infections: major issues in the early years of the 21st century. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 1, p. 85-88, 15 jul. 2007. DOI 10.1086/518136.

WONG, E.; GIANDOMENICO, C. M. Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2451-2466, ago. 1999. DOI 10.1021/cr980420v.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. 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: 04 abr. 2022.

YANG, Y.; LIAO, G.; FU, C. Recent Advances on Octahedral Polypyridyl Ruthenium(II) Complexes as Antimicrobial Agents. **Polymers**, v. 10, n. 6, p. 650, jun. 2018. DOI 10.3390/polym10060650.

YAO, Y.; STURDEVANT, D. E.; OTTO, M. Genomewide Analysis of Gene Expression in *Staphylococcus epidermidis* Biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 191, n. 2, p. 289-298, jan. 2005. DOI 10.1086/426945.

YIN, W.; WANG, Y.; LIU, L.; HE, J. Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 3423, jul. 2019. DOI 10.3390/ijms20143423.

ZENG, L.; GUPTA, P.; CHEN, Y.; WANG, E.; JI, L.; CHAO, H.; CHEN, Z-S. The development of anticancer ruthenium(ii) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 19, p. 5771-5804, 2017. DOI 10.1039/c7cs00195a.

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.