



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIENCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

FATIMA DAIANA DIAS BARROSO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
BIOSURFACTANTE COMPLEXADO COM ARGININA FRENTE A *Staphylococcus
aureus* RESISTENTE À METICILINA (SARM) e *Candida spp.* E SEU POTENCIAL
PARA DESAGREGAÇÃO DE BIOFILMES EM CATETERES VENOSOS
PERIFÉRICOS**

FORTALEZA

2025

FATIMA DAIANA DIAS BARROSO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
BIOSURFACTANTE COMPLEXADO COM ARGININA FRENTE A *Staphylococcus
aureus* RESISTENTE À METICILINA (SARM) e *Candida* spp. E SEU POTENCIAL
PARA DESAGREGAÇÃO DE BIOFILMES EM CATETERES VENOSOS
PERIFÉRICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

Coorientador: Prof. Dra. Cecília Rocha da Silva

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B285a Barroso, Fatima Daiana Dias.

Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de biossurfactante complexado com a arginina frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) e *Candida* spp. e seu potencial para desagregação de biofilmes em cateteres venosos periféricos / Fatima Daiana Dias Barroso. – 2025.
154 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Junior.

Coorientação: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva.

1. Resistência. 2. *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. 3. Biofilme. 4. Cateter. 5. Ramnolipídeos. I. Título.

CDD 616.9

FATIMA DAIANA DIAS BARROSO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
BIOSURFACTANTE COMPLEXADO COM ARGININA FRENTE A *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA (SARM) e *Candida* spp. E SEU POTENCIAL
PARA DESAGREGAÇÃO DE BIOFILMES EM CATETERES VENOSOS
PERIFÉRICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Aprovada em: 26/06/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Helio Vitoriano Nobre Junior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Livia Gurgel do Amaral Valente Sá
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira
Universidade Regional do Cariri (URCA)

Prof. Dr. Iri Sandro Pampolha Lima
Universidade Federal do Cariri (UFCA)

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
Universidade Regional do Cariri (URCA)

A Deus.

A minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em sua infinita bondade me permitiu chegar até aqui. A todas as oportunidades, eventos positivos e negativos que moldaram meu caminho e fortaleceram minha fé.

A meu querido esposo, Saulo Maia, pelo incentivo e dedicação diária.

A meus pais, Evanildo e Daniela, pelo amor e dedicação na construção de nosso caráter e educação. Aos meus irmãos, Deisy e Amadeu pelo companheirismo e apoio.

Ao professor Hélio Vitoriano, que me acompanhou ao longo desses 10 anos, desde a iniciação científica até o doutorado. Obrigada pelas oportunidades e confiança.

A todos os meus colegas do LABIMAN, sem a contribuição de todos vocês esse trabalho não seria realizado.

Aos professores participantes da banca examinadora pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A professora Dra. Lourdes Perez e ao Dr. Anderson Ramos pelo fornecimento das moléculas utilizadas no estudo. Ao professor Bruno Cavalcanti pela contribuição experimental.

A central analítica da UFC pela operacionalização das análises por microscopia.

À Instituição CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

“Os acasos só favorecem os espíritos
preparados.” (LOUIS PASTEUR, 1822–1895).

RESUMO

O espectro de resistência microbiana tem se expandido globalmente, desafiando a eficácia de terapias antimicrobianas e representando uma grave ameaça à saúde pública. Essa problemática se agrava com o aumento de infecções associadas a biofilmes. Os dispositivos médicos, amplamente utilizados em diversos procedimentos e tratamentos, constituem um ambiente propício para a formação de biofilmes, especialmente em cateteres, próteses e implantes. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia antimicrobiana de um ramnolípido complexado com o aminoácido arginina (RLMIX_Arg) contra células planctônicas, biofilmes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (SARM) e biofilmes polimicrobianos de SARM e *C. albicans* resistentes ao fluconazol em placas de poliestireno e cateteres venosos periféricos (CVP), assim como, analisar a eficiência de cateteres impregnados com RLMIX_Arg isolado e uma formulação de gel. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada de acordo com os documentos M07-A10 e M23-A3 do CLSI. Assim como a avaliação da interação farmacológica foi determinada utilizando a metodologia do *checkboard*. Para as análises de formação de biofilmes foram utilizados testes de redução do MTT, marcação com cristal violeta e microscopia eletrônica de varreduras (MEV). A formação de biofilmes nos cateteres foi analisada por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Além disso, testes de citometria de fluxo foram utilizados para avaliar a viabilidade celular e a fragmentação do DNA das células bacterianas. A CIM do composto frente a células planctônicas de SARM variou de 4 a 16 µg/mL, apresentando atividade bactericida. Notavelmente, observamos sinergismo com oxacilina em 37,5% das cepas, com redução de até quatro vezes a CIM para oxacilina. Para as cepas de *Candida* as CIMs variaram de 2 a 13 µg/mL. Além disso, concentrações de 64 µg/mL e 80 µg/mL levaram a uma redução significativa (90%) na viabilidade celular de biofilmes em placas de poliestireno e em CVP tanto no processo inicial de formação como biofilmes maduros de SARM isoladamente. Para biofilmes formados pela associação SARM e *C. albicans* a concentração de 112 µg/mL (16xCIM) mostrou diminuir cerca de 81,8% da viabilidade celular em placas. Cateteres impregnados com RLMIX_Arg isoladamente na concentração de 4 mg/mL foram capazes de diminuir a aderência de células de SARM em 29,5%. A prevenção na formação de biofilmes mistos foi verificada com CVP impregnados com 10 mg/mL de RLMIX_Arg isoladamente, diminuindo cerca de 93,8% da adesão celular. A formulação utilizando RLMIX_Arg 0,9 µg/mL incorporado a gel Pluronic F-127 mostrou-se mais efetiva na prevenção de biofilmes mistos em CVP, diminuindo cerca de

99,1% da adesão. Os cateteres impregnados apresentaram manutenção de seu efeito antimicrobiano após 28 dias de armazenamento. O mecanismo de ação em células planctônicas possivelmente envolve danos à membrana celular e fragmentação do DNA de maneira dependente da concentração. Esses danos foram mais pronunciados quando o composto foi combinado com oxacilina. As descobertas indicam que o RLMIX_Arg exibe potencial para aplicação na prevenção de infecções relacionadas a biofilmes de SARM isolados e mistos com *C. albicans*.

Palavras-chave: Resistência; *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina; Biofilme; Cateter; Ramnolipídeos; Arginina

ABSTRACT

The spectrum of microbial resistance has been expanding globally, challenging the effectiveness of antimicrobial therapies and representing a serious threat to public health. This issue is further exacerbated by the increasing incidence of biofilm-associated infections. Medical devices, which are widely used in various procedures and treatments, provide a favorable environment for biofilm formation, particularly in catheters, prostheses, and implants. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial efficacy of a rhamnolipid complexed with the amino acid arginine (RLMIX_Arg) against planktonic cells, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms, and polymicrobial biofilms formed by MRSA and fluconazole-resistant *Candida albicans* on polystyrene plates and peripheral venous catheters (PVCs). Additionally, the study assessed the interference of RLMIX_Arg, both in its isolated form and formulated in a gel, with the biofilm formation process in impregnated catheters. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined in accordance with CLSI documents M07-A10 and M23-A3. The assessment of the pharmacological interaction was also determined using the checkerboard methodology. Biofilm formation was assessed through MTT reduction assays, crystal violet staining, and scanning electron microscopy (SEM). Biofilm formation on catheters was analyzed by counting colony-forming units (CFU/mL). Furthermore, flow cytometry assays were performed to evaluate cell viability and DNA fragmentation in bacterial cells. The MIC of the compound against planktonic MRSA cells ranged from 4 to 16 µg/mL, demonstrating bactericidal activity. Notably, synergy with oxacillin was observed in 37.5% of the strains, resulting in up to a threefold reduction in oxacillin MIC. For *Candida* strains, MICs ranged from 2 to 13 µg/mL. In addition, concentrations of 64 µg/mL and 80 µg/mL led to a significant (90%) reduction in biofilm cell viability on polystyrene plates and PVCs, both during the initial formation stage and in mature MRSA biofilms. For polymicrobial biofilms formed by MRSA and *C. albicans*, a concentration of 112 µg/mL (16×MIC) reduced cell viability by approximately 81.8% on plates. Catheters impregnated with RLMIX_Arg at a concentration of 4 mg/mL alone were able to reduce MRSA cell adhesion by 29.5%. Prevention of mixed biofilm formation was observed in PVCs impregnated with 10 mg/mL of RLMIX_Arg alone, with approximately 93.8% reduction in cell adhesion. The formulation containing 0.9 µg/mL RLMIX_Arg incorporated into Pluronic F-127 gel proved to be more effective in preventing mixed biofilms on PVCs, reducing adhesion by about 99.1%. Impregnated catheters maintained their antimicrobial effect after 28 days of storage. The

mechanism of action against planktonic cells possibly involves membrane damage and concentration-dependent DNA fragmentation. These effects were more pronounced when the compound was combined with oxacillin. The findings indicate that RLMIX_Arg shows potential for application in the prevention of infections associated with MRSA biofilms, both isolated and in combination with *C. albicans*.

Keywords: Resistance; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Biofilm; Catheter; Rhamnolipids; Arginine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> (A) Coloração do <i>S. aureus</i> pelo método de Gram mostrando cocos Gram-positivos em pares, tétrades e cachos. Amplificação original de 1.000 vezes. (B) Colônias de <i>S. aureus</i> em uma placa de ágar-sangue após incubação de 24 horas.....	25
Figura 2	Mecanismo de resistência do <i>S. aureus</i> à penicilina e meticilina. (A) Penicilina é hidrolisada por uma β -lactamase resultando em ácido peniciloico (molécula inativa). (B) Expressão da PBP2a diminui a afinidade pela meticilina, resultando em resistência.....	28
Figura 3	Infecções de corrente sanguínea causadas por SARM com teste de sensibilidade reportados no mundo, por um milhão de habitantes entre os anos de 2016, 2018 e 2020.....	30
Figura 4	Aspectos relevantes para o estabelecimento da infecção por <i>S. aureus</i> relacionado: ao hospedeiro e ao patógeno.....	34
Figura 5	Ciclo de formação de um biofilme microbiano.....	36
Figura 6	Interações no biofilme polimicrobiano de <i>C. albicans</i> – <i>S. aureus</i> (A) <i>S. aureus</i> adere à proteína Als3 presente nas hifas de <i>C. albicans</i> , promovendo forte adesão e favorecendo o crescimento do biofilme (B) Sinais químicos produzidos por <i>C. albicans</i> , como o farnesol e a PGE2, estimulam o crescimento e o aumento de biomassa do biofilme de <i>S. aureus</i> (C) A β -glucana, atua como uma barreira física que dificulta a ação de antimicrobianos e favorece a sobrevivência de <i>S. aureus</i> (D) Biofilmes de <i>C. albicans</i> geram um microambiente hipóxico que pode potencializar a produção de toxinas por <i>S. aureus</i>	43
Figura 7	Estrutura química da molécula de Vancomicina. a) Ligações entre a vancomicina e a porção D-Ala-D-Ala terminal do peptideoglicano. b) Porção modificada D-Ala D-Lac.....	49
Figura 8	a) Estrutura química da molécula de Daptomicina. b) Mecanismo de ação da Daptomicina.....	51
Figura 9	Estrutura química(a) e mecanismo de ação(b) da molécula de Linezolida.....	53
Figura 10	Estrutura química da molécula de Ceftarolina.....	54

Figura 11	Estrutura química de moléculas de RL formadas por mono ou di-(L)-ramnose e cadeias de ácido graxo.....	57
Figura 12	Interação eletrostática de biossurfactante catiônico com a membrana de bactérias Gram-positivas. 1) Atração eletrostática do biossurfactante catiônico (+) com o ácido teicoico e lipoteicoico (-) da parede celular. 2) Ligação do biossurfactante catiônico com a parede celular. 3) Interação entre a membrana e a parede celular alterada, permitindo a perturbação da integridade da membrana.....	60
Figura 13	Estrutura química dos monos (2) e di-RL (1) complexados com a molécula de arginina.....	61
Figura 14	Esquema simplificado da metodologia utilizada no estudo. SARM: <i>Staphylococcus aureus</i> Resiste a Meticilina; MTT: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) - 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium; CV: Cristal Violeta; UFC/mL: Unidades Formadoras de Colonia por mililitro; IP : Iodeto de propídio; TUNEL: <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>	65
Figura 15	Avaliação do efeito do RLMIX_Arg na viabilidade celular de biofilmes pré-formados de SARM após 12h e 24 h de tratamento.....	88
Figura 16	Avaliação do efeito do RLMIX_Arg na biomassa do biofilmes pré-formados de SARM após 24h de tratamento.....	90
Figura 17	Avaliação do efeito do RLMIX_Arg na viabilidade celular dos biofilmes de SARM na fase inicial de formação após 12h e 24 h de tratamento.....	91
Figura 18	Avaliação do efeito do RLMIX_Arg na biomassa dos biofilmes de SARM na fase inicial de formação após 24h de tratamento.....	92
Figura 19	Avaliação do efeito do RLMIX_Arg em concentrações subinibitórias na viabilidade celular dos biofilmes de SARM na fase inicial de formação após 24h de tratamento.....	93
Figura 20	Efeito na adesão da biomassa celular de biofilmes de SARM em placas de poliestireno após tratamento das placas com RLMIX_Arg por 24h.....	94

Figura 21	Avaliação do efeito do RLMIX_Arg na viabilidade celular de biofilmes mistos de SARM e <i>C. albicans</i> pré-formados em placas de poliestireno após 24h de tratamento.....	95
Figura 22	Efeito do RLMIX_Arg nas UFC de biofilmes maduros e na fase inicial de adesão em CVP após tratamento por 24h. A: Biofilmes maduros. B: efeito anti formação do biofilme.....	97
Figura 23	Efeito do RLMIX_Arg nas UFC de biofilmes maduros de SARM 4 em CVP após 24h de tratamento.....	98
Figura 24	A) Efeito do cateter impregnado com o RLMIX_Arg sobre a formação de biofilmes de SARM em CVP. B) Antibiograma com cateteres impregnados.....	99
Figura 25	Avaliação da atividade e da durabilidade do efeito antimicrobiano do cateter impregnado com o RLMIX_Arg isolado sobre a formação de biofilmes mistos de SARM e <i>C. albicans</i> em CVP.....	101
Figura 26	Avaliação da atividade e da durabilidade do efeito antimicrobiano do cateter impregnado com o gel Pluronic F-127 + RLMIX_Arg sobre a formação de biofilmes mistos de SARM e <i>C. albicans</i> em CVP.....	102
Figura 27	Avaliação dos danos causados por RLMIX_Arg nas membranas de células de SARM após 24h de tratamento.....	104
Figura 28	Avaliação da fragmentação do DNA causada após tratamento com RLMIX_Arg em células de SARM após 24h de tratamento.....	105
Figura 29	Avaliação da ação do RLMIX_Arg em biofilmes maduros de SARM formados em cateteres venosos periféricos após 24h de tratamento por MEV.....	106
Figura 30	Avaliação da ação de cateteres impregnados com RLMIX_Arg 10 mg/mL na prevenção da formação de biofilme mistos de SARM e <i>Candida albicans</i> em cateteres venosos periféricos após 48h de incubação com inóculo bacteriano.....	107
Figura 31	Avaliação da ação de cateteres impregnados com gel Pluronic F-127 + RLMIX_Arg (0.9 µg/ml) na prevenção da formação de biofilme mistos de SARM	108

e *Candida albicans* em cateteres venosos periféricos após 48h de incubação com
inoculo bacteriano.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lista de patógenos prioritários de acordo com a OMS, 2024	29
Tabela 2	Principais fatores relacionados a adesão, maturação e dispersão de células de biofilmes de <i>S. aureus</i>	37
Tabela 3	Medidas de Prevenção de ICSAC-CVC, diretrizes da SHEA.....	46
Tabela 4	Avaliação da atividade antimicrobiana do RLMIX_Arg isolado frente a cepas de SARM de diferentes sítios anatômicos.....	81
Tabela 5	Avaliação da atividade antimicrobiana do RLMIX_Arg isolado frente a cepas de <i>Candida albicans</i>	82
Tabela 6	Avaliação do efeito sinérgico do RLMIX_Arg com oxacilina e vancomicina frente a cepas de SARM.....	84
Tabela 7	Comparação do efeito sinérgico do RLMIX_Arg com oxacilina e vancomicina frente a cepas de SARM em valores de percentual de redução de concentração inibitória mínima.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Agr</i>	<i>Accessory Regulatory Gene</i> - Gene acessório regulador
ANOVA	Análise de variância
AIP	<i>Autoinducer Peptide</i> - Peptídeo Autoindutor
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> – Coleção Americana de Culturas
Bap	<i>Biofilm associated protein</i> - Proteína associada ao biofilme
BHE	Barreira hemato encefálica
CAMHB	<i>Cation-Adjusted Mueller Hinton Broth</i> - Mueller Hinton caldo cátion ajustado
CBM	Concentração bactericida mínima
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> - Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CIM	Concentração Inibitória mínima
ClfA	Fator de aglomeração A
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> – Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
COVID-19	Coronavírus-19
CSIC	<i>Consejo Superior de Investigaciones Científicas</i> – Conselho Superior de Investigações Científicas
CVC	Cateter venoso central
CVP	Cateter venoso periférico
DMSO	Dimetilsulfóxido
eDNA	DNA extracelular
EUA	Estados Unidos da América
ICIF	<i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i> - Índice de Concentração Inibitória Fracionária
IQAC	<i>Instituto de Química Avanzada de Cataluña</i> – Instituto de Química Avançada da Catalunha
IP	Iodeto de Propídio
GLASS	<i>Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System</i> - Sistema Global de Vigilância da Resistência e Uso de Antimicrobianos
HMDS	Hexametildisilazano

ICSAC	Infecção de corrente sanguínea associada à cateter
ICSAC-CVP	Infecção de corrente sanguínea associada à cateter venoso periférico
IRAS	Infecções relacionadas a assistência à saúde
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
NIH	<i>National Institutes of Health</i> – Instituto Nacional de Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP	<i>Penicillin binding protein</i> - Proteína de ligação a penicilina
PBP2a	<i>Penicillin binding protein</i> - Proteína de ligação a penicilina 2a
PIA	<i>Intracellular adhesion polysaccharide</i> - Polissacarídeo de adesão intracelular
PSMs	Peptídeos semelhantes a surfactantes
PH	Potencial Hidrogeniônico
RL	Ramnolipídios
RLMIX_Arg	Mistura de mono e di-ramnolipídeo complexado com Arginina
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
SARM-CA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina adquirido na comunidade
SARM-HA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina adquirido em hospital
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
SCCmec	Cassete cromossômico estafilocócico
SHEA	<i>Society for Healthcare Epidemiology of America</i> - Sociedade de Epidemiologia Hospitalar da América
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SPE	Substância Polimérica Extracelular
SSP1	<i>Staphylococcal surface protein</i> - Proteína de superfície estafilocócica
SSSS	<i>Staphylococcal Scalded Skin Syndrome</i> - Síndrome da pele Escaldada Estafilocócica
SSTIs	<i>Skin and soft tissue infections</i> - Infecções de pele e tecidos moles
TSB	Caldo triptona soja
TSST-1	Toxina da síndrome do choque tóxico 1
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay</i>
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mL
UTI	Unidades de terapia intensiva

VISA	<i>Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária a vancomicina
VRSA	<i>Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Gênero <i>Staphylococcus</i> spp	25
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (SARM).....	27
2.3	Epidemiologia do SARM.....	30
2.4	Patogênese das infecções causadas por <i>S. aureus</i>	32
2.5	Biofilmes formados por <i>S. aureus</i>	35
2.5.1	O gênero <i>Candida</i>	39
2.5.2	Biofilme <i>cross-kingdom</i> de <i>S. aureus</i> associado a <i>Candida albicans</i>	40
2.6	Infecções relacionadas a cateteres.....	43
2.7	Tratamento.....	48
2.7.1	Vancomicina.....	49
2.7.2	Daptomicina.....	50
2.7.3	Linezolida.....	42
2.7.4	Ceftarolina.....	54
2.8	Biossurfactantes.....	56
2.9	Biossurfactantes catiônicos derivados de aminoácidos.....	58
3	HIPÓTESES.....	63
4	OBJETIVOS.....	59
4.1	Objetivo geral.....	64
4.2	Objetivos específicos.....	64
5	MATERIAIS E MÉTODOS	65
5.1	Microrganismos.....	66
5.2	Fármacos.....	66
5.3	Teste de Sensibilidade Antimicrobiana.....	67
5.3.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	67
5.3.2	Avaliação da interação farmacológica utilizando a metodologia do <i>checkerboard</i>	68
5.3.3	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	69
5.3.4	Determinação do Nível de Tolerância.....	69
5.3.5	Análise de dados.....	69

5.4	Avaliação da atividade do RLMIX_Arg frente a biofilmes de <i>S. aureus</i> em placas de poliestireno isolado e combinado a <i>C. albicans</i>	70
5.4.1	Formação do biofilme nas placas de 96 poços.....	70
5.4.2	Avaliação da viabilidade celular utilizando o MTT (brometo de 3-4,5-dimetil tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio)	71
5.4.3	Avaliação da biomassa celular dos biofilmes de SARM utilizando corante Cristal Violeta.....	72
5.4.4	Avaliação do efeito <i>in vitro</i> do RLMIX_Arg sobre a etapa de formação inicial (adesão) de biofilmes de <i>S. aureus</i> em placas de 96 poços.....	72
5.4.5	Avaliação do efeito do pré-tratamento da placa de poliestireno com RLMIX_Arg na adesão das células de SARM.....	73
5.4.6	Análise de dados.....	73
5.5	Avaliação do efeito <i>in vitro</i> do RLMIX_Arg em biofilmes formados e em formação de SARM em cateteres venosos periféricos (CVP).....	73
5.5.1	Formação do biofilme no CVP.....	73
5.5.2	Avaliação da interferência do RLMIX_Arg em biofilmes maduros e na fase inicial de adesão em cateteres.....	74
5.6	Efeito da impregnação de cateteres com RLMIX_Arg isolado e em gel na formação de biofilmes de SARM e de biofilme misto de SARM e <i>C. albicans</i>	75
5.6.1	Avaliação da durabilidade do efeito antimicrobiano do RLMIX_Arg e seu gel impregnados em cateteres.....	76
5.7	Avaliação do mecanismo de ação de RLMIX_Arg em células planctônicas de SARM.....	76
5.7.1	Preparo das suspensões de SARM e tratamento com RLMIX_Arg.....	76
5.7.2	Avaliação da viabilidade celular através de citometria de fluxo.....	77
5.7.3	Avaliação de fragmentação no DNA.....	77
5.7.4	Análise de dados.....	78
5.8	Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	78
6	RESULTADOS	80
6.1	Teste de sensibilidade antimicrobiana e interação farmacológica.....	80

6.2	Efeito do RLMIX_Arg sobre biofilmes pré-formados em placas de 96 poços.....	87
6.3	Efeito do RLMIX_Arg sobre biofilmes em formação em placas de 96 poços.....	90
6.4	Efeito inibitório na adesão das células ao poliestireno (<i>in vitro</i>)	93
6.5	Avaliação do efeito do RLMIX_Arg na viabilidade celular de biofilmes misto de SARM e <i>C. albicans</i> pré-formados em placas após 24h de tratamento.....	94
6.6	Efeito do RLMIX_Arg sobre biofilmes de SARM isolado formados e em formação em cateteres venosos periféricos (CVP).....	95
6.7	Efeito do cateter impregnado com o RLMIX_Arg isolado e em gel de Pluronic F-127 + RLMIX_Arg sobre a formação de biofilmes em cateteres venosos periféricos.....	98
6.7.1	Efeito do cateter impregnado com RLMIX_Arg isolado sobre a formação de biofilme de SARM em CVP.....	98
6.7.2	Efeito do cateter impregnado com RLMIX_Arg isolado e da formulação em gel sobre a formação de biofilme misto em CVP.....	100
6.8	Avaliação de viabilidade celular através de citometria de fluxo.....	103
6.9	Teste de TUNEL.....	103
6.10	Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	106
7	DISCUSSÃO	109
8	CONCLUSÃO	118
9	REFERÊNCIAS	119
10	ANEXOS	138
	ANEXO I – ARTIGOS PUBLICADOS.....	145
	ANEXO II – RESULTADOS PARA BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.....	147
	ANEXO III - TABELAS COM DADOS DO EXEL.....	148

1 INTRODUÇÃO

A resistência microbiana é uma das principais causas de aumento da mortalidade e morbidade globais, tornando-se um importante problema de saúde pública. O tratamento de infecções resistentes está associado ao aumento dos custos com drogas de amplo espectro, bem como aumento dos dias de hospitalização (Tsuzuki *et al.*, 2021). Estudos demonstram que, nos Estados Unidos da América (EUA), um custo adicional de US\$ 2,9 bilhões esteja relacionado ao tratamento de infecções resistentes anualmente (Shrestha *et al.*, 2018). Apesar da disseminação global da resistência aos antibióticos, a aprovação regulatória de novos antibióticos nos EUA sofreu uma queda drástica de 90% nos últimos 30 anos. Essa redução se deve, em grande parte, ao alto custo da pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, estimado em cerca de 1,4 bilhão de dólares por antibiótico registrado, aliado à rápida evolução da resistência, que resulta em retornos de mercado diminutos para a indústria farmacêutica (Brüssow, 2024; Watkins e Bonomo, 2016).

Estima-se que 80% das infecções crônicas resistentes estejam relacionadas a biofilmes, os quais caracterizam-se como uma comunidade microbiana aderida a uma superfície biótica ou abiótica imersa em uma matriz extracelular polimérica (Idrees *et al.*, 2021). A arquitetura do biofilme permite que as bactérias sobrevivam a condições desfavoráveis, sendo 1000 vezes mais resistentes ao tratamento com antibióticos em relação às células planctônicas (Breij, De *et al.*, 2018). Nos EUA essas infecções levam a uma perda de 11.5 bilhões por ano, incluindo infecções de sítio cirúrgico, trato urinário e principalmente aquelas relacionadas ao uso de cateteres (Singh *et al.*, 2022).

Apesar de seu papel crucial, o uso de cateteres leva os pacientes a um alto risco de desenvolvimento de infecções na corrente sanguínea (Farrag *et al.*, 2019), o qual pode ser contaminado durante a manipulação, através da migração da flora normal da pele, por fluidos contaminados, entre outros (Barbara W. Trautner, MD; Rabih O. Darouiche, 2015). De acordo com Salmanov *et al.* (2019), ocorrem anualmente cerca de 250.000 infecções de corrente sanguínea, destas, 36,5% estão relacionadas ao uso de cateteres.

S. aureus é um patógeno comensal, o qual está associado a infecções oportunistas, nosocomiais, de pele, tecidos moles e sobretudo infecções relacionadas ao uso de cateteres (Liu, Y. *et al.*, 2021). Um estudo de Bonnal *et al.* (2015) identificou que dentre as 573 bacteremias causadas por *S. aureus*, 189 tiveram origem em cateteres intravasculares (32,8%). Outro ponto importante é o surgimento de variantes de *S. aureus* resistentes à meticilina (SARM), as quais atualmente são responsáveis por 43% das infecções causadas por *S. aureus*, levando a óbito

cerca de 20.000 pacientes (EUA) anualmente, semelhante ao número de mortes por SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida), tuberculose e hepatites combinadas (Dadashi *et al.*, 2018; Liu, W. T. *et al.*, 2021).

Historicamente, a pesquisa sobre infecções em implantes concentrou-se principalmente em biofilmes bacterianos. Contudo, estudos recentes têm demonstrado a crescente importância dos biofilmes fúngicos, particularmente aqueles formados por *Candida* (Liu *et al.*, 2025). *Candida* frequentemente forma biofilmes polimicrobianos, ou *cross-kingdom*, interagindo com bactérias em comunidades complexas e estabelecendo trocas metabólicas e físicas. Em tais associações, *Candida* pode atuar como um fator predisponente ao desenvolvimento de infecções microbianas, incrementando a formação de biofilme e a virulência dos microrganismos envolvidos (Bernard, Girardot e Imbert, 2020; Kurakado *et al.*, 2024).

Dentro desse contexto, é necessário o desenvolvimento de novas estratégia terapêuticas, de forma que venham a minimizar o impacto das infecções por SARM e suas associações. Biossurfactantes, os quais são definidos quimicamente como moléculas anfipáticas produzidas pela fermentação microbiana (Thakur *et al.*, 2021) têm sido extensivamente estudados por suas propriedades antimicrobianas (Shekhar, Sundaramanickam e Balasubramanian, 2015; Singh, Patil e Rale, 2019). Algumas características como: alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, tolerância a altas temperaturas e variações de pH tornam os biossurfactantes uma opção interessante para a indústria farmacêutica (Chong e Li, 2017). Estudos apontam a eficácia de diversos ramnolipídeos (RLs) frente a *S. aureus*. Tambone *et al.* (2021) mostrou que discos de titânio revestidos com o RL R89BS (4 mg/mL) inibem a formação de biofilmes de *S. aureus* em até 99%.

É sabido que estruturas anfífilas podem alterar a interação entre microrganismos e superfície, interferindo na adesão e permeabilidade celular (Ceresa *et al.*, 2019). Sendo assim, o uso de RLs catiônicos tem ainda maior aplicabilidade em comparação com os aniônicos (Ramos da Silva *et al.*, 2019). Nesse estudo foi utilizado um RL produzido por *Pseudomonas aeruginosa* conjugado ao aminoácido arginina (RLMIX_Arg). Da Silva *et al.* (2020) mostrou que o RLMIX_Arg possui boa atividade frente a fungos do gênero *Candida* spp. e atividade antiprotozoário, porém sua atividade contra biofilmes de *S. aureus* ainda não foi investigada.

Tendo em vista a necessidade de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções por SARM, objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana de RLMIX_Arg de forma isolada e associada a antibacterianos de relevância clínica, bem como na elucidação de possíveis de vias pelas quais este biossurfactante pode atuar em sua ação frente *S. aureus*. Ademais, considerando a relevância da formação de biofilmes por SARM e suas associações com

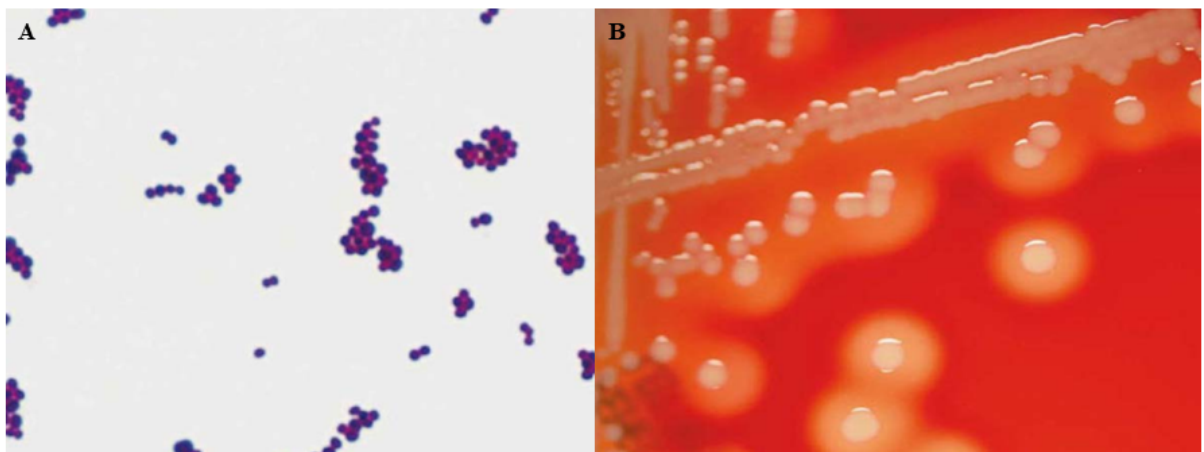
Candida, tendo em vista sua expressiva importância epidemiológica, também objetivou-se avaliar a aplicação de RLMIX_Arg impregnado em cateteres isoladamente e associado a um gel para verificar o potencial preventivo deste biossurfactante na formação de biofilmes de SARM e da combinação SARM e *Candida albicans*, caracterizando uma nova possibilidade de biomaterial. Dada a crescente resistência a antibióticos e seus efeitos colaterais, o desenvolvimento de revestimentos antimicrobianos para implantes que não utilizem antibióticos torna-se uma estratégia particularmente relevante, minimizando os efeitos adversos associados ao uso prolongado de antibióticos (Kadirvelu *et al.*, 2024).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* está classificado na família *Staphylococcaceae*, ordem *Bacillales*, classe *Bacilli* e no filo *Bacillota* (Madhaiyan, Wirth e Saravanan, 2020). Constituem-se de bactérias esféricas Gram-positivas, imóveis, catalase positivas, não formadoras de esporos e que se organizam em um padrão característico semelhante a um cacho de uvas, com dimensões que variam entre 0,5 e 1,5 μm de diâmetro (Figura 1). Essas bactérias são capazes de crescer e, potencialmente, causar doenças em diversas condições, incluindo atmosferas aeróbicas e anaeróbicas, altas concentrações de sal e temperaturas que variam de 18 a 40°C (Murray, 2022).

Figura 1 – Identificação de *Staphylococcus aureus* (A) Coloração do *S. aureus* pelo método de Gram mostrando cocos gram-positivos em pares, tétrades e cachos. Amplificação original de 1.000 vezes. (B) Colônias de *S. aureus* em uma placa de ágar-sangue após incubação de 24 horas.



Fonte: Jawetz, Melnick e Adelberg, 2014.

Atualmente, o gênero *Staphylococcus* abrange mais de 80 espécies e subespécies, muitas das quais são consideradas ubíquas, encontradas na pele e nas membranas mucosas de seres humanos e animais (Coates, Moran e Horsburgh, 2014). Algumas espécies possuem nichos muito específicos onde são comumente encontradas. Por exemplo, o *S. aureus* coloniza as narinas anteriores, *S. capitis* é encontrado em áreas com glândulas sebáceas, e *S. haemolyticus*

e o *S. hominis* são observados em regiões onde estão presentes as glândulas apócrinas (Murray, 2022).

Macroscopicamente, as colônias em meio de cultivo sólido são relativamente grandes, medindo entre 1 a 2 mm de diâmetro, arredondadas, opacas, cremosas e com uma coloração que varia de acinzentada a amarelo-ouro (Koneman *et al.*, 2020; Palavecino, 2014). A coloração amarelo-dourada é devida à presença de pigmentos carotenoides na membrana citoplasmática dos *S. aureus*. Essa característica macroscópica, juntamente com a prova de coagulase positiva, fermentação do manitol e produção de desoxirribonuclease, complementa a identificação manual dessa espécie (Koneman *et al.*, 2020).

Algumas espécies de *Staphylococcus* patogênicos em humanos e animais produzem uma enzima chamada coagulase, cuja detecção é utilizada no laboratório para identificar esses microrganismos. Entre os *Staphylococcus*, a espécie coagulase-positiva *S. aureus* e as espécies coagulase-negativas *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* são frequentemente associadas a infecções humanas (Cuny *et al.*, 2024). Nesse contexto, de acordo com Denis (2017) e Rosenthal *et al.* (2020), *S. aureus* é considerado o patógeno humano mais significativo do gênero *Staphylococcus*, sendo encontrado no ambiente externo e nas narinas anteriores de 20 a 40% dos adultos. Outros locais de colonização incluem pregas cutâneas intertriginosas, períneo, axilas e vagina (Koneman *et al.*, 2020).

Embora *S. aureus* frequentemente faça parte da microbiota humana, ele pode causar infecções oportunistas graves em condições favoráveis, como por exemplo: presença de doenças cardíacas, neoplasias, queimaduras, leões de pele, uso de dispositivos invasivos como cateteres e prótese, entre outras (Tang e Stratton, 2010). *S. aureus* é um agente significativo de infecções relacionadas à assistência à saúde, responsável por uma ampla gama de doenças, desde condições brandas até fatais. É uma das principais causas de bacteremia nosocomial, pneumonia adquirida em ambiente hospitalar e infecções de sítio cirúrgico, possuindo ainda um alto potencial para adquirir resistência antimicrobiana (Denis, 2017; Mulcahy e McLoughlin, 2016; Piewngam e Otto, 2024).

Além disso, de acordo com a sensibilidade ao antibiótico meticilina, *S. aureus* pode ser dividido em *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (SASM) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticlina (SARM). Nos últimos anos, devido à adaptação bacteriana e ao abuso de antibióticos, a resistência do *S. aureus* ao tratamento convencional aumentou gradualmente, tornando-se um importante problema de saúde pública (Guo *et al.*, 2020).

2.2 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM)

A penicilina, descoberta por Alexander Fleming em 1928 e introduzida na prática clínica em 1940, foi o medicamento utilizado inicialmente para tratar infecções graves causadas por *S. aureus* (Ferreira;Paes;Lichtenstein, 2008). Apenas dois anos após a introdução da penicilina foram relatados os primeiros casos de resistência bacteriana, possivelmente devido à aquisição de elementos genéticos transportados por plasmídios que codificam β -lactamases, substâncias capazes de inativar o anel β -lactâmico da penicilina (Guo *et al.*, 2020).

Posteriormente, seguiu-se o desenvolvimento de penicilinas semissintéticas e resistentes à penicilinase (oxacilina, meticilina e nafcilina) para o tratamento, sendo introduzidas para uso clínico em 1959. No ano de 1960 foram relatadas as primeiras infecções por *S. aureus* resistente à meticilina (SARM) e novos clones apareceram posteriormente (Liu, W. T. *et al.*, 2021). As infecções causadas por SARM estão fortemente associadas à assistência médica (Bonnal *et al.*, 2015), podendo se estabelecer através de contato direto com um campo infectado ou mãos de profissionais contaminadas. Se não tratada corretamente, a infecção pode evoluir para pneumonia, infecções graves de corrente sanguínea, sepse e infecções de sítio cirúrgico (Ali Alghamdi *et al.*, 2023).

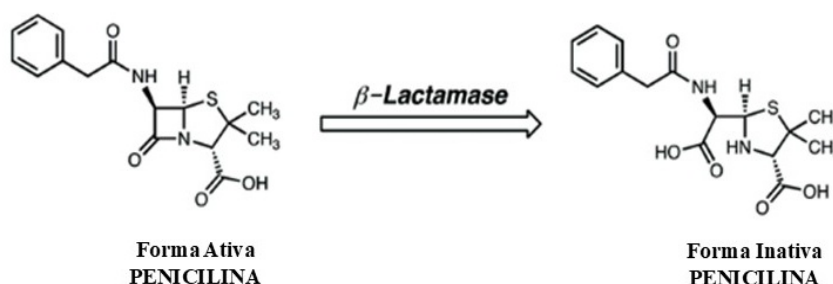
A resistência à meticilina é atribuída à presença de uma proteína de ligação a penicilina (PBP) modificada, chamada PBP2a, resultando em uma menor afinidade pelos antibióticos β -lactâmicos. Essa modificação resulta da aquisição de um gene cromossômico conhecido como *mecA*, o qual está localizado dentro de um grande elemento cromossômico móvel dos estafilococos, conhecido como SCCmec (cassete cromossômico estafilocócico) (Cuny *et al.*, 2024). Diversos tipos e subtipos de SCCmec foram identificados desde a descrição inicial desses elementos genéticos (Koneman *et al.*, 2020). Estudos indicam que o *S. aureus* tenha adquirido o transposon SCCmec de uma espécie de estafilococo coagulase-negativo encontrada em animais e no ambiente, conhecida como *S. sciuri* (Wu *et al.*, 1997).

As PBPs são enzimas ligadas à membrana celular que catalisam a ligação cruzada, ou transpeptidação, das cadeias de peptideoglicano na parede celular bacteriana. Na ausência de mecanismos de resistência, os antibióticos β -lactâmicos bloqueiam a atividade transpeptidase das PBPs. Essa inibição impede a formação da camada de peptideoglicano, que se torna instável. Na ausência de uma parede celular estruturalmente sólida, a bactéria fica fragilizada e perde a capacidade de conter o conteúdo interno da célula (Stapleton e Taylor, 2002). Embora a PBP2a compartilhe características estruturais com outras PBPs, relacionadas à ligação da penicilina, ela apresenta baixa afinidade por todos os antibióticos β -lactâmicos, ou seja, cepas

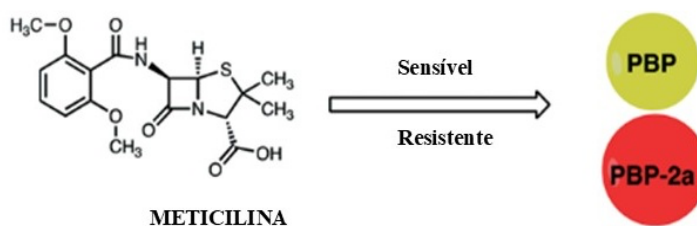
que expressam as PBP2a são capazes de inativar todos os antibióticos β -lactâmicos, cefalosporinas e carbapenêmicos (Craft *et al.*, 2019), com exceção da ceftarolina (CLSI, 2021). A Figura 2 mostra a ação das β -lactamases sobre o anel β -lactâmico das penicilinas com consequente inativação do antibiótico e resume o mecanismo de resistência do SARM à molécula de meticilina.

Figura 2 - Mecanismo de resistência de *S. aureus* à penicilina e meticilina. (A) Penicilina é hidrolisada por uma β -lactamase resultando em ácido peniciloico (forma inativa da penicilina). (B) Expressão da PBP2a diminui a afinidade pela meticilina, resultando em resistência.

A) Inativação da Droga



B) Mudança no Alvo da Droga



Fonte: adaptado de Craft *et al.* (2019)

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças - CDC (US-FDA, 2019), SARM tem sido considerado um perigo substancial e grave, sendo presença constante na lista de alvos de bactérias virulentas. Relatório publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) considera também o SARM no grupo de patógenos de alto risco (Tabela 1), enfatizando

características como: patógenos de difícil tratamento, tendências crescentes de resistência, patógenos altamente transmissíveis e de difícil prevenção (WHO, 2024).

O estudo *Global Burden of Disease* relatou que, em países de alta renda, aproximadamente 50% da carga fatal atribuída à resistência bacteriana está ligada a apenas dois patógenos: SARM e *Escherichia coli* (Wagenlehner e Dittmar, 2022). Dessa forma, a morbidade, mortalidade e os custos de assistência médica associados ao SARM não podem ser subestimados, permanecendo uma grande preocupação devido à sua prevalência persistente e às infecções potencialmente graves que podem ser causadas (WHO, 2024).

Tabela 1- Lista de patógenos prioritários de acordo com a OMS, 2024.

GRUPO DE RISCO	BACTÉRIA	RESISTÊNCIA
Crítico	<i>Enterobacterales/ Enterobacterales</i>	Carbapenem/ Cefalosporina de terceira geração
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenem
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Rifampicina
Alto	<i>Salmonella typhi</i>	Fluoroquinolona
	<i>Shigella spp.</i>	Fluoroquinolona
	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenem
	<i>Salmonella não-tifoide</i>	Fluoroquinolona
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Terceira geração de cefalosporina e/ou fluoroquinolona
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina
	Grupo A <i>Streptococcus</i>	Macrolídeos
Médio	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Macrolídeos
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	Grupo B <i>Streptococcus</i>	Penicilina

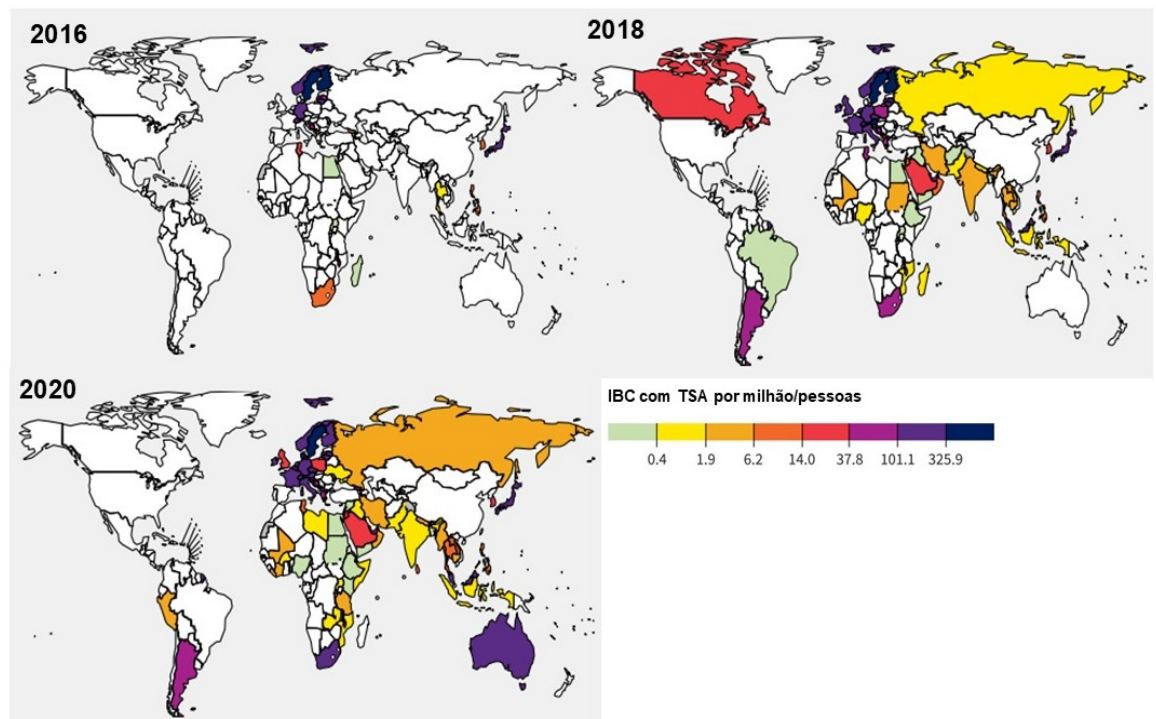
Fonte: Adaptado de *WHO bacterial priority pathogens list*, 2024.

2.3 Epidemiologia do SARM

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2024), SARM possui taxa de incidência de >10.000 casos por 1 milhão/pessoas, a qual é classificada como alta, assim como as taxas de transmissibilidade e mortalidade entre 21-30%, considerada de média-alta. Em 2015, a OMS estabeleceu o Sistema Global de Vigilância da Resistência e Uso de Antimicrobianos (GLASS) para monitorar a resistência à terapia em bactérias comuns e fungos invasores, e o consumo de antimicrobianos em humanos.

De acordo com a última publicação, envolvendo dados de 196 países, SARM foi responsável por 35% das infecções de corrente sanguínea com testes de sensibilidade analítica confirmados, ressaltando a importância desse patógeno (Figura 3). Observa-se o aumento exponencial das infecções na Europa, Ásia, África e Oceania. No ano de 2020, os dados referentes ao Brasil não foram repostados ao serviço de vigilância (Mestrovic *et al.*, 2022).

Figura 3 - Infecções de corrente sanguínea causadas por SARM com teste de sensibilidade reportados no mundo, por um milhão de habitantes entre os anos de 2016, 2018 e 2020.



Fonte: adaptado de (GLASS), 2022.

SARM é classificado em SARM adquirido em hospital (SARM-HA) e SARM adquirido na comunidade (SARM-CA). Estudos conduzidos na China mostram que a proporção de SARM adquirido em ambiente hospitalar atinge cerca de 50,4% (Guo *et al.*, 2020). A presença da linhagem resistente à meticilina aumenta significativamente a gravidade da infecção, elevando em 64% a probabilidade de morte em comparação com infecções por *S. aureus* sensíveis a medicamentos (Bächli *et al.*, 2022). Estudos mostram que 16% das IRAs relacionadas a patógenos multirresistentes, 8% foram causadas por SARM, demonstrando a relevância desse patógeno no contexto hospitalar (Hidron *et al.*, 2008).

O papel do SARM nas infecções nosocomiais torna-se ainda mais preocupante quando se leva em consideração a forma de transmissão facilitada, através das mãos contaminadas dos profissionais de saúde e do contato direto pessoa-pessoa (Denis, 2017). Kontantinovski *et al.* (2024) analisaram a taxa de transmissão de SARM em três hospitais holandeses ao longo de 20 anos. Foram analisados 27.377 contatos, com a identificação de 41 (0,15%) transmissões. O estudo mostrou que o risco de transmissão era maior em contatos diretos entre pacientes, com taxas variando de 0,32% a 1,32% entre os hospitais participantes. A taxa de transmissão em contato entre profissionais de saúde e pacientes, no entanto, foi significativa, atingindo 0,13% (19 de 15.874) em ambiente hospitalar. Esse dado sugere que, apesar de os contatos com pacientes em isolamento serem menos propensos à transmissão, a equipe médica ainda está suscetível ao risco de infecção.

Outro estudo conduzido por Quirino *et al.* (2023) em um hospital universitário na Itália, identificou isolados de SARM em *swabs* de vigilância nasal em 18,2% das amostras. Baroja *et al.* (2021) também analisou amostras de *swabs* nasal, porém em trabalhadores de um hospital terciário no Equador, e encontrou uma taxa de colonização de 5% por SARM. No Brasil, de acordo com Silva, L. da *et al.* (2020) a taxa de colonização por SARM, utilizando *swabs* nasais de trabalhadores de um hospital no Nordeste, é de cerca de 16,8%.

Estudos multicêntricos ao redor do mundo demonstram uma prevalência variada de infecções por SARM. Trabalho conduzido na China entre os anos de 2016 e 2022 em hospitais pediátricos encontrou uma prevalência de 32% das infecções causadas por SARM, com diferentes perfis de resistência (Zhou *et al.*, 2023). Já na Espanha, estudo realizado entre 2017 e 2018 mostrou uma taxa de infecções por SARM de 16,6%, destas 28,8% estavam relacionadas à assistência à saúde e 71,2% adquiridas na comunidade (Garriga Ferrer-Bergua *et al.*, 2022).

No que se refere à América Latina, pesquisa entre os anos de 2011 e 2014 (Sader *et al.*, 2016) mostrou que a prevalência foi de 44,7% de SARM. No ano de 2019, de acordo com Aguilar *et al.* (2023), a prevalência das infecções relacionadas a SARM foi de 45%, variando

de 18% no Canadá a 63% em Trindade e Tobago. Esse mesmo estudo mostrou que o aumento com custos de hospitalização e tratamento antimicrobiano aumentam entre 3 – 6,7 vezes em pacientes com infecção por SARM.

No Brasil, estudo conduzido por Braga *et al.* (2018) em 28 hospitais de diferentes portes demonstrou que *S. aureus* estava relacionado com 39% (46/119) das infecções desenvolvidas em unidades de terapia intensiva. Nesse mesmo estudo, 45% das cepas isoladas de *S. aureus* foram consideradas resistentes. Outros estudos realizados na Escola Paulista de Medicina/São Paulo e no Hospital Universitário da Universidade Federal de Uberlândia relataram incidências de 50% de infecções relacionadas a SARM (Martins e Cunha, 2007).

Trabalho realizado na região Sul do Brasil, em hospitais pediátricos com 593 pacientes, mostrou que, entre os anos de 2013 e 2020, as prevalências de infecções por SARM adquiridas na comunidade e no hospital foram de 46,1% e 8,1%, respectivamente. Nenhuma mudança significativa ocorreu durante o período do estudo (Fassbind *et al.*, 2023).

Durante a pandemia de COVID-19 diversos trabalhos mostraram que houve um aumento na incidência de SARM relacionado com COVID-19, aumentando a mortalidade dos pacientes no ambiente hospitalar. Um estudo conduzido em um hospital terciário na Espanha mostrou que a taxa de bacteremia por *S. aureus* em 2018 e 2019 era de 1,95 e 1,63 casos por mil internações, respectivamente. Durante o período pandêmico (2020-2021), a incidência geral de bacteremia por *S. aureus* foi de 1,96 casos por mil internações não relacionadas à COVID-19, enquanto em pacientes com COVID-19, essa taxa saltou para 10,59 casos por mil internações, um aumento de 140%. SARM foi detectado em 32,4% das amostras de pacientes com COVID-19 (Falces-Romero *et al.*, 2023; Miquel Sánchez-Osuna *et al.*, 2024).

2.4 Patogênese das infecções causadas por *S. aureus*

Os estafilococos são agentes causadores de doenças com diversas localizações, manifestações e evoluções clínicas. As infecções mais comuns são de caráter local, acometendo diferentes tecidos. De modo geral, as infecções são categorizadas como infecções de pele e tecidos moles (SSTIs), com manifestações como dermatite, abscessos, furunculose, furúnculos, foliculite, impetigo ou mastite. Além disso, incluem outras patologias graves, como intoxicação alimentar estafilocócica, síndrome do choque tóxico e síndrome da pele escaldada estafilocócica (SSSS) (Lisowska-Łysiak *et al.*, 2021).

Uma característica biológica fundamental de *S. aureus* reside em sua capacidade de colonizar indivíduos sadios de forma assintomática. Estima-se que cerca de 30% da população humana seja portadora nasal do microrganismo, o qual se integra à microbiota normal. Portadores de *S. aureus* apresentam maior probabilidade de desenvolver infecções e são considerados uma fonte significativa de disseminação das cepas do microrganismo entre a população (Stefani e Goglio, 2010). Porém, para que haja o estabelecimento da infecção é necessário um desequilíbrio entre o patógeno e o sistema imune do hospedeiro (Mulcahy e McLoughlin, 2016).

Determinados grupos de pacientes demonstram maior vulnerabilidade à infecção por *S. aureus* associada à assistência médica, como por exemplo: neonatos prematuros de muito baixo peso, indivíduos com cateteres permanentes, intubação endotraqueal, implantes médicos de corpos estranhos, histórico de trauma, procedimentos cirúrgicos, hemodiálise, diálise peritoneal, diabetes, bem como aqueles submetidos a terapia imunossupressora ou antineoplásica (Lisowska-Lysiak *et al.*, 2021; Thomer, Schneewind e Missiakas, 2017).

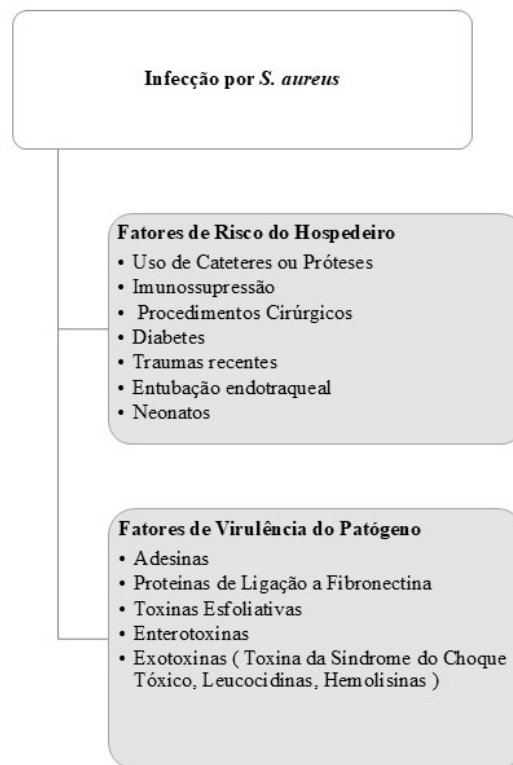
No que diz respeito às características relacionadas a *S. aureus*, a expressão de diversos fatores de virulência, os quais são fundamentais para o microrganismo invadir, multiplicar-se e causar danos, contribuem para o estabelecimento da infecção (Schilcher *et al.*, 2016). O sistema de regulação *agr* (gene acessório regulador) modula de forma recíproca a expressão de múltiplas proteínas de parede celular (como proteínas de ligação à imunoglobulina e à fibronectina) e exotoxinas (tais como hemolisinas, enterotoxinas, leucocidinas, toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), além de exoenzimas (nucleases, proteases, lipases) e peptídeos semelhantes a surfactantes (PSMs), uma família de peptídeos anfipáticos de cadeia curta com atividade citolítica (Parastan *et al.*, 2020; Williams *et al.*, 2023). Todos esses mecanismos são importantes no processo inicial de invasão do microrganismo.

As proteínas de superfície estafilocócicas promovem a adesão aos tecidos do hospedeiro e contribuem para a evasão do sistema imune, enquanto as exotoxinas causam danos teciduais e muitas atuam como superantígenos, desencadeando síndromes semelhantes a choque (Parlet, Brown e Horswill, 2019; Williams *et al.*, 2023). O sistema *agr* do *S. aureus* desempenha um papel crucial na evasão da endocitose, na sobrevivência intracelular e na replicação. Em relação ao desenvolvimento de biofilme, outro importante fator de virulência, o *agr* contribui para as etapas iniciais de adesão, estruturação e dispersão (Mulcahy e McLoughlin, 2016; Williams *et al.*, 2023).

Outros fatores de virulência são as enterotoxinas e a TSST-1, as quais desencadeiam o choque tóxico e doenças associadas por meio da indução massiva de liberação de citocinas,

tanto por macrófagos quanto por células T. Recentemente, isolados de SARM-CA demonstraram um aumento em sua virulência, resultando em um aumento na prevalência de casos de choque tóxico, infecções mais graves em tecidos moles e, em inúmeros casos, maior taxa de mortalidade (Coates, Moran e Horsburgh, 2014; Palavecino, 2014). A Figura 4 apresenta um panorama dos principais fatores de risco que contribuem para o estabelecimento da infecção por *S. aureus* no hospedeiro, englobando tanto os fatores inerentes ao indivíduo quanto os fatores associados ao microrganismo.

Figura 4 - Aspectos relevantes para o estabelecimento da infecção por *S. aureus* relacionados ao hospedeiro e ao patógeno.



Fonte: Autor, 2025.

Dessa forma, as infecções sistêmicas causadas por SARM são dependentes de um mecanismo inicial de rompimento da barreira protetora da epiderme, de forma que pequenas infecções derivadas de arranhões na pele podem evoluir para infecções invasivas. No entanto, a literatura já descreve que cepas de SARM podem promover de forma ativa a ruptura da

epiderme por clivagem de moléculas de E-caderina através da expressão de α -toxinas (Cheung, Bae e Otto, 2021).

A contaminação de dispositivos médicos implantados também representa um importante foco inicial de infecção. O mecanismo primordial por trás dessa via de infecção reside na capacidade do *S. aureus* de aderir a materiais plásticos utilizados na fabricação dos dispositivos, bem como às moléculas da matriz que recobrem os dispositivos logo após sua inserção, culminando na formação de um biofilme sobre o dispositivo (Schilcher e Horswill, 2020).

2.5 Biofilmes formados por *S. aureus*

O *National Institutes of Health* (NIH) estima que bactérias formadoras de biofilme estejam envolvidas em 65% de todas as infecções microbianas e sejam responsáveis por 80% das infecções crônicas. A cada ano, as infecções relacionadas a biofilme nos EUA atingem cerca de 2 milhões de casos, resultando em aproximadamente 268.000 mortes e gerando um custo direto estimado de US\$ 18 bilhões para o tratamento dessas infecções (Omar *et al.*, 2017).

Biofilmes são definidos como comunidades microbianas sésseis onde as células se agrupam, frequentemente encobertas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) autoproduzida. Essa estrutura, aderente a superfícies, confere coesão e proteção à comunidade microbiana (Flemming *et al.*, 2016). A SPE compõe entre 50% e 90% da matéria orgânica total de um biofilme, apresentando-se como uma estrutura complexa composta por diversas substâncias poliméricas, como DNA extracelular (eDNA), proteínas e polissacarídeos (Donlan, 2002).

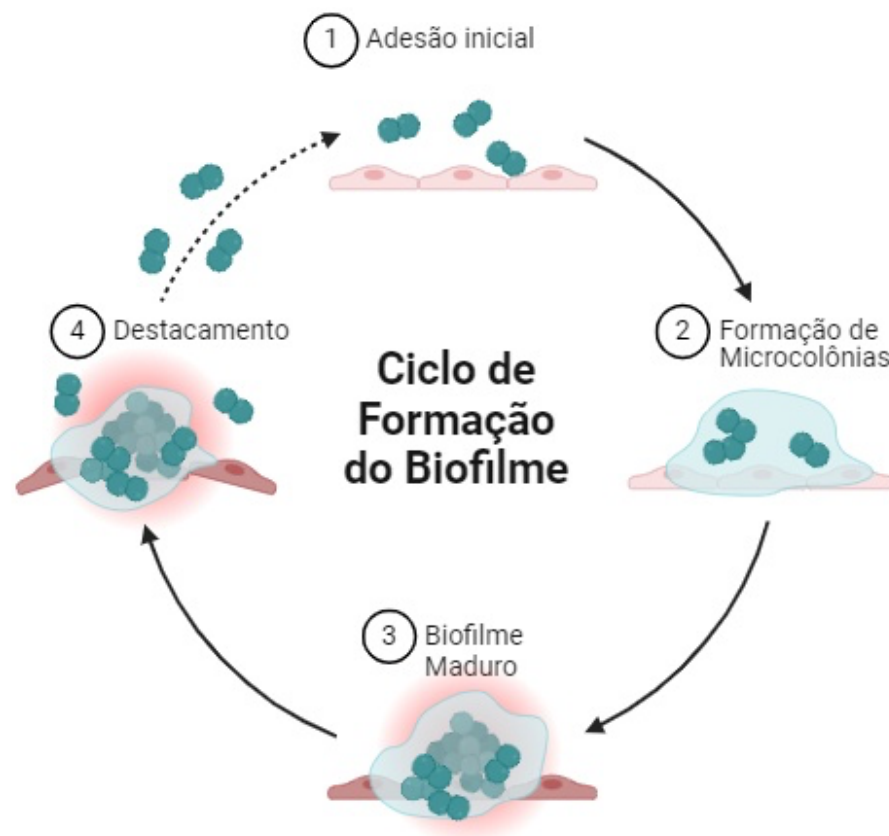
Assim como outros biofilmes bacterianos, o biofilme formado por *S. aureus* também possui dois componentes distintos: água (cerca de 97%) e a matéria orgânica, sendo o principal componente da SPE o polissacarídeo PIA (polissacarídeo de adesão intracelular), o qual é dependente da expressão do gene *icaADBC*. Os PIA possuem carga positiva (catiônicos) e desempenham um papel crucial na colonização, formação de biofilme e infecções associadas a biofilmes, na evasão do sistema imunológico, na resistência a antimicrobianos e na proteção contra a fagocitose (Nguyen, Nguyen e Otto, 2020).

Os PIAs atuam como uma molécula de adesão entre as células bacterianas, possibilitando a integração do DNA bacteriano e formando uma estrutura organizada e resistente. Eles parecem desempenhar um papel na formação de múltiplos agrupamentos

bacterianos, cruciais para o amadurecimento do biofilme, incluindo o fator de aglomeração A (ClfA), a proteína de superfície estafilocócica (SSP1) e a proteína associada ao biofilme (Bap) (François, Schrenzel e Götz, 2023; Parastan *et al.*, 2020).

A formação de um biofilme se inicia com a adesão de uma bactéria a uma superfície, seja viva (biótica) ou inanimada (abiótica). Após a fixação, as bactérias passam por um período de crescimento e amadurecimento. No final do ciclo do biofilme, os agrupamentos de células se desprendem da estrutura principal (Craft *et al.*, 2019). Esse processo, conhecido como destacamento, é facilitado pela produção de peptídeos semelhantes a surfactantes, que também desempenham papel fundamental na manutenção da integridade e estrutura tridimensional do biofilme. Esses agrupamentos de células podem então iniciar novas colônias de biofilme em outras superfícies (Flemming *et al.*, 2016). A Figura 5 mostra as etapas envolvidas na formação do biofilme microbiano.

Figura 5 - Ciclo de formação de um biofilme microbiano.



Fonte: Autor, 2025 (Figura elabora na plataforma BioRender)

Com relação ao biofilme de *S. aureus*, a fixação inicial à superfície depende de moléculas presentes na superfície bacteriana, como a mureína hidrolase AtlA (essencial para a divisão celular, renovação da parede celular e lise bacteriana), proteínas que se ligam à fibronectina e ácidos teicoicos. As células de *S. aureus* podem se fixar a superfícies não vivas (abióticas) por meio de interações hidrofóbicas e a superfícies vivas (bióticas) por meio de moléculas de adesão presentes na matriz extracelular microbiana (Schilcher *et al.*, 2016).

As características da superfície sólida influenciam no processo de fixação. De acordo com Pandey (2017), a fixação das células microbianas aumenta à medida que a rugosidade da superfície aumenta, pois, a área superficial também aumenta de tamanho. Estudos também apontam que os microrganismos se fixam mais rapidamente em superfícies hidrofóbicas e não polares, como teflon e outros plásticos, do que em materiais hidrofílicos, como vidro ou metais (Donlan, 2002).

Após a fixação, ocorre a formação de uma estrutura semelhante a um tapete celular, composta por DNA extracelular e matriz proteica. Posteriormente, as células são liberadas do biofilme pela degradação do DNA extracelular, mediada por nucleases, permitindo a formação de microcolônias tridimensionais. Finalmente, a dispersão das células ocorre pela ativação de proteases (Françóis, Schrenzel e Götz, 2023; Gebreyohannes *et al.*, 2019). A Tabela 2 mostra um resumo dos principais fatores envolvidos na adesão inicial, maturação e dispersão dos biofilmes de *S. aureus*.

Tabela 2 - Principais fatores relacionados a adesão, maturação e dispersão de células de biofilmes de *S. aureus*.

Estágio do Biofilme	Fatores	Genes	Observações
Adesão	Proteínas de superfície (Bap),	<i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>icaB</i> , <i>icaC</i> , <i>bap</i>	A produção de PIA facilita a coesão entre as células bacterianas.
	Polissacarídeo de adesão intracelular (PIA)		A Bap facilita a ligação a componentes da matriz extracelular das bactérias.
Maturação	DNA extracelular (eDNA), Proteínas de ligação à fibronectina, proteases, enzimas de	<i>nuc</i> , <i>lukE</i> , <i>lukD</i> , <i>atlA</i> , <i>splA</i> , <i>splE</i> , <i>splF</i> , <i>cidA</i> , <i>lrgAB</i> , <i>aur</i> , <i>sspA</i> , <i>fnbA</i> ,	eDNA contribui para a estrutura do biofilme e a resistência a antibióticos.

	modificação de superfície	<i>fnbB, sdrC, sdrD, bap</i>	Diversas proteínas auxiliam na formação da matriz, conferindo resistência e proteção à bactéria.
Dispersão	Peptídeos semelhantes a surfactantes (PSMs), Proteases e Nucleases	<i>psmA, psmβ, splA, splE, splF, aur, sspA, nuc</i>	PSMs promovem o desprendimento das células do biofilme. Proteases e nucleases degradam a matriz extracelular, liberando as células.

Fonte: Adaptado de Peng *et al.* (2023).

Diversos estudos mostram que é necessário um sinal inicial para que os organismos alterem seu comportamento, passando de uma população dispersa para um biofilme. Esse sinal tem sido descrito como os sinais químicos produzidos pelos próprios organismos, à medida que a população atinge um tamanho crítico, os chamados sinais de *quorum sensing*. Outros fatores que influenciam na formação do biofilme são: a disponibilidade de nutrientes, o pH e a temperatura, presença de iniciadores químicos ou físicos (Feraco *et al.*, 2016).

S. aureus utiliza principalmente o sistema de *quorum sensing agr* (gene acessório regulador) para coordenar a expressão de genes em resposta à densidade populacional. A principal molécula autoindutora secretada por esse sistema é um peptídeo cíclico chamado AIP (Peptídeo autoindutor). Os AIPs se acumulam no meio extracelular à medida que a densidade populacional aumenta. Quando atingem uma concentração limiar, ativam o receptor *agrA*, um regulador transcricional que controla a expressão de vários genes de virulência (Nguyen, Nguyen e Otto, 2020b; Yamazaki *et al.*, 2024).

A adesão microbiana a superfícies e a subsequente formação de biofilmes emergiram como uma ameaça global (Idrees *et al.*, 2021), pois conferem aos microrganismos a capacidade de prosperar em ambientes hostis, e sua complexa estrutura fisiológica contribui para a sobrevivência individual de bactérias, particularmente sob condições adversas. Essa proteção se manifesta por meio de diversos mecanismos, incluindo a evasão do sistema imunológico do hospedeiro, resistência a agentes antimicrobianos e antibióticos, tolerância à dessecação, absorção e armazenamento de nutrientes, atividade enzimática extracelular intensificada, adesão ao local da infecção e retenção de água, entre outros (Singh *et al.*, 2022). Em um estudo *in vivo* utilizando um modelo murino de infecção de biofilme associado a implante ortopédico, observou-se uma redução na atividade fagocítica e citotóxica de macrófagos na

presença do biofilme. Demonstrou-se que este efeito é, em parte, dependente da funcionalidade do sistema *agr* (Torres *et al.*, 2015).

Os microrganismos em biofilmes desenvolvem resistência a agentes antimicrobianos por meio de mecanismos de persistência molecular ou dormência metabólica, o que pode resultar no reaparecimento de infecções por biofilme. Comparativamente às células planctônicas, as bactérias dentro dos biofilmes demonstram uma resistência a antibióticos 1000 vezes maior (McCarthy *et al.*, 2015; Mohammed *et al.*, 2018). Outro fator negativo relacionado às infecções causadas por biofilmes é alta durabilidade do tratamento com antibióticos, fato que além de aumentar o risco de aparecimento de resistência, também aumenta a toxicidade medicamentosa, pois expõe o paciente a altas doses de antibióticos (Peng *et al.*, 2023).

2.5.1 O gênero *Candida*

Estima-se que existam aproximadamente cinco milhões de espécies fúngicas, as quais ocupam uma ampla variedade de nichos ambientais e hospedeiros, incluindo ambientes aquáticos, solos, vegetais, animais e seres humanos. Embora a maioria dessas espécies não apresente potencial patogênico, algumas são capazes de ocasionar infecções em humanos (Valentine *et al.*, 2025). Dentre essas, diversas espécies do gênero *Candida* destacam-se por sua relevância clínica, conforme recentemente reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2024). Em relatório publicado pela instituição, os patógenos fúngicos foram classificados segundo critérios como taxas de mortalidade, incidência de infecções, resistência aos antifúngicos e dificuldades terapêuticas. Nesse contexto, *Candida albicans* foi categorizada como uma das quatro espécies fúngicas de prioridade crítica para a saúde pública global.

Sob condições fisiológicas normais, *C. albicans* integra a microbiota comensal humana, colonizando de forma assintomática superfícies mucosas, como as do trato gastrointestinal, da cavidade oral e da mucosa vaginal. A colonização pode ocorrer precocemente, inclusive durante o parto, por meio da transmissão vertical da mãe para o neonato. No entanto, a presença de condições predisponentes pode levar à transição desse microrganismo do estado comensal (levedura) para o patogênico (hifa) (Armstrong *et al.*, 2024). Nessa condição, *C. albicans* é capaz de provocar um espectro de manifestações clínicas que inclui desde infecções mucocutâneas localizadas, como a candidíase orofaríngea (em indivíduos imunocomprometidos) e a candidíase vulvovaginal (em mulheres imunocompetentes), até formas sistêmicas graves e potencialmente fatais, como a candidíase invasiva (Bongomin *et al.*, 2017).

A habilidade de *C. albicans* em colonizar e infectar distintos nichos no organismo do hospedeiro está relacionada a um conjunto diversificado de fatores de virulência e características adaptativas. Dentre esses fatores, destacam-se a capacidade de alternar entre as formas morfológicas de levedura e hifa, a presença de proteínas de adesão (adesinas) e de invasão (invasinas) na superfície celular, a formação estruturada de biofilmes e a produção de enzimas hidrolíticas que facilitam a degradação de tecidos e a invasão do hospedeiro (Pereira *et al.*, 2021; Sulaiman *et al.*, 2023).

Por outro lado, apesar da *C. albicans* geralmente manter uma relação comensal e não prejudicial com o hospedeiro, determinadas condições também podem favorecer sua proliferação e transformação em um agente patogênico. Fatores como o uso de antibióticos, que desestabilizam a microbiota, lesões nas barreiras epiteliais, bem como estados de imunossupressão, podem comprometer o equilíbrio dessa interação e permitir a invasão tecidual pelo fungo (Romo e Kamamoto 2020).

Infecções por espécies de *Candida* têm sido tratadas com azóis, a maior classe de antifúngicos. Contudo, a resistência a esses medicamentos tem aumentado tanto em ambientes clínicos quanto *in vitro*. Os azóis atuam inibindo a enzima lanosterol 14- α -desmetilase, essencial na síntese de ergosterol, componente da membrana fúngica. Essa ação afeta a estrutura da membrana do fungo sem prejudicar células humanas. Sendo assim, a *Candida* pode se tornar resistente aos azóis por três vias principais. A primeira envolve bombas de efluxo que eliminam o fármaco da célula, a segunda ocorre por mutações ou aumento da expressão do gene *ERG11*, alterando o local de ligação dos azóis e a terceira consiste no desenvolvimento de vias alternativas a célula fúngica (Pristov e Ghannoum 2019).

2.5.2 Biofilme *cross-kingdom* de *S. aureus* associado a *Candida albicans*

As infecções associadas a biofilmes constituem uma causa cada vez mais prevalente de morbidade e mortalidade em ambiente hospitalar. Dessa forma, a natureza multiespécies dos biofilmes, particularmente em infecções crônicas como fibrose cística e feridas crônicas, tem sido reconhecida como um fator crucial na progressão da doença (Ul Haq, Khan e Krukiewicz, 2024).

Embora seja amplamente aceito que os biofilmes *in vivo* sejam tipicamente compostos por múltiplas espécies bacterianas imersas em uma matriz extracelular polimérica, de acordo com Liu *et al.* (2025), ainda persistem importantes lacunas no conhecimento sobre a formação

de biofilmes multiespécies e as interações, sejam sinérgicas ou antagônicas, entre os diferentes microrganismos que os compõem.

C. albicans e *S. aureus* são frequentemente isolados, tanto individualmente quanto em conjunto, em diversos dispositivos médicos, incluindo próteses, implantes, tubos endotraqueais e de alimentação, sendo os cateteres o local mais comum de co-isolamento. De acordo com dados da literatura, em 27% das infecções nosocomiais causadas por *C. albicans*, há o envolvimento de múltiplos microrganismos, sendo *S. aureus* o terceiro patógeno mais frequentemente associado. A coexistência de *Candida* spp. e *S. aureus* também é relatada em infecções pulmonares de pacientes com fibrose cística, onde a formação de biofilmes mistos tem sido observada (Bernard, Girardot e Imbert, 2020; Luo *et al.*, 2021).

O desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* compreende, classicamente, quatro estágios sequenciais e inter-relacionados: adesão, proliferação, maturação e dispersão. Inicialmente, na fase de adesão, células leveduriformes planctônicas aderem ao substrato, estabelecendo uma camada basal que serve de alicerce para o desenvolvimento subsequente da estrutura (Pereira *et al.*, 2021). A etapa de proliferação é caracterizada pela transição morfológica das células leveduriformes para a forma filamentosa, com a elongação e desenvolvimento de hifas. Este processo de filamentação representa um ponto crítico na patogênese, permitindo que *C. albicans* invada tecidos do hospedeiro, superfícies plásticas ou outros materiais poliméricos presentes em dispositivos médicos inertes. A invasão é facilitada pela secreção de um conjunto de enzimas hidrolíticas, incluindo proteinases, hemolisinas e fosfolipases, que degradam componentes teciduais e facilitam a penetração do fungo (Souza, *et al.*, 2023; Watamoto *et al.*, 2011).

Durante a maturação do biofilme, a produção de hifas é acompanhada pela síntese e secreção de substâncias poliméricas extracelulares, que formam uma matriz complexa. A matriz do biofilme de *C. albicans* é composta principalmente por polissacarídeos, destacando-se α -manano, β -1,6-glucano e β -1,3-glucano (Kumari *et al.*, 2018; Zarnowski *et al.*, 2018). Adicionalmente, a comunicação intercelular mediada por mecanismos de *quorum sensing* desempenha um papel regulatório fundamental, o farnesol, uma molécula de *quorum sensing* amplamente estudada em *C. albicans*, modula diversos aspectos do desenvolvimento do biofilme. Finalmente, no estágio de dispersão, células leveduriformes são liberadas do biofilme maduro, disseminando-se para locais distantes e potencialmente iniciando um novo ciclo de formação de biofilme (Lee, Song e Kim, 2024; Watamoto *et al.*, 2011).

Biofilmes inter-reinos formados pela interação de *C. albicans* e *S. aureus* exibem elevada virulência e resistência a terapias antimicrobianas e às defesas imunes do hospedeiro

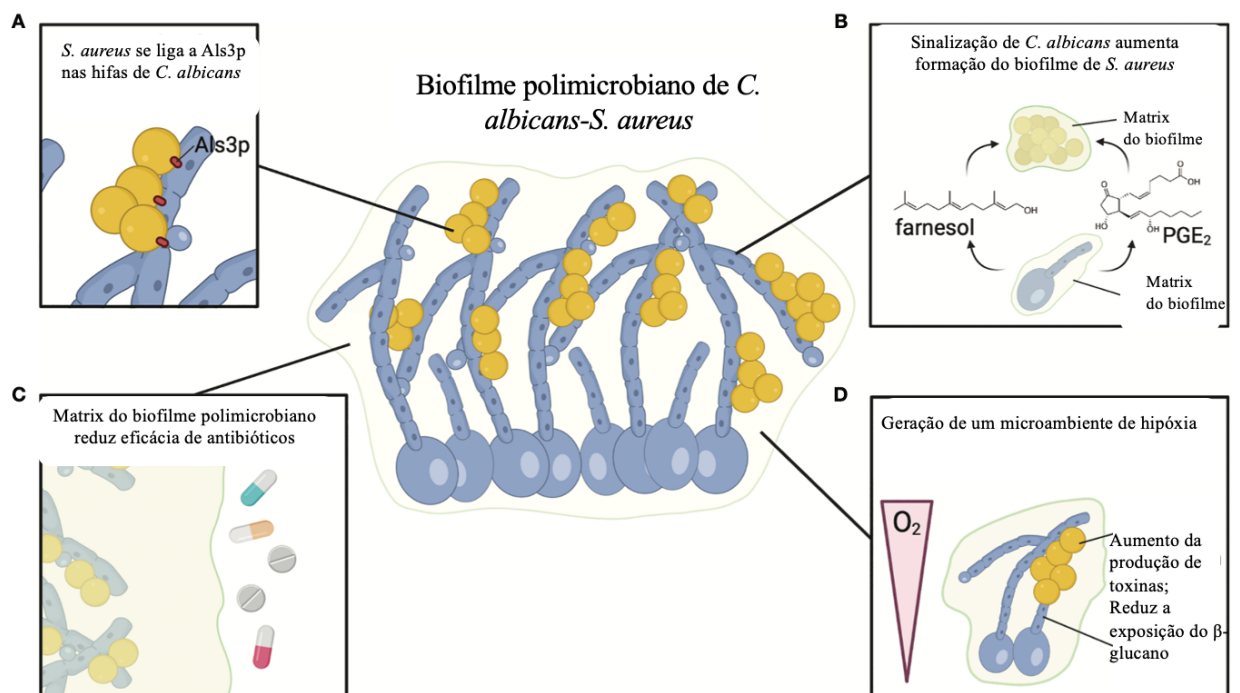
walla *et al.*, 2022). Os estudos também descrevem uma interação sinérgica entre esses microrganismos, resultando em maior morbidade e mortalidade (Carlson, 1983), além disso estudos demonstram que as interações entre *C. albicans* e estafilococos promovem um aumento significativo na resistência à vancomicina (Harriott e Noverr, 2009).

Sugere-se que a plasticidade morfológica de *C. albicans* entre as formas de levedura e hifa tenha uma grande influência na sua virulência, e que a forma hifa de *C. albicans* poderia fornecer arquitetura ao biofilme em desenvolvimento, elevando o número de células bacterianas durante o processo de maturação do biofilme (Luo *et al.*, 2021; Ul Haq, Khan e Krukiewicz, 2024). Outros achados indicam que biofilmes formados pela associação de *S. aureus* e *C. albicans* demonstraram resistência superior a biofilmes formados por uma única espécie, mantendo-se firmemente aderidos à superfície de plástico mesmo sob estresse de cisalhamento, indicando assim que a complexidade estrutural dos biofilmes mistos confere a eles propriedades de adesão aprimoradas e maior resistência às forças físicas (Lin *et al.*, 2013).

Nos biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. aureus*, a interação entre as espécies é mediada por diversas moléculas de adesão. As adesinas estafilocócicas *FnBPs*, *SasF* e *Atl*, e a adesina *Als3* de *C. albicans*, atuam na ligação célula-célula. O aumento do pH extracelular, promovido por *C. albicans*, estimula a produção da toxina alfa, potente agente citotóxico, por *S. aureus*. Adicionalmente, o farnesol, molécula sinalizadora de *C. albicans*, aumenta a expressão de bombas de efluxo em *S. aureus*, incrementando a resistência bacteriana a antimicrobianos e comprometendo a cicatrização de feridas, conforme observado em úlceras de pé diabético (Elnagar, 2024; Paul *et al.*, 2024).

Além disso, *C. albicans* produz prostaglandina E2, que estimula o crescimento e a formação de biofilme de *S. aureus*, assim como o (1,3)- β -D-glucano, componente da parede celular fúngica, liberado na matriz extracelular, protege as bactérias da ação dos antibióticos (Arévalo-James e Torrents, 2024; Rogiers *et al.*, 2018). A figura 6 resume as principais interações entre os biofilmes de *C. albicans* e *S. aureus*.

Figura 6: Interações no biofilme polimicrobiano de *C. albicans* – *S. aureus* (A) *S. aureus* adere à proteína Als3 presente nas hifas de *C. albicans*, promovendo forte adesão e favorecendo o crescimento do biofilme (B) Sinais químicos produzidos por *C. albicans*, como o farnesol e a PGE₂, estimulam o crescimento e o aumento de biomassa do biofilme de *S. aureus* (C) A β -glucana, atua como uma barreira física que dificulta a ação de antimicrobianos e favorece a sobrevivência de *S. aureus* (D) Biofilmes de *C. albicans* geram um microambiente hipóxico que pode potencializar a produção de toxinas por *S. aureus*.



Fonte: Adaptado de Eichelberger e Cassat, 2021.

2.6 Infecções relacionadas a cateteres

A crescente utilização de dispositivos médicos em ambientes hospitalares para fins terapêuticos tem contribuído para o aumento da incidência de infecções nosocomiais. Entre esses dispositivos, destacam-se os cateteres venosos centrais (CVC) e periféricos (CVP), amplamente empregados em tratamentos de pacientes internados e até mesmo em pacientes ambulatoriais que necessitam de diversos tipos de terapia, como hemodiálise, procedimentos

cirúrgicos de menor porte, tratamentos oncológicos, entre outros (Baier *et al.*, 2020; Cangui-Panchi *et al.*, 2022).

As infecções de corrente sanguínea associadas a cateteres (ICSAC) representam um desafio para o sistema de saúde, pois estão ocasionam maior morbidade, risco de 2,75 vezes maior de mortalidade e aumento significativo na utilização de recursos hospitalares. Além disso, pacientes que desenvolvem infecções relacionadas a cateteres durante a internação hospitalar enfrentam um prolongamento no tempo de permanência no hospital de 19,2 a 22,5 dias (Alotaibi, Barri e Elahi, 2020; Ngo Bell *et al.*, 2024).

O período estendido de internação e os tratamentos associados podem gerar um aumento considerável nos custos hospitalares, variando de US\$ 42.201 a US\$ 70.407 (Yu, Jung e Ai, 2023). Outro fator agravante é a maior probabilidade de readmissão hospitalar, pacientes com infecções relacionadas a cateteres apresentam 35,9% mais chances de serem readmitidos no hospital em um período de 30 dias em comparação com pacientes que não adquiriram infecção (Torres, Rupp e Cawcutt, 2024).

De acordo com Alotaibi, Barri e Elahi (2020), o prolongamento dos dias de internação hospitalar devido a infecções relacionadas a cateteres também estão relacionados à sensibilidade do microrganismo causador da infecção. Sendo assim, para infecções causadas por microrganismos não resistentes o tempo de internação hospitalar aumenta em cerca de 12,2 dias, enquanto para microrganismos multirresistentes o tempo é de 14 dias.

Um estudo conduzido por Ruiz-Giardin *et al.* (2019) analisou 1866 casos de infecções de corrente sanguínea em um hospital na Espanha, demonstrando que Enterobactérias (15,6%) e *S. aureus* (23,4%) foram agentes causadores mais frequentes de bacteremias associadas a CVP, enquanto estafilococos coagulase-negativos foram mais frequentes entre os agentes causadores de bacteremias associadas a cateteres centrais (64,1%).

Um estudo multicêntrico conduzido pelo Consórcio Internacional de Controle de Infecções Nosocomiais em 2013 avaliou a taxa de infecções associadas a dispositivos médicos em unidades de terapia intensiva (UTIs) de 43 países. As taxas de infecções de corrente sanguínea associadas a cateteres centrais foram de 4,9/1000 dias de uso para adultos e de 5,17 para pacientes pediátricos. O resultado desse estudo mostrou também que o nível socioeconômico mais elevado do país estava correlacionado a um menor risco de infecção, de forma que em UTIs pediátricas e países de renda média à baixa tiveram taxas estatisticamente maiores de infecções primárias da corrente sanguínea associadas à cateteres do que países de renda média à alta (Rosenthal *et al.*, 2014). Outro estudo conduzido por Saqui, Fernandes e

Allard (2020) em hospitais do Canadá mostrou que a taxa de infecções de cateter foi de 0,97/1000 cateter por dia, com ênfase para cateteres venosos centrais.

A ocorrência de ICSAC pode ser atribuída a três vias principais de contaminação, as quais permitem a entrada de microrganismos de um ambiente externo não estéril para a corrente sanguínea normalmente estéril através do dispositivo médico. A primeira via, denominada extra luminal, é caracterizada pela migração de microrganismos, principalmente da pele do paciente, para o lúmen do cateter. Esse processo pode ocorrer durante a inserção do cateter ou enquanto ele permanece *in situ* (Osório *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2013, 2016).

A segunda via, conhecida como intraluminal, envolve a contaminação direta dos *hubs* e conectores do cateter por contato com as mãos de profissionais de saúde, fluidos ou dispositivos contaminados. A manipulação inadequada do cateter ou o uso de materiais contaminados representam os principais fatores de risco nesse contexto. A terceira via de contaminação ocorre quando o cateter é contaminado por microrganismos circulantes na corrente sanguínea, em decorrência de uma condição infecciosa preexistente que, por sua vez, causa a contaminação do dispositivo (Osório *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2013, 2016). Esses dispositivos médicos, devido à sua superfície, proporcionam um ambiente favorável para a adesão de microrganismos (Reiter *et al.*, 2011).

Posteriormente a fixação, muitas comunidades microbianas formam biofilmes, os quais se tornam de difícil tratamento, pois protegem as células da ação dos antibióticos. Como consequência, tem-se a persistência da infecção e contribuição para aumento da morbidade do paciente (Reiter *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016).

A prevalência das ICSAC é influenciada por diversos fatores, incluindo as práticas relacionadas à inserção e manutenção do cateter, de forma que diretrizes recentes sobre prevenção de ICSAC da *Society for Healthcare Epidemiology of America* (SHEA) destacam práticas cruciais para a prevenção em três etapas do ciclo de vida do CVC: antes da inserção do cateter, durante a inserção e durante a manutenção contínua do cateter após a inserção (Buetti *et al.*, 2022; Torres, Rupp e Cawcutt, 2024). As diretrizes estão descritas na tabela 3, com foco na inserção e na retirada do cateter em condições assépticas, visando a diminuição de contaminações microbianas. De acordo com La Torre, Baldanziil e Troster (2018), outros fatores relacionados ao desenvolvimento de ICSAC são: local de inserção, tempo de uso, presença ou ausência de doenças de base e imunossupressão.

Tabela 3 - Medidas de Prevenção de ICSAC por CVC, diretrizes da SHEA.

Antes da Inserção	<ul style="list-style-type: none"> - Avaliar se o acesso central é necessário - Treinamento do pessoal - Utilizar clorexidina para preparação de banhos diários em pacientes com mais de dois meses de idade
Durante a Inserção	<ul style="list-style-type: none"> - Priorizar a inserção da linha em local anatômico menos associado a complicações - Higiene das mãos antes de manipular a linha - Preparar a pele com clorexidina alcoólica - Técnica estéril e barreira estéril completa
Após a Inserção	<ul style="list-style-type: none"> - Alocação adequada de pessoal para cuidados com o cateter - Curativos com clorexidina em pacientes com mais de dois meses de idade - Troca de curativos conforme necessário e pelo menos a cada 7 dias - Desinfetar o <i>hub</i> antes de acessar o cateter - Remover os cateteres quando não forem necessários - Monitoramento específico para ICSAC na unidade

Fonte: adaptado de Buetti *et al.* (2022).

No que se refere ao uso de CVP, estima-se que cerca de 1,2 bilhão de dispositivos sejam utilizados anualmente em todo o mundo. As principais complicações da inserção e uso incluem: flebite, hematomas e extravasamento, sendo as ICSAS causadas por CVP menos relatadas (Zanella *et al.*, 2024). Porém sabe-se que cerca de 30-80% dos pacientes admitidos em ambiente hospitalar fazem uso de CVP durante sua estadia, apresentando tempo de permanência do CVP de 3 a 4 dias, com tempo médio de permanência de 2 dias (Zingg e Pittet, 2009).

A incidência de infecções de corrente sanguínea associadas a CVP é estimada em aproximadamente 0,2 a 0,7 casos a cada 1000 dias de uso do dispositivo, uma proporção geral de 0,08% de uso (Pujol *et al.*, 2007; Zingg e Pittet, 2009). Outro estudo sugere que a incidência seja de 65,1 a cada 100.000 cateteres por dia (Marsh *et al.*, 2024). Entretanto, outros dados afirmam que cerca de 5-25% dos dispositivos estejam colonizados por microrganismo no momento da remoção (Pujol *et al.*, 2007).

Outro agravante é o microrganismo causador, pacientes com ICSAC-CVP causadas por *S. aureus* apresentaram maior taxa de bacteremia complicada e maior mortalidade geral (27%) do que pacientes com ICSAC-CVP causadas por outros microrganismos (11%) (Pujol *et al.*, 2007). De acordo Sato *et al.* (2017) para pacientes com ICSAC-CVP, a bacteremia por *S. aureus* continua sendo o maior problema que pode influenciar o prognóstico. As implicações

de custo associadas ao tratamento antimicrobiano também são consideráveis para ICSAC-CVP causadas por *S. aureus*, que levam quase o dobro do tempo (43 dias) para serem tratadas do que as infecções não causadas por *S. aureus* (27 dias) (Marsh *et al.*, 2024).

Estudo realizado por Osório *et al.* (2023) em hospitais de Portugal demonstrou que 30% dos CVPs apresentaram contaminação com o gênero *Staphylococcus*, sendo o mais prevalente, representando 48,8% dos isolados. Este gênero demonstrou resistência significativa a diversos antibióticos, incluindo penicilina (91%), eritromicina (82%), ciprofloxacino (64%) e cefoxitina (59%). Além disso, 59% das cepas foram classificadas como resistentes à meticilina. Entretanto, a detecção do gene *mecA* em 82% dos isolados testados sugere uma prevalência ainda maior de resistência a essa classe de antibióticos.

No Brasil, a literatura relata altas taxas de ICSAC, um estudo realizado em três hospitais públicos da cidade de São Paulo demonstrou que a taxa de incidência de ICSAC por CVC foi de 3,9 a cada 1000 cateteres centrais por dia. A taxa de mortalidade dos pacientes com e sem ICSAC foram de 12,9% e 10,7% respectivamente. Na análise dos fatores de risco, foram identificados como mais críticos para o desenvolvimento de ICSAC o maior tempo de uso do cateter, bem como a utilização de mais de um dispositivo (Torre, La, Baldanzi e Troster, 2018).

A pandemia de COVID-19 teve um impacto significativo na prevalência de IRAS em âmbito internacional. Estudos que analisaram as taxas de IRAS antes e nos primeiros seis meses (2020) da pandemia demonstraram um aumento de 51% (0,51 para 0,85) na taxa de ICSAC por CVC por 1.000 dias de uso do dispositivo e de 62,9% a cada 10.000 pacientes (Fakih *et al.*, 2022). Outro estudo conduzido com dados de pacientes hospitalizados com e sem pneumonia por COVID-19, constatou que aqueles com diagnóstico positivo para COVID-19 apresentaram maior incidência de ICSAC, correspondendo a 78,95% do total de infecções observadas (Jaffer *et al.*, 2024).

Em síntese, a patogênese das infecções em dispositivos intravasculares é um processo multifatorial, resultante da complexa interação entre diversos elementos. Fatores bacterianos, como a afinidade da cepa de *S. aureus* por ligantes presentes nos tecidos do hospedeiro, e características do dispositivo, como as propriedades da superfície do material utilizado, desempenham papéis distintos na instalação da infecção. Embora as propriedades de virulência dos microrganismos colonizadores exerçam uma influência significativa na ocorrência da infecção, diversas estratégias podem ser utilizadas pelos profissionais de saúde para combater essas infecções (Trautner; Darouiche, 2015).

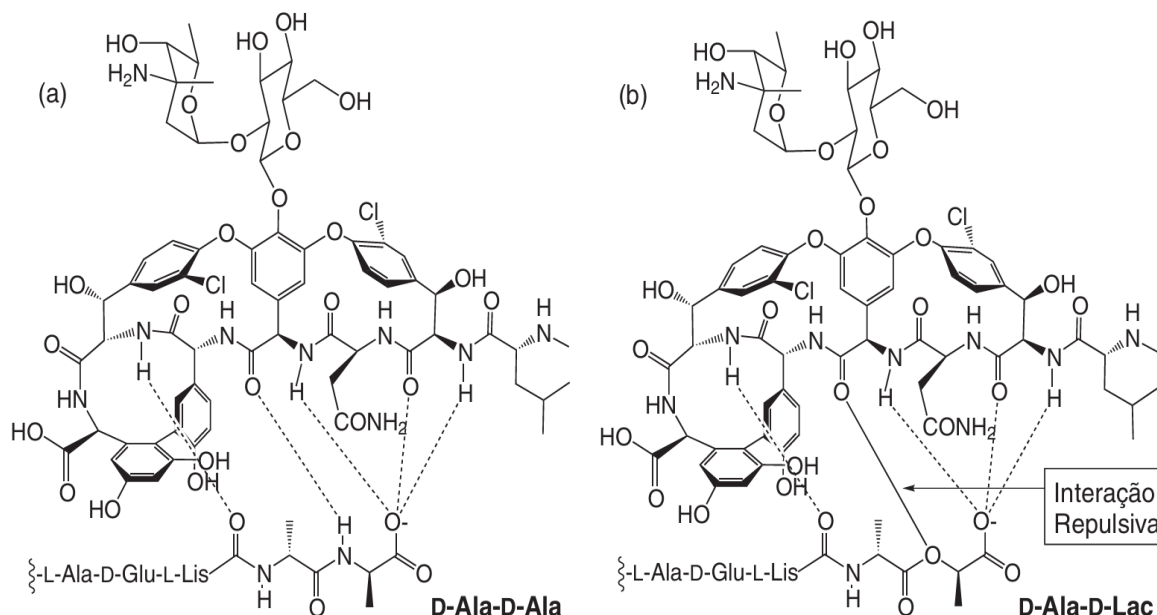
2.7 Tratamento

A vancomicina é o fármaco de escolha para o tratamento de infecções por SARM. No entanto, o surgimento de cepas resistentes à vancomicina tem sido relatado nos últimos anos, tornando-se mais uma barreira no tratamento de SARM (Palavecino, 2014).

O avanço do microrganismo impulsionou o uso generalizado de vancomicina, de forma que o surgimento de cepas com suscetibilidade reduzida era inevitável. O primeiro relato ocorreu em 1996, com a identificação da cepa MU80, que demonstrava uma concentração inibitória mínima (CIM) de vancomicina de 8 µg/mL. A cepa foi isolada de uma infecção de ferida em uma criança japonesa que recebia tratamento prolongado com um antibiótico glicopeptídeo (Holubar, Meng e Deresinski, 2016; Liu *et al.*, 2024).

Esta descoberta marcou o início da era de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA), caracterizado por uma CIM entre 4 e 8 µg/mL. Em seguida, surgiram cepas com resistência intermediária heterogênea (hVISA), resultado de alterações na parede celular do patógeno, que levaram ao sequestro do glicopeptídeo. Em 2002, foi identificada a primeira cepa totalmente resistente à vancomicina (VRSA), com uma CIM superior a 32 µg/mL (Adamu *et al.*, 2024; Holubar, Meng e Deresinski, 2016; Liu *et al.*, 2024), via aquisição do operon *van* de enterococos resistentes à vancomicina, o qual contém genes que alteram a via de síntese do peptidoglicano, substituindo o terminal D-Ala-D-Ala por D-alanil-D-lactato (D-Ala-D-Lac) ou D-alanil-D-serina (D-Ala-D-Ser). A vancomicina tem uma afinidade muito menor por esses terminais modificados, conferindo alta resistência (Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022) (Figura 7).

Figura 7 – Estrutura química da molécula de Vancomicina. a) Ligações entre a vancomicina e a porção D-Ala-D-Ala terminal do peptideoglicano. b) Porção modificada D-Ala-D-Lac.



Fonte: Adaptado de Silveira *et al.*, 2006.

Embora a contenção rigorosa da fonte infecciosa seja crucial para o manejo persistente de SARM, diversos fatores inerentes ao paciente podem dificultar o tratamento, portanto, a otimização do tratamento antibiótico também se torna fundamental. O uso combinado de daptomicina e ceftarolina tem sido indicado como uma alternativa terapêutica promissora, embora os dados disponíveis se limitem, em sua maioria, a relatos de casos ou pequenos estudos de coorte. A substituição da vancomicina pela daptomicina carrega um risco potencial de desenvolvimento de resistência ao tratamento com daptomicina, entretanto, essa probabilidade é reduzida quando se utiliza a associação de daptomicina e ceftarolina (Kufel *et al.*, 2023).

2.7.1 Vancomicina

A vancomicina é um antibiótico da classe dos glicopeptídeos, com estrutura complexa (Figura 7), e atua como um potente bactericida frente a bactérias Gram-positivas. Seu mecanismo de ação principal reside na inibição da síntese do peptidoglicano, o principal componente estrutural da parede celular bacteriana (Bugg *et al.*, 2011). A vancomicina se liga à porção D-alanil-D-alanina das unidades precursoras de peptídeos, bloqueando o sítio crucial

de ligação. Essa interação impede a atividade da peptidoglicano polimerase, uma enzima essencial para a formação da parede celular, e bloqueia as reações de transpeptidação. Como a vancomicina interfere com a síntese do peptidoglicano em um ponto anterior ao local de ação da penicilina, não foi relatada a resistência cruzada entre esses antibióticos. A inibição provoca enfraquecimento das paredes celulares bacterianas, causando vazamentos de componentes celulares com consequente morte celular (Koyama; Inokshi; Tomoda, 2013; Wilhelm, 1991).

A vancomicina possui taxa de ligação às proteínas plasmáticas de aproximadamente 55%. Em indivíduos com função renal normal, sua meia-vida é de cerca de 6 horas. No entanto, em caso de disfunção renal, a meia-vida se estende significativamente, chegando a 7,5 dias. Em pacientes com função renal normal, a administração intravenosa de 1 grama de vancomicina geralmente resulta em níveis séricos máximos entre 20 e 50 µg/mL e níveis mínimos entre 5 e 10 µg/mL. A excreção ocorre principalmente por filtração glomerular, com cerca de 90% da dose sendo eliminada inalterada na urina em um período de 24 horas (Torres *et al.*, 2023; Wilhelm, 1991).

O principal efeito adverso relacionado ao uso da vancomicina é a ototoxicidade, ou seja, o dano ao nervo auditivo, que pode resultar em perda de audição. Esse efeito colateral é mais comum em pacientes com níveis séricos extremamente elevados de vancomicina, geralmente acima de 80 a 100 µg/mL, dessa forma, é raro observar ototoxicidade quando os níveis séricos se mantêm em 30 µg/mL ou abaixo (Adamu *et al.*, 2024; Jiang *et al.*, 2023; Wilhelm, 1991).

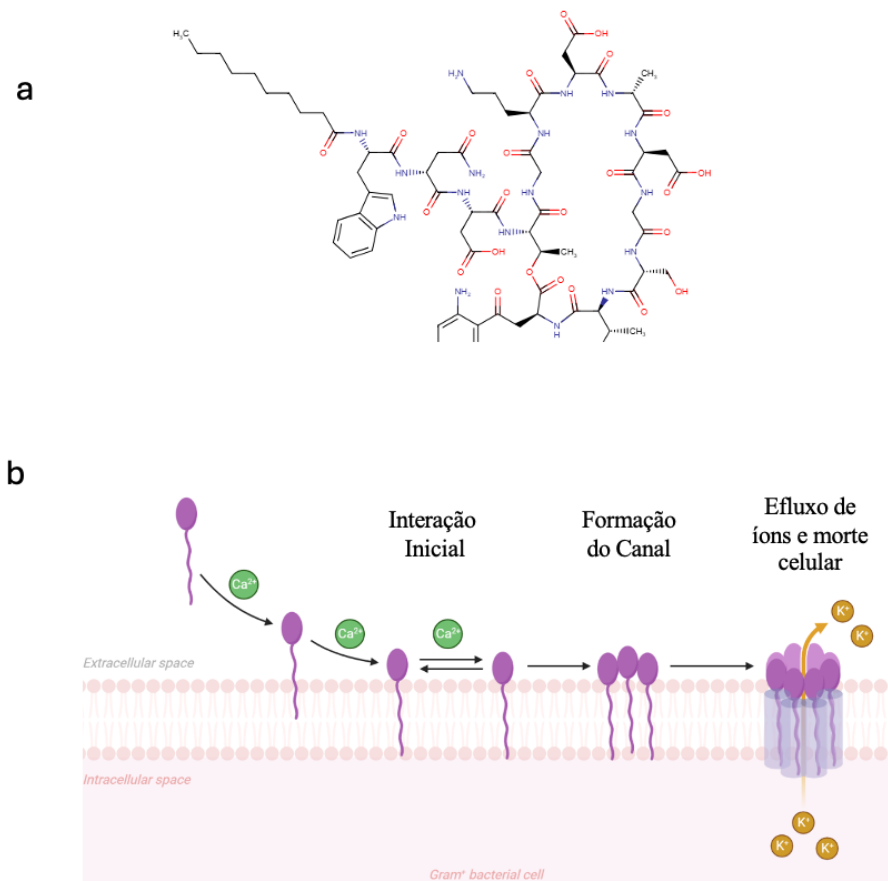
Outro efeito adverso característico da vancomicina é conhecido como síndrome do "homem vermelho" ou "pescoço vermelho", a qual se manifesta como uma reação alérgica cutânea. Essa reação se apresenta como prurido e erupção cutânea avermelhada eritematosa que afeta principalmente o rosto, pescoço e parte superior do tronco, podendo, em alguns casos, estar associada à queda da pressão arterial. A síndrome pode se desenvolver minutos após o início da infusão da vancomicina ou logo após o término. A causa dessa reação é a liberação de histamina, não mediada pelo sistema imunológico. Sendo assim, para evitar essa complicação, é recomendado que a infusão da vancomicina seja administrada em um período mínimo de 1 hora (Wilhelm, 1991; Williams, 1984).

2.7.2 Daptomicina

A daptomicina (Figura 8), um lipopeptídeo cíclico que ocorre naturalmente, é produzido pela bactéria *Streptomyces roseosporus*. Seu mecanismo de ação está baseado na ligação irreversível à membrana citoplasmática, de forma Ca^{2+} dependente, resultando em

despolarização da membrana e ruptura dos gradientes iônicos, ocasionando a morte da célula (Guo *et al.*, 2020; Huang, 2020). A daptomicina foi aprovada nos EUA pela *Food and Drug Administration* (FDA) em setembro de 2003 e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) em janeiro de 2006 para o tratamento de infecções complicadas de pele e tecidos moles causadas por organismos Gram-positivos na dose de 4 mg/kg uma vez ao dia (Enoch *et al.*, 2007).

Figura 8 – a) Estrutura química da molécula de Daptomicina. b) Mecanismo de ação da Daptomicina.



Fonte: disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00080>. Acesso em 06/12/2024. Plataforma Biorender.

Apresenta potente atividade contra bactérias Gram-positivas, porém bactérias Gram-negativas são resistentes à daptomicina, pois o medicamento não pode penetrar através do envoltório celular até a membrana citoplasmática (Murray, 2022). Outro fator relevante é que,

por conta de seu mecanismo de ação singular, há diminuição da probabilidade da ocorrência de resistência cruzada com outros antibióticos (Heidary *et al.*, 2018).

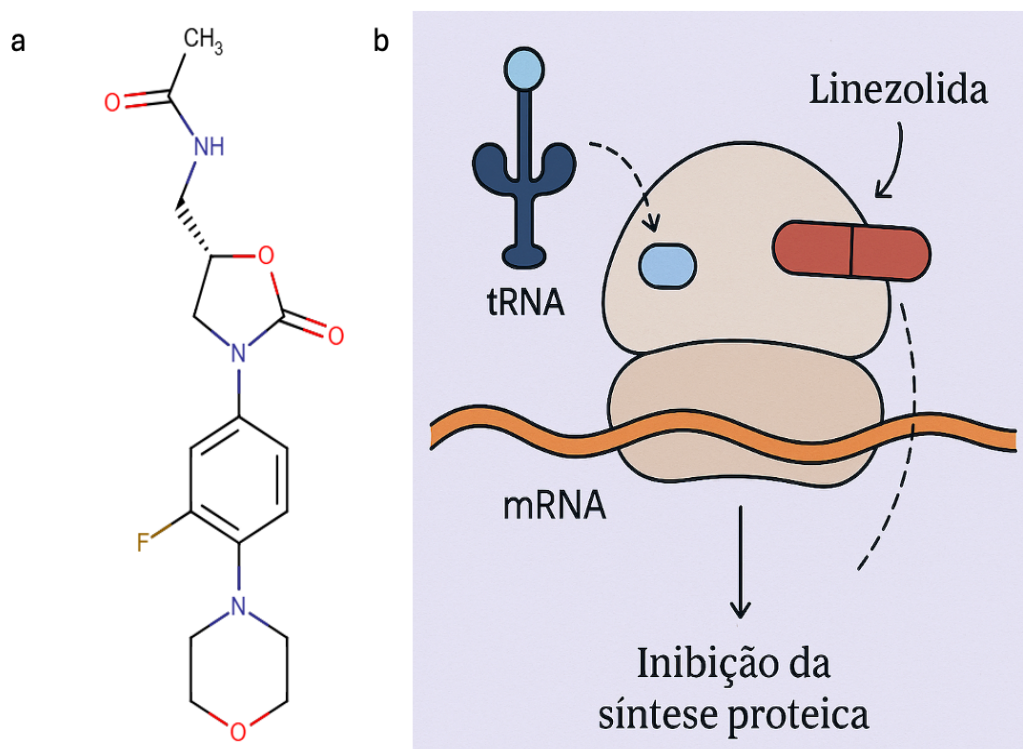
Esse medicamento, na maioria das vezes, é utilizado como dose única (6mg/Kg a cada 24h), pois possui meia-vida de aproximadamente 8 h, mostrando ainda um efeito pós-antibiótico prolongado (> 6,8 h). Estudos mostram que a daptomicina atinge concentrações terapêuticas em infecções de pele e tecido moles, bem como em endocardite. Porém apresenta como principal limitação o fato de não atravessar a barreira hemato encefálica (BHE) e a sua inativação por surfactantes alveolares, inviabilizando seu uso em casos de pneumonia por SARM (Enoch *et al.*, 2007; Heidary *et al.*, 2018; Koyama, Inokoshi e Tomoda, 2013).

As principais manifestações adversas consistem em reações gastrointestinais, reações no local da aplicação, febre, dores de cabeça e *rashes* cutâneos. Todos os sintomas foram relatados em níveis de médio a moderado (Guo *et al.*, 2020). A daptomicina geralmente é utilizada em infecções onde a vancomicina apresentou falha terapêutica. Entretanto, em 2010, foram relatados seis casos de bacteremia por *Staphylococcus aureus* não suscetível à daptomicina, todos em pacientes que haviam recebido tratamento prévio com vancomicina. Esses casos, identificados em hospitais locais dentro de um ano do lançamento da daptomicina em Singapura, corroboram com estudos *in vitro* que associam o desenvolvimento de resistência à daptomicina à exposição prévia à vancomicina (Heidary *et al.*, 2018; Hsu *et al.*, 2010).

2.7.3 Linezolida

A linezolida (Figura 9) é um antibiótico sintético da classe das oxazolidinonas, que atua na inibição da síntese de proteínas bacterianas, ligando-se ao RNA ribossômico (rRNA) na subunidade ribossômica 50S (Murray, 2022). Esse mecanismo impede a formação do complexo de iniciação da tradução, o que resulta em cadeias peptídicas mais curtas e na redução da velocidade da reação de tradução. É importante destacar que o local de ação da linezolida, o complexo de iniciação, ocorre antes do sítio de ação de outros inibidores da síntese de proteínas que atuam na fase de alongamento da tradução. Essa característica singular explica a ausência de resistência cruzada com outros inibidores da síntese de proteínas (Hashemian, Farhadi e Ganjparvar, 2018).

Figura 9 - Estrutura química(a) e mecanismo de ação(b) da molécula de Linezolida.



Fonte: a) disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00601>. Acesso em 06/12/2024. b) Imagem gerada por IA.

O fármaco apresenta ótima absorção oral, com biodisponibilidade de 100%, tornando-a uma opção terapêutica de fácil acesso para o tratamento de infecções causadas por microrganismos Gram-positivos (Mendes, Deshpande e Jones, 2014). Além disso, a linezolida possui a capacidade de bloquear a expressão de elementos de virulência bacteriana, o que leva à redução da produção de toxinas por patógenos Gram-positivos (Koyama, Inokoshi e Tomoda, 2013).

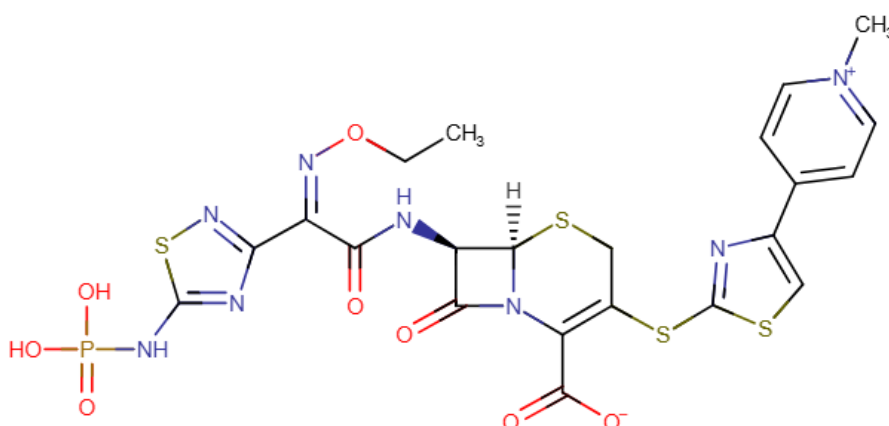
Em um estudo clínico realizado por Fu *et al.* (2013), a linezolida foi comparada com a vancomicina no tratamento de pacientes com suspeita ou confirmação de infecções de pele e tecidos moles causadas por SARM. A pesquisa incluiu pacientes com infecções por SARM acometendo áreas extensas da pele ou tecidos moles mais profundos, como abscessos, celulite, úlceras infectadas ou queimaduras. Na análise de tratamento, 92,2% dos pacientes foram tratados com linezolida e 88,5% com vancomicina. Os resultados da terapia com linezolida demonstraram superioridade em relação à vancomicina, com taxas de sucesso significativamente maiores.

Os efeitos adversos relacionados aos medicamentos foram semelhantes entre os grupos tratados com linezolida e vancomicina. Os resultados deste estudo indicam que a terapia com linezolida é superior à vancomicina no tratamento de infecções de pele e tecidos moles causadas por SARM (Chai *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2013). A resistência do *Staphylococcus aureus* a linezolida, embora ainda relativamente incomum (2%) em comparação com outros antibióticos, está emergindo como uma preocupação crescente (Yang *et al.*, 2025). Os mecanismos de resistência incluem: mutações no domínio V do 23S rRNA, presença do gene *cfr* que codifica uma metiltransferase que modifica o rRNA 23S no mesmo sítio de ligação do linezolida e expressão de bombas de efluxo (Yang *et al.*, 2024).

2.7.4 Ceftarolina

A ceftarolina (Figura 10), o metabólito ativo do pro-fármaco ceftarolina fosamil, é uma cefalosporina de amplo espectro com atividade bactericida *in vitro* contra microrganismos Gram-positivos comuns, incluindo SARM, SARM e *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (Soriano, 2021). Semelhante a outros antibióticos β -lactâmicos, a ceftarolina exerce seu efeito bactericida por meio da ligação às PBPs, o que resulta na inibição da síntese da parede celular bacteriana, levando à lise celular e morte bacteriana (Welte *et al.*, 2019).

Figura 10 - Estrutura química da molécula de Ceftarolina.



Fonte: disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06590>. Acesso em 06/12/2024.

Ao contrário da maioria dos β -lactâmicos, a ceftarolina tem como alvo a PBP2a com alta afinidade, aumentando sua atividade contra SARM e incluindo variantes resistentes à vancomicina. Um estudo conduzido em várias regiões do mundo entre os anos de 2008 a 2020 demonstrou que a ceftarolina possui potente atividade frente a SARM, principalmente em pacientes com pneumonia (Roy *et al.*, 2023; Welte *et al.*, 2019). De acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021), as CIMs para ceftarolina contra *S. aureus* são: sensível (≤ 1 mg/L), sensível dependente da dose (2-4 mg/L) e resistente (≥ 8 mg/L).

A respeito da farmacocinética, o fármaco é administrado por via intravenosa, em infusão de 60 minutos, alcançando uma concentração sérica máxima de 28 mg/L com a administração de 600 mg. Apresenta meia-vida de 2,5 horas e ligação às proteínas plasmáticas de 15-20%. Aproximadamente 20% da ceftarolina é metabolizada no fígado, sem afetar a atividade das isoenzimas do citocromo P-450. A eliminação ocorre principalmente por via urinária (90%), sendo 64% excretada na forma ativa (Soriano, 2021).

No que se refere à resistência, em 2023 foi publicado estudo conduzido em hospitais terciários na Índia, havendo mostrado que, de um total de 198 isolados de SARM, 8,6% (17/198) apresentaram fenótipo de resistência intermediária à ceftarolina, enquanto 91,4% (181/198) permaneceram sensíveis a este antibiótico. Dos 17 isolados classificados como intermediários à ceftarolina, 88,2% (15/17) apresentaram uma CIM de 2 μ g/ml, e 11,8% (2/17) apresentaram uma CIM de 3 μ g/ml. Os 91,4% restantes (181/198) isolados foram sensíveis à ceftarolina, exibindo uma CIM ≤ 1 μ g/mL (Roy *et al.*, 2023). O estudo sugere que a ceftarolina é uma melhor alternativa em relação à vancomicina e linezolida.

Diante desse contexto observa-se que a utilização de agentes bacterianos exerce uma pressão seletiva que favorece a emergência de microrganismos resistentes. Inicialmente raros nas populações naturais, esses organismos podem se tornar predominantes à medida que a exposição contínua aos fármacos elimina os microrganismos sensíveis. Evidências indicam que a presença de antibióticos pode, inclusive, acelerar processos de mutação e recombinação em bactérias, contribuindo para a perda de eficácia do próprio tratamento ao longo do tempo. A resistência, portanto, é um fenômeno antigo e amplamente disseminado (Ahmed *et al.*, 2024; Prestinaci *et al.*, 2015).

Sendo assim, a demanda por novos agentes antimicrobianos, especialmente antibacterianos, é contínua, considerando que o aparecimento de resistência é, em muitos casos, inevitável. Nas últimas décadas, avanços relevantes foram obtidos por meio da modificação estrutural de antibióticos já existentes, tanto de origem natural quanto sintética. Exemplos disso incluem as gerações mais recentes de beta-lactâmicos e macrolídeos, que representam

aprimoramentos sucessivos de compostos previamente conhecidos (Salam *et al.*, 2024; Asghar *et al.*, 2024). Contudo, o desenvolvimento de novas estratégias e abordagens inovadoras para a descoberta de moléculas com mecanismos de ação que limitem o aparecimento de resistência tem sido limitado. Nesse contexto, o reposicionamento de fármacos, o sinergismo entre moléculas e a pesquisa por novos produtos naturais com ação antimicrobiana têm sido utilizadas como estratégias promissoras (Brüssow 2024).

2.8 Biossurfactantes

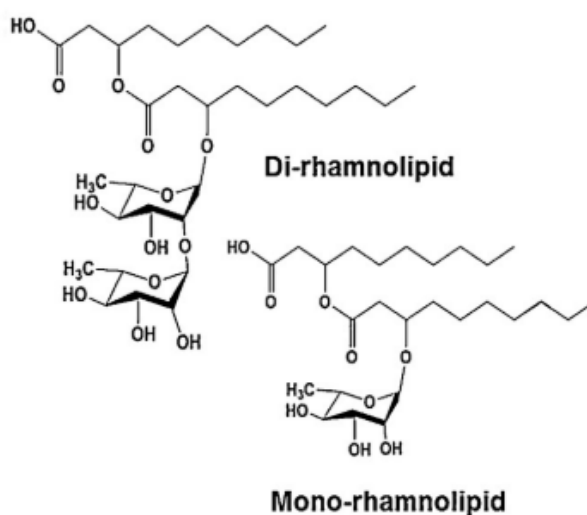
Biossurfactantes são compostos anfífilos de natureza diversa, sintetizados a partir de recursos renováveis (Tambone *et al.*, 2021). Sua estrutura singular é caracterizada por uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica (Moutinho *et al.*, 2021). A porção hidrofóbica, que interage com solventes orgânicos, é tipicamente composta por cadeias de hidrocarbonetos saturados ou insaturados, ou ácidos graxos. Em contrapartida, a porção hidrofílica, que repele solventes orgânicos, pode ser constituída por ácidos, cátions ou ânions peptídicos, mono-, di- ou polissacarídeos (Ceresa *et al.*, 2019).

Essas estruturas podem ser produzidas por meio de diferentes vias microbianas de fermentação. No processo de produção, utiliza-se uma única fonte de carbono, como um carboidrato, ou uma combinação de dois substratos, como açúcares e lipídios. Os organismos mais comumente utilizados na produção de biossurfactantes por fermentação são bactérias, leveduras e fungos filamentosos. O produto gerado pode ainda ser modificado quimicamente para melhorar suas propriedades, envolvendo diversas estratégias, como saponificação, sulfonação, etoxilação e polimerização (Chong e Li, 2017; Moutinho *et al.*, 2021; Shekhar, Sundaramanickam e Balasubramanian, 2015).

Os biossurfactantes são classicamente agrupados em duas categorias, sendo estas glicolipídios e lipoproteínas. Os primeiros consistem em moléculas de baixo peso molecular e possuem característica de reduzir a tensão de interface em superfícies. Já as lipoproteínas são estruturas de alto peso molecular com características de bioemulsificantes e de ligação às superfícies. Os glicolipídios são formados por uma fração hidrofílica de um composto carboidrato como glicose, manose, ramnose e a fração hidrofóbica com uma longa cadeia de ácido graxo. São subdivididos em ramnolipídeos (RL), sorolipídeos, galactosil-diglicerídeo, entre outros (Chong e Li, 2017; de Vieira e Nitschke, 2019; Pornsunthorntawe, Wongpanit e Rujiravanit, 2010).

Os RL são os biossurfactantes anfipáticos microbianos mais amplamente estudados, possuindo duas frações distintas: a fração ramnose (glicon) e a fração lipídica (aglicon). A fração ramnose, por sua natureza hidrofílica, é constituída por moléculas de mono ou di-(L)-ramnose, unidas por uma ligação glicosídica α -1,2. Já a fração lipídica, de natureza hidrofóbica, é composta por uma ou mais cadeias de ácidos graxos beta-hidroxilados, saturados ou insaturados, com comprimentos de cadeia variando de C8 a C24 (Figura 11). Essas cadeias são unidas por meio de uma ligação éster (Chong e Li, 2017; Thakur *et al.*, 2021).

Figura 11 - Estrutura química de moléculas de RL formadas por mono ou di-(L)-ramnose e cadeias de ácido graxo.



Fonte: Adaptado de Ramos da Silva *et al.* (2019).

A diversidade estrutural dos RL é vasta, com a possibilidade de produção de cerca de sessenta congêneres ou homólogos, dependendo das variedades de açúcares ou hidrocarbonetos utilizados. A bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* é a espécie mais comumente associada à produção de RL (Aleksic *et al.*, 2017).

Além da sustentabilidade, os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos à base de óleo. Como por exemplo, biodegradabilidade e menor toxicidade, os biossurfactantes se decompõem facilmente no ambiente, sendo produzidos através de fontes renováveis e diminuindo o impacto ambiental. Assim como, essas moléculas apresentam ausência de carcinogenicidade e teratogenicidade (Marangon *et al.*, 2020; Mařátková *et al.*, 2021). Estudos demonstram que os biossurfactantes poderiam ter uma ampla

gama de aplicações em campos farmacêuticos, como entrega de genes, agentes para insuficiência respiratória, adjuvantes imunológicos, agentes antiadesivos em cirurgias e inibição da adesão de organismos patogênicos a superfícies sólidas (Abdel-Mawgoud, Lépine e Déziel, 2010; Buonocore *et al.*, 2023; Falagas e Makris, 2009; Ohadi *et al.*, 2020; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011).

O fato de os biossurfactantes serem anfipáticos faz com que essas moléculas reduzam a tensão interfacial entre duas superfícies, alterando as propriedades das superfícies com as quais entram em contato (Pisárčik *et al.*, 2019). Dessa forma, uma das principais aplicações é na prevenção da formação de biofilmes microbianos. Parreira, Granjeiro e Mano (2020) mostraram que implantes ortopédicos cobertos com RL em sua superfície diminuem em 72% a adesão de microrganismos como *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae*.

Rodrigues *et al.* (2004, 2006) também demonstraram que a extensão da adesão bacteriana a tubos de silicone pré-tratados com um biossurfactante produzido por *S. thermophilus* e com um RL produzido por *P. aeruginosa* diminuiu significativamente em relação aos tubos não tratados. As taxas de diminuição variaram de 72% a 48%, respectivamente. Nesse contexto, o pré-tratamento com compostos biossurfactantes pode constituir uma estratégia promissora para reduzir a taxa de colonização microbiana.

Com relação a farmacocinética desses compostos, estudos indicam que os biossurfactantes podem ser rapidamente absorvidos por vias tópicas e sistêmicas, mas sua distribuição depende do tipo de biomolécula e da presença de proteínas carreadoras no plasma. O metabolismo desses compostos parece ocorrer, em grande parte, no fígado, com possível geração de metabólitos ativos. A excreção ocorre principalmente por vias biliar e renal (Banat *et al.*, 2010; Marchant e Banat, 2012). Sendo assim, dados mais robustos são necessários para estabelecer parâmetros farmacocinéticos precisos, o que demanda ensaios clínicos e estudos toxicológicos, de forma que a compreensão desses aspectos é essencial para o desenvolvimento seguro e eficaz de biossurfactantes como agentes terapêuticos.

2.9 Biossurfactantes catiônicos derivados de aminoácidos

Há muito tempo, os biossurfactantes são produzidos em diversas formas. Com sua relevância e aplicações se expandindo continuamente, impulsionadas por suas características vantajosas, como a origem renovável, a biodegradabilidade e a baixa toxicidade (Singh, Patil e Rale, 2019). Os surfactantes catiônicos, devido sua ampla gama de aplicações, têm recebido

crescente atenção nos últimos anos. Surfactantes catiônicos à base de amônio quaternário são antimicrobianos utilizados há mais de 50 anos em antissépticos, sem aparente perda de eficácia. Apesar de seu uso disseminado, esses compostos apresentam limitações para aplicações biomédicas devido à toxicidade para células humanas e ao seu impacto ambiental negativo, dada a baixa biodegradabilidade e toxicidade para organismos aquáticos. Estudos demonstram que sua persistência no ambiente aquático é elevada, com meias-vidas estimadas em anos, aumentando a exposição e o risco para a biota (Colomer *et al.*, 2011; Pinazo *et al.*, 2016).

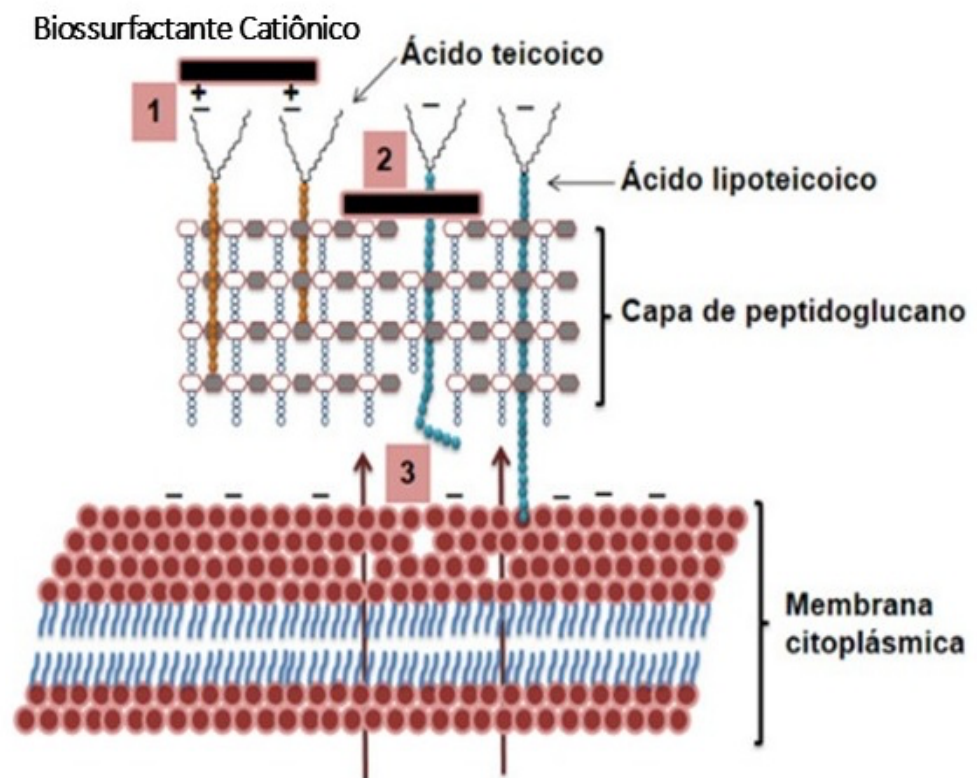
A combinação de um grupo de cabeça carregado positivamente com uma ou mais cadeias alquílicas hidrofóbicas confere aos surfactantes catiônicos uma multifuncionalidade superior em relação aos surfactantes aniônicos, pois as superfícies celulares de bactérias (e, em menor grau, outros microrganismos) geralmente possuem uma carga líquida negativa devido à presença de fosfolipídios, lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas em suas membranas ou paredes celulares (Moutinho *et al.*, 2021; Thakur *et al.*, 2021). Sua atividade de superfície se baseia na troca iônica, promovendo a adsorção em superfícies com carga oposta. Essa propriedade, combinada com seu potencial antimicrobiano, amplia ainda mais as áreas de aplicação dos biossurfactantes catiônicos (Tantawy *et al.*, 2018).

A interação desses compostos com as membranas celulares de microrganismos tem sido explorada em novas terapias antimicrobianas e antifúngicas, com um mecanismo de ação que é baseado em interações eletrostáticas (Pérez *et al.*, 2020; Ramos da Silva *et al.*, 2019). A interação dos biossurfactantes catiônicos com microrganismos ocorre em duas etapas principais. Na primeira etapa, o biossurfactante se liga à membrana celular alvo, processo impulsionado por interações eletrostáticas entre o grupo de cabeça polar carregado positivamente do surfactante e as moléculas negativamente carregadas presentes nas membranas bacterianas. Em bactérias Gram-negativas, essas moléculas são os lipopolissacarídeos, enquanto em bactérias Gram-positivas, o ácido lipoteicoico é o principal componente que interage com o surfactante catiônico (Banat, Rienzo e Quinn, 2014; Ceresa *et al.*, 2023).

Na segunda etapa, a cadeia alquílica hidrofóbica do biossurfactante catiônico interage com a bicamada lipídica da membrana celular, alterando sua estrutura e facilitando o transporte de componentes intracelulares através da membrana. Esse mecanismo explica a menor eficácia dos surfactantes catiônicos contra bactérias Gram-negativas, as quais apresentam uma composição de membrana dupla, externa e interna, as quais dificultam a entrada da molécula na célula (Ceresa *et al.*, 2021, 2023; Ramos da Silva *et al.*, 2019). De forma resumida, o modo de ação seria por atração eletrostática, pois a carga positiva do biossurfactante seria atraída

pelas cargas negativas dos lipídeos que constituem a membrana de bactérias Gram-positivas (Figura 12) (Mejía Jiménez, Arceo Martínez e Loeza Lara, 2018).

Figura 12 - Interação eletrostática de biossurfactante catiônico com a membrana de bactérias Gram-positivas. 1) Atração eletrostática do biossurfactante catiônico (+) com o ácido teicoico e lipoteicoico (-) da parede celular. 2) Ligação do biossurfactante catiônico com a parede celular. 3) Interação entre a membrana e a parede celular alterada, permitindo a perturbação da integridade da membrana.



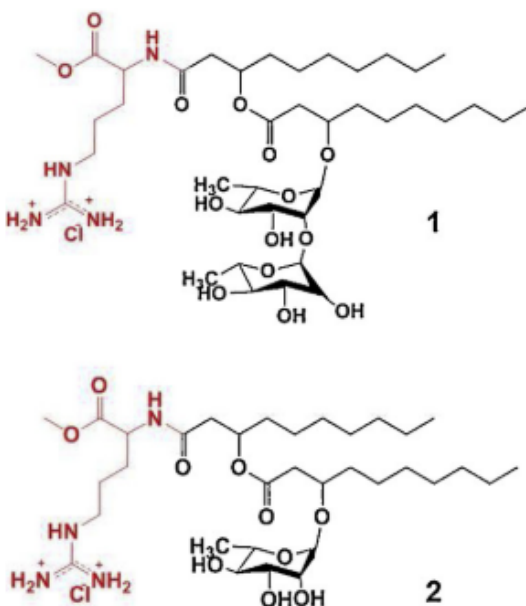
Fonte: Adaptado de Mejía Jiménez, Arceo Martínez e Loeza Lara (2018)

A versatilidade estrutural dos biossurfactantes catiônicos derivados de aminoácidos é muito evidenciada, com a possibilidade de projetar uma variedade de estruturas, considerando a diversidade de aminoácidos (polares, apolares, ácidos e básicos). Assim, representa uma opção promissora aos tensoativos sintéticos tradicionais, apresentando características cruciais para a viabilidade industrial: versatilidade, baixa toxicidade, fontes renováveis de insumos, biodegradabilidade e síntese simplificada (Pinazo *et al.*, 2016; Polidor *et al.*, 2024; Zakharova *et al.*, 2019).

Em virtude da presença de um grupo guanidina, a arginina se destaca como um excelente precursor para a produção de tensoativos com atividade antimicrobiana. A literatura científica registra um número expressivo de compostos com notável ação antisséptica e propriedades farmacológicas, tendo em comum grupos fortemente básicos do tipo guanidina ligados a uma porção lipofílica (Pérez *et al.*, 2020; Pinazo *et al.*, 2020; Polidor *et al.*, 2024).

A molécula utilizada nesse estudo consiste em uma mistura de mono e di-ramnolipídeos complexada com o aminoácido arginina (RLMIX_Arg) (Figura 13), a qual foi produzida de acordo com Ramos da Silva *et al.* (2019). Os RLMIX_Arg foram preparados ligando-se o grupo NH₂ livre da arginina ao grupo carboxila terminal do RL. Sendo assim, o objetivo principal desta modificação foi aumentar a atividade antimicrobiana dos RL por introdução de grupos carregados positivamente. Trabalhos publicados anteriormente demonstram que a incorporação do grupo catiônico arginina, diminuiu as concentrações inibitórias mínimas do composto para cepas de *Candida albicans*: mistura de mono e di-ramnolipídeos (CIM > 250 µg/mL) e mistura de mono e di-ramnolipídeos complexado a arginina (CIM = 20,7 µg/mL) (da Silva *et al.*, 2020). Já para uma cepa de SARM a CIM relatada foi de 32 µg/mL e para uma cepa de *E. coli* a CIM > 250 µg/mL (Ramos da Silva *et al.*, 2019).

Figura 13 - Estrutura química dos monos (2) e di-RL (1) complexados com a molécula de arginina.



Fonte: Ramos da Silva *et al.* (2019)

Tendo em vista que estudo prévio de da Silva *et al.* (2020) demonstrou a atividade antifúngica do RLMIX_Arg frente *Candida* spp. em células planctônicas e biofilme, o presente estudo exibe uma abordagem que enfatiza a ação antibacteriana em SARM. Ramos da Silva *et al.* (2019) indicou em testes preliminares o potencial deste biossurfactante frente bactérias Gram positivas, porém poucos aspectos da atividade antibacteriana foram elucidados nesse estudo. Além disso, considerando a importância clínica e epidemiológica dos biofilmes polimicrobianos, investigou-se também a ação do RLMIX_Arg frente a biofilmes duo-espécie formados por *C. albicans* resistente ao fluconazol e SARM. Ademais, visando a obtenção de um material biomédico com atividade antimicrobiana, foi averiguada a potencial aplicação desse biossurfactante em CVP como forma preventiva para a formação de biofilmes isolados e mistos.

3 HIPÓTESES

3.1 O RLMIX_Arg possui atividade antimicrobiana *in vitro* contra cepas de SARM, bactérias Gram negativas *E. coli* e *K. pneumoniae* e leveduras do gênero *Candida* spp.

3.2 O RLMIX_Arg apresenta atividade sinérgica com oxacilina e vancomicina contra cepas de SARM e com meropenem e ciprofloxacino frente a cepas de Gram negativas *E. coli* e *K. pneumoniae*.

3.3 O RLMIX_Arg é capaz de desagregar biofilmes maduros e inibir a formação da fase inicial de biofilmes de SARM em placas de poliestireno e em cateter venoso periférico.

3.4 O RLMIX_Arg é capaz de desagregar biofilmes maduros mistos formados por SARM e *C. albicans* em placas de poliestireno.

3.5 O pré-tratamento de placas de poliestireno com RLMIX_Arg inibe a adesão de células de SARM.

3.6 A impregnação de CVP com RLMIX_Arg diminui a adesão de células de SARM, impedindo a formação de biofilmes.

3.7 A impregnação de CVP com RLMIX_Arg em gel diminui a formação de biofilmes mistos de SARM e *C. albicans*.

3.8 O RLMIX_Arg interfere na viabilidade celular, levando a célula a morte, assim como causa fragmentação ao DNA da célula bacteriana.

3.9 O RLMIX_Arg possui potencial para ser utilizado no desenvolvimento de fármacos antibiofilme.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

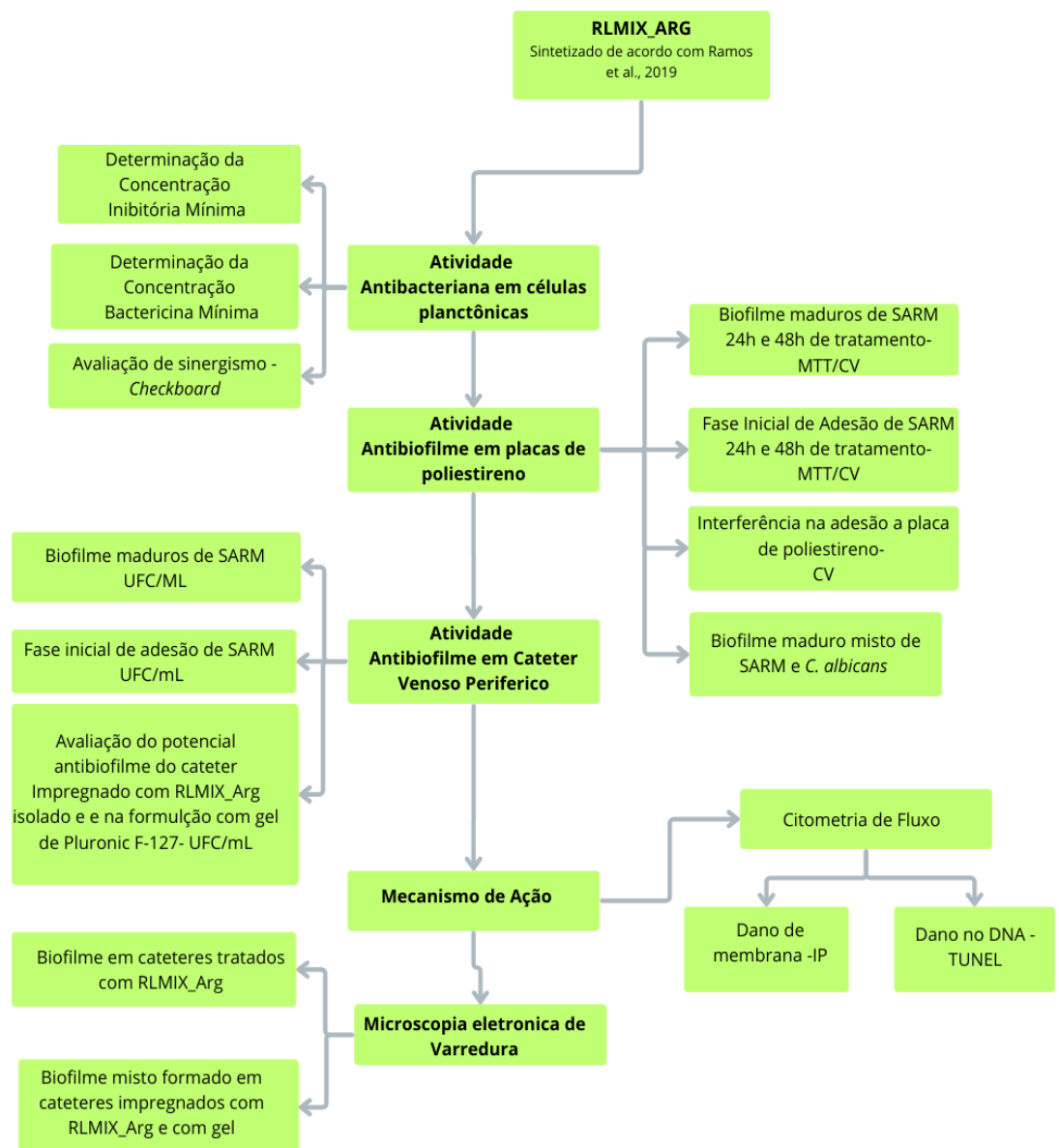
Avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* de um biossurfactante catiônico derivado de arginina (RLMIX_Arg) frente a cepas de SARM, bem como sua atividade frente a biofilmes formados, em processo de formação e biofilmes mistos *inter-kingdom* em Placas de Poliestireno e Cateter Venoso Periférico (CVP).

4.2 Objetivos Específicos

- 4.2.1 Determinar a CIM do RLMIX_Arg frente a cepas de SARM, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *C. albicans* resistentes ao fluconazol.
- 4.2.2 Determinar a CBM e nível de tolerância do RLMIX_Arg frente a cepas de SARM.
- 4.2.3 Avaliar a atividade do RLMIX_Arg combinado à oxacilina e vancomicina frente a cepas de SARM e combinado a Meropenem e Ciprofloxacino frente a cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*.
- 4.2.4 Avaliar a atividade do RLMIX_Arg na desagregação de biofilmes maduros e em fase inicial de formação de SARM em placas de poliestireno e em CVP.
- 4.2.5 Avaliar a atividade do RLMIX_Arg na desagregação de biofilmes maduros mistos de SARM e *C. albicans* maduros em placa de poliestireno.
- 4.2.6 Impregnar CVP com RLMIX_Arg isolado e com um gel de RLMIX_Arg.
- 4.2.7 Avaliar o efeito da impregnação de CVP com RLMIX_Arg isolado na adesão de células de SARM a superfície do cateter.
- 4.2.8 Avaliar o efeito da impregnação de CVP com um gel de RLMIX_Arg na formação de biofilmes mistos de SARM e *C. albicans* em CVP.
- 4.2.9 Avaliar os danos causados nas células de SARM através de citometria de fluxo nas células de SARM após exposição ao RLMIX_Arg em diferentes concentrações.
- 4.2.10 Avaliar a integridade das células de SARM em CVP após tratamento com RLMIX_Arg através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- 4.2.11 Avaliar a integridade da arquitetura do biofilme misto de SARM e *C. albicans* formado em CVP após tratamento com RLMIX_Arg isolado e em gel através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 14 - Esquema simplificado da metodologia utilizada no estudo. SARM: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio; CV: Cristal Violeta; UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônia por mililitro; IP : Iodeto de propídio; TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*.



5.1 Microrganismos

Para avaliar a atividade antimicrobiana do RLMIX_ARG, foram utilizadas 15 cepas de SARM, destas, uma cepa SARM ATCC (*American Type Culture Collection*) 65398 e 14 isolados de diversos sítios identificadas através de equipamento de automação VITEK (Biomérieux, Brasil). Também foi utilizada uma cepa de SARM ATCC 6538p. Para avaliação da citometria de fluxo e biofilmes, foram utilizadas três cepas de SARM (SARM 1, SARM 2 e SARM 4). Para a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada a cepa SARM 1.

Foram utilizadas seis cepas de *E. coli*, sendo uma ATCC 8739 e cinco de sítios diversos. Com relação a *K. pneumoniae*, foram utilizadas seis cepas, sendo uma ATCC 10031 e cinco de sítios diversos. Foram ainda utilizadas cinco cepas de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol, além de 1 cepa de *C. parapsilosis* ATCC 22019 (intrinsecamente sensível ao fluconazol) e 1 cepa de *C. krusei* ATCC (intrinsecamente resistente ao fluconazol) para controle dos testes. Todas as cepas utilizadas pertencem ao acervo do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará com Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) número: AF317AF.

As cepas utilizadas estavam armazenadas em caldo Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia) acrescido de glicerol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) em temperatura de -20°C em freezer. Para reativação dos microrganismos, foram adicionados 10 µL das soluções estoques das cepas, as quais foram previamente descongeladas a temperatura ambiente, em 3 mL de caldo Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia), sendo posteriormente incubados por 24h a 37°C. Após o esse processo foi realizado o repique das cepas utilizando ágar Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia) sendo incubadas novamente por 48h a 37°C.

5.2 Fármacos

Nesse estudo foi utilizada uma mistura de mono e di-ramnolipídeos conjugados com o aminoácido arginina (RLMIX_Arg), o qual foi sintetizado e caracterizado de acordo com Da Silva *et al.* (2020) e gentilmente cedido pela equipe da professora Dra. Lourdes Perez do Instituto de Química Avanzada de Cataluña, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQAC/CSIC) da Universidade de Barcelona. Para a síntese do RLMIX_Arg, foi utilizada a cepa de *P. aeruginosa* MB e o óleo residual de fritura como fonte de carbono, sendo a concentração micelar crítica da mistura igual a 0.016 g/L. Para esse estudo também foi utilizado

um gel produzido no Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais (LABPIM) da UFC utilizando Pluronic F-127 15 wt%, preparado de acordo a estudos prévios de Ricardo *et al.* (2012), Oliveira *et al.* (2011) e Chaibundit *et al.* (2007).

A oxacilina, vancomicina, meropeném, ciprofloxacino e fluconazol foram obtidos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich Co. (USA).

5.3 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

5.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada de acordo com o protocolo M07-A10 (CLSI, 2015). Foi utilizado o meio caldo Mueller Hinton cátion ajustado (CAMHB) acrescido de 2% de NaCl e placas de poliestireno estéreis de 96 poços. O arranjo da placa para os testes de sensibilidade ocorreu da seguinte forma: a coluna 12 da placa foi utilizada como controle de 100% de crescimento, sendo adicionado apenas meio de cultura e suspensão microbiana. Para controle da esterilidade do meio de cultura foi utilizado a coluna 1 da placa. As colunas de 2 a 11 foram utilizadas para a realização da diluição seriada do RLMIX_Arg e antimicrobianos.

O RLMIX_Arg foi solubilizado inicialmente em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Dinâmica, São Paulo, Brasil), sendo posteriormente adicionado água destilada previamente esterilizada para completar a diluição. A faixa de teste utilizada foi de 64 - 0,25 µg/mL para SARM. A oxacilina foi previamente solubilizada em água destilada estéril. Foi preparada uma solução estoque de 4 mg/mL e a faixa de concentração testada foi de 512 – 0,125 µg/mL. Para a vancomicina a faixa testada foi de 4 – 0,015 µg/mL.

Previamente à realização do teste, as cepas foram semeadas em ágar Mueller Hinton e incubadas por 24 h a 37°C. A partir desse repique inicial foram preparadas suspensões de inóculos de acordo com a escala 0,5 McFarland (Probac do Brasil, SP, Brasil), a qual corresponde à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Posteriormente foi feita a diluição do inóculo inicial em meio CAMHB (acrescido de 2% de NaCl para testes com a oxacilina) de forma que a concentração final de microrganismos foi de 5×10^5 UFC/mL. Um volume de 100 µL desse inóculo foi adicionado aos poços de 2 a 12 das placas, sendo posteriormente incubada por 24 h a 37 °C. Após o período de incubação, o resultado foi verificado de acordo com o documento M07-A10 CLSI (2015), com a CIM sendo caracterizada como a menor concentração do antibiótico que inibe completamente o crescimento microbiano de forma visível. Cepas com $CIM \geq 4$ µg/mL foram consideradas resistentes à oxacilina. Para a vancomicina, a CIM utilizada como critério de resistência foi ≥ 16 µg/mL de acordo com o documento M100-S31 (CLSI

(2021). As cepas SARM ATCC 65398 e SASM ATCC 6538 foram utilizadas como controle das drogas. O experimento foi realizado em triplicata em diferentes dias.

Os testes para determinação de CIM para bactérias Gram-negativas foram realizados utilizando-se a mesma metodologia descrita acima. O meropeném foi previamente solubilizado e testado na faixa de 32 – 0,0625 µg/mL, e o ciprofloxacino na faixa de 32 - 0,0625 µg/mL. O RLMIX_Arg foi solubilizado conforme descrito acima e testado na faixa de 1024 - 0,25 µg/mL. Cepas com CIM ≥ 4 µg/mL foram consideradas resistentes ao meropeném e CIM ≤ 1 µg/mL foram consideradas sensíveis. Para o ciprofloxacino CIM ≥ 1 µg/mL foram consideradas resistentes (CLSI, 2021). As cepas *E. coli* ATCC 8739 e *K. pneumoniae* ATCC 10031 foram utilizadas como controle.

Para as cepas de *C. albicans*, a CIM foi definida de acordo com documento M27-A3 (CLSI, 2008). As cepas estavam armazenadas em caldo Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, India) acrescido de glicerol (dinâmica, São Paulo, Brasil) em freezer a -20°C. Para a realização dos testes utilizou-se meio RPMI (pH 7,0) tamponado com 0,165 de MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico) (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Após o crescimento de 24 h a 35°C das cepas utilizadas no estudo, foi preparado uma suspensão de inóculo inicial em salina estéril na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de acordo com a turvação da escala 0,5 de McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Posteriormente, foram realizadas duas diluições consecutivas em meio RPMI 1640 para obtenção de concentração final do inóculo 0,5 a $2,5 \times 10^8$ UFC/mL. Foram adicionados 100µL do inóculo final em todos os poços, com exceção da coluna 1. O RLMIX_Arg foi solubilizado conforme descrito acima e testado na faixa de 1024 - 0,25 µg/mL. O fluconazol foi testado na faixa de 128 – 0,125 µg/mL.

As placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 35°C, realizando-se posteriormente a leitura visual. O teste foi realizado em triplicata. A concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento visível das leveduras, assim como cepas com CIM ≥ 8 µg/mL foram consideradas resistentes ao fluconazol de acordo com o documento M27-S4 (CLSI, 2012).

5.3.2 Avaliação da interação farmacológica utilizando a metodologia do *checkerboard*

Após obtenção das CIM para todos os componentes testados, foi realizada a determinação da interação farmacológica utilizando a técnica do *checkerboard*. Foram preparadas soluções do RLMIX_Arg em associação aos antibacterianos, às quais foram posteriormente adicionadas a placa de 96 poços. O RLMIX_Arg foi testado na faixa de 64 –

0,125 µg/mL, a oxacilina na faixa de 256 – 0,5 µg/mL e vancomicina na faixa de 32 – 0,0625 µg/mL. Para cada cepa foi preparada uma solução específica com base na CIM. Para as cepas Gram negativas foi utilizado o meropeném na faixa de 32 – 0,0625 µg/mL e o ciprofloxacino de 32 – 0,0625 µg/mL. As placas foram preparadas e incubadas por 24 h a 37 °C.

Para análise de interação entre as drogas, foi calculado o Índice de Concentração Inibitória fracionada (FICI) de acordo com Da Silva *et al.* (2013), onde $FICI = (CIM \text{ da droga A em combinação} / CIM \text{ da droga A isolada}) + (CIM \text{ da droga B em combinação} / CIM \text{ da droga B isolada})$. Um índice $FICI \leq 0,5$ foi considerado sinergismo, para $FICI > 0,5$, mas < 1 foi realizada classificação em sinergismo parcial, $FICI = 1$ em aditivo e $FICI > 1$ em antagonismo (Asok Kumar *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009).

5.3.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após a incubação das placas de poliestireno por 24 h a 37 °C e leitura para determinação da CIM, uma alíquota de 10 µL da suspensão utilizada no teste de sensibilidade foi semeada em placas de ágar Mueller Hinton e incubadas por 24 h a 37 °C. As alíquotas foram retiradas dos poços onde foi considerada a CIM da droga, 2x CIM e CIM/2. A menor concentração capaz de inibir 99,9% do crescimento bacteriano em colônias nas placas após a incubação foi definida como a CBM (Batista de Andrade Neto *et al.*, 2019). O experimento foi realizado em triplicata nos mesmos dias dos testes de sensibilidade.

5.3.4 Determinação do Nível de Tolerância

O nível de tolerância foi determinado de acordo com Das *et al.* (2016), o qual fornece a razão entre a CBM/CIM, e reflete a atividade bactericida da droga. Para uma razão entre $CBM/CIM \geq 16$, a droga é considerada bacteriostática, e para uma razão $CBM/CIM \leq 4$ a droga é considerada bactericida. Para isso foi realizado o cálculo das razões entre a CBM/CIM utilizando planilhas do Microsoft Excel®.

5.3.5 Análise de Dados

Todos os testes de microdiluição em caldo foram realizados em triplicata em dias diferentes utilizando inóculos preparados no dia do teste. Foram utilizadas as médias aritméticas para realizar as comparações dos resultados de CIM para os testes com as drogas isoladas e em combinação. Para a CBM, também foi utilizada a média aritmética.

5.4 Avaliação da atividade do RLMIX_Arg frente a biofilmes de *S. aureus* em placas de poliestireno isolado e combinado a *C. albicans*.

5.4.1 Formação do biofilme nas placas de 96 poços

O efeito do RLMIX_Arg na formação de biofilmes pré-formados foi determinado de acordo com Costa *et al.* (2014) com modificações. Foi utilizado o meio caldo triptona soja (TSB) (Himedia, Mumbai, Índia) acrescido de 1% de glicose. Inicialmente, foram semeadas três cepas de SARM (SARM 1, SARM 2 e SARM 4) em ágar Mueller Hinton e incubadas por 24h a 37°C. No dia seguinte, as cepas foram suspensas em caldo TSB acrescido de 1% de glicose, sendo incubadas novamente por 24 h a 37 °C. Em seguida, os tubos contendo as suspensões bacterianas foram centrifugados a 2500 rpm durante 5 min e foram lavados com solução salina 0,9 %. Esse procedimento foi repetido por três vezes, de forma que após a terceira lavagem suspendeu-se as células remanescentes em 1 mL de solução salina. Após as lavagens, foi preparado em uma nova suspensão do inóculo utilizando 3 mL de TSB na escala de 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Foram adicionados 200 µL da suspensão em cada poço da placa de 96 poços, sendo incubadas por 48h a 37°C.

Para a formação do biofilme misto, utilizou-se metodologia de She *et al.* (2020). Inóculos de *C. albicans* e *S. aureus* foram preparados a partir de culturas com 24 h de crescimento. As cepas de *C. albicans* foram cultivadas em 3 mL de meio YNB (Difco, Becton Dickinson, EUA) suplementado com 100 mM de glicose (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil), enquanto as cepas de *S. aureus* foram cultivadas em 3 mL de caldo Triptona de Soja (TSB) (Kasvi, Paraná, Brasil) suplementado com 2% de glicose. Após incubação a 37 °C por 24 horas, as culturas foram centrifugadas (2500 rpm, 5 minutos), lavadas três vezes com solução salina a 0,85% e ressuspensas em TSB suplementado com 2% de glicose. A concentração final do inóculo de *C. albicans* foi ajustada para 1×10^6 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL, correspondendo à escala 0,5 de McFarland. Para *S. aureus*, utilizou-se uma concentração de 3×10^8 UFC/mL, equivalente à escala 1 de McFarland. Em placa de poliestireno de 96 poços, foram adicionados 100 µL de inóculo fúngico e 100 µL de inóculo bacteriano, e a placa incubada por 48h a 37°C. Duas combinações de *C. albicans* resistente ao fluconazol e SARM foram utilizadas no estudo (*C. albicans* 1 + SARM 1 e *C. albicans* 2 + SARM 2).

A coluna 1 foi utilizada como controle da esterilidade do meio de cultura. Posteriormente os biofilmes foram lavados delicadamente por três vezes com solução salina (0,9% NaCl).

5.4.2 Avaliação da viabilidade celular dos biofilmes utilizando o MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio)

O RLMIX_Arg foi testado isolado nas concentrações de CIM/2, CIM, 2xCIM, 8xCIM e 10xCIM. As cepas escolhidas para o teste (SARM 1, SARM 2 e SARM 4) apresentavam as mesmas CIM, portanto as concentrações testadas foram: 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 64 µg/mL e 80 µg/mL. Para o biofilme misto, foram utilizadas duas combinações de *C. albicans* resistente ao fluconazol e SARM. Tendo em vista a maior complexidade do biofilme misto em comparação ao isolado de SARM e o perfil de sensibilidade dos isolados, a faixa de concentração foi modificada. Assim, o RLMIX_Arg foi testado nas concentrações de CIM, 2x CIM, 4x CIM, 8x CIM e 16x CIM, considerando o CIM das combinações como a maior concentração inibitória mínima estabelecidas individualmente para cada espécie, portanto foi utilizada a concentração de CIM de 11 µg/mL para a combinação *C. albicans* 1 + SARM 1 e o CIM de 7 µg/mL para *C. albicans* 2 + SARM 2. As CIMs utilizadas para SARM 1 e 2 foram determinadas em estudos prévios, sendo para SARM 1, 11 µg/mL e para SARM 2, 7 µg/mL.

Na coluna 12 não foram adicionadas drogas, pois foi utilizada como controle de 100% de crescimento dos biofilmes, portanto, após as lavagens, foi repostado apenas o meio de cultura (200 µL de TSB) nos respectivos poços. As placas foram incubadas novamente por 24 h a 37 °C e por 12 h a 37 °C.

Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o ensaio de redução do 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich Co., MO, EUA) a 1 mg/mL⁻¹ (da Silva *et al.*, 2013). As placas foram novamente lavadas gentilmente com solução salina 0,9%. Após a última lavagem, foi adicionado 100 µL de MTT aos poços de 1 a 12, sendo as placas incubadas novamente por 2 h a 37 °C no escuro. Em seguida, o MTT foi retirado delicadamente e foi adicionado 150 µL de DMSO, o qual tem a função de dissolver o sal de formazan. Após 15 min, o conteúdo dos poços foi homogeneizado e foram transferidos 100 µL do líquido para uma nova placa de 96 poços. A leitura foi realizada utilizando o leitor de placas Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambrigde, Reino Unido) no comprimento de onda de 570 nm. O resultado foi calculado comparando-se o crescimento do biofilme não exposto ao RLMIX_Arg e do biofilme exposto à droga. O experimento foi realizado em triplicata.

5.4.3 Avaliação da biomassa celular dos biofilmes de SARM utilizando corante Cristal Violeta

O RLMIX_Arg foi testado isolado nas concentrações de CIM/2, CIM, 2xCIM, 8xCIM e 10xCIM. As cepas de bactéria escolhidas para o teste apresentavam as mesmas CIM, portanto as concentrações testadas foram: 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 64 µg/mL e 80 µg/mL. Após o período final de incubação das placas e lavagens semelhante ao que foi descrito para análise de viabilidade celular, foram adicionados 100 µL de metanol nos poços para fixação dos biofilmes formados, de acordo com (Stepanović *et al.*, 2000). As placas foram deixadas em repouso durante 15 min, em que posteriormente o conteúdo de metanol foi retirado dos poços e a placa foi submetida à secagem a temperatura ambiente durante 15 min. Foi então adicionado 100 µL de uma solução de cristal violeta a 0,1% em cada poço. Após 20 min, os poços foram lavados gentilmente por três vezes com água destilada estéril. Adicionou-se 150 µL de ácido acético aos poços, sendo então homogeneizados, e 100 µL do conteúdo dos poços foi transferido para uma nova placa de 96 poços. A leitura foi realizada utilizando o leitor de placas Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambrigde, reino Unido) no comprimento de onda de 490 nm. O resultado foi calculado percentualmente comparando-se o crescimento do biofilme não exposto ao RLMIX_Arg e do biofilme exposto à droga. O experimento foi realizado em triplicata.

5.4.4 Avaliação do efeito *in vitro* do RLMIX_Arg sobre a etapa de formação inicial (adesão) de biofilmes de *S. aureus* em placas de 96 poços.

Para avaliação da interferência do RLMIX_Arg na fase inicial de adesão dos biofilmes foi utilizada metodologia de Brambilla *et al.* (2017). A fase de obtenção de inóculos das células bacterianas foi realizada de forma semelhante ao tópico 5.4.1. Após obtenção das suspensões bacterianas na concentração da escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), foram adicionados 100 µL de inóculo nos poços 2 a 11 simultaneamente à adição de 100 µL do RLMIX_Arg. O poço 1 foi utilizado como controle de esterilidade do meio, e o poço 12 como controle de 100% de crescimento bacteriano sem exposição à droga. O RLMIX_Arg foi testado nas concentrações: 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 64 µg/mL e 80 µg/mL. A placa foi tratada para leitura da viabilidade celular de acordo com o ponto 5.4.2 e avaliação da biomassa celular de acordo com 5.4.3.

5.4.5 Avaliação do efeito do pré-tratamento da placa de poliestireno com RLMIX_Arg na adesão das células de SARM.

A avaliação do tratamento prévio da placa de poliestireno com RLMIX_Arg, com objetivo de investigar a ação do biossurfactante na superfície do poliestireno e possível interferência na adesão de células de SARM, foi realizada de acordo com Alencar de Barros *et al.* (2021) com modificações. Uma placa de poliestireno (96 poços) estéril foi previamente tratada com diferentes concentrações, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 64 µg/mL e 80 µg/mL do RLMIX_Arg por 24 h a 37 °C. Após esse período, o conteúdo da placa foi aspirado e uma alíquota de 200µL do inóculo bacteriano na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) preparada em TSB foi adicionada a placa, sendo então incubada novamente por 24 h a 37 °C. O Cristal violeta (570 nm) foi utilizado para quantificar a formação da biomassa bacteriana após o tratamento.

5.4.6 Análise de dados

Todas as leituras de absorbâncias foram tabeladas utilizando o programa Microsoft Excel, sendo calculados os desvios padrões das análises. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados comparados através de análise de variância (ANOVA) *one way* e *two way* seguidos pelo teste de Student Newman Keuls ($p < 0,05$) utilizando o software Prism versão 8.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.5 Avaliação do efeito *in vitro* do RLMIX_Arg em biofilmes formados e em formação de SARM em cateteres venosos periféricos (CVP)

5.5.1 Formação do biofilme no CVP

A avaliação da atividade antibiofilme em cateteres foi realizada de acordo com protocolo de Weiss *et al.* (2009), com algumas modificações. Foram utilizados cateteres intravenosos Jelco 18G (Descarpack). As cepas utilizadas foram: SARM 1, SARM 2 e SARM 4, às quais foram previamente semeadas em ágar Mueller Hinton e incubadas por 24h a 37°C. Seguiu-se ao repique de colônias das cepas em 3 mL do meio TSB acrescido de 1% de glicose, sendo então incubadas novamente por 24h a 37°C.

Posteriormente, os fragmentos de cateteres, os quais foram cortados em pedaços de 5 mm foram colocados em placas de poliestireno de 24 poços. Para o preparo dos inóculos bacterianos, os tubos contendo as cepas em crescimento exponencial foram lavados três vezes

com solução salina, sendo centrifugados a 2500 rpm por 5 min a cada lavagem. Após a última lavagem, as células bacterianas foram suspensas em 100 µL de solução salina (0,9%NaCl), sendo então preparado uma nova suspensão utilizando 5 mL de meio TSB + 1% de glicose na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Foram adicionados 1 mL da suspensão bacteriana sobre os fragmentos de cateteres na placa de poliestireno de 24 poços com incubação por 48h a 37°C. No intervalo de 24 h, as placas foram retiradas da estufa e lavadas gentilmente com salina. O meio de cultura foi repostado no mesmo volume.

Para avaliação da formação de biofilmes mistos, após a impregnação dos cateteres com RLMIX_Arg e com a formulação em gel, foram utilizadas placas de poliestireno de 24 poços e em seguida adicionados o inóculo fúngico e bacteriano na proporção 1:1 (200 µL;200 µL) de cada combinação, preparado como descrito anteriormente e com as mesmas combinações de cepas, sendo realizada incubação por 48 h a 37 °C.

Para avaliação da formação dos biofilmes, após as 48 h de incubação, os fragmentos de cateter foram lavados gentilmente com solução salina e retirados da placa com pinça estéril, sendo transferidos para microtubos contendo 1 mL de solução salina. Os tubos foram submetidos a vórtex (2500 rpm) durante 1,5 min continuamente. Retirou-se uma alíquota de 10 µL de cada tudo eppendorf, a qual foi diluída em 1 mL de solução salina.

Com o auxílio de um *swab* estéril, as diluições foram semeadas em ágar Mueller Hinton e incubadas por 24 h a 37 °C para avaliação de biofilmes de SARM. Posteriormente, foi realizada a contagem de colônias na placa e cálculo da % e Log₁₀ das Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL) em relação ao controle não tratado. Para o biofilme misto, a semeadura foi realizada em placas de Petri contendo ágar batata (Kasvi, Paraná, Brazil) suplementado com cloranfenicol (Sigma-Aldrich, MO, USA) e ágar sal manitol (Kasvi, Paraná, Brazil).

5.5.2 Avaliação da interferência do RLMIX_Arg em biofilmes maduros e na fase inicial de adesão em cateteres

Para análise dos efeitos da droga no biofilme maduro, a exposição dos cateteres ao RLMIX_Arg ocorreu logo após a incubação de 48 h do inóculo. Após essa etapa, o sobrenadante foi retirado das placas e os poços com os cateteres foram lavados gentilmente por três vezes com solução salina (0,9%). Foi adicionado o RLMIX_Arg nas concentrações de 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 64 µg/mL e 80 µg/mL, sendo um poço reservado para o controle

positivo (cateter não tratado com RLMIX_Arg) e incubados por 24 h a 37 °C. Após o período de incubação, seguiu-se a leitura das colônias bacterianas de acordo com item 5.5.1.

Para a avaliação do efeito da droga sobre a fase inicial de formação do biofilme, o inoculo na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em TSB + 1% de glicose foi adicionado juntamente com a droga nas diferentes concentrações. As concentrações testadas foram: 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 64 µg/mL e 80 µg/mL, sendo um poço reservado para o controle positivo (cateter não tratado com RL-MIX_Arg). As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Após esse período, os cateteres foram lavados e transferidos para um tubo contendo 1 mL de salina, foram então submetidos a vórtex (2500 rpm) por 1,5 min. As amostras foram então diluídas, e uma alíquota de 10 µL foi semeada em placas de ágar Mueller Hinton. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. O número de UFC/mL foi contado e multiplicado pelo fator de diluição (Iwata *et al.*, 2021).

5.6 Efeito da impregnação de cateteres com RLMIX_Arg isolado e em gel na formação de biofilmes de SARM e de biofilme misto de SARM e *C. albicans*

O revestimento RLMIX_Arg via adsorção física foi obtido de acordo com Ceresa *et al.* (2019) com modificações. Os cateteres foram previamente cortados em unidade de 5,0 mm com tesoura estéril. Os pedaços foram submersos em microtubos contendo 1 mL de clorofórmio (Dinâmica, São Paulo, Brasil) por 1 h a 37 °C. Essa etapa é importante, pois o clorofórmio dilata a superfície do cateter, fazendo com que a droga não penetre apenas na superfície (Sidrim *et al.*, 2019). Após esse período, os cateteres foram submersos em 1 mL de solução RLMIX_Arg isoladamente em diferentes concentrações: de 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 64 µg/mL, 80 µg/mL, 4 mg/mL e 8 mg/mL por 24 h a 37 °C. Após a impregnação dos fragmentos de cateter com RLMIX_Arg, foram realizados testes para avaliar o efeito na formação de biofilme por três isolados de SARM (SARM 1, SARM 2 e SARM 4).

A formação de biofilme foi induzida, conforme descrito anteriormente (5.5.1). A avaliação da inibição da formação do biofilme foi realizada seguindo a metodologia descrita no tópico 5.5.2, substituindo-se os cateteres estéreis por cateteres impregnados. Cateteres impregnados com clorofórmio foram usados como controle de crescimento de biofilme. Um teste de antibiograma (DME, 2022) em placa foi realizado utilizando a cepa SARM 2, semeada em meio ágar Mueller Hinton, no qual foram adicionados os cateteres impregnados na superfície. Este teste foi executado para comprovar a impregnação dos fragmentos de cateteres. Para avaliação do efeito dos cateteres impregnados com RLMIX_Arg isoladamente (10

mg/mL) sobre os biofilmes mistos foi realizada metodologia semelhante e avaliação após 24 h e após 48 h de incubação.

Para a avaliação do efeito de gel contendo RLMIX_Arg na formação de biofilmes mistos os cateteres estéreis foram cortados em unidades de 5,0 mm e submersos por 24 h a 37 °C em microtubos contendo o gel de Pluronic F-127, a 10 mg/mL apresentando 0.9 µg/mL de RLMIX_Arg. O gel e RLMIX_Arg foram utilizados em concentrações de 1% p/v no processo de impregnação, conforme descrito com outras moléculas, como triclosan e esparfloxacino (Fisher *et al.*, 2015). Após este período, foram transferidos para placas de Petri estéreis e secos em estufa a 37 °C por 24 h. A formação de biofilme foi induzida, conforme descrito anteriormente (5.5.1). A avaliação da contagem das colônias foi realizada após 24 h e após 48 h.

5.6.1 Avaliação da durabilidade do efeito antimicrobiano do RLMIX_Arg e seu gel impregnados em cateteres

Os ensaios foram realizados de acordo com Raad *et al.* (2012) para verificação da durabilidade de inibição da formação de biofilme misto de *C. albicans* resistente ao fluconazol e SARM em CVP. Após a impregnação do cateter com RLMIX_Arg e do seu gel por 24 h a 37 °C, os segmentos de cateteres foram mantidos em estufa por 7, 14, 21 e 28 dias a 37 °C. A cada intervalo de uma semana, os cateteres foram submetidos às condições de formação do biofilme misto descritas anteriormente.

5.7 Avaliação do mecanismo de ação do RLMIX_Arg em células planctônicas de SARM

5.7.1 Preparo das suspensões de SARM e tratamento com RLMIX_Arg

Três cepas de SARM (SARM 1, SARM 2 e SARM 4) representativas foram escolhidas para serem submetidas aos testes de citometria de fluxo. As cepas foram inicialmente semeadas em ágar Mueller Hinton e incubadas por 24 h a 37 °C. Posteriormente, as cepas foram suspensas em 3 mL de caldo Infusão cérebro coração (BHI) (HiMedia, Mumbai, Índia) e levadas à estufa bacteriológica por 24 h a 37 °C. Após serem incubadas, os tubos contendo as suspensões bacterianas foram centrifugados a 3000 rpm por 5 min e lavadas com solução salina (0,9%). Esse procedimento foi repetido por três vezes. Após a última lavagem, as células remanescentes

foram ressuspensas em meio caldo BHI na concentração final de 10^6 células/mL (Neto *et al.*, 2014; Silva, Da *et al.*, 2013).

As suspensões bacterianas foram expostas aos tratamentos com RLMIX_Arg isolado e combinado a oxacilina. Para a cepa SARM 1 foram testados: controle (células sem tratamento), oxacilina (256 $\mu\text{g/mL}$), RLMIX_Arg (4 $\mu\text{g/mL}$ ou CIM/2, 8 $\mu\text{g/mL}$ ou CIM e 16 $\mu\text{g/mL}$ ou 2xCIM), RLMIX_Arg (8 $\mu\text{g/mL}$ ou CIM) + Oxacilina (256 $\mu\text{g/mL}$). Para a cepa SARM 2 foram testados o controle (células sem tratamento), Oxacilina (32 $\mu\text{g/mL}$), RLMIX_Arg (4 $\mu\text{g/mL}$ ou CIM/2, 8 $\mu\text{g/mL}$ ou CIM e 16 $\mu\text{g/mL}$ ou 2xCIM), RLMIX_Arg (8 $\mu\text{g/mL}$ ou CIM) + Oxacilina (32 $\mu\text{g/mL}$). Para a cepa SARM 4 foram testados o controle (células sem tratamento), Oxacilina (64 $\mu\text{g/mL}$), RLMIX_Arg (4 $\mu\text{g/mL}$ ou CIM/2, 8 $\mu\text{g/mL}$ ou CIM e 16 $\mu\text{g/mL}$ ou 2xCIM), RLMIX_Arg (8 $\mu\text{g/mL}$ ou CIM) + Oxacilina (64 $\mu\text{g/mL}$). Três tubos contendo apenas meio caldo BHI foram utilizados como controle de esterilidade do teste. As células expostas aos tratamentos foram incubadas a 37 °C por 24 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas em três experimentos distintos.

5.7.2 Avaliação da viabilidade celular através de citometria de fluxo

A viabilidade das células de SARM foi avaliada utilizando o teste de exclusão de iodeto de propídio (IP) na concentração de 2 mg/L de acordo com Neto *et al.* (2015). O IP é uma molécula que se liga ao DNA da célula, sendo capaz de emitir fluorescência, de forma que, se houver perda da integridade da membrana, esse marcador é capaz de penetrar na membrana e ser visualizado.

Após a incubação das células bacterianas com o RLMIX_Arg, a fluorescência celular foi determinada utilizando o equipamento de citometria de fluxo *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS) e analisada através do software *CytoSoft* 4.1. Foram avaliados 10.000 eventos celulares (Batista de Andrade Neto *et al.*, 2019).

5.7.3 Avaliação de fragmentação no DNA

Os danos causados no DNA das células após o tratamento das amostras com RLMIX_Arg foi analisado através do ensaio de *Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay* (TUNEL) descrito por Neto *et al.* (2015). Inicialmente, as células foram submetidas ao tratamento e fixação com paraformaldeído 7%, sendo posteriormente penetradas com Triton X-100 na concentração de 1% durante 10 min em gelo. Após esse período, as células foram incubadas com a mistura reacional TUNEL por 1 hora a 37 °C. A utilização do Kit de

ensaio foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Roche, Suíça). Posteriormente, um número final de 200 células foi contado por amostra para a determinação da porcentagem de células positivas utilizando microscópio de fluorescência (Olympus, Tokyo, Japan).

5.7.4 Análise de dados

Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados comparados através de análise de variância (ANOVA) seguidos pelo Student Newman Keuls ($p < 0,05$) utilizando o software Prism versão 8.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.8 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise foi realizada de acordo com Do Amaral Valente Sá *et al.* (2020). A cepa de SARM 1 foi utilizada como representativa, sendo empregada uma placa de 24 poços de poliestireno para o ensaio. Primeiramente, os biofilmes de SARM pré-formados em cateteres (0.5 mm) de acordo com o tópico 5.5.1 foram tratados com 8 $\mu\text{g/mL}$ e 80 $\mu\text{g/mL}$ do RLMIX_Arg. O controle de crescimento de 100% do biofilme foi realizado com a cepa sem exposição ao RLMIX_Arg. Assim, os biofilmes pré-formados (48 h) nos cateteres e tratados com RLMIX_Arg por 24 h foram fixados com uma solução de glutaraldeído (Sigma-Aldrich Co., MO, USA) a 2.5% diluída em tampão de cacodilato de sódio (Electron Microscopy Sciences, PA, USA) a 0,15M.

Posteriormente, as placas contendo os cateteres fixados foram incubadas *overnight* a temperatura de 4 °C. O próximo passo foi a desidratação das células, a qual foi realizada utilizando-se uma série alcoólica crescente (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%) seguida de secagem em estufa por 20 min. Após a secagem dos cateteres, foi adicionado 150 μL de uma solução de hexametildisilazano (HMDS) (Polysciences Europe, Hirschberg an der Bergstraße, Germany) em cada poço da placa, sendo deixadas na cabine de fluxo até secagem total do reagente. Após a secagem, os cateteres foram transferidos para uma nova placa, com o auxílio de uma pinça estéril, e devidamente identificados. As amostras foram então conduzidas à central analítica da Universidade Federal do Ceará, sendo cobertas com 10 nm de ouro e analisadas por FEI Inspect S50 Emitech Q150T (Quorum Technologies Ltd, Laughton, UK) em alto vácuo.

Para a análise do biofilme misto formado em cateters, foi utilizada a combinação *C. albicans* 1 + SARM 1. Para isto, o CVP foi impregnado com RLMIX_Arg de forma isolada (10 mg/mL) e em gel (10 mg/mL da formulação). Foi realizado o mesmo procedimento descrito

anteriormente, apenas com adição do azul de Alcian 0,1% (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) à solução de fixação.

6. RESULTADOS

6.1 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana e interação farmacológica

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) para o RLMIX_Arg variaram de 4 - 16 µg/mL. As cepas ATCCs de SASM e SARM apresentaram CIM de 4 e 8 µg/mL respectivamente para RLMIX_Arg isolado (Tabela 4). Todas as cepas clínicas testadas apresentaram resistência à oxacilina, com CIM variando de 16 - 256 µg/mL, em que uma CIM ≥ 4 para oxacilina é classificado como resistente. A cepa de SASM utilizada como controle apresentou CIM de 0,125 µg/mL, confirmando sua sensibilidade.

Comparando-se os resultados das CIM do RLMIX_Arg e da Oxacilina observa-se que o ramnolipídeo apresenta valores até trinta e seis vezes menores de CIM em quatro cepas testadas, dezesseis vezes menor em uma cepa, oito vezes menor em três cepas e quatro vezes menor em cinco cepas. Evidenciando assim a maior efetividade do RLMIX_Arg em relação a Oxacilina.

Com relação à vancomicina, apenas uma cepa mostrou resistência intermediária com CIM = 4 µg/mL (*S. aureus* 8) (Tabela 4), as demais foram consideradas sensíveis à vancomicina, com valores de CIM ≤ 2 (CLSI, 2021). No que se refere à Concentração Bactericida Mínima (CBM), ou seja, a concentração capaz de inibir 99,9% do crescimento das colônias visivelmente em placas de ágar, os valores variaram de 8 - 32 µg/mL (Tabela 4). As razões entre CBM/CIM variaram de 1 – 2, caracterizando uma atividade bactericida (Tabela 4).

Tabela 4 - Avaliação da atividade antimicrobiana do RLMIX_Arg isolado frente a cepas de SARM de diferentes sítios anatômicos.

Valores de CIM ^a µg/mL							
Cepas	Fonte	ISOLADOS			NÍVEL DE TOLERANCIA		
		RLMIX_Arg	Oxacilina	Vanco	CBM ^b	CBM/CIM	INTER ^c
SARM ATCC	ATCC	8	8	2	8	1	Bactericida
SASM ATCC	ATCC	4	0,125	0,5	8	2	Bactericida
SARM 1*#	Sangue	8	256	1	8	1	Bactericida
SARM 2*	Secreção Ocular	8	32	0,5	8	1	Bactericida
SARM 3	Urina	8	256	1	8	1	Bactericida
SARM 4*	Secreção Abscesso	8	64	0,5	8	1	Bactericida
SARM 5	Fluido pleural	8	64	1	8	1	Bactericida
SARM 6	Sangue	4	64	1	8	2	Bactericida
SARM 7	Sangue	4	128	2	8	2	Bactericida
SARM 8	Sangue	16	64	4	16	1	Bactericida
SARM 9	Secreção pele	8	32	1	16	2	Bactericida
SARM 10	Sangue	16	64	2	32	2	Bactericida
SARM 11	Secreção pele	8	16	1	16	2	Bactericida
SARM 12	Sangue	8	64	1	16	2	Bactericida
SARM 13	Sangue	16	64	2	32	2	Bactericida
SARM 14	Aspirado Traqueal	8	256	1	16	2	Bactericida

^a: CIM (concentração inibitória mínima) concentração capaz de inibir 99.99% do crescimento visível;

^b: CBM (concentração bactericida mínima) menos concentração capaz de inibir 99.99% do crescimento bacteriano em colônias visíveis;

^c: CBM/CIM \geq 16 Bacteriostático; CBM/CIM \leq 4 Bactericida;

*: Cepa utilizada no teste de biofilmes em placas, cateteres e citometria;

#: Cepa utilizada na microscopia eletrônica de varredura;

Para as cepas de *Candida*, foram obtidas CIM 50% entre 2 µg/mL e 13 µg/mL. Todas as cepas de *C. albicans* com CIM ≥ 8 µg/mL foram consideradas resistentes ao fluconazol (Tabela 5). A cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi sensível ao fluconazol e a cepa de *C. krusei* ATCC 6258 foi resistente ao fluconazol. Observa-se também que para uma das cepas testadas (*C. albicans* 2) a CIM para o RLMIX_Arg foi vinte e seis vezes menor que para o fluconazol. As outras cepas apresentaram CIMs para RLMIX_Arg variando de quatro a duas vezes menores que para o fluconazol.

Tabela 5 - Avaliação da atividade antimicrobiana do RLMIX_Arg isolado frente a cepas de *C. albicans*.

Valores de CIM ^a µg/mL		
Cepas	CIM ^a 50% (µg/ml) FLC ^b	CIM ^a 50% (µg/ml) RLMIX_Arg
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1	9
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	16	7
<i>C. albicans</i> 1	21	5
<i>C. albicans</i> 2	53	2
<i>C. albicans</i> 3	32	9
<i>C. albicans</i> 4	12	7
<i>C. albicans</i> 5	21	13

^a: menor concentração que inibiu 50% do crescimento fúngico visualmente após o período de incubação.

^b: FLC: Fluconazol

Com relação às cepas de bactérias Gram-negativas, em nenhum dos gêneros testados RLMIX_Arg apresentou boa atividade nas concentrações testadas. As CIMs para o RLMIX_Arg isolado foram maiores que 1024 µg/mL (maior concentração testada) para todas as cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae*, inclusive as ATCC. Como mostrado na tabela 6, todas as cepas de *E. coli* testadas apresentaram sensibilidade ao meropeném (CIM ≤ 1), já as cepas de *K. pneumoniae* apresentaram-se como resistentes (CIM ≥ 4) a esse antibiótico. Todas as cepas testadas, com exceção das ATCC foram classificadas como resistentes a ciprofloxacino (CIM ≥ 1) (M100-S31) (CLSI, 2021). Não foi observado sinergismo entre as combinações de drogas testadas para nenhuma das cepas de bactérias Gram-negativas, porém foi observado uma modulação negativa para a combinação RLMIX_Arg e ciprofloxacino.

No que tange ao teste de interação farmacológica, de acordo com a tabela 6 constatou-se que 37,5% das cepas apresentaram sinergismo, 56,25% apresentaram relação aditiva, 6,25% mostraram antagonismo e nenhuma das cepas apresentou relação de sinergismo parcial para a combinação RLMIX_Arg e Oxacilina. Os valores de FICI variaram de 0,25 – 2. A cepa que apresentou relação de antagonismo foi a SARM ATCC. As maiores quedas nas CIM foram observadas nas cepas SARM 6, pois o CIM para oxacilina caiu de 64 µg/mL (isolado) para 8 µg/mL (combinação), um valor três vezes menor, e na cepa de SARM 9, com diminuição da CIM para oxacilina de 32 µg/mL(isolado) para 4 µg/mL (combinação). Para a combinação RLMIX_Arg e Vancomicina (tabela 7) foi observado que 50% das cepas apresentaram efeito aditivo e 50% efeito antagônico. Observa-se que apesar do FICI traduzir um efeito antagônico, não houve variações consideráveis nas CIM das cepas quando expostas a combinação RLMIX_Arg e vancomicina.

Tabela 6 - Avaliação do efeito sinérgico do RLMIX_Arg com oxacilina e vancomicina frente a cepas de SARM.

Valores de CIM ^a µg/mL									
COMBINADOS									
Cepas	Fonte	RL-MIX-ARG	Oxacilina	ΣFICI ^b	INTER ^c	RL-MIX-ARG	Vanco	ΣFICI ^b	INTER ^c
SARM ATCC	ATCC	8	8	2	ANT	4	1	1,00	ADD
SASM ATCC	ATCC	2	0,0625	1	ADD	4	0,5	2,00	ANT
SARM 1*#	Sangue	4	128	1	ADD	8	1	2,00	ANT
SARM 2*	Secreção Ocular	4	16	1	ADD	8	0,5	2,00	ANT
SARM 3	Urina	4	128	1	ADD	8	1	2,00	ANT
SARM 4*	Secreção Abcesso	4	32	1	ADD	8	0,5	2,00	ANT
SARM 5	Fluido Pleural	2	16	0,5	SIN	4	0,5	1,00	ADD
SARM 6	Sangue	0,5	8	0,25	SIN	2	0,5	1,00	ADD
SARM 7	Sangue	1	32	0,5	SIN	4	2	2,00	ANT
SARM 8	Sangue	8	32	1	ADD	16	4	2,00	ANT
SARM 9	Secreção pele	1	4	0,25	SIN	4	0,5	1,00	ADD
SARM 10	Sangue	4	16	0,5	SIN	8	1	1,00	ADD
SARM 11	Secreção pele	4	8	1	ADD	4	0,5	1,00	ADD
SARM 12	Sangue	4	32	1	ADD	4	0,5	1,00	ADD
SARM 13	Sangue	4	16	0,5	SIN	8	1	1,00	ADD
SARM 14	Aspirado Traqueal	4	128	1	ADT	8	1	2,00	ANT

^a: CIM (concentração inibitória mínima) concentração capaz de inibir 99,99% do crescimento visível;

^b: ΣFICI: Concentração inibitória fracionada;

^c: FICI ≤ 0,5 sinergismo (SIN); FICI > 0,5 mas < 1 sinergismo parcial (SYP); FICI = 1 aditivo (ADD); FICI > 1 antagonismo (ANT);

*: Cepa utilizada no teste de biofilmes em placas, cateteres e citometria;

#: Cepa utilizada na microscopia eletrônica de varredura.

Para facilitar a visualização e comparação a tabela 7 mostra de forma detalhada o percentual de variação das CIM para oxacilina e vancomicina isolada e combinada ao RLMIX_Arg. A variação percentual foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula: variação (%) = $[(\text{OXA Combinada} - \text{OXA Isolada}) / \text{OXA Isolada}] * 100$ (igualmente para vancomicina) de forma que os valores negativos indicam uma redução na CIM da oxacilina quando combinada com o RLMIX_Arg e quanto mais negativo o valor, maior a potencialização do efeito com a combinação. Uma redução de 50% da CIM não implica necessariamente em efeito sinérgico de acordo com o cálculo do FICI, mas sim em efeito aditivo, onde a combinação tem efeito igual à soma das partes, sem potência aumentada, porém pode justificar dosagens menores para reduzir toxicidade. Para ser considerada sinérgica a combinação precisa reduzir em pelo menos quatro vezes o valor da CIM.

Tabela 7 – Comparação do efeito sinérgico do RLMIX_Arg com oxacilina frente a cepas de SARM em valores de percentual de redução de concentração inibitória mínima.

Cepas	OXA Isolada µg/mL	OXA Combinada µg/mL	Variação na CIM (%)	Vanco isolada µg/mL	Vanco combinada µg/mL	Variação na CIM (%)
SARM ATCC	8	8	0%	2	1	-50%
SASM ATCC	0,125	0,0625	-50%	0,5	0,5	0%
SARM 1	256	128	-50%	1	1	0%
SARM 2	32	16	-50%	0,5	0,5	0%
SARM 3	256	128	-50%	1	1	0%
SARM 4	64	32	-50%	0,5	0,5	0%
SARM 5	64	16	-75%	1	0,5	-50%
SARM 6	64	8	-87.5%	1	0,5	-50%
SARM 7	128	32	-75%	2	2	0%
SARM 8	64	32	-50%	4	4	0%
SARM 9	32	4	-87.5%	1	0,5	-50%
SARM 10	64	16	-75%	2	1	-50%
SARM 11	16	8	-50%	1	0,5	-50%

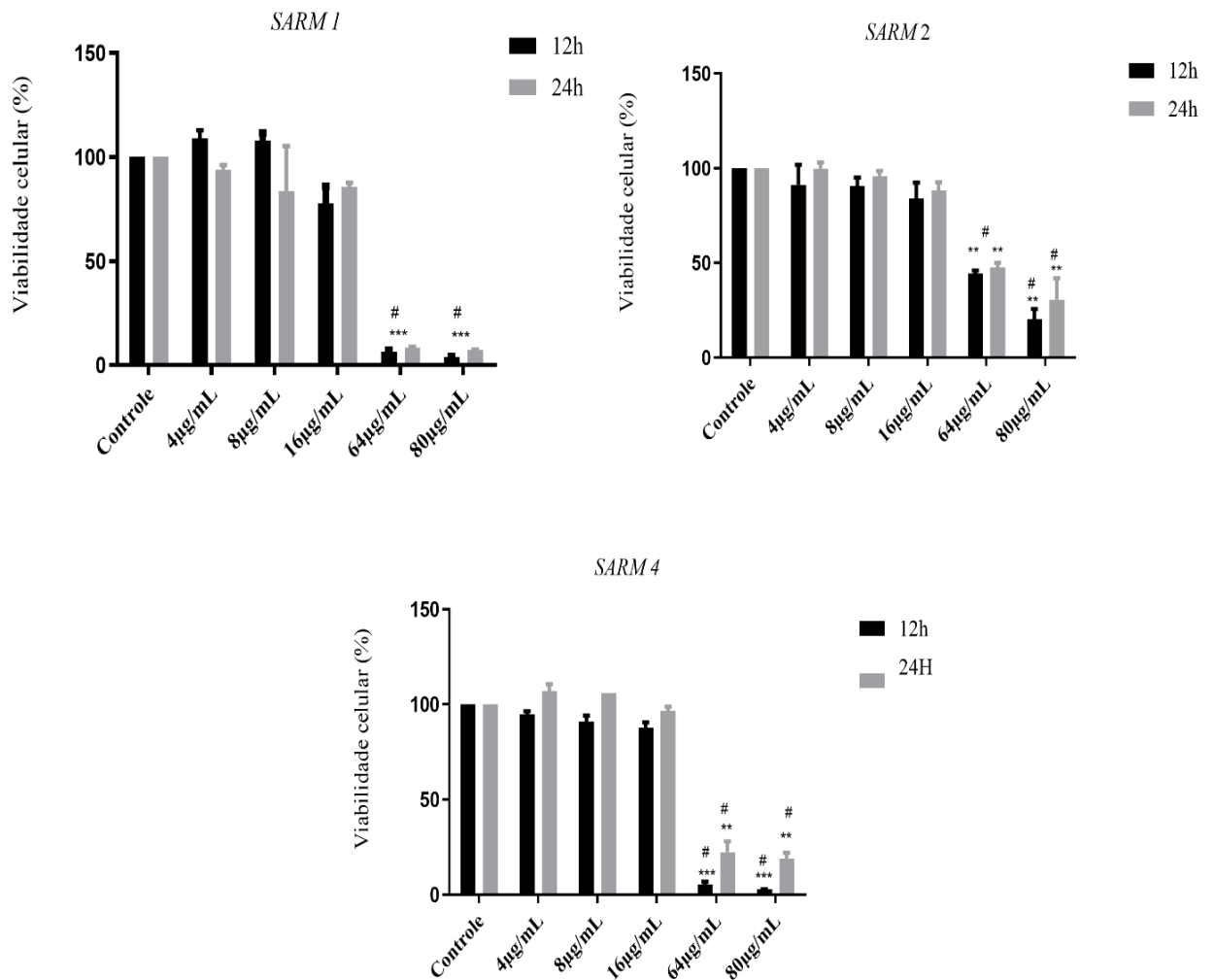
SARM 12	64	32	-50%	1	0,5	-50%
SARM 13	64	16	-75%	2	1	-50%
SARM 14	256	128	-50%	1	1	0%

OXA: Oxacilina. Vanco: Vancomicina. CIM: Concentração inibitório mínima

6.2 Efeito do RLMIX_Arg sobre biofilmes pré-formados em placas de 96 poços

Para os biofilmes formados nas placas de 96 poços foi observado diminuição significativa da viabilidade celular ($p < 0.05$) para as três cepas testadas após 12h e 24h de tratamento. Essa diminuição foi notoriamente relevante nas concentrações de 64 $\mu\text{g/mL}$ e 80 $\mu\text{g/mL}$ quando comparadas com as demais concentrações utilizadas (Figura 15). Nenhuma das cepas testadas apresentou redução significativa quando utilizados CIM/2 (4 $\mu\text{g/mL}$), CIM (8 $\mu\text{g/mL}$) e 2xCIM (16 $\mu\text{g/mL}$) nos tempos de incubação de 12h e 24h. Para o tempo de 24h, a cepa SARM 1 mostrou redução do crescimento de 91,7% e 95,1% nas concentrações de 64 $\mu\text{g/mL}$ e 80 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. A cepa SARM 4 apresentou redução 77,6% e 80,9% para 64 $\mu\text{g/mL}$ e 80 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. SARM 2 apresentou os menores níveis de redução, 52,5% e 69,4% para as concentrações de 64 $\mu\text{g/mL}$ e 80 $\mu\text{g/mL}$. As porcentagens relatadas anteriormente referem-se à comparação com os grupos controle, ou seja, sem tratamento com RLMIX_Arg.

Figura 15 - Avaliação do efeito do RLMIX_Arg na viabilidade celular de biofilmes pré-formados de SARM após 12h e 24 h de tratamento.



* $P < 0.05$ comparado com controle / ** $P < 0.01$ comparado com controle / *** $P < 0.001$ comparado com controle / # comparado com 4 µg/mL, 8 µg/mL e 16 µg/mL ($p < 0.05$).

O efeito na viabilidade celular também foi avaliado após 12h de tratamento com RLMIX_Arg (Figura 15). Observou-se que para a cepa SARM 1, na concentração de 4 µg/mL houve uma redução de 15,3% da viabilidade celular entre os tempos de 12h e 24h, e na concentração de 8 µg/mL a redução foi de 24% entre 12h e 24h de tratamento. Nas outras concentrações testadas não houve diferenças expressivas com relação ao tempo de exposição ao RLMIX_Arg. Após 12h, as concentrações de 64 µg/mL e 80 µg/mL permaneceram com

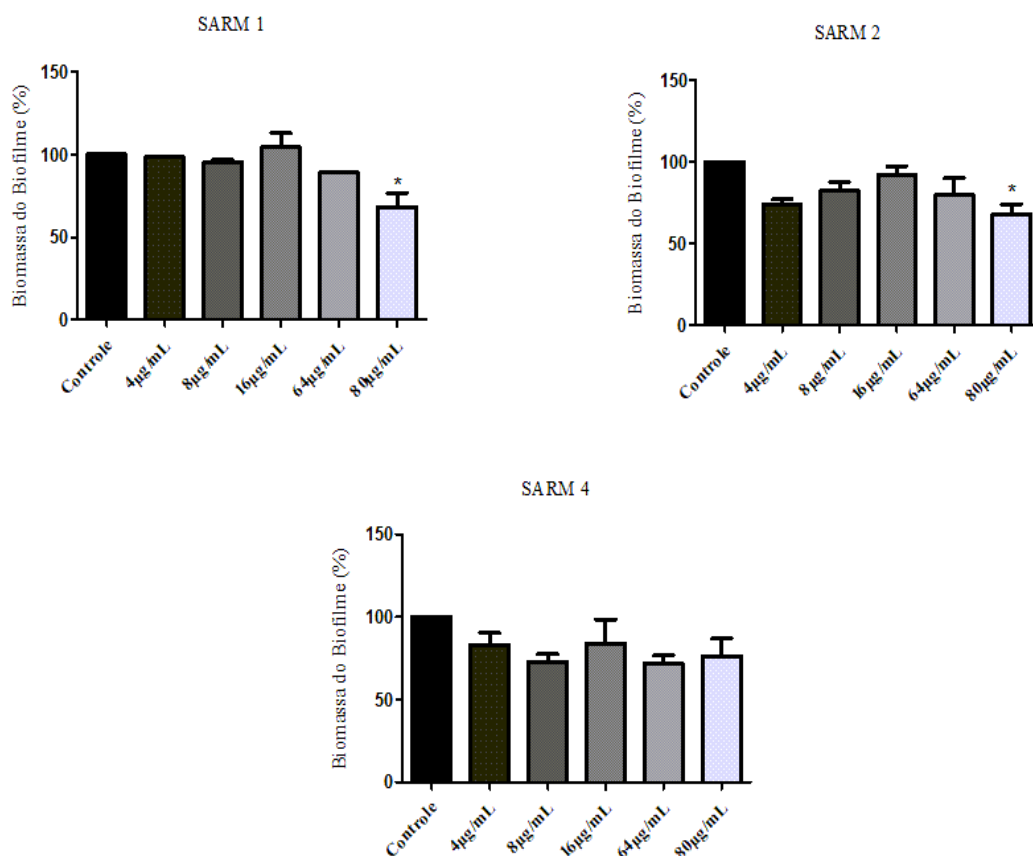
redução significativa de viabilidade celular com relação ao controle, porém quando comparada a variável “tempo” (12h e 24h) não houve diferenças.

Para a cepa SARM 2 não foi observada diferença significativa no tempo de tratamento, porém observa-se uma tendência de diminuição da ação do RLMIX_Arg. Na concentração de 80 µg/mL, por exemplo, houve um aumento da viabilidade celular de 10% e na concentração de 64 µg/mL observou-se um aumento de 5% quando comparados os tempos de 12h e 24h.

A cepa SARM 4 foi a que apresentou maior tendência a aumento da viabilidade celular quando comparado os tratamentos de 12h e 24h. Na concentração de 64 µg/mL, o aumento na viabilidade celular foi de 24,8%, e na de 80 µg/mL o aumento foi de 15,2% em relação ao tratamento por 12h. Nas outras concentrações o aumento de viabilidade celular foi de: 4 µg/mL (9,98%), 8 µg/mL (12,64%) e 16 µg/mL (8,5%) em relação ao tratamento por 12h. Nas cepas de SARM 1, SARM 2 e SARM 4 mesmo após 24 h de tratamento as concentrações de 64 µg/mL e 80 µg/mL permaneceram com redução bastante significativa de viabilidade celular com relação ao controle.

Com relação à biomassa celular nos biofilmes pré-formados, duas das cepas testadas demonstraram diminuição significativa após os tratamentos ($p < 0.05$) apenas para as concentrações de 80 µg/mL. A menor biomassa observada após o tratamento com cristal violeta (24 h) foi na cepa SARM 2 na concentração de 80 µg/mL, mostrando diminuição de 32% de biomassa, e na cepa SARM 1 quando tratada com 80 µg/mL, mostrando uma redução de 31,96 % na formação da biomassa celular (Figura 16).

Figura 16 - Avaliação do efeito do RLMIX_Arg na biomassa do biofilmes pré-formados de SARM após 24h de tratamento.



* $P < 0.05$ comparado com controle / ** $P < 0.01$ comparado com controle / *** $P < 0.001$ comparado com controle.

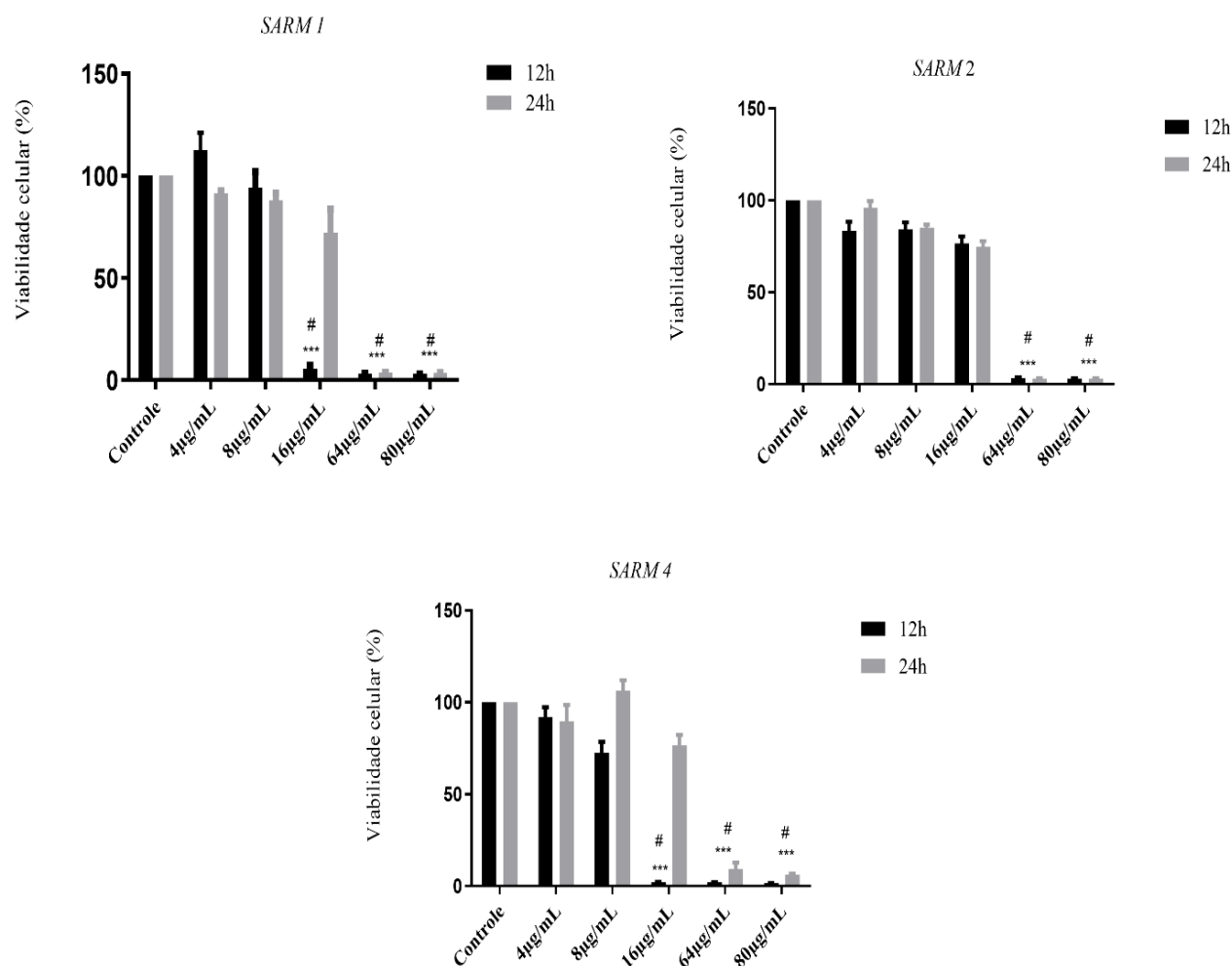
6.3 Efeito do RLMIX_Arg sobre biofilmes em formação em placas de 96 poços

Na avaliação da atividade antibiofilme, ou seja, interferência do RLMIX_Arg na fase inicial de adesão, todas as cepas testadas mostraram redução significativa de viabilidade celular nas concentrações de 64 µg/mL e 80 µg/mL ($p < 0.05$) em relação ao controle (Figura 17) após 24h de tratamento.

A cepa SARM 1 apresentou redução de 96,8% e 96,9% nas concentrações de 64 µg/mL e 80 µg/mL, respectivamente após 24h. A concentração de 16 µg/mL mostrou-se menos eficiente, com redução de viabilidade de 27,7%, não sendo considerada significativa. A cepa SARM 2 apresentou redução de viabilidade celular de 96,9% e de 97,05% quando tratada com 64 µg/mL e 80 µg/mL de RLMIX_Arg, respectivamente, por 24 h. A cepa SARM 4 apresentou

redução 90,7% e 93,86% quando tratada com 64 $\mu\text{g/mL}$ e 80 $\mu\text{g/mL}$ de RLMIX_Arg, respectivamente, por 24 h.

Figura 17 - Avaliação do efeito do RLMIX_Arg na viabilidade celular dos biofilmes de SARM na fase inicial de formação após 12h e 24 h de tratamento.



* $P < 0.05$ comparado com controle / ** $P < 0.01$ comparado com controle / *** $P < 0.001$ comparado com controle / # comparado com 4 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$ e 16 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$).

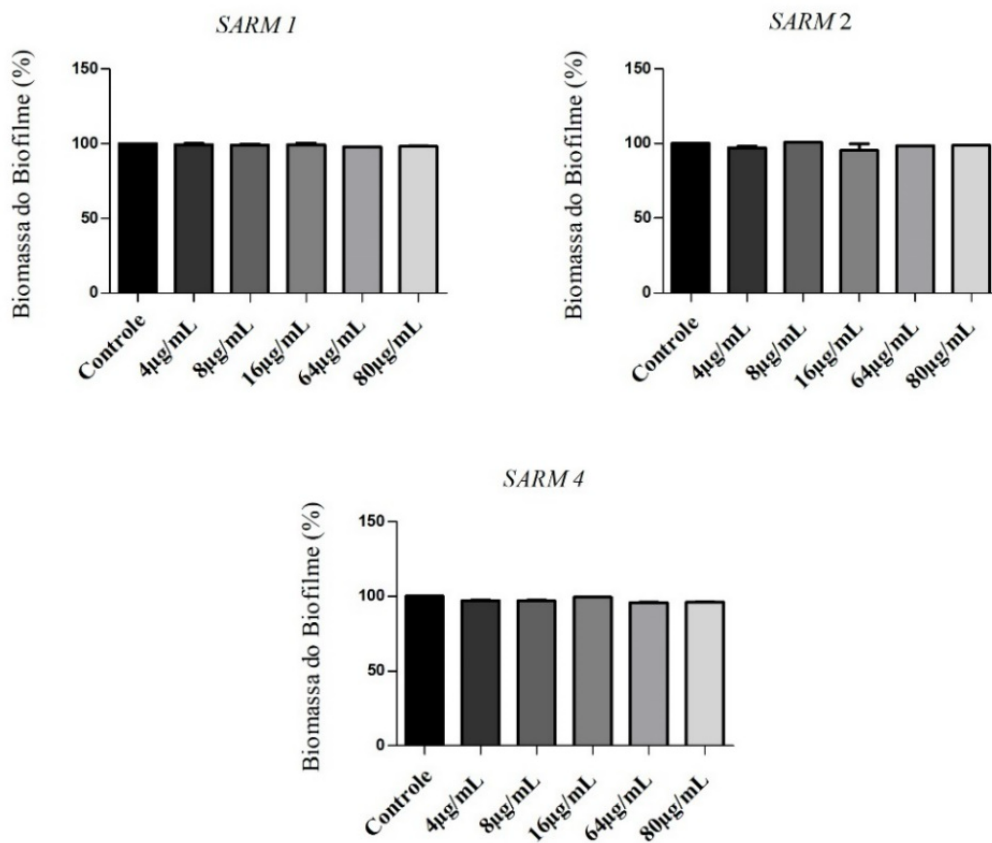
O efeito na viabilidade celular também foi avaliado após 12 h de tratamento com RLMIX_Arg (Figura 17). Observou-se um comportamento diferente entre as cepas testadas. Para a cepa de SARM 1 nas concentrações de 64 $\mu\text{g/mL}$ e 80 $\mu\text{g/mL}$ não houve diferenças significativas na viabilidade celular ($p > 0.05$) quando comparados os tratamentos de 12h e 24

h. Já para a concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ nas cepas de SARM 1 e SARM 4 observou-se um aumento exponencial na viabilidade celular entre os tempos de 12h e 24h. Na cepa de SARM 1 por exemplo, houve aumento de 66,84% da viabilidade celular em 24h, em relação a leitura com 12h.

Para a cepa de SARM 2 não foram observadas diferenças significativas no crescimento entre os tempos de 12h e 24h. Para a cepa SARM 4 também foi demonstrado que na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ após 24h de tratamento com o RLMIX_Arg, há um aumento considerável na viabilidade celular (70,28%) em relação ao tratamento por 12h. As concentrações de 64 $\mu\text{g/mL}$ e 80 $\mu\text{g/mL}$ permanecem com redução significativa de viabilidade celular em relação aos controles em todas as cepas testadas nos tempos de 12h e 24h.

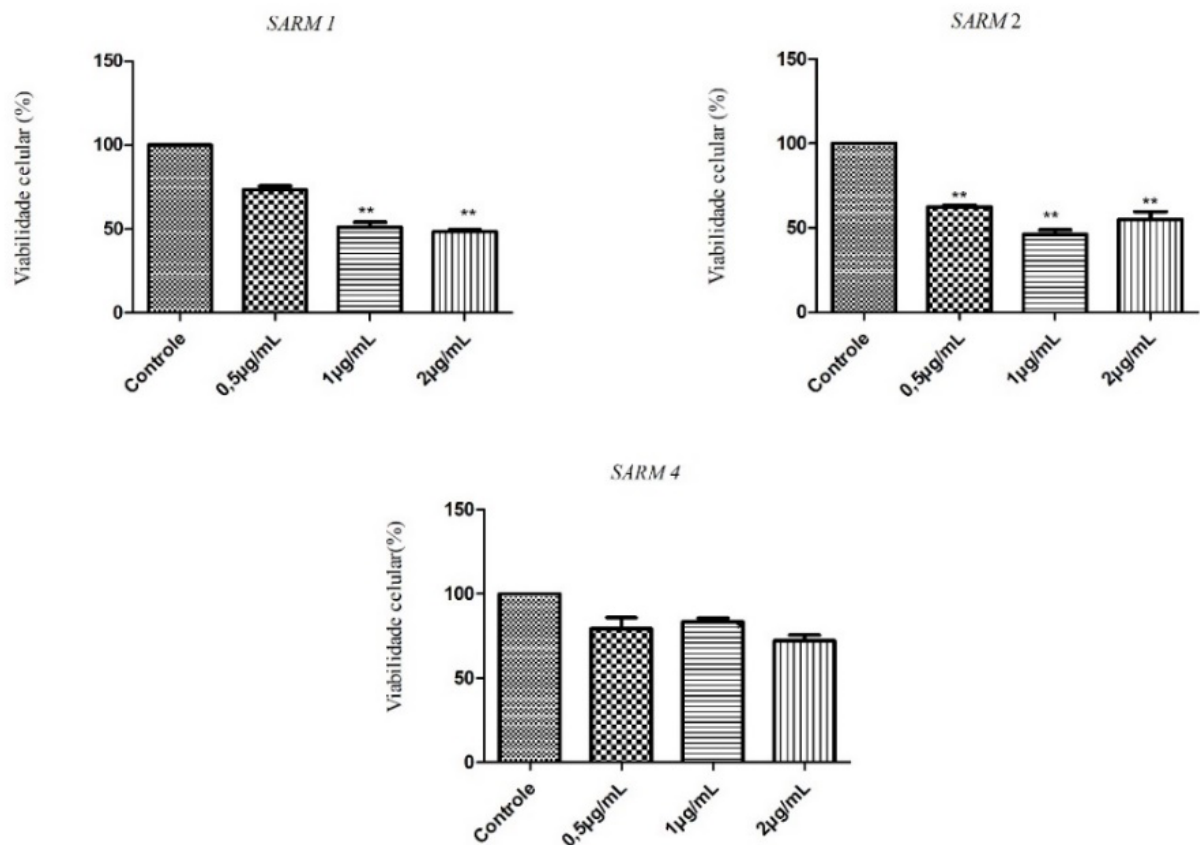
No que se refere à biomassa celular, não foi observada diminuição significativa em nenhuma das concentrações testadas (Figura 18).

Figura 18 - Avaliação do efeito do RLMIX_Arg na biomassa dos biofilmes de SARM na fase inicial de formação após 24h de tratamento.



O efeito do RLMIX_Arg na fase inicial de formação do biofilme também foi testado nas concentrações subinibitórias (Figura 19). Observou-se que para a cepa SARM 1 houve as seguintes reduções: 0,5 µg/mL (23,4%), 1 µg/mL (44,2%) e 2 µg/mL (49,1%). Para a cepa SARM 2: 0,5 µg/mL (38%), 1 µg/mL (54,3%) e 2 µg/mL (47,09%). Para a cepa SARM 4: 0,5 µg/mL (16,04%), 1 µg/mL (13,7%) e 2 µg/mL (22,8%).

Figura 19 - Avaliação do efeito do RLMIX_Arg em concentrações subinibitórias na viabilidade celular dos biofilmes de SARM na fase inicial de formação após 24 h de tratamento.



* $P < 0.05$ comparado com controle / ** $P < 0.01$ comparado com controle / *** $P < 0.001$ comparado com controle

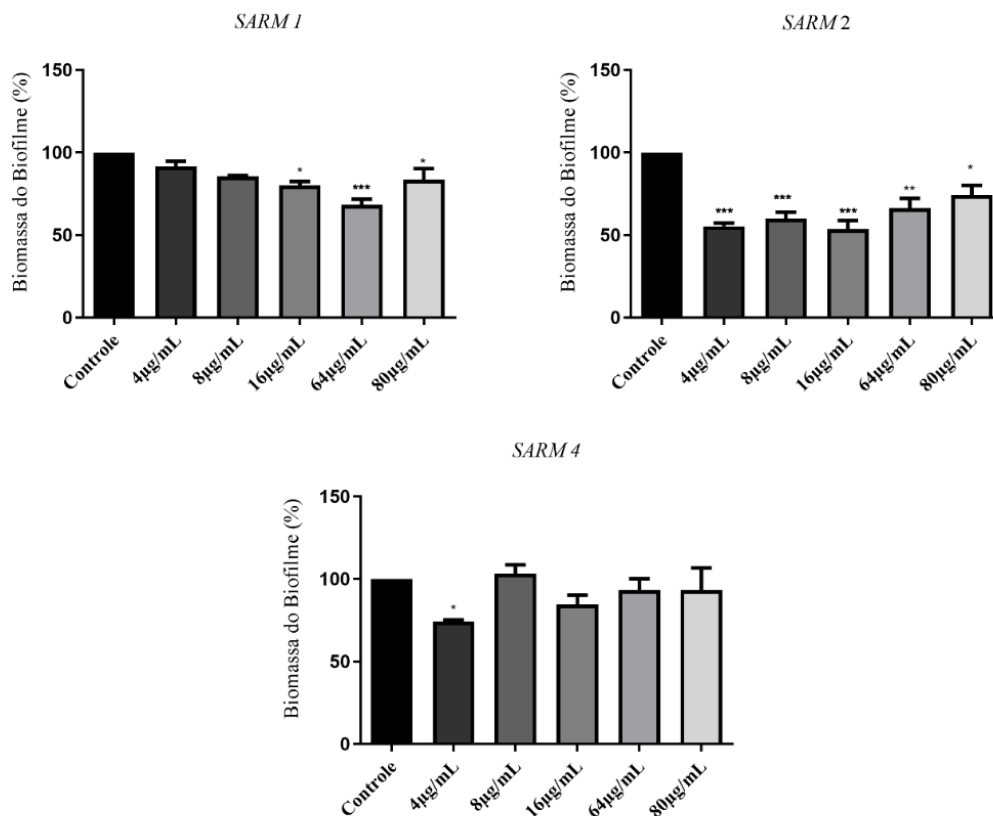
6.4 Efeito inibitório na adesão das células ao poliestireno (*in vitro*)

Para a cepa SARM 1, na concentração de 64 µg/mL foi observada a maior redução de formação de biomassa 31,74%. Nas concentrações de 16 µg/mL (19,90%) e 80 µg/mL (16,42%)

também foram observadas reduções significativas. Na cepa SARM 2 foi observada a maior inibição na adesão das células à superfície de poliestireno na concentração de 4 µg/mL (44,67%), 8 µg/mL (40,05%) e 16 µg/mL (46,50%). Para a referida cepa, em todas as concentrações testadas houve redução na adesão de biomassa: 64 µg/mL (33,67%) e 80 µg/mL (25,87%). Observou-se que o aumento das concentrações e a adesão nessa cepa ao poliestireno possuem relação inversa.

Para a cepa SARM 4 a única concentração considerada significativa foi de 4 µg/mL, com redução de 25,76% da biomassa celular (Figura 20).

Figura 20 - Efeito na adesão da biomassa celular de biofilmes de SARM em placas de poliestireno após tratamento das placas com RLMIX_Arg por 24h.

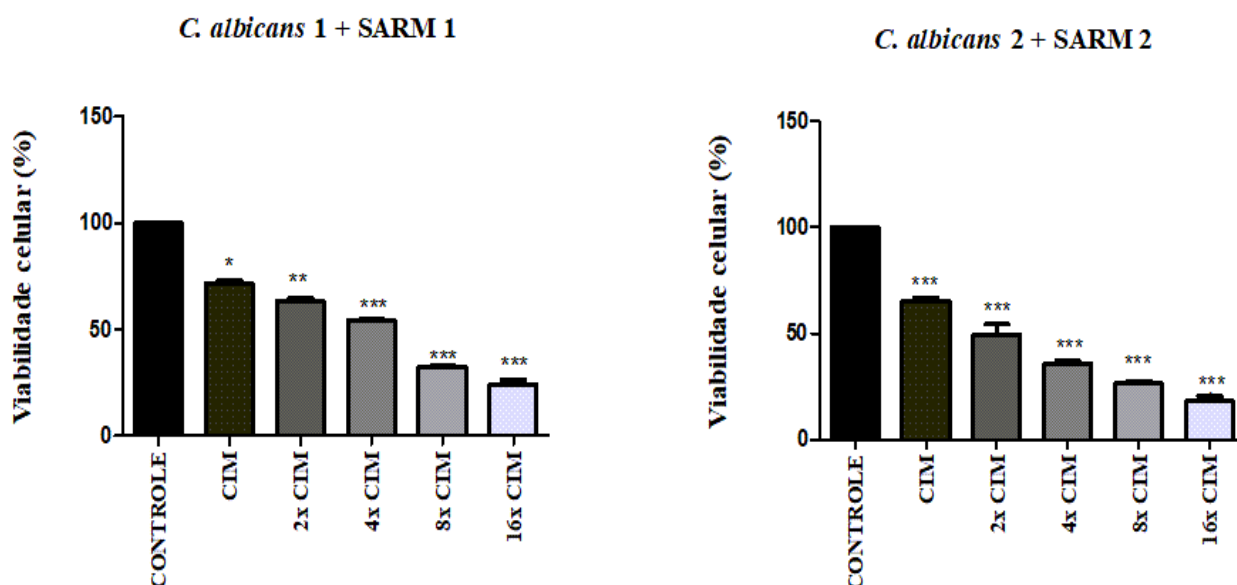


* $P < 0.05$ comparado com controle / ** $P < 0.01$ comparado com controle / *** $P < 0.001$ comparado com controle

6.5 Avaliação do efeito do RLMIX_Arg na viabilidade celular de biofilmes mistos de SARM e *C. albicans* pré-formados em placas após 24 h de tratamento.

O RLMIX_Arg atuou reduzindo de forma significativa a viabilidade celular em biofilme polimicrobiano de *C. albicans* resistente ao fluconazol e SARM (Figura 21). Para a combinação *C. albicans* 1 + SARM 1, o biofilme demonstrou diminuição de atividade metabólica significativa de acordo com o aumento das concentrações. Dessa forma, as atividades metabólicas encontradas foram de 70% em CIM, 63,6% em 2x CIM, 54,3% em 4xCIM, 32,7% em 8xCIM e 24,2% em 16xCIM. Para a combinação *C. albicans* 2 + SARM 2, a viabilidade celular encontrada foi de 66,8% em CIM, 49% em 2xCIM, 35,9% em 4xCIM, 27,06 % em 8xCIM e 18,2% em 16xCIM.

Figura 21 - Avaliação do efeito do RLMIX_Arg na viabilidade celular de biofilmes mistos de SARM e *C. albicans* pré-formados em placas de poliestireno após 24h de tratamento.



* P < 0.05 comparado com controle / ** P < 0.01 comparado com controle / *** P < 0.001 comparado com controle

6.6 Efeito do RLMIX_Arg sobre biofilmes de SARM isolado formados e em formação em cateteres venosos periféricos (CVP)

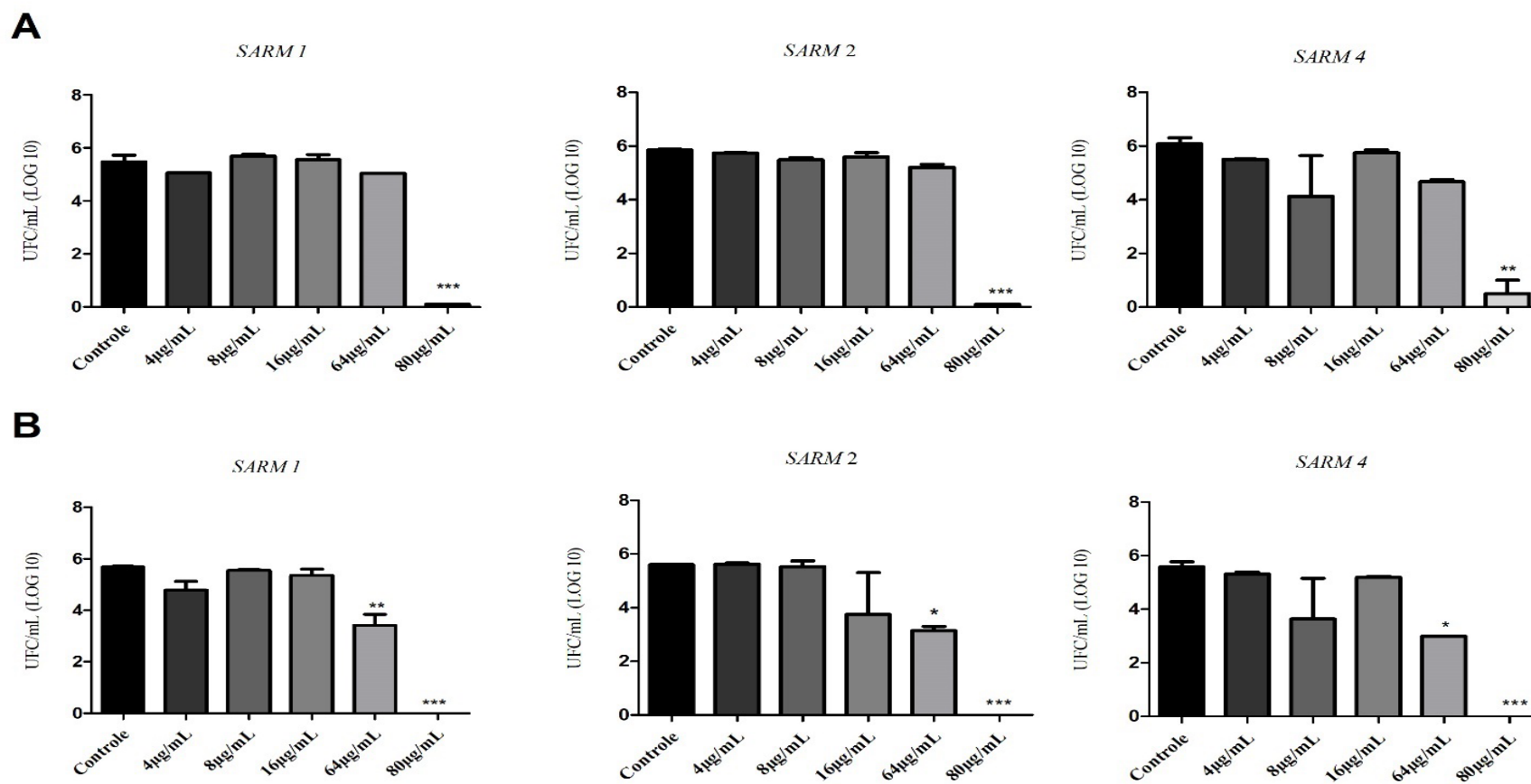
O RLMIX_Arg diminuiu significativamente a quantidade de células viáveis (UFC/mL) nos biofilmes pré-formados (48 h) e em processo inicial de formação na concentração de 80

$\mu\text{g/mL}$ após incubação por 24 h ($p < 0.0001$) (Figura 22A). Para a cepa SARM 1, apenas a concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ foi significativa para o biofilme pré-formado (redução de 5,3 na escala de Log) (Figura 23A) e as concentrações de 64 $\mu\text{g/mL}$ (redução de 2,2 log) e 80 $\mu\text{g/mL}$ (redução de 5,6 log) para os biofilmes em fase inicial de formação (Figura 22B).

Para a cepa SARM 2, nas concentrações de 8 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$ e 64 $\mu\text{g/mL}$ não foi observado diferença significativa em relação ao controle ($p < 0.05$) para os biofilmes pré-formados. Na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ observou-se inibição de cerca de 97% das UFC (redução de 5,7 log) (Figura 22A). Ainda para a cepa SARM 2, a concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ mostrou-se eficiente em reduzir as UFC no biofilme em fase inicial de formação, com uma queda de 5,6 na escala logarítmica. Na concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$ houve redução de 2,4 log (Figura 22B).

Para a cepa SARM 4 foram significativas as concentrações de 80 $\mu\text{g/mL}$ para o biofilme pré-formado, com redução de 5,5 log (Figura 22A). Já para o biofilme em fase inicial de formação houve 5,6 na escala logarítmica (Figura 22B). Para todas as cepas testadas, a concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de desagregar o biofilme maduro, assim como impedir a agregação de células bacterianas ao cateter, dificultando a formação de biofilmes.

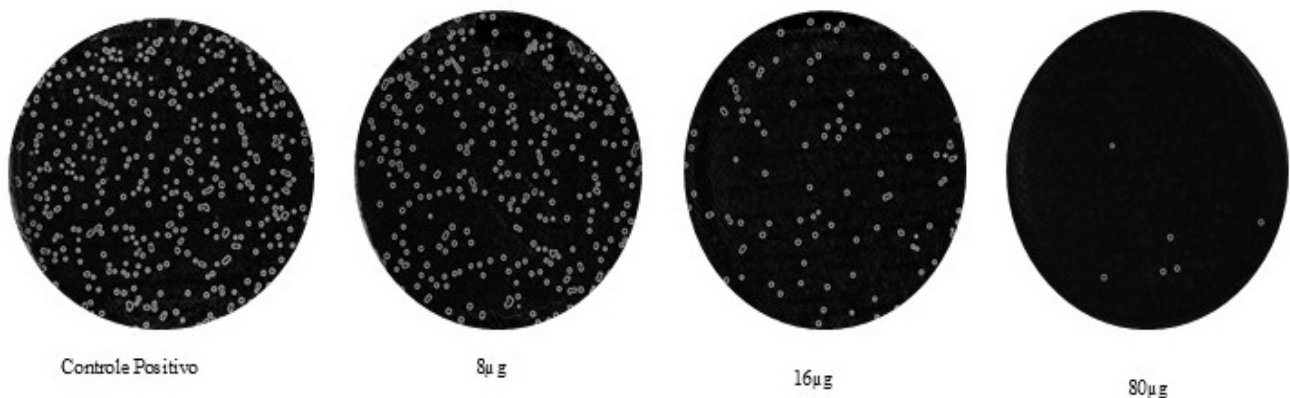
Figura 22 - Efeito do RLMIX_Arg nas UFCs de biofilmes maduros e na fase inicial de adesão em Cateter Venoso Periférico após tratamento por 24h. **A:** Biofilmes maduros. **B:** Efeito antibiofilme (biofilme em formação).



*P < 0.05 comparado com controle/ **P < 0.01 comparado com controle/ *** P < 0.001 comparado com controle.

A diminuição visual das colônias bacterianas em decorrência do aumento da concentração de RLMIX_Arg é apresentada na Figura 23.

Figura 23 - Efeito do RLMIX_Arg nas UFC de biofilmes maduros de SARM 4 em CVP após 24h de tratamento.



Fonte: Autor, 2024.

6.7 Efeito do cateter impregnado com o RLMIX_Arg isolado e em gel de Pluronic F-127 + RLMIX_Arg sobre a formação de biofilmes em cateteres venosos periféricos

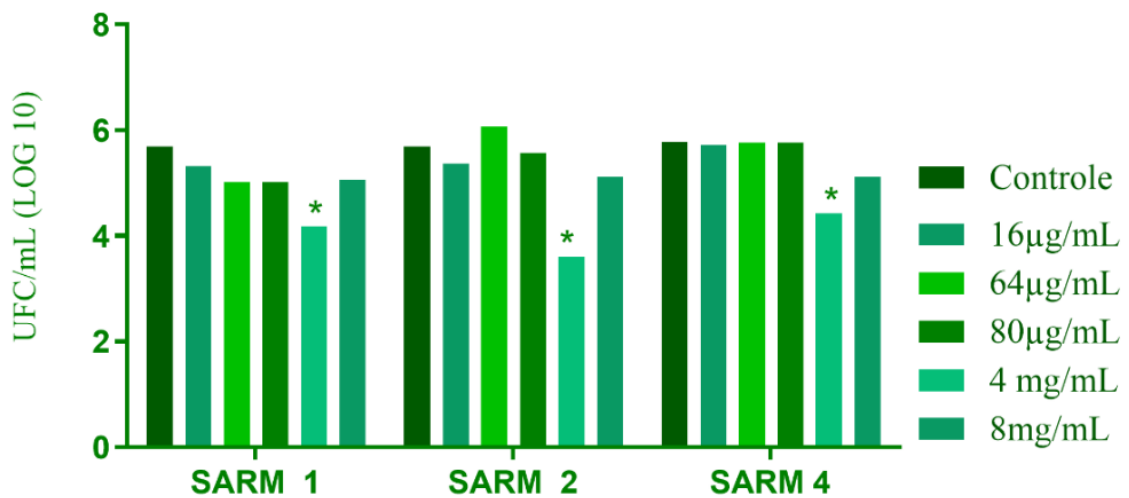
6.7.1 Efeito do cateter impregnado com RLMIX_Arg isolado sobre a formação de biofilme de SARM em CVP

Após impregnação dos cateteres nas concentrações de 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 64 µg/mL e 80 µg/mL, não foram encontradas reduções significativas no crescimento do biofilme (Figura 24A). A concentração de 4 mg/mL apresentou maior redução na adesão de células para a formação de biofilme isolado de SARM. Para SARM 1 houve redução de 28,1% de adesão, para SARM 2 obteve-se a maior redução, 36,85%, e SARM 4 uma redução de 23,75%. Na concentração de 8 mg/mL as taxas de redução na formação de biofilme foram inferiores às de 4 mg/mL. Um halo de inibição utilizando meio ágar Mueller Hinton foi observado apenas nas

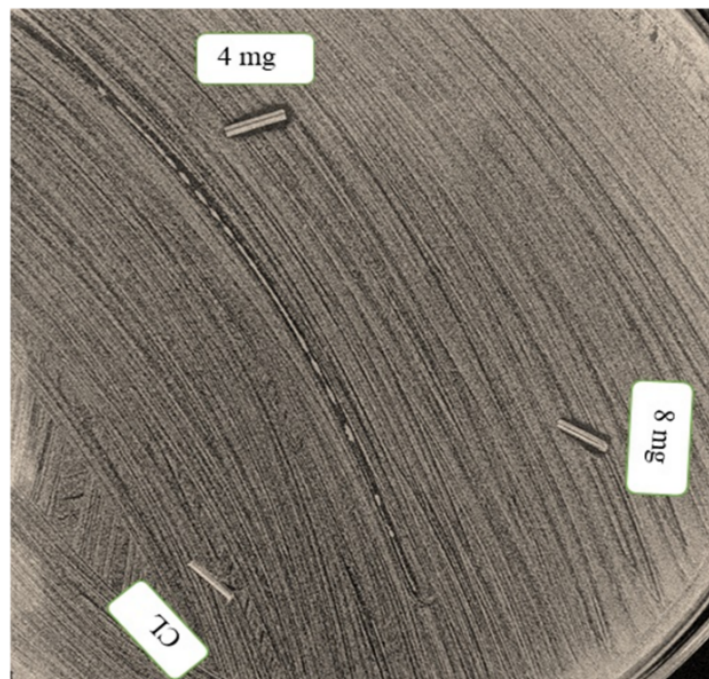
concentrações mais altas, 4 mg/mL e 8 mg/mL, comprovando a efetividade do processo de impregnação do cateter. Não foi observado halo de inibição no cateter utilizado como controle (Figura 24B).

Figura 24 – A) Efeito do cateter impregnado com o RLMIX_Arg sobre a formação de biofilmes de SARM em CVP. **B)** Antibiógrama com cateteres impregnados.

A



B

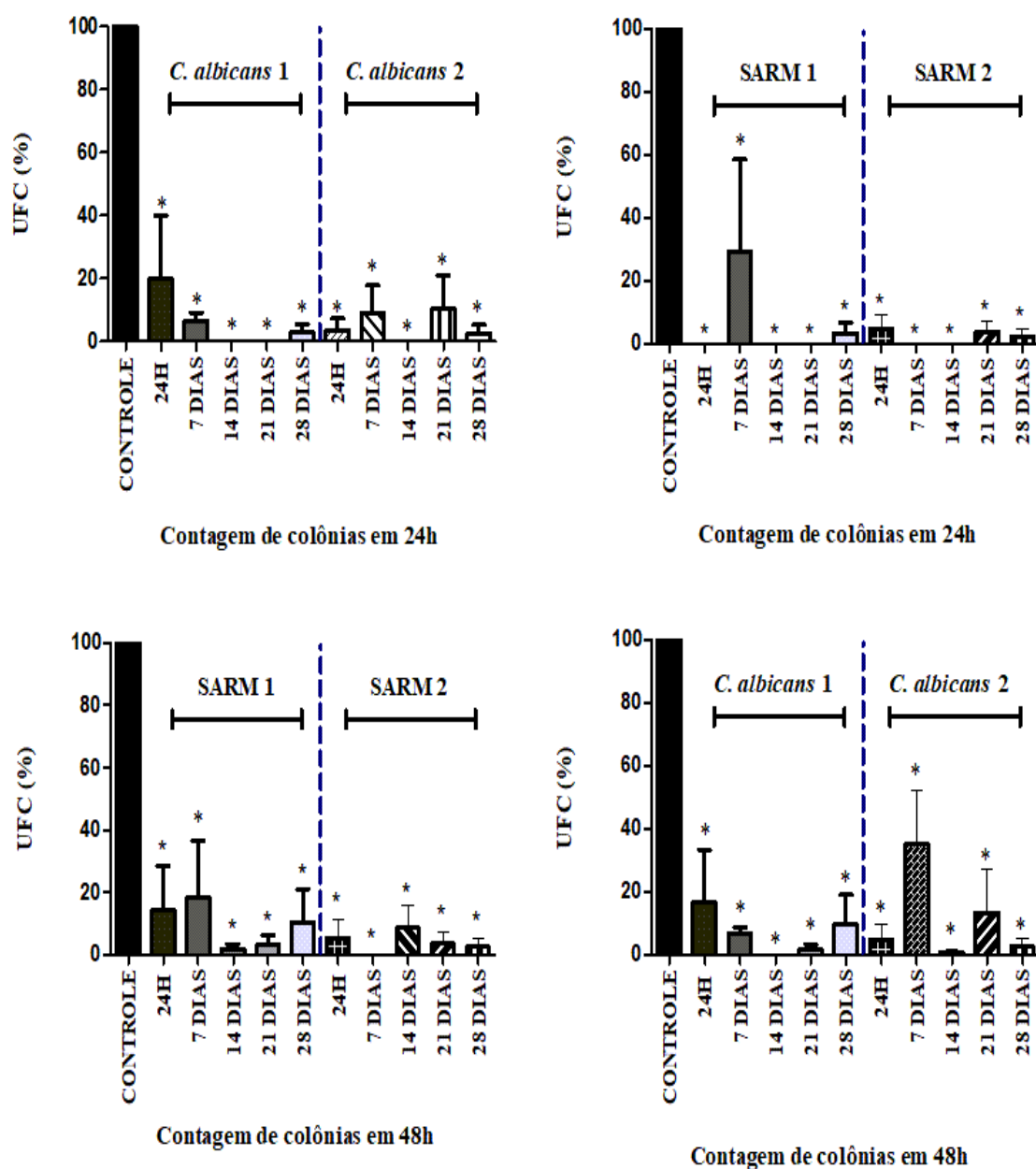


* $P < 0.05$ comparado com controle / ** $P < 0.01$ comparado com controle / *** $P < 0.001$ comparado com controle

6.7.2 Efeito do cateter impregnado com RLMIX_Arg isolado e da formulação em gel sobre a formação de biofilme misto em CVP

Na avaliação do efeito do CVP impregnado com RLMIX_Arg isoladamente (10 mg/mL) sobre a formação de biofilmes mistos de SARM e *C. albicans* (Figura 25), constatou-se que houve redução de UFC variando entre 90.5% a 97.4 % em *C. albicans* e entre 89.5% e 97.8% para SARM nos cateteres no período final avaliado, o qual corresponde a 28 dias. O efeito inibitório na adesão das células foi constatado nos tempos de 24h. Para as contagens de unidades formadoras de colônias em 48 h observou-se uma tendência de aumento na contagem para alguns tratamentos. Com relação a durabilidade, houve manutenção do efeito antimicrobiano durante o período avaliado, tendo em vista que após 28 dias observou-se significativo percentual inibitório das UFCs após 48h. Para a combinação SARM 1 e *C. albicans* 1 após 28 dias manteve-se redução na adesão de 71,4% (SARM 1) e 33,4% (*C. albicans* 1). Para a outra combinação utilizada as reduções observadas foram de 84,4% para SARM 2 e 80,5% para *C. albicans* 2.

Figura 25 – Avaliação da atividade e da durabilidade do efeito antimicrobiano do cateter impregnado com o RLMIX_Arg isolado sobre a formação de biofilmes mistos de SARM e *C. albicans* em CVP.

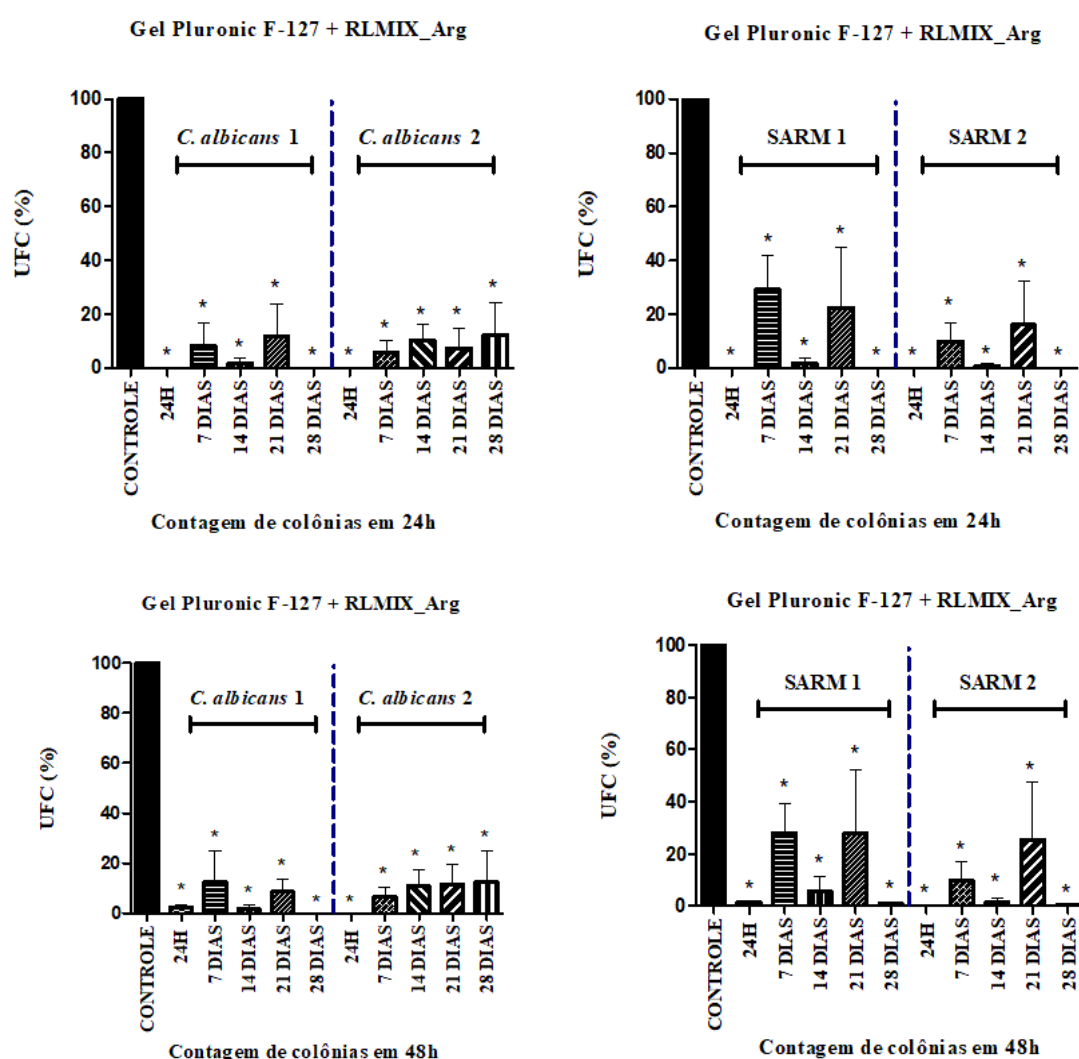


* $P < 0.05$ comparado com controle. UFC: Unidades formadoras de colônia por mL. Foram utilizadas as combinações SARM 1 + *C. albicans* 1 e SARM 2 + *C. albicans* 2. O controle refere-se ao cateter estéril sem contato com o RLMIX_Arg.

Para o cateter impregnado com o gel contendo RLMIX_Arg 0,9 $\mu\text{g/mL}$, a redução de UFC variou entre 87.6% a 100% para *C. albicans* e entre 99.1% e 100% para SARM na última análise de 28 dias (Figura 26), apresentando evidente manutenção do efeito inibitório após 28 dias de

armazenamento. Para a combinação SARM 1 e *C. albicans* 1 após 28 dias na contagem de 48h observou-se redução na adesão de 98% e 100% respectivamente. Para a outra combinação obteve-se redução de 99% para SARM 2 e de 68% para *C. albicans* 2. Observou-se também que para o tempo de 48h houve tendência ao aumento na contagem das UFC.

Figura 26 – Avaliação da atividade e da durabilidade do efeito antimicrobiano do cateter impregnado com o gel Pluronic F-127 + RLMIX_Arg sobre a formação de biofilmes mistos de SARM e *C. albicans* em CVP.



* P < 0.05 comparado com controle. UFC: Unidades formadoras de colônia por mL. Foram utilizadas as combinações SARM 1 + *C. albicans* 1 e SARM 2 + *C. albicans* 2. O controle refere-se ao cateter estéril sem contato com o RLMIX_Arg.

6.8 Avaliação de viabilidade celular através de citometria de fluxo

Nas três cepas testadas houve redução significativa da viabilidade celular ($p < 0.05$). A oxacilina, a qual foi utilizada como controle, gerou redução da viabilidade celular de 60%, 41,94% e 36,04% nas cepas SARM 1, SARM 4 e SARM 2 respectivamente nas concentrações de CIM para cada cepa em comparação com os controles negativos (Figura 27).

O RLMIX_Arg diminuiu a viabilidade celular de forma concentração dependente em todas as cepas. Para a cepa SARM 1: 4 µg/mL (9,9%), 8 µg/mL (24,58%), 16 µg/mL (42,18%). A combinação RLMIX_Arg 8 µg/mL + Oxacilina 256 µg/mL diminuiu a viabilidade celular em 81,40%.

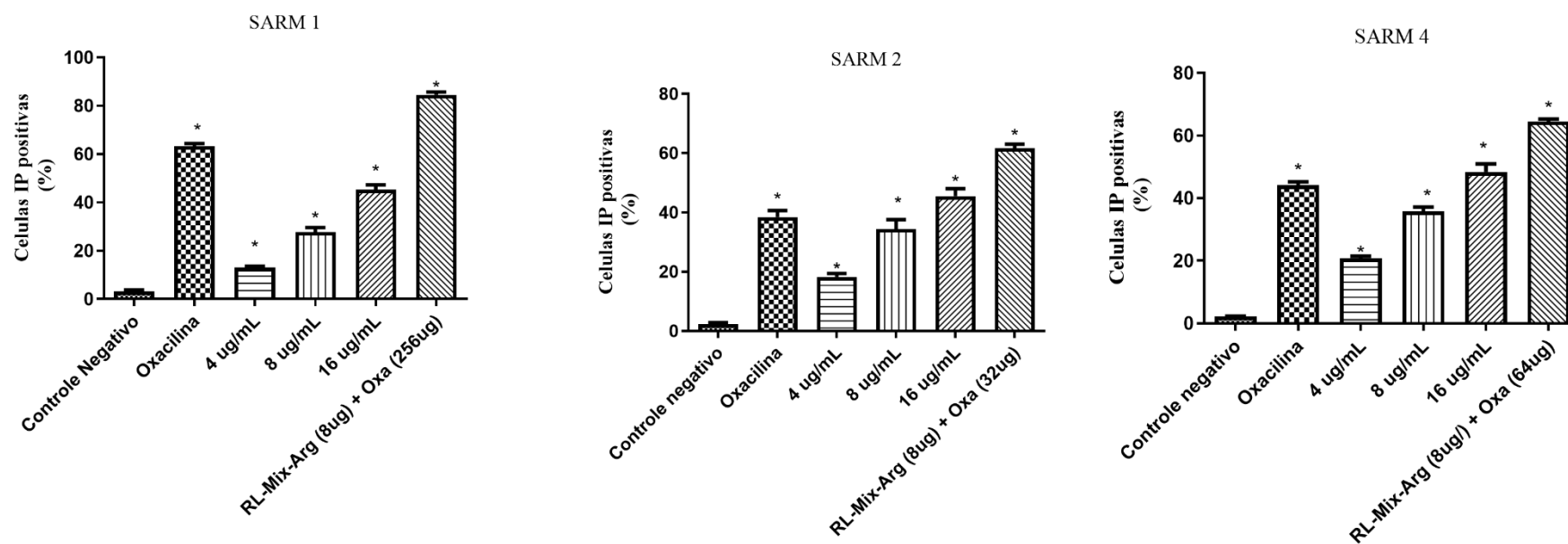
Para a cepa SARM 2 observou-se diminuições de: 4 µg/mL (15,83%), 8 µg/mL (32,04%), 16 µg/mL (43,09%). A combinação RLMIX_Arg 8 µg/mL + Oxacilina 32 µg/mL diminuiu a viabilidade celular em 59,31%. Para a cepa SARM 4 observou-se diminuições de: 4 µg/mL (18,50%), 8 µg/mL (33,60%), 16 µg/mL (46,15%). A combinação RLMIX_Arg 8 µg/mL + Oxacilina 64 µg/mL diminuiu a viabilidade celular em 62,27%.

6.9 Teste de TUNEL

Nas três cepas testadas observou-se fragmentação significativa do DNA celular ($p < 0.05$) (Figura 28). O RLMIX_Arg demonstrou aumentar a fragmentação no DNA de forma concentração dependente, de forma que a combinação RLMIX_Arg e oxacilina mostrou os maiores níveis de células TUNEL positivas, 68,31% (SARM 1), 57,36% (SARM 4) e 63,39% (SARM 2).

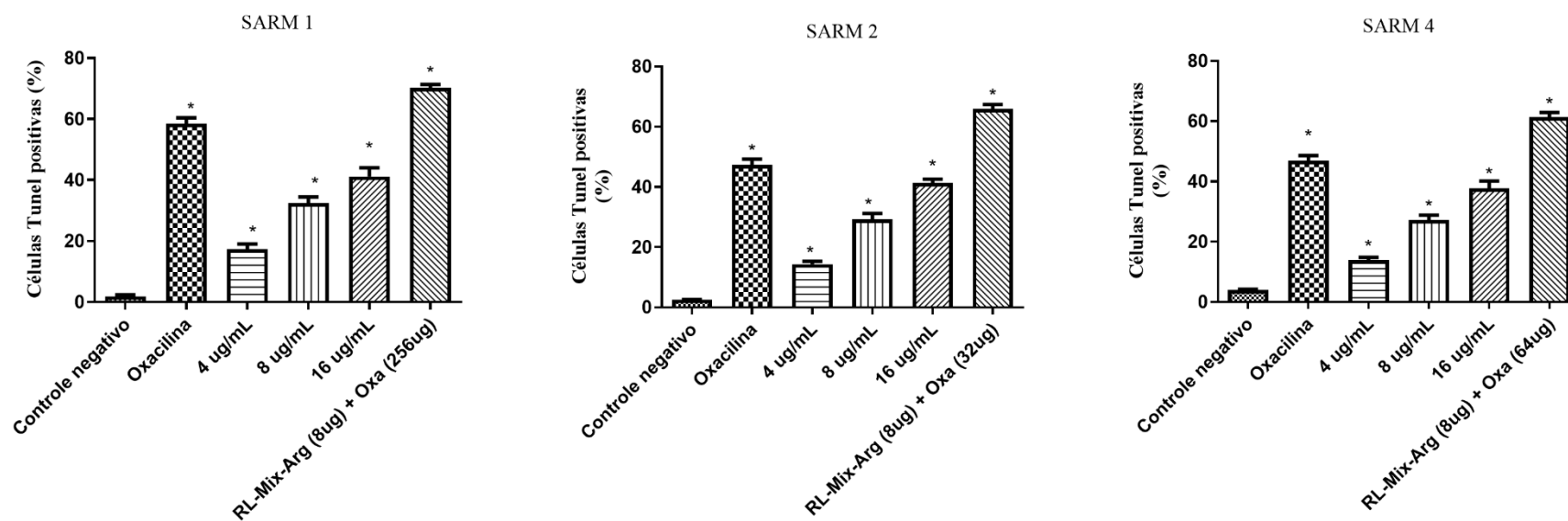
Para SARM 1 observamos: 4 µg/mL (15,39%), 8 µg/mL (30,54%), 16 µg/mL (39,15%). A combinação RLMIX_Arg 8 µg/mL + oxacilina 256 µg/mL aumentou o número de células TUNEL positivas em 68,31%. Para SARM 2: 4 µg/mL (11,72%), 8 µg/mL (26,72%), 16 µg/mL (38,81%). A combinação RLMIX_Arg 8 µg/mL + oxacilina 32 µg/mL aumentou o número de células TUNEL positivas em 63,39%. Para SARM 4: 4 µg/mL (9,82%), 8 µg/mL (23,22%), 16 µg/mL (33,73%). A combinação RLMIX_Arg 8 µg/mL + oxacilina 64 µg/mL aumentou o número de células TUNEL positivas em 57,36%. Para oxacilina observamos os valores de 56,75% (SARM 1), 44,72% (SARM 2) e 42,99% (SARM 4).

Figura 27 - Avaliação dos danos causados por RLMIX_Arg nas membranas de células de SARM após 24 h de tratamento.



* $P < 0.05$ comparado com controle negativo (células sem tratamento).

Figura 28 - Avaliação da fragmentação do DNA causada após tratamento com RLMIX_Arg em células de SARM após 24h de tratamento.



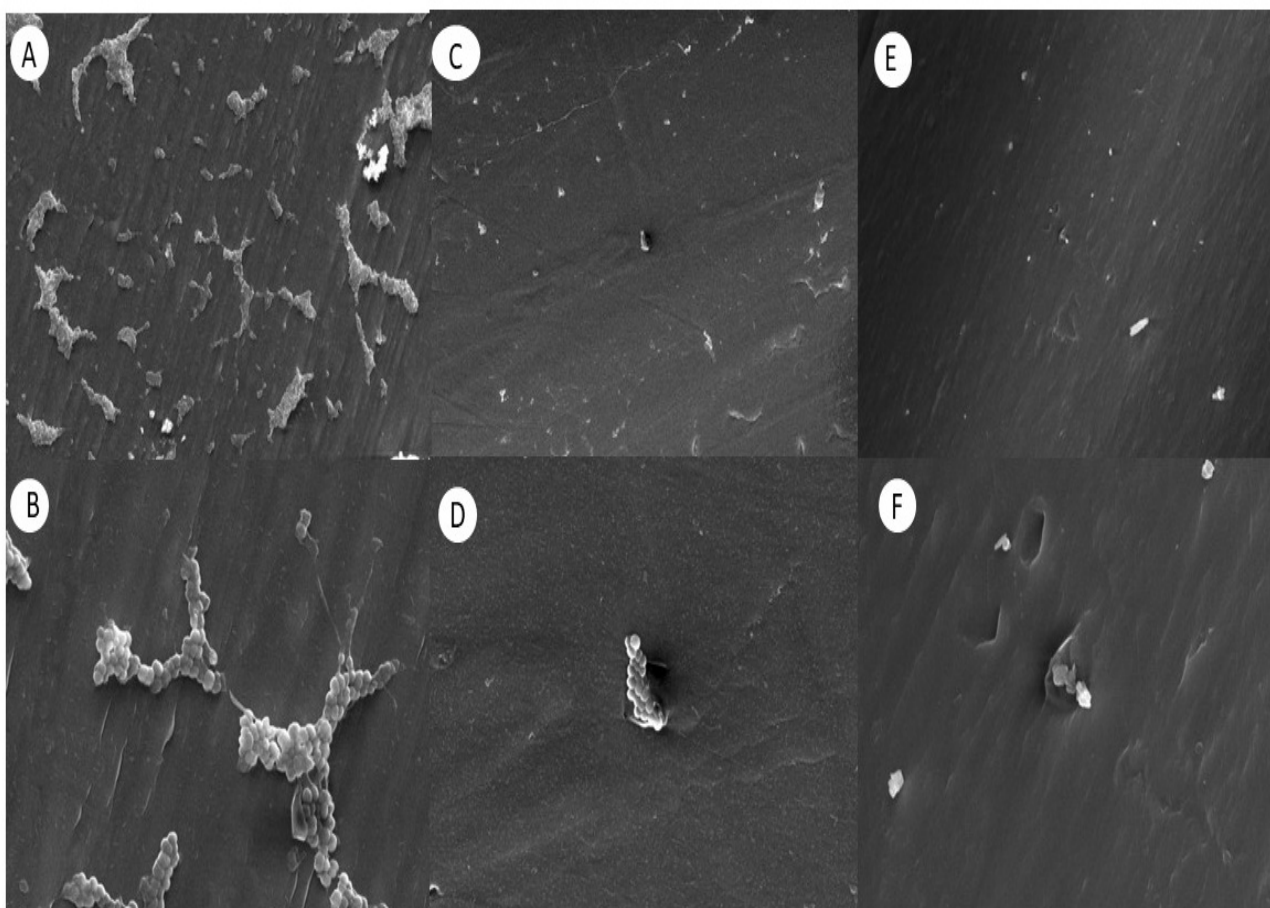
* $P < 0.05$ comparado com controle negativo (células sem tratamento).

6.10 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise por MEV realizada em cateteres submetidos à formação de biofilmes e após tratamento com RLMIX_Arg confirmou a redução celular. Na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$ foram identificados ainda alguns agregados celulares, com danos em seu formato original (Figura 29 C/D). No tratamento com a concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ foi possível observar apenas restos de fragmentos celulares e destruição significativa da matriz exopolimérica (Figura 29 E/F).

No cateter não tratado é possível observar a complexa rede de matriz exopolimérica que une as células, a qual é fundamental para a adesão celular a superfícies (Figura 29 A /B).

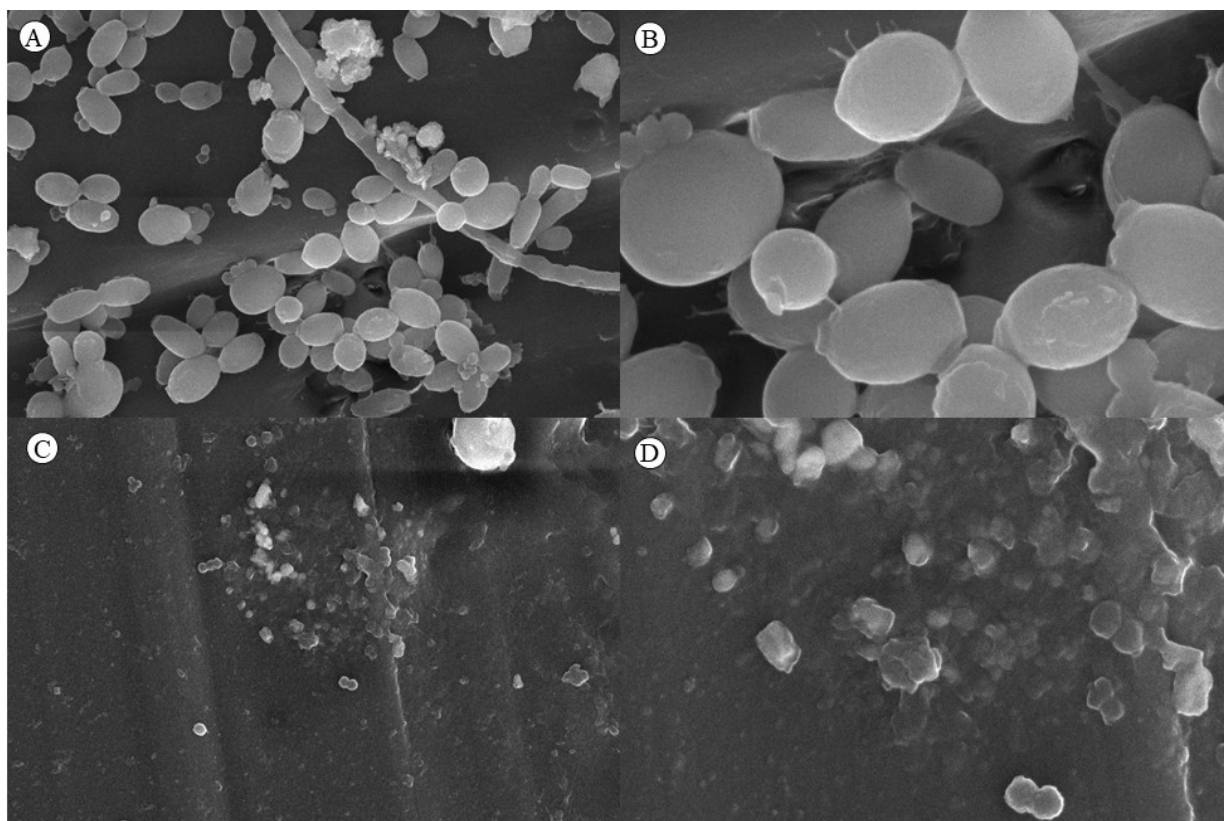
Figura 29 – Avaliação da ação do RLMIX_Arg em biofilmes maduros de SARM formados em CVP após 24h de tratamento por MEV.



A e B- Cateteres sem tratamento (A 2000x; B 10000x). C e D - Cateteres tratados com 8 $\mu\text{g/mL}$ do RLMIX_Arg (C 2000x; D 10000x). E e F - Cateteres tratados com 80 $\mu\text{g/mL}$ do RLMIX_Arg (E 2000x; F 10000x). Barra 10 μm (magnificação de 10000x) e 50 μm (magnificação de 2000x).

A formação do biofilme misto composto por *C. albicans* resistente ao fluconazol e SARM evidenciou-se sobre a superfície do cateter, demonstrando células íntegras com aglomerados celulares de leveduras e células bacterianas aglomeradas em cachos, arranjo ao qual *S. aureus* se dispõe, nos cateteres controles (Figura 30A-B e 31A-B). Para as impregnações realizadas com RLMIX_Arg isolado e gel de RLMIX_Arg, foi visualizada redução no número de células microbianas e presença de dano celular. A Figura 30 C e 30 D mostra o resultado da formação de biofilmes em cateteres impregnados com 10 mg/mL de RLMIX_Arg, de forma que são constatadas evidências de restos celulares e intensa destruição celular.

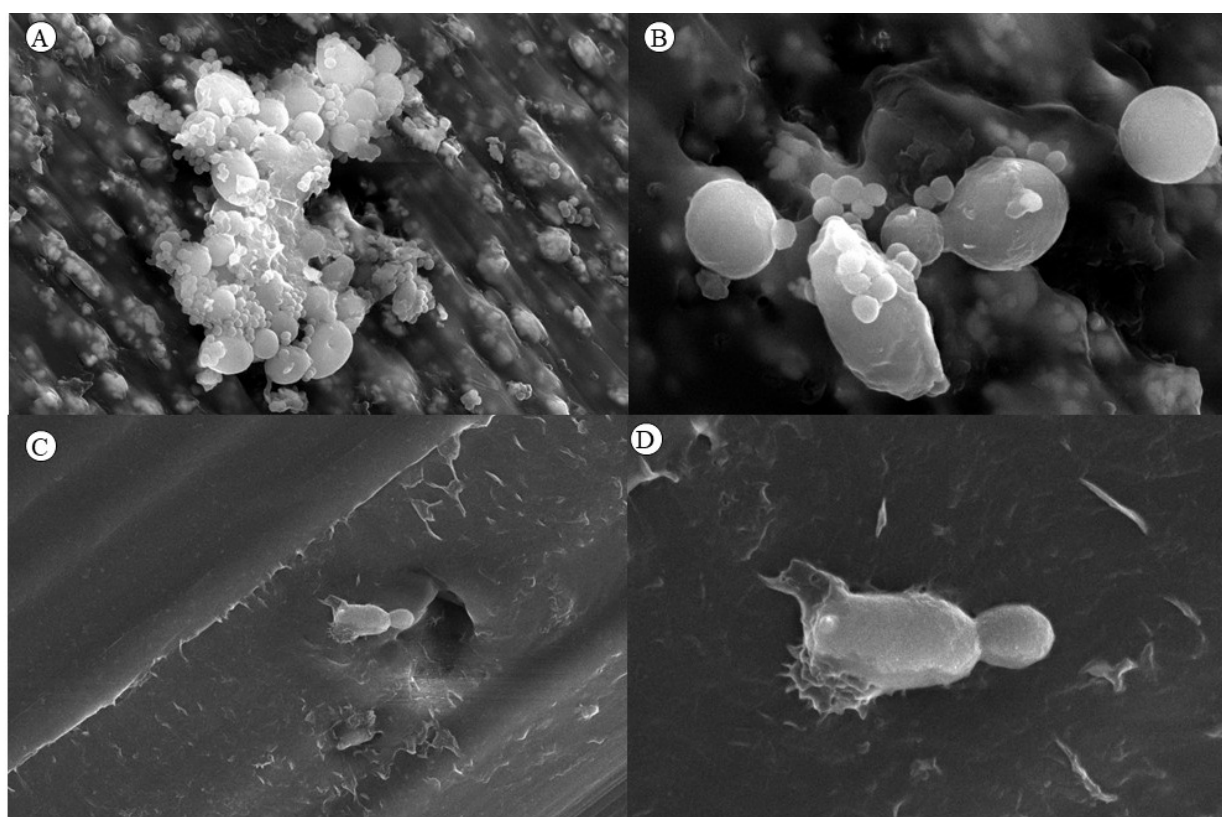
Figura 30 – Avaliação da ação de cateteres impregnados com RLMIX_Arg 10 mg/mL na prevenção da formação de biofilme mistos de SARM e *C. albicans* em cateteres venosos periféricos após 48h de incubação.



A e B - Cateteres controle (A 8000x; B 25000x). C e D - Cateteres impregnados com 10mg/mL (C 8000x; D 25000x). Barra 10 μ m (magnificação de 8000x) e 5 μ m (magnificação de 25000x).

A Figura 31 C e 31 D apresenta o resultado da visualização microscópica dos biofilmes formados em cateter impregnados com gel Pluronic F-127 + RLMIX_Arg. Observa-se também alteração na morfologia de células fúngicas e bacterianas, com diminuição da formação de biofilmes.

Figura 31 – Avaliação da ação de cateteres impregnados com gel de RLMIX_Arg (0.9 µg/ml) na prevenção da formação de biofilme mistos de SARM e *C. albicans* em cateteres venosos periféricos após 48 h de incubação.



A e B – Cateteres controle (A 8000x; B 25000x). C e D - Cateteres impregnado com gel Pluronic F-127 + RLMIX_Arg (0.9 µg/ml) (C 8000x; D 25000x). Barra 10 µm (magnificação de 8000x) e 5 µm (magnificação de 25000x).

7 DISCUSSÃO

Os RL, definidos como uma classe de biossurfactantes produzidos por microrganismos, são caracterizados por duas porções, uma delas é uma ramnose (parte hidrofílica), constituída por moléculas de mono ou di-ramnose que estão conectadas por ligações α 1-2-glicosídicas (Abdel-Mawgoud, Lépine e Déziel, 2010). A outra porção é constituída por ácidos graxos (parte hidrofóbica) com C8-C24 cadeias saturadas/insaturadas. Tendo em vista essas características, sabe-se que os biossurfactantes são capazes de acumular-se nas interfaces e reduzir a tensão superficial entre duas fases de diferentes polaridades (Gudiña *et al.*, 2015).

Além disso, os biossurfactantes têm sido qualificados como agentes terapêuticos em virtude de sua capacidade de: promover a ruptura das membranas celulares, resultando em lise e extravasamento de metabólitos; alterar a conformação de proteínas essenciais para funções de membrana, como transporte e geração de energia e formação de um filme superficial que modifica a molhabilidade e a energia da superfície original, impactando as propriedades de adesão de microrganismos (Sánchez *et al.*, 2010; Satpute *et al.*, 2019). O caráter biodegradável é outro ponto positivo dos biossurfactantes, os quais também apresentam baixa toxicidade (Soberón-Chávez *et al.*, 2021).

Evidenciou-se que o RLMIX_Arg, um RL produzido por *P. aeruginosa*, complexado com o aminoácido arginina, possui propriedade bactericida contra cepas planctônicas de SARM em concentrações que variaram de 4 - 16 $\mu\text{g/mL}$. Nossos dados corroboram com os achados de Ramos da Silva *et al.* (2019), os quais encontraram CIMs de 8 $\mu\text{g/mL}$ para SASM e 32 $\mu\text{g/mL}$ para SARM quando expostos ao RLMIX_Arg. No mesmo estudo observou-se que a mistura de RL, sem a presença da arginina, não apresentou atividade bactericida na maior concentração testada: CIM > 250 $\mu\text{g/mL}$. Samadi *et al.* (2012) encontrou CIM de 50 $\mu\text{g/mL}$, uma concentração menor que a relatada no estudo de Ramos da Silva *et al.* (2019), para uma mistura de mono e di-ramnolipídeos, sem funcionalização com aminoácidos, também produzido por *P. aeruginosa* frente a *S. aureus*. Observa-se que a incorporação do aminoácido arginina aumentou significativamente a ação antimicrobiana, pois em nosso estudo demonstramos que a CIM diminui cerca de 84% se comparada com os resultados de Samadi *et al.* (2012).

Na literatura são relatadas outras formas de exploração da ação antibacteriana dos RL. Malakar *et al.* (2021), por exemplo, utilizou nanopartículas de óxido de zinco revestidas com um RL também produzido por *P. aeruginosa*, obtendo resultados de CIM de 500 $\mu\text{g/mL}$ para o RL sozinho e de 250 $\mu\text{g/mL}$ quando o RL foi revestido com óxido de zinco para SASM. Observa-se que valores de CIM encontradas em nosso estudo são significativamente menores.

Tantawy *et al.* (2018) sintetizaram moléculas de surfactantes catiônicos através da complexação de ácidos graxos com grupamentos aminas derivados de N,N-dimetil-1,3-propanodiamina. Todos os surfactantes catiônicos apresentaram uma alta atividade antimicrobiana contra a maioria dos microrganismos testados, em que as moléculas sintetizadas mostraram zonas de inibição de diâmetro de 13-27 mm para cepas de *S. aureus*. Outro estudo conduzido por De Freitas Ferreira, Vieira e Nitschke (2019) mostrou a atividade antimicrobiana de um RL obtido comercialmente contra os microrganismos *Bacillus cereus* (CIM = 19,5 µg/mL) e *Listeria monocytogenes* (156,2 µg/mL), com CBM de 39,1 µg/mL e 312,5 µg/mL, respectivamente. Nesse estudo, o crescimento de *S. aureus* não foi completamente inibido (sem CIM), porém a densidade óptica foi reduzida em 57% quando comparada ao controle.

Além da arginina, o uso de outros aminoácidos catiônicos complexados a surfactantes também é relatado na literatura. Colomer *et al.* (2011) sintetizou diferentes composições moleculares de surfactantes complexados com o aminoácido lisina, o qual possui dois grupos amino de diferentes valores de pKa/basicidade. Nesse estudo foram observadas CIMs entre 125 µg/mL e 250 µg/mL para SASM, mostrando ainda que eficácia antimicrobiana e potencial hemolítico dependem da densidade de carga, do tipo de aminoácido na região polar e da localização da carga positiva na molécula. Diante do exposto, a complexação com aminoácidos catiônicos torna-se uma estratégia interessante para diminuição dos valores de CIM e da toxicidade das moléculas (Ramos da Silva *et al.*, 2019).

Todas as cepas de bactérias Gram-negativas testadas, *E. coli* e *K. pneumoniae*, não mostraram inibição de crescimento por RLMIX_Arg nas faixas de concentrações testadas, confirmando os achados de Ramos da Silva *et al.* (2019), os quais relataram CIM > 250 µg/mL para o composto. Outro estudo encontrou CIM > 1000 µg/mL para cepas de *E. coli* 683/693 para um RL vendido comercialmente (Chlumsky *et al.*, 2021). Shen *et al.* (2020) também não encontrou CIM para *E. coli* e *P. aeruginosa* em concentrações de até 10 mg/mL de um RL, assim como Silva *et al.* (2022) encontrou CIM > 500µM (maior concentração testada) para surfactantes catiônicos derivados de serina frente a cepas de *E. coli*. Esses dados corroboram com os achados do nosso estudo, o qual também não encontrou efeito inibitório do RLMIX_Arg sobre células de bactérias Gram-negativas.

A classificação das bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas baseia-se nas diferenças estruturais de suas paredes celulares. As Gram-positivas exibem uma espessa camada de peptidoglicano (~30 nm) rica em polissacarídeos e ácidos teicóicos, enquanto as Gram-negativas possuem uma camada mais fina (~10 nm) recoberta por uma membrana externa complexa, contendo proteínas e fosfolipídeos (Araújo *et al.*, 2010). Apesar da presença de

cargas negativas na superfície das bactérias Gram-negativas, a baixa densidade de cargas pode explicar a fraca interação e, consequentemente, a ação reduzida dos surfactantes catiônicos nessas bactérias (Pinazo *et al.*, 2016). Evidências também sugerem que bactérias Gram-negativas são muito mais difíceis de tratar em comparação com os patógenos bacterianos Gram-positivos devido a presença de membrana externa adicional, suas bombas de efluxo e outros mecanismos de resistência (Hajipour *et al.*, 2012; Saxena *et al.*, 2023).

Com relação ao sinergismo, observamos queda das CIM quando o RLMIX_Arg é utilizado concomitantemente com a oxacilina. Nossos resultados corroboram com os achados de Samadi *et al.* (2012), o qual utilizando uma mistura de RL e oxacilina obtiveram 42,8% de sinergismo e 57,2% de relação sinérgica parcial. Sabe-se que os surfactantes se intercalam nas membranas das células-alvo, prejudicando a homeostase celular, com consequente aumento da permeabilidade na membrana, dessa forma, o efeito da oxacilina seria maximizado, pois haveria maior facilidade a droga penetrar nas paredes bacterianas (Otzen, 2017).

Um estudo de Radlinski *et al.* (2019) utilizando concentrações de 30 µg/mL e 40 µg/mL de uma mistura de mono e di-RL adicionadas de 58 µg/mL do aminoglicosídeo tobramicina foram capazes de erradicar cerca de 99.9% das células planctônicas de *S. aureus*. O acentuado sinergismo observado pode ser atribuído a perda de integridade da membrana bacteriana provocada pelo RL com aumento da penetração da tobramicina, a qual se liga a subunidade 30S do ribossomo prejudicando a síntese proteínas.

O mesmo estudo não demonstrou uma relação sinérgica significativa quando utilizadas oxacilina e a mesma mistura de RL. A adição do aminoácido arginina, com sua carga catiônica, à mistura de RL pode explicar essa diferença de achados. A arginina, um composto básico e de caráter catiônico, interage fortemente com as moléculas carregadas negativamente da membrana bacteriana (ácido lipotecóico/Gram positivas), aumentando a permeabilidade da membrana, favorecendo a liberação de íons celulares (Alalaiwe *et al.*, 2018). Consequentemente, há potencialização da ação do biosurfactante, assim como favorecimento da entrada da oxacilina nas células, aumentando sua concentração no local de ação (Patrone *et al.*, 2010; Pinazo *et al.*, 2016; Serpa Sampaio Moreno *et al.*, 2021).

Existem poucos relatos em relação ao sinergismo de biosurfactantes com a vancomicina. Faqri, Hayder e Hashim (2019) relataram sinergismo em cepas de *S. aureus* utilizando disco de vancomicina (30 µg/mL) combinados com 250 µg/mL de mono-RL, porém apenas uma cepa foi testada. A estrutura cíclica e complexa da vancomicina pode ser uma das razões pelas quais verificou-se a prevalência de relações aditivas e antagônicas no presente estudo (Williams, D. H., 1984).

Verificou-se que o RLMIX_Arg afeta a fase inicial de formação do biofilme microbiano em placas de poliestireno de forma concentração dependente. Assim como possui uma boa atividade de dispersão das células de SARM em biofilmes maduros nas concentrações de 64 µg/mL e 80 µg/mL. Serpa Sampaio Moreno *et al.* (2021) sintetizaram surfactantes tendo como base aminoácidos catiônicos com cabeças polares compostas por pares de aminoácidos: arginina-fenilalanina e arginina-triptofano, os quais mostraram uma propriedade de dispersão de biofilmes maduros de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol na concentração de 81,2 µg/mL, próxima a encontrada em nosso estudo.

Sabarinathan *et al.* (2021) demonstraram que 100 µg/mL de um RL obtido de cepas de *P. plecoglossicida* BP03 foi capaz de inibir a formação do biofilme de *S. aureus* em 83,5% em placas. Shen *et al.* (2020) também mostraram que um RL obtido comercialmente foi capaz de desagregar em cerca de 30% o biofilme maduro de *S. aureus* na concentração de 5000 µg/mL com atividade antibiofilme (fase inicial de formação do biofilme) na concentração de 310 µg/mL. Em nosso estudo, uma concentração menor, 80 µg/mL, foi capaz de inibir a formação do biofilme em mais de 90%.

Diferentemente do caso com bactérias planctônicas, os antibióticos convencionais são menos eficazes no tratamento de bactérias em biofilmes devido à resistência a penetração, porém observamos que o RLMIX_Arg consegue erradicar de forma eficiente as células do biofilme. O DNA extracelular desempenha um papel fundamental na produção de biofilme, atuando como um quelante de moléculas catiônicas, de forma que a incorporação da arginina pode aumentar a afinidade do RL com essas moléculas, favorecendo a desintegração dos biofilmes (Alalaiwe *et al.*, 2018; Baelo *et al.*, 2015). Observou-se também que em 12h e 24 h de tratamento o RLMIX_Arg ainda permanece com boa atividade tanto sobre biofilmes maduros quanto em biofilmes na fase inicial de formação.

Os ramnolipídios são secretados por *P. aeruginosa* e desempenham um papel dual na formação de biofilme: inicialmente, promovem a motilidade e inibem a fixação, enquanto mantêm canais para água e oxigênio (Banat, Rienzo e Quinn, 2014). No entanto, em biofilmes estabelecidos, a adição externa de ramnolipídios pode levar à degradação da matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e à destruição de microcolônias. Essa ação é mediada pela alteração do ambiente do biofilme devido às propriedades de superfície ativa dos ramnolipídios, bem como pela modificação das propriedades de carga (Diaz De Rienzo *et al.*, 2016). Esse mecanismo de ação amplo e não específico também pode reduzir a probabilidade das bactérias desenvolverem resistência por meio de mutações espontâneas (Ceresa *et al.*, 2023).

A adesão das células a placas de poliestireno também foi prejudicada após tratamento da placa com RLMIX_Arg por 24 h, porém cada cepa apresentou um padrão de inibição diferente, inversamente proporcional à concentração do RLMIX_Arg. Um estudo de Zezzi do Valle Gomes e Nitschke (2012) mostrou que a adesão de *S. aureus* em placas de poliestireno foi reduzida em 67.8% quando as placas foram pré-tratadas com um RL na concentração de 1% (w/v). Sabe-se que um dos principais fatores envolvidos na adesão microbiana é a redução da hidrofobicidade da superfície (Shao *et al.*, 2017). Sendo assim, pode-se supor que, após o tratamento com o RLMIX_Arg, em concentrações subinibitórias há uma redução na hidrofobicidade da superfície de poliestireno, prejudicando a adesão das células bacterianas.

Observou-se também que concentrações subinibitórias, 1 µg/mL e 2 µg/mL, são capazes de diminuir a primeira fase de formação do biofilme, com a adesão em placas de poliestireno reduzindo em até 49%. Outro estudo investigou a ação antibiofilme de uma mistura de mono e di-RL produzidas por *P. aeruginosa* M15 e verificou que em concentrações de 6,25 µg/mL houve redução de cerca de 70% da adesão das células de SASM a placas de poliestireno. Para células de SARM verificou-se que na concentração de 6,25 µg/mL (¼ CIM) houve redução da adesão de 25%, e na concentração de 12,5 µg/mL (1/2 CIM) houve cerca de 80% de inibição da adesão (Buonocore *et al.*, 2023). Para biofilmes pré-formados (maduros) o mesmo estudo citado acima observou que após 72h o RL manteve atividade contra SASM, com 60% de degradação de 25 µg/mL a 100 µg/mL e 50% a 12,5 µg/mL (CIM). Menor atividade foi registrada contra a cepa SARM, com 50% de degradação a 50 µg/mL e 100 µg/mL, e 35% de atividade a 25 µg/mL (CIM).

Avaliou-se, também, a eficácia do complexo RLMIX_Arg contra biofilmes polimicrobianos pré-formados, constituídos por *C. albicans* resistente ao fluconazol e MRSA. Observou-se uma redução de até 81,8% na viabilidade celular na combinação de *C. albicans* e SARM (2:2), utilizando 16 vezes a concentração inibitória mínima (CIM), equivalente a 112 µg/mL. Esses achados corroboram dados da literatura que demonstram o potencial dos ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* como agentes antiadesivos e dispersantes eficazes contra biofilmes fúngicos e bacterianos já estabelecidos. A incorporação de ramnolipídios em revestimentos de superfícies tem sido sugerida como estratégia promissora para prevenir a fixação inicial de fungos e bactérias (Abdel-Mawgoud, Lépine e Déziel, 2010; Nickzad e Déziel, 2014)

Sabe-se que a associação confere vantagens a ambos os microrganismos, resultando em efeitos prejudiciais ao hospedeiro, no entanto, foi apenas recentemente que o principal promotor de letalidade e seu mecanismo de ativação foram identificados. Estudos mostram que

o catabolismo da ribose por *C. albicans*, resultando na alcalinização do meio extracelular, induz a ativação do sistema *agr* de *S. aureus* (Arévalo-James e Torrents, 2024). Apesar do mecanismo preciso que desencadeia a ativação do sistema *agr* ainda não estar totalmente elucidado, seu efeito final é a produção de α -toxina, molécula efetora capaz de induzir danos à membrana celular, liberação de eicosanoides, ruptura de junções intercelulares, agregação plaquetária e disfunção hemostática. Esses eventos culminam na disfunção orgânica e, eventualmente, na falência de múltiplos órgãos (Paul *et al.*, 2024).

Estudo complementar conduzido por Tambone *et al.* (2021) demonstrou a eficácia de um biossurfactante derivado de ramnolipídios (R89BS) aplicado ao revestimento de discos de titânio para inibir a formação de biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. aureus*, observando inibição superior a 90% em 24 horas. Similarmente Ceresa *et al.* (2019) investigaram o efeito inibitório de três biossurfactantes (lipopeptídeo (AC7BS), ramnolipídio (R89BS) e soforolipídio (SL18) contra biofilmes mistos de *C. albicans*–*S. aureus* e *C. albicans*–*S. epidermidis*. Todos os biossurfactantes avaliados apresentaram efetiva atividade inibitória contra a formação desses biofilmes, evidenciada pela redução da biomassa, atividade metabólica, alteração da arquitetura microestrutural e diminuição da viabilidade celular, por até 72 horas, em placas de poliestireno e discos de silicone.

O RLMIX_Arg afetou a fase inicial de formação de biofilme de SARM em CVP de forma concentração dependente, em que 80 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de eliminar 99.9% das células. Sodagari *et al.* (2013) identificou em seus estudos que uma mistura de mono e di-RL (Delia, AB, Canadá) nas concentrações de 10 a 200 mg/L é capaz de prejudicar a adesão de diversos microrganismos Gram negativos (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e Gram positivos (*B. subtilis* e *S. epidermidis*) a superfícies de vidro.

Rodrigues *et al.* (2004) estudou as propriedades antiaderentes de um biossurfactante, o qual mostrou reduzir a adesão inicial de *S. aureus* em próteses vocais em até 86%. Há uma redução de 85% na adesão de *S. aureus* em discos elastoméricos de silicone incubados concomitantemente com uma mistura de mono e di-RL (R89BS) produzidos por *P. aeruginosa* após 72 h, assim como uma diminuição da atividade metabólica das células de 68-89% em concentrações entre 0.12 - 2 mg/mL (Allegrone *et al.*, 2021). Esses dados corroboram com os demonstrados no presente estudo, os quais apontam que CVP incubados com RLMIX_Arg na concentração de 4 mg/mL diminuem a adesão de células bacterianas (23%), consequentemente, diminuindo a formação de biofilmes. Além disso mostrou a ação frente biofilmes de SARM, fato pouco relatado na literatura.

Os biossurfactantes podem afetar as interações entre microrganismos e superfícies por meio de vários modos de ação, entre eles a modificação das propriedades físico-químicas, como por exemplo, carga de superfície e hidrofobicidade, o que reduz a adesão microbiana (Janek *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021). O RLMIX_Arg demonstrou prejudicar a formação de biofilmes de SARM como também potencial para desagregação do biofilme maduro em CVP. E Silva *et al.* (2017) demonstrou que um RL obtido comercialmente (147858–26–2) é capaz de remover 88.9% do biofilme formado por SASM em placas, tendo o leite como fonte de carboidrato, e 35% quando utilizado um meio nutriente convencional.

Com relação às análises dos cateteres impregnados com RLMIX_Arg e seu gel frente a biofilmes polimicrobianos formados por SARM e *C. albicans*, foi demonstrado o efeito preventivo sobre os cateteres, assim como foi verificado que, mesmo após 28 dias de armazenamento, os compostos ainda preservam sua atividade antibiofilmes. Dardouri *et al.* (2022) analisou a impregnação de superfícies de polidimetilsiloxano (PDMS) com uma mistura de mono e di-RL (5 mg, 0.008 mmol) obtidos comercialmente. Foi observado uma redução de log nas UFC/mL de 4,20 (99,99%) para adesão de células de SASM nessa superfície, bem como quando analisado a formação de biofilmes mistos de *C. albicans* e SASM houve redução de 1,69 log (97,95%).

De acordo com Sidrim *et al.* (2019) cateteres tratados com antimicrobianos para prevenção da colonização microbiana é uma estratégia interessante para redução da formação de biofilmes, entretanto podem ter sua eficácia reduzida contra patógenos resistentes e durabilidade limitada da atividade antimicrobiana (Mansouri *et al.*, 2013). Sendo assim, tanto os cateteres impregnados com RLMIX_Arg isolado como incorporado ao gel de Pluronic-F127 demonstraram boa atividade contra patógenos resistentes, mesmo após 28 dias de armazenamento.

O gel contendo RLMIX_Arg exibiu atividade antibiofilme comparável à do biossurfactante isolado, porém em concentrações aproximadamente 1000 vezes menores. Considerando que a microbiota cutânea promove o desenvolvimento de comunidades microbianas, especialmente na forma de biofilmes, em áreas de pele com integridade comprometida, ressalta-se a importância para o desenvolvimento de novas estratégias alternativas para a prevenção da formação de biofilmes em dispositivos médicos implantados. Alvarado-Gomez *et al.* (2018) também demonstraram a efetividade de nanopartículas de prata estabilizadas em Pluronic F-127 (um veículo biocompatível) na inibição da formação de biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa* em apenas 30 minutos, utilizando 250 ppm do gel, apresentando também ausência de citotoxicidade em até 4 horas.

A aplicação de Pluronic F-127 em formulações para o combate a biofilmes mistos também é mencionada na literatura. Estudos demonstram a eficácia desse polímero na encapsulação de curcumina durante a terapia fotodinâmica antimicrobiana. Esse tratamento se mostrou eficiente no controle de biofilmes mistos compostos por *Streptococcus mutans* e *C. albicans* (dos Santos *et al.*, 2022). O Pluronic F-127 é um surfactante não iônico composto de copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, sendo um exemplo de gel termorreversível, cuja capacidade de sofrer transições de estado físico em resposta à temperatura tem possibilitado seu uso como veículo em diversas vias de administração, incluindo oral, tópica e intranasal (Agrawal *et al.*, 2018; Riess, 2003).

Nos últimos anos, o Pluronic F-127 tem despertado particular interesse no desenvolvimento de sistemas de liberação dérmica e transdérmica. Suas propriedades permitem modular a permeação de fármacos através da pele. Em formulações tópicas, busca-se a deposição cutânea com mínima penetração sistêmica (Alvarado-Gomez *et al.*, 2018; Escobar-Chávez *et al.*, 2006). No caso do presente estudo, foi utilizada uma nova abordagem, no qual o gel foi utilizado para impregnar os CVP com a finalidade de aumentar a ação do RLMIX_Arg.

A atividade antibiofilme dos RL contra uma variedade de microrganismos já foi relatada, porém o mecanismo de ação não foi totalmente elucidado (Thakur *et al.*, 2021). De acordo com Nickzad e Déziel (2014), os RL interagem com estruturas presentes na superfície celular, como lipopolissacarídeos, proteínas e fosfolipídeos, resultando em mudança na hidrofobicidade celular e consequente diminuição da adesão a superfícies. Dessa forma, os biossurfactantes possuem potencial para retardar o desenvolvimento de biofilmes de *S. aureus* em cateteres, assim como em outros materiais médicos, diminuindo o uso de antibióticos de largo espectro e a evolução da resistência microbiana (Rodrigues *et al.*, 2006).

Com relação aos possíveis mecanismos de ação em células planctônicas, foi observado que o RLMIX_Arg possivelmente causa rupturas na membrana das células de SARM de forma concentração dependente. Tais dados complementam os achados de outros estudos, os quais demonstram que o principal mecanismo de ação dos RL é a ruptura da parede celular (Allegrone *et al.*, 2021; Bjerk *et al.*, 2021). Esses dados também confirmam o sinergismo do RLMIX_Arg com oxacilina observados nos testes de *checkboard in vitro*. Outro ponto observado foi um aumento da fragmentação do DNA celular. A presença de grupos básicos, como a arginina, pode favorecer o aumento da interação da molécula de RL com o DNA, devido à presença de cargas positivas (Bera, Zhanel e Schweizer, 2010; Serpa Sampaio Moreno *et al.*, 2021).

Sendo assim, sugere-se que há a ocorrência dos eventos concomitantes: prejuízo de integridade da membrana e fragmentação do DNA, com consequente perda da homeostase e

morte celular. De acordo com Pérez *et al.* (2020) e Tantawy *et al.* (2018), os surfactantes catiônicos podem lisar a membrana celular, afetando gravemente a integridade da célula bacteriana. Primeiramente, o monômero de surfactante é adsorvido à membrana e então penetra na estrutura, levando à alternância na permeabilidade da membrana e prejudicando o equilíbrio osmótico.

Com relação a citotoxicidade, Da Silva *et al.* (2020) mostrou que a viabilidade de células de mamíferos (L929) não é prejudicada em concentrações de 25 µg/mL do RLMIX_Arg, sendo a toxicidade uma das características fundamentais para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial terapêutico. A análise utilizando MEV confirmou o potencial desagregativo do RLMIX_Arg em biofilmes de SARM em CVP, de forma que há uma destruição visível da matriz extracelular após o tratamento com 80 µg/mL, assim como o efeito sobre biofilmes polimicrobianos após a impregnação de cateteres tanto com o RLMIX_Arg isolado como na formulação em gel. O efeito na morfologia de microrganismos causados por ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* é reconhecido na literatura, a exemplo do estudo de Singh, Patil e Rale (2019), no qual o MEV exibiu uma interrupção na densa rede de células de *Candida*, tubo germinativo, hifas e pseudo-hifas, envolvidas na matriz exopolissacarídica no biofilme pré-formado de *C. albicans* tratado com o biossurfactante RL-2 na concentração de 5 mg/mL.

Dessa forma o RLMIX_Arg mostra-se como uma alternativa eficiente dentro do contexto das novas estratégias terapêuticas, podendo ser utilizado possivelmente tanto para erradicação de biofilmes de SARM isolados e associado a *C. albicans*, como para evitar que essas comunidades se formem em matrizes abióticas, como cateteres.

8 CONCLUSÃO

Os resultados da presente pesquisa demonstraram que o RLMIX_Arg, produzido por *P. aeruginosa* e complexado com o aminoácido arginina, apresenta um notável potencial antimicrobiano contra SARM, tanto na forma planctônica como em biofilmes formados em placas de poliestireno e em CVP. Acrescenta-se a esse fato a ação do RLMIX_Arg também sobre biofilmes mistos de SARM e *C. albicans*. Esses resultados fornecem evidências robustas de que a introdução de um grupo catiônico na estrutura do biossurfactante se configura como uma estratégia promissora para aumentar a atividade antimicrobiana da molécula sem comprometer sua segurança, ou seja, sem aumentar a toxicidade.

A pesquisa demonstrou que o RLMIX_Arg é capaz de interferir em diferentes estágios da formação de biofilmes, atuando tanto na desintegração de biofilmes já estabelecidos em cateteres e placas quanto na redução da adesão bacteriana, impedindo a formação inicial do biofilme. Cateteres impregnados com RLMIX_Arg isolado e com RLMIX_Arg incorporado a gel de Pluronic F-127 também apresentaram diminuição da adesão de células bacterianas em sua estrutura em comparação com o controle, assim como excelente estabilidade e manutenção de atividade microbiana após 28 dias de armazenamento, representando uma possível alternativa a ser explorada no contexto das infecções relacionadas a assistência à saúde.

O estudo indica que o principal mecanismo de ação do RLMIX_Arg envolve a ruptura das membranas celulares bacterianas e a fragmentação do DNA, processos que são potencializados pela presença do aminoácido arginina. A compreensão da dinâmica e do potencial dos RL se torna crucial para o desenvolvimento de novas aplicações para essas moléculas na indústria farmacêutica, com foco no combate à resistência bacteriana e na prevenção de infecções.

Nosso estudo apresenta também algumas limitações como quantidade de cepas utilizadas para os testes de biofilmes e utilização exclusiva de testes *in vitro*, de forma que o comportamento das cepas clínicas de SARM também pode variar frente aos diferentes tratamentos devido, por exemplo, a aquisição de genes de resistência ou outras características moleculares individuais.

Neste contexto, as perspectivas futuras apontam para o desenvolvimento e a aplicação de formulações contendo RLMIX_Arg como uma estratégia promissora para a prevenção da formação de biofilmes de SARM em dispositivos médicos, como cateteres, próteses e implantes. Sendo assim, nossos resultados contribuem para a busca constante por novas alternativas terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1323–1336, 2010.
- ADAMU, Y.; PUIG-ASENSIO, M.; DABO, B.; SCHWEIZER, M. L. Comparative effectiveness of daptomycin versus vancomycin among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bloodstream infections: A systematic literature review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 19, n. 2 February, p. 1–20, 2024.
- AGARWALLA, S. V.; ELLEPOLA, K.; SOROKIN, V.; IHSAN, M.; SILIKAS, N.; NETO, A. C.; SENEVIRATNE, C. J.; ROSA, V. Antimicrobial-free graphene nanocoating decreases fungal yeast-to-hyphal switching and maturation of cross-kingdom biofilms containing clinical and antibiotic-resistant bacteria. **Biomaterials and Biosystems**, v. 8, n. April, p. 100069, 2022.
- AGRAWAL, M.; SARAF, SWARNLATA; SARAF, SHAILENDRA; ANTIMISIARIS, S. G.; CHOUGULE, M. B.; SHOYELE, S. A.; ALEXANDER, A. Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 281, n. April, p. 139–177, 2018.
- AGUILAR, G.; SWETSCHINSKI, L.; WEAVER, N.; IKUTA, K.; MESTROVIC, T.; GRAY, A.; CHUNG, E.; WOOL, E.; HAN, C.; HAYOON, A.; ARAKI, D.; ABDOLLAHI, A.; ABU-ZAID, A.; ADNAN, M.; AGARWAL, R.; DEHKORDI, J.; ARAVKIN, A.; AREDA, D.; AZZAM, A.; BEREZIN, E.; BHAGAVATHULA, A.; BHUTTA, Z.; BHUYAN, S.; BROWNE, A.; CASTAÑEDA-ORJUELA, C.; CHANDRASEKAR, E.; CHING, P.; DAI, X.; DARMSTADT, G.; DE LA HOZ, F.; DIAO, N.; DIAZ, D.; MOMBAQUE DOS SANTOS, W.; EYRE, D.; GARCIA, C.; HAINES-WOODHOUSE, G.; HASSEN, M.; HENRY, N.; HOPKINS, S.; HOSSAIN, M.; IREGBU, K.; IWU, C.; JACOBS, J.; JANKO, M.; JONES, R.; KARAYE, I.; KHALIL, I.; KHAN, I.; KHAN, T.; KHUBCHANDANI, J.; KHUSUWAN, S.; KISA, A.; KOYA-WEDA, G.; KRAPP, F.; KUMARAN, E.; KYU, H.; LIM, S.; LIU, X.; LUBY, S.; MAHARAJ, S.; MARONGA, C.; MARTORELL, M.; MAY, J.; MCMANIGAL, B.; MOKDAD, A.; MOORE, C.; MOSTAFAVI, E.; MURILLO-ZAMORA, E.; MUSSI-PINHATA, M.; NANAVATI, R.; NASSERELDINE, H.; NATTO, Z.; QAMAR, F.; NUÑEZ-SAMUDIO, V.; OCHOA, T.; OJO-AKOSILE, T.; OLAGUNJU, A.; OLIVAS-MARTINEZ, A.; ORTIZ-BRIZUELA, E.; OUNCHANUM, P.; PAREDES, J.; PATTHIPATI, V.; PAWAR, S.; PEREIRA, M.; POLLARD, A.; PONCE-DE-LEON, A.; SADY PRATES, E.; QATTEA, I.; REYES, L.; ROILIDES, E.; ROSENTHAL, V.; RUDD, K.; SANGCHAN, W.; SEEKEAW,

S.; SEYLANI, A.; SHABABI, N.; SHAM, S.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; SINGH, H.; STERGACHIS, A.; TASAK, N.; TAT, N.; THAIPRAKONG, A.; VALDEZ, P.; YADA, D.; YUNUSA, I.; ZASTROZHIN, M.; HAY. The burden of antimicrobial resistance in the Americas in 2019: a cross-country systematic analysis. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 25, p. 1–16, 2023.

AHMED S.; FAREEQ A.; SAFIN HUSSEIN B.; KOCHR ALI MAHMOOD F.; KARZAN QURBANI B.; RADHWAN HUSSEIN I.; MOHAMED M. Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. **Journal of Medicine, Surgery, and Public Health** , v. 2 , n . 100081, 2024

ALALAIWE, A.; WANG, P.-W.; LU, P.-L.; CHEN, Y.-P.; FANG, J.-Y.; YANG, S.-C. Synergistic Anti-MRSA Activity of Cationic Nanostructured Lipid Carriers in Combination With Oxacillin for Cutaneous Application. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 4 jul. 2018.

ALARJANI, K. M.; SKALICKY, M. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* and its *in-vitro* potential inhibition efficiency. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 12, p. 1796–1801, 1 dez. 2021.

ALEKSIC, I.; PETKOVIC, M.; JOVANOVIĆ, M.; MILIVOJEVIĆ, D.; VASILJEVIĆ, B.; NIKODINOVIC-RUNIC, J.; SENEROVIC, L. Anti-biofilm properties of bacterial di-rhamnolipids and their semi-synthetic amide derivatives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, 8 dez. 2017.

ALENCAR DE BARROS, K. M.; SARDI, J. DE C. O.; MARIA-NETO, S.; MACEDO, A. J.; RAMALHO, S. R.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, D. G.; PONTES, G. S.; WEBER, S. S.; RAMALHO DE OLIVEIRA, C. F.; MACEDO, M. L. R. A new Kunitz trypsin inhibitor from *Erythrina poeppigiana* exhibits antimicrobial and antibiofilm properties against bacteria. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 144, n. October, 2021.

ALI ALGHAMDI, B.; AL-JOHANI, I.; AL-SHAMRANI, J. M.; MUSAMED ALSHAMRANI, H.; AL-OTAIBI, B. G.; ALMAZMOMI, K.; YUSNORAINI YUSOF, N. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 30, n. 4, p. 103604, 2023.

ALLEGRONE, G.; CERESA, C.; RINALDI, M.; FRACCHIA, L. Diverse effects of natural and synthetic surfactants on the inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2021.

ALOTAIBI, N. H.; BARRI, A.; ELAHI, M. A. Length of Stay in Patients With Central Line-Associated Bloodstream Infection at a Tertiary Hospital in the Kingdom of Saudi Arabia. **Cureus**, v. 12, n. 10, p. e10820, 2020.

- ALVARADO-GOMEZ, E.; MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G.; SANCHEZ-SANCHEZ, R.; GANEM-RONDERO, A.; YACAMAN, M. J.; MARTINEZ-GUTIERREZ, F. Evaluation of anti-biofilm and cytotoxic effect of a gel formulation with Pluronic F-127 and silver nanoparticles as a potential treatment for skin wounds. **Materials Science and Engineering C**, v. 92, p. 621–630, 2018.
- VALENTE SÁ, L. G. A.; ROCHA DA SILVA, C.; ANDRADE NETO, J. B.; AIRES DO NASCIMENTO, F. B. S.; DIAS BARROSO, F. D.; JUVÊNCIO DA SILVA, L.; PESSOA DE FARIAS CABRAL, V.; DIAS BARBOSA, A.; SILVA, J.; SILVA MARINHO, E.; ODORICO DE MORAES, M.; FRANÇA RIOS, M. E.; COELHO CAVALCANTI, B.; PAMPOLHA LIMA, I. S.; NOBRE JÚNIOR, H. V.. Antifungal activity of etomidate against growing biofilms of fluconazole-resistant *Candida* spp. strains, binding to mannoproteins and molecular docking with the ALS3 protein. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 1221–1227, 2020.
- ARAÚJO, E. A.; ANDRADE, N. J. DE; CARVALHO, A. F. DE; RAMOS, A. M.; SÁ SILVA, C. A. DE; SILVA, L. H. M. DA. Colloidal aspects of bacterial adhesion. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1940–1948, 2010.
- ARÉVALO-JAMES, B.; TORRENTS, E. *Candida albicans* enhances *Staphylococcus aureus* virulence by progressive generation of new phenotypes. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 7, n. November, p. 100316, 2024.
- ARMSTRONG E.; HEMMERLING A.; MILLER S.; HUIBNER S.; KULIKOVA M.; LIU R.; CRAWFORD E.; CASTAÑEDA GR.; COBURN B.; COHEN CR.; KAUL R. Vaginal fungi are associated with treatment-induced shifts in the vaginal microbiota and with a distinct genital immune profile. **Microbiol Spectr**, v. 12, n. 8, p. e0350123, 2024.
- ASOK KUMAR, K.; MAZUMDAR, K.; DUTTA, N. K.; KARAK, P.; DASTIDAR, S. G.; RAY, R. Evaluation of synergism between the aminoglycoside antibiotic streptomycin and the cardiovascular agent amlodipine. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 7, p. 1116–1120, 2004.
- ASGHAR, A.; KHALID, A.; BAQAR, Z.; HUSSAIN, N.; SALEEM, M. Z.; SAIRASH; RIZWAN, K. An insights into emerging trends to control the threats of antimicrobial resistance (AMR): an address to public health risks. **Archives of Microbiology**, v. 206, p. 72, 2024.
- BÄCHLI, M.; SOMMERSTEIN, R.; CASANOVA, C.; DROZ, S.; KÜFFER, M.; MARSCHALL, J. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* Contact Screening Strategy in a Low Prevalence Setting; a Nested Case-Control Study. **Infection Prevention in Practice**, v. 4, n. 2, p. 0–4, 2022.

- BAELO, A.; LEVATO, R.; JULIÁN, E.; CRESPO, A.; ASTOLA, J.; GAVALDÀ, J.; ENGEL, E.; MATEOS-TIMONEDA, M. A.; TORRENTS, E. Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. **Journal of Controlled Release**, v. 209, p. 150–158, 10 jul. 2015.
- BAIER, C.; LINKE, L.; EDER, M.; SCHWAB, F.; CHABERNY, I. F.; VONBERG, R. P.; EBADI, E. Incidence, risk factors and healthcare costs of central line-associated nosocomial bloodstream infections in hematologic and oncologic patients. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2020.
- BANAT, I. M.; RIENZO, MAYRI.; QUINN, GERRY. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 9915-9929, 2014.
- BANAT, I. M. *et al.* Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427–444, 2010.
- BARBARA W. TRAUTNER, MD; RABIH O. DAROUICHE, M. Catheter-Associated Infections. **Arch Intern Med**, v. 164, p. 842–850, 2015.
- BAROJA, I.; GUERRA, S.; CORAL-ALMEIDA, M.; RUÍZ, A.; GALARZA, J. M.; WAARD, J. H. DE; BASTIDAS-CALDES, C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization among health care workers of a tertiary hospital in ecuador and associated risk factors. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, n. August, p. 3433–3440, 2021.
- ANDRADE NETO, J. B.; JOSINO, M. A.; ROCHA DA SILVA, C.; SOUSA CAMPOS, R. S.; AIRES DO NASCIMENTO, F.; SAMPAIO, L.; VALENTE SÁ, L. G. A.; SÁ CARNEIRO, I.; DIAS BARROSO, F.; JUVÊNCIO DA SILVA, L.; LIMA DE MESQUITA, J.; CAVALCANTI, B.; ODORICO DE MORAES, M.; NOBRE JÚNIOR, H. A mechanistic approach to the *in-vitro* resistance modulating effects of fluoxetine against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, n. November 2018, p. 335–340, 2019.
- BERA, S.; ZHANEL, G. G.; SCHWEIZER, F. Antibacterial activity of guanidinylated neomycin B- and kanamycin A-derived amphiphilic lipid conjugates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1224–1227, 2010.
- BERNARD, C.; GIRARDOT, M.; IMBERT, C. *Candida albicans* interaction with Gram-positive bacteria within interkingdom biofilms. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 30, n. 1, 2020.
- BJERK, T. R.; SEVERINO, P.; JAIN, S.; MARQUES, C.; SILVA, A. M.; PASHIROVA, T.; SOUTO, E. B. Biosurfactants: Properties and applications in drug delivery, biotechnology and ecotoxicology. **Bioengineering**, v. 8, n. 8, p. 115, 2021.

- BONNAL, C.; BIRGAND, G.; LOLOM, I.; DIAMANTIS, S.; DUMORTIER, C.; L'HERITEAU, F.; ARMAND-LEFEVRE, L.; LUCET, J. C. *Staphylococcus aureus* healthcare associated bacteraemia: An indicator of catheter related infections. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 45, n. 3, p. 84–88, 2015.
- BONGOMIN F.; GAGO S.; OLADELE RO.; DENNING DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **J Fungi (Basel)**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.
- BRAGA, I. A.; CAMPOS, P. A.; GONTIJO-FILHO, P. P.; RIBAS, R. M. Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 99, n. 3, p. 318–324, 2018.
- BRAMBILLA, L. Z. S.; ENDO, E. H.; CORTEZ, D. A. G.; FILHO, B. P. D. Anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* MRSA and MSSA of neolignans and extract of *Piper regnellii*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 112–117, 1 jan. 2017.
- DE BREIJ, A.; RIOOL, M.; CORDFUNKE, R.; MALANOVIC, N.; DE BOER, L.; KONING, R.; RAVENSBERGEN, E.; FRANKEN, M.; VAN DER HEIJDE, T.; BOEKEMA, B.; KWAKMAN, P.; KAMP, N.; GHALBZOURI, A.; LOHNER, K.; ZAAT, S.; DRIJFHOUT, J.; PETER, †; NIBBERING, H. The antimicrobial peptide SAAP-148 combats drug-resistant bacteria and biofilms. **Science translational medicine**, v. 10, n. ean4044, 2018.
- BRÜSSOW, H. The antibiotic resistance crisis and the development of new antibiotics. **Microbial Biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 1–17, 2024.
- BUETTI, N.; MARSCHALL, J.; DREES, M.; FAKIH, M.; HADAWAY, L.; MARAGAKIS, L.; MONSEES, E.; NOVOSAD, S.; O'GRADY, N.; RUPP, M.; WOLF, J.; YOKOE, D.; MERMEL, L. Strategies to prevent central line-associated bloodstream infections in acute-care hospitals: 2022 Update. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 43, n. 5, p. 553–569, 2022.
- BUGG, T. D. H.; BRADDICK, D.; DOWSON, C. G.; ROPER, D. I. Bacterial cell wall assembly: Still an attractive antibacterial target. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 167–173, 2011.
- BUONOCORE, C.; GIUGLIANO, R.; SALA, G. DELLA; PALMA ESPOSITO, F.; TEDESCO, P.; FOLLIERO, V.; GALDIERO, M.; FRANCI, G.; PASCALE, D. DE. Evaluation of Antimicrobial Properties and Potential Applications of *Pseudomonas gessardii* M15 Rhamnolipids towards Multiresistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, 2023.
- CANGUI-PANCHI, S. P.; ÑACATO-TOAPANTA, A. L.; ENRÍQUEZ-MARTÍNEZ, L. J.; REYES, J.; GARZON-CHAVEZ, D.; MACHADO, A. Biofilm-forming microorganisms

causing hospital-acquired infections from intravenous catheter: A systematic review. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 3, n. November, 2022.

CARLSON, E. Effect of strain of *Staphylococcus aureus* on synergism with *Candida albicans* resulting in mouse mortality and morbidity. **Infection and Immunity**, v. 42, n. 1, p. 285–292, 1983.

CERESA, C.; TESSAROLO, F.; MANIGLIO, D.; TAMBONE, E.; CARMAGNOLA, I.; FEDELI, E.; CAOLA, I.; NOLLO, G.; CHIONO, V.; ALLEGRONE, G.; RINALDI, M.; FRACCHIA, L. Medical-grade silicone coated with rhamnolipid R89 is effective against *Staphylococcus* spp. Biofilms. **Molecules**, v. 24, n. 21, 25 out. 2019.

CERESA, C.; FRACCHIA, L.; SANSOTERA, A. C.; RIENZO, M. A. D. DE; BANAT, I. M. Harnessing the Potential of Biosurfactants for Biomedical and Pharmaceutical Applications. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, 2023.

CERESA, C.; RINALDI, M.; TESSAROLO, F.; MANIGLIO, D.; FEDELI, E.; TAMBONE, E.; CACIAGLI, P.; BANAT, I. M.; DIAZ DE RIENZO, M. A.; FRACCHIA, L. Inhibitory Effects of Lipopeptides and Glycolipids on *C. albicans*–*Staphylococcus* spp. Dual-Species Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 13 jan. 2021.

CHAI, D.; LIU, X.; WANG, R.; BAI, Y.; CAI, Y. Efficacy of Linezolid and Fosfomycin in Catheter-Related Biofilm Infection Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

CHAIBUNDIT, C.; RICARDO, N. M. P. S.; COSTA, F. D. M. L. L.; YEATES, S. G.; BOOTH, C. Micellization and gelation of mixed copolymers P123 and F127 in aqueous solution. **Langmuir**, v. 23, n. 18, p. 9229–9236, 2007.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021.

CHLUMSKY, O.; SMITH, H. J.; PARKER, A. E.; BRILEYA, K.; WILKING, J. N.; PURKRTOVA, S.; MICHOVA, H.; ULBRICH, P.; VIKTOROVA, J.; DEMNEROVA, K. Evaluation of the antimicrobial efficacy of n-acetyl-l-cysteine, rhamnolipids, and usnic acid—novel approaches to fight food-borne pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, 1 nov. 2021.

CHONG, H.; LI, Q. Microbial production of rhamnolipids: Opportunities, challenges and strategies. **Microbial cell factories**, v. 16, p. 1-12, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. 10th ed. Wayne, PA: CLSI, 2015. (CLSI document M07-A10).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 31st ed. Wayne, PA: CLSI, 2021. (CLSI document M100-S31).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. 3rd ed. Wayne, PA: CLSI, 2008. (CLSI document M27-A3).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: fourth informational supplement*. Wayne, PA: CLSI, 2012. (CLSI document M27-S4).

COATES, R.; MORAN, J.; HORSBURGH, M. J. Staphylococci: Colonizers and pathogens of human skin. **Future Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 75–91, 2014.

COLOMER, A.; PINAZO, A.; MANRESA, M. A.; VINARDELL, M. P.; MITJANS, M.; INFANTE, M. R.; PÉREZ, L. Cationic surfactants derived from lysine: Effects of their structure and charge type on antimicrobial and hemolytic activities. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 989–1002, 24 fev. 2011.

COSTA, E. M.; SILVA, S.; MADUREIRA, A. R.; CARDELLE-COBAS, A.; TAVARIA, F. K.; PINTADO, M. M. A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 1081–1086, 2014.

CRAFT, K. M.; NGUYEN, J. M.; BERG, L. J.; TOWNSEND, S. D. Methicillin-resistant: *Staphylococcus aureus* (MRSA): Antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. **MedChemComm**, v. 10, n. 8, p. 1231–1241, 2019.

CUNY, C.; LAYER-NICOLAOU, F.; WERNER, G.; WITTE, W. A look at staphylococci from the one health perspective. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 314, p. 151604, 2024.

DADASHI, M.; NASIRI, M. J.; FALLAH, F.; OWLIA, P.; HAJIKHANI, B.; EMANEINI, M.; MIRPOUR, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Iran: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 12, n. 2010, p. 96–103, 2018.

DARDOURI, M.; ALJNADI, I. M.; DEUERMEIER, J.; SANTOS, C.; COSTA, F.; MARTIN, V.; FERNANDES, M. H.; GONÇALVES, L.; BETTENCOURT, A.; GOMES, P. S.; RIBEIRO, I. A. C. Bonding antimicrobial rhamnolipids onto medical grade PDMS: A strategy to overcome multispecies vascular catheter-related infections. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 217, n. July, p. 112679, 2022.

- 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**, v. 9, p. IDRT.S31741, 2016.
- DENIS, O. Route of transmission of *Staphylococcus aureus*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 124–125, 2017.
- DIAZ DE RIENZO, M. A.; STEVENSON, P. S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Effect of biosurfactants on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms in a BioFlux channel. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5773–5779, 1 jul. 2016.
- DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 108–126, 2002.
- DME – DIAGNÓSTICOS MICROBIOLÓGICOS ESPECIALIZADOS. *Bula de Bancada – Edição CLSI 2022: Antibiograma – Interpretação das zonas de inibição e concentração inibitória mínima*. Araçatuba: DME, 2022. Disponível em: <https://www.dme.ind.br/wp-content/uploads/Bula-de-Bancada-CLSI-2022.pdf>. Acesso em: jan 2025.
- E SILVA, S. S.; CARVALHO, J. W. P.; AIRES, C. P.; NITSCHKE, M. Disruption of *Staphylococcus aureus* biofilms using rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p. 7864–7873, 1 out. 2017.
- EICHELBERGER K.; CASSAT J. Metabolic Adaptations During *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* Co-Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. 797550, 2021.
- ELNAGAR, R. M. Cross interaction between bacterial and fungal microbiota and their relevance to human health and disease: mechanistic pathways and prospective therapy. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 43, n. 4, p. 309–320, 2024.
- ENOCH, D. A.; BYGOTT, J. M.; DALY, M. L.; KARAS, J. A. Daptomycin. **Journal of Infection**, set. 2007.
- ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J.; LÓPEZ-CERVANTES, M.; NAÏK, A.; KALIA, Y. N.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEM-QUINTANAR, A. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 339–358, 2006.
- FAKIH, M. G.; BUFALINO, A.; STURM, L.; HUANG, R. H.; OTTENBACHER, A.; SAAKE, K.; WINEGAR, A.; FOGEL, R.; CACCHIONE, J. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, central-line-Associated bloodstream infection (CLABSI), and catheter-Associated urinary tract infection (CAUTI): The urgent need to refocus on hardwiring prevention efforts. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 43, n. 1, p. 26–31, 2022.

- FALAGAS, M. E.; MAKRIS, G. C. Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. **Journal of Hospital Infection**, v. 71, n. 4, p. 301-306, 2009.
- FALCES-ROMERO, I. *et al.* *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with SARS-CoV-2 infection. **Medicina Clinica**, v. 160, n. 11, p. 495–498, 2023.
- FAQRI, A. M. A.; HAYDER, N. H.; HASHIM, A. J. lab-scale production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* a3 and study its synergistic effect with certain antibiotics against some pathogenic bacteria. **Iraqi Journal of Agricultural Sciences**, v. 50, n. 5, p. 1290–1301, 2019.
- FARRAG, H. A.; HOSNY, A. E. D. M. S.; HAWAS, A. M.; HAGRAS, S. A. A.; HELMY, O. M. Potential efficacy of garlic lock therapy in combating biofilm and catheter-associated infections; experimental studies on an animal model with focus on toxicological aspects. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 6, p. 830–840, 2019.
- FASSBIND, D. A.; REZENDE, R. Q.; DIAS, C. A. G.; MOTTA, F. Community-acquired and healthcare-associated *Staphylococcus aureus* infections in a pediatric hospital in southern Brazil over 8 years: how common is MRSA? **Frontiers in Pediatrics**, v. 11, n. June, p. 1–6, 2023.
- FERACO, D.; BLAHA, M.; KHAN, S.; GREEN, J. M.; PLOTKIN, B. J. Host environmental signals and effects on biofilm formation. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 253–263, 2016.
- FERREIRA, M. V. C.; PAES, V. R.; LICHTENSTEIN, A. Penicilina: oitenta anos. **Rev. Med.**, v. 87, n. 4, p. 272–276, 2008.
- FISHER, L. E. *et al.* Biomaterial modification of urinary catheters with antimicrobials to give long-term broadspectrum antibiofilm activity. **Journal of Controlled Release**, v. 202, p. 57–64, 2015.
- FLEMMING, H.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Publishing Group**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.
- FRANÇOIS, P.; SCHRENZEL, J.; GÖTZ, F. Biology and Regulation of Staphylococcal Biofilm. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, 2023.
- FREITAS FERREIRA, J. DE; VIEIRA, E. A.; NITSCHKE, M. The antibacterial activity of rhamnolipid biosurfactant is pH dependent. **Food Research International**, v. 116, p. 737–744, 1 fev. 2019.
- FU, J.; YE, X.; CHEN, C.; CHEN, S. The Efficacy and Safety of Linezolid and Glycopeptides in the Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 6 mar. 2013.
- GARRIGA FERRER-BERGUA, L.; BORRULL SENRA, A. M.; PÉREZ VELASCO, C.; MONTERO VALLADARES, C.; COLLAZO VALLDURIOLA, I.; MOYA VILLANUEVA,

- S.; VELASCO ZÚÑIGA, R.; PÉREZ ALBA, M.; LA TORRE ESPÍ, M. DE. Rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatric emergency departments in Spain. **Anales de Pediatría**, v. 97, n. 2, p. 95–102, 1 ago. 2022.
- GEBREYOHANNES, G.; NYERERE, A.; BII, C.; SBHATU, D. B. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. **Heliyon**, v. 5, n. 8, p. e02192, 2019.
- GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, A. I.; ALVES, E.; DOMINGUES, M. R.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 177, n. 2015, p. 87–93, 2015.
- GUO, Y.; SONG, G.; SUN, M.; WANG, J.; WANG, Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. March, p. 1–11, 2020.
- HAJIPOUR, M. J.; FROMM, K. M.; AKBAR ASHKARRAN, A.; JIMENEZ DE ABERASTURI, D.; LARRAMENDI, I. R. DE; ROJO, T.; SERPOOSHAN, V.; PARAK, W. J.; MAHMOUDI, M. Antibacterial properties of nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 499–511, 2012.
- HARRIOTT, M. M.; NOVERR, M. C. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: Effects on antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3914–3922, 2009.
- HASHEMIAN, S. M. R.; FARHADI, T.; GANJPARGAR, M. Linezolid: A review of its properties, function, and use in critical care. **Drug design, development and therapy**, p. 1759–1767, 2018.
- HEIDARY, M.; KHOSRAVI, A. D.; KHOSHNOOD, S.; NASIRI, M. J.; SOLEIMANI, S.; GOUDARZI, M. Daptomycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 1, p. 1–11, 2018.
- HIDRON, A. I.; EDWARDS, J. R.; PATEL, J.; HORAN, T. C.; SIEVERT, D. M.; POLLOCK, D. A.; FRIDKIN, S. K. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 11, p. 996–1011, 2008.
- HOLUBAR, M.; MENG, L.; DERESINSKI, S. Bacteremia due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: New Therapeutic Approaches. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 491–507, 2016.

HSU, L. Y.; LEONG, M.; BALM, M.; CHAN, D. S.; HUGGAN, P.; TAN, T. Y.; KOH, T. H.; HON, P. Y.; NG, M. M. Six cases of daptomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Singapore. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 1509–1513, dez. 2010.

HUANG, H. W. DAPTOMYCIN, its membrane-active mechanism vs. that of other antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, v. 1862, n. 10, p. 183395, 2020.

IDREES, M.; SAWANT, S.; KARODIA, N.; RAHMAN, A. *Staphylococcus aureus* biofilm: Morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 14, p. 7602, 2021.

IWATA, Y.; SAKAI, N.; YONEDA, I.; SENDA, Y.; SAKAI-TAKEMORI, Y.; OSHIMA, M.; NAKAGAWA-YONEDA, S.; OGURA, H.; SATO, K.; MINAMI, T.; KITAJIMA, S.; TOYAMA, T.; YAMAMURA, Y.; MIYAGAWA, T.; HARA, A.; SHIMIZU, M.; FURUICHI, K.; MATSUSHIMA, K.; WADA, T. D-Serine inhibits the attachment and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 537, p. 50–56, 22 jan. 2021.

JAFFER, Manar *et al.* Impact of COVID-19 pandemic on the rates of central line-associated bloodstream infection and catheter-associated urinary tract infection in an intensive care setting: National experience. **American Journal of Infection Control**, v. 1, n. January, 2024

JANEK, T.; KRASOWSKA, A.; CZYZNIKOWSKA, Z.; ŁUKASZEWICZ, M. Trehalose lipid biosurfactant reduces adhesion of microbial pathogens to polystyrene and silicone surfaces: An experimental and computational approach. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, 16 out. 2018.

JIANG, S.; CHEN, M.; ZHANG, J.; BA, X.; ZHANG, H.; HONG, Y.; SUN, L. Profiling daptomycin resistance among diverse methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 1–12, 2023.

KADIRVELU, L.; SIVARAMALINGAM, S. S.; JOTHIVEL, D.; CHITHIRAISELVAN, D. D.; KARAIYAGOWDER GOVINDARAJAN, D.; KANDASWAMY, K. A review on antimicrobial strategies in mitigating biofilm-associated infections on medical implants. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 6, n. March, p. 100231, 2024.

KIM, E. S.; JEONG, S. IL; KIM, J. H.; PARK, C.; KIM, S. M.; KIM, J. K.; LEE, K. M.; LEE, S. H.; SO, H.; PARK, R. Synergistic effects of the combination of 20-hydroxyecdysone with ampicillin and gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 12, p. 1576–1581, 2009.

- KONEMAN, Elmer W. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020.
- KONSTANTINOVSKI, M.; GEEST, C. VAN; BRUIJNING, M.; KROON-DE KEIZER, L.; WALLINGA, J.; BURGEL, N. VAN; VELDKAMP, K. E. Rate of nosocomial MRSA transmission evaluated via contact screening. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 13, n. 1, 2024.
- KOYAMA, N.; INOKOSHI, J.; TOMODA, H. Anti-infectious agents against MRSA. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 204–224, 2013.
- KUFEL, W. D.; PARSELS, K. A.; BLAINE, B. E.; STEELE, J. M.; MAHAPATRA, R.; PAOLINO, K. M.; THOMAS, S. J. Vancomycin plus ceftaroline for persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Pharmacotherapy**, v. 43, n. 1, p. 15–23, 1 jan. 2023.
- KUMARI, A.; MANKOTIA, S.; CHAUBEY, B.; LUTHRA, M.; SINGH, R. Role of biofilm morphology, matrix content and surface hydrophobicity in the biofilm-forming capacity of various *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 889–892, 2018.
- KURAKADO, S.; MATSUMOTO, Y.; ESHIMA, S.; SUGITA, T. Antimicrobial Tolerance in Cross-Kingdom Dual-Species Biofilms Formed by Fungi and Bacteria. **Medical Mycology Journal**, v. 65, n. 3, p. 49–57, 2024.
- LEE, J.; SONG, H.; KIM, K. Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation and Attenuation of Its Virulence by *Liriope muscari*. **Antibiotics**, v. 13, n. 5, p. 1–13, 2024.
- LIN, Y. J.; ALSAD, L.; VOGEL, F.; KOPPAR, S.; NEVAREZ, L.; AUGUSTE, F.; SEYMOUR, J.; SYED, A.; CHRISTOPH, K.; LOOMIS, J. S. Interactions between *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* within mixed species biofilms. **Bios**, v. 84, n. 1, p. 30–39, 2013.
- LISOWSKA-ŁYSIAK, K.; LAUTERBACH, R.; MIĘDZOBRODZKI, J.; KOSECKA-STROJEK, M. Epidemiology and pathogenesis of *Staphylococcus* bloodstream infections in humans: A review. **Polish Journal of Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 13–23, 2021.
- LIU, K.; WANG, C.; ZHOU, X.; GUO, X.; YANG, Y.; LIU, W.; ZHAO, R.; SONG, H. Bacteriophage therapy for drug-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, n. 1336821, 2024.
- LIU, S.; FENG, X.; ZHANG, H.; LI, P.; YANG, B.; GU, Q. Decoding bacterial communication: Intracellular signal transduction, quorum sensing, and cross-kingdom interactions. **Microbiological Research**, v. 292, n. December 2024, p. 127995, 2025.

- LIU, W. T.; CHEN, E. Z.; YANG, L.; PENG, C.; WANG, Q.; XU, Z.; CHEN, D. Q. Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus aureus*: A comprehensive review. **Microbial Pathogenesis**, v. 156, p. 104915, 2021.
- LIU, Y.; SHE, P.; XU, L.; CHEN, L.; LI, Y.; LIU, S.; LI, Z.; HUSSAIN, Z.; WU, Y. Antimicrobial, Antibiofilm, and Anti-persister Activities of Penfluridol Against *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 18 ago. 2021.
- LUO, Y.; MCAULEY, D. F.; FULTON, C. R.; PESSOA, J. S.; MCMULLAN, R.; LUNDY, F. T. Targeting *Candida albicans* in dual-species biofilms with antifungal treatment reduces *Staphylococcus aureus* and MRSA in vitro. **PLoS ONE**, v. 16, n. 4 April, p. 1–14, 2021.
- MADHAIYAN, M.; WIRTH, J. S.; SARAVANAN, V. S. Phylogenomic analyses of the *Staphylococcaceae* family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliicoccus* gen. nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family *Staphylococcaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5926–5936, 2020.
- MALAKAR, C.; PATOWARY, K.; DEKA, S.; KALITA, M. C. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial efficacy of rhamnolipid-coated zinc oxide nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 11, p. 1–14, 2021.
- MANSOURI, M. D.; HULL, R. A.; STAGER, C. E.; CADLE, R. M.; DAROUICHE, R. O. In vitro activity and durability of a combination of an antibiofilm and an antibiotic against vascular catheter colonization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 621–625, 2013.
- MARANGON, C. A.; MARTINS, V. C. A.; LING, M. H.; MELO, C. C.; PLEPIS, A. M. G.; MEYER, R. L.; NITSCHKE, M. Combination of rhamnolipid and chitosan in nanoparticles boosts their antimicrobial efficacy. **ACS applied materials & interfaces**, v. 12, n. 5, p. 5488–5499, 2020.
- MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 558–565, 2012.
- MARSH, N.; LARSEN, E. N.; ULLMAN, A. J.; MIHALA, G.; COOKE, M.; CHOPRA, V.; RAY-BARRUEL, G.; RICKARD, C. M. Peripheral intravenous catheter infection and failure: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Nursing Studies**, v. 151, p. 104673, 2024.

MARTINS, A.; CUNHA, M. D. L. R. S. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: Epidemiological and molecular aspects. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n. 9, p. 787–795, 2007.

MAŤÁTKOVÁ, O.; KOLOUCHOVÁ, I.; LOKOČOVÁ, K.; MICHAILIDU, J.; JAROŠ, P.; KULIŠOVÁ, M.; ŘEZANKA, T.; MASÁK, J. Rhamnolipids as a Tool for Eradication of *Trichosporon cutaneum* Biofilm. **Biomolecules**, v. 11, n. 11, p. 1727, 19 nov. 2021.

MCCARTHY, H.; RUDKIN, J. K.; BLACK, N. S.; GALLAGHER, L.; O'NEILL, E.; O'GARA, J. P. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. Frontiers Research Foundation, 1 jan. 2015.

MEJÍA JIMÉNEZ, R.; ARCEO MARTÍNEZ, M. T.; LOEZA LARA, P. D. Quitosano: actividad antimicrobiana y mecanismos de acción. **e-CUCBA**, n. 9, p. 17–23, 2018.

MENDES, R. E.; DESHPANDE, L. M.; JONES, R. N. Linezolid update: Stable *in vitro* activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. **Drug Resistance Updates**. v. 17, n. 1-2, p. 1-12, 2014.

MESTROVIC, T.; ROBLES AGUILAR, G.; SWETSCHINSKI, L.; IKUTA, K.; GRAY, A.; DAVIS WEAVER, N.; HAN, C.; WOOL, E.; GERSHBERG HAYOON, A.; HAY, S.; DOLECEK, C.; SARTORIUS, B.; MURRAY, C.; ADDO, I.; AHINKORAH, B.; AHMED, A.; ALDEYAB, M.; ALLEL, K.; ANCUCEANU, R.; ANYASODOR, A.; AUSLOOS, M.; BARRA, F.; BHAGAVATHULA, A.; BHANDARI, D.; BHASKAR, S.; CRUZ-MARTINS, N.; DASTIRIDOU, A.; DOKOVA, K.; DUBLJANIN, E.; DUROJAIYE, O.; FAGBAMIGBE, A.; FERRERO, S.; GAAL, P.; GUPTA, V.; GUPTA, V.; GUPTA, V.; HERTELIU, C.; HUSSAIN, S.; ILIC, I.; ILIC, M.; JAMSHIDI, E.; JOO, T.; KARCH, A.; KISA, A.; KISA, S.; KOSTYANEV, T.; KYU, H.; LÁM, J.; LOPES, G.; MATHIOUDAKIS, A.; MENTIS, A.; MICHALEK, I.; MONI, M.; MOORE, C.; MULITA, F.; NEGOI, I.; NEGOI, R.; PALICZ, T.; PANA, A.; PERDIGÃO, J.; PETCU, I.; RABIEE, N.; RAWAF, D.; RAWAF, S.; SHAKHMARDANOV, M.; SHEIKH, A.; SILVA, L.; SKRYABIN, V.; SKRYABINA, A.; SOCEA, B.; STERGACHIS, A.; STOEVA, T.; SUMI, C.; THIYAGARAJAN, A.; TOVANI-PALONE, M.; YESILTEPE, M.; ZAMAN, S.; NAGHAVI, M. The burden of bacterial antimicrobial resistance in the WHO European region in 2019: a cross-country systematic analysis. **The Lancet Public Health**, v. 7, n. 11, p. e897–e913, 2022.

SÁNCHEZ-OSUNA, M., PEDROSA, M., BIERGE, P., GÓMEZ-SÁNCHEZ, I., ALGUACIL-GUILLÉN, M., ESPASA, M., ERILL, I., GASCH, O., PICH, O.Q. Genomic analysis of

Staphylococcus aureus isolates from bacteremia reveals genetic features associated with the COVID-19 pandemic. **ISCIENCE**, v. 1, n. 1, p. 100540, 2024.

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B.; KOWALEWSKI, C.; KROLAK-ULINSKA, A.; MARUSZA, W. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, 2022.

MOHAMMED, Y. H. E.; MANUKUMAR, H. M.; RAKESH, K. P.; KARTHIK, C. S.; MALLU, P.; QIN, H. L. Vision for medicine: *Staphylococcus aureus* biofilm war and unlocking key's for anti-biofilm drug development. **Microbial Pathogenesis**. v. 123, p. 339-347, 2018.

MOUTINHO, L. F.; MOURA, F. R.; SILVESTRE, R. C.; ROMÃO-DUMARESQ, A. S. Microbial biosurfactants: A broad analysis of properties, applications, biosynthesis, and technological assessment of rhamnolipid production. **Biotechnology Progress**, v. 37, n. 2, 1 mar. 2021.

MULCAHY, M. E.; MCLOUGHLIN, R. M. Host–Bacterial Crosstalk Determines *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 11, p. 872–886, 2016.

MURRAY, Patrick R.. **Microbiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2022. v. 1. ISBN 978-85-352-9999-9.

NETO, J.; DA SILVA, C.; NETA, M.; CAMPOS, R.; SIEBRA, J.; SILVA, R.; GASPAR, D.; MAGALHÃES, H.; DE MORAES, M.; LOBO, M.; GRANGEIRO, T.; CARVALHO, T.; DIOGO, E.; DA SILVA JÚNIOR, E.; RODRIGUES, F.; CAVALCANTI, B.; JÚNIOR, H. Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds in vitro against fluconazole-resistant strains of different *Candida* species: A special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2014.

NETO, J.; SILVA, C.; NASCIMENTO, F.; SAMPAIO, L.; SILVA, A.; FREITAS, D.; CAMPOS, R.; ANDRADE, L.; GONÇALVES, T.; NAGAO-DIAS, A.; MARIA, T.; PONTE, D.; RICARTE, J.; MESQUITA, L.; MAGALHÃES, H.; MORAES, M.; GRANGEIRO, T.; MARIA, G.; SANTIAGO, P.; CARLOTA, H.; SOUSA, M.; GOMES, A.; CAVALCANTI, B.; JÚNIOR, H. Screening of Antimicrobial Metabolite Yeast Isolates Derived Biome Ceará against Pathogenic Bacteria, Including MRSA: Antibacterial Activity and mode of Action Evaluated by Flow Cytometry. Original Research Article Screening of Antimicrobial Metabolite Yeas. n. January, 2015.

NGO BELL, E. C.; CHAPON, V.; BESSEDE, E.; MERIGLIER, E.; ISSA, N.; DOMBLIDES, C.; BONNET, F.; VANDENHENDE, M. A. Central venous catheter-related bloodstream

infections: Epidemiology and risk factors for hematogenous complications. **Infectious Diseases Now**, v. 54, n. 3, p. 104859, 2024.

NGUYEN, H. T. T.; NGUYEN, T. H.; OTTO, M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 3324–3334, 2020.

NICKZAD, A.; DÉZIEL, E. The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development - an approach for control? **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 447–453, 2014.

OHADI, M.; FOROOTANFAR, H.; DEHGHANNOUDEH, G.; ESLAMINEJAD, T.; AMERI, A.; SHAKIBAIE, M.; ADELI-SARDOU, M. Antimicrobial, anti-biofilm, and anti-proliferative activities of lipopeptide biosurfactant produced by *Acinetobacter junii* B6. **Microbial Pathogenesis**, v. 138, p. 103806, 2020.

OLIVEIRA, C. P.; VASCONCELLOS, L. C. G.; RIBEIRO, M. E. N. P.; RICARDO, N. M. P. S.; SOUZA, T. V. D. P.; COSTA, F. D. M. L. L.; CHAIBUNDIT, C.; YEATES, S. G.; ATTWOOD, D. The effect of polymeric additives on the solubilisation of a poorly-soluble drug in micellar solutions of Pluronic F127. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 409, n. 1–2, p. 206–208, 2011.

OMAR, A.; WRIGHT, J. B.; SCHULTZ, G.; BURRELL, R.; NADWORNÝ, P. Microbial biofilms and chronic wounds. **Microorganisms**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2017.

OSÓRIO, N.; OLIVEIRA, V.; COSTA, M. I.; SANTOS-COSTA, P.; SERAMBEQUE, B.; GAMA, F.; ADRIANO, D.; GRAVETO, J.; PARREIRA, P.; SALGUEIRO-OLIVEIRA, A. Short Peripheral Venous Catheters Contamination and the Dangers of Bloodstream Infection in Portugal: An Analytic Study. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 1–11, 2023.

OTZEN, D. E. Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: Same but different? **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1859, n. 4, p. 639–649, 2017.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 633–654, 2011.

PALAVECINO, E. L. Clinical, epidemiologic, and laboratory aspects of methicillin-resistant staphylococcus aureus infections. **Methods in Molecular Biology**, v. 1085, p. 1–24, 2014.

PANDEY, A. Biofilms: A Comprehension of Microbial Chemical Ecology. **Organic & Medicinal Chemistry International Journal**, v. 3, n. 3, 2017.

- PARASTAN, R.; KARGAR, M.; SOLHJOO, K.; KAFILZADEH, F. *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. **Gene Reports**, v. 20, n. May, 2020.
- PARLET, C. P.; BROWN, M. M.; HORSWILL, A. R. Commensal Staphylococci Influence *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Disease. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 497–507, 2019.
- PARREIRA, A. G.; GRANJEIRO, P. A.; MANO, C. S. Evaluation of the Anti-Biofilm Effects of Biosurfactants and Silver Nanoparticles on Biomaterials Surfaces. **Archives in Biomedical Engineering & Biotechnology**, v. 3, n. 5, 2020.
- PATRONE, V.; CAMPANA, R.; VITTORIA, E.; BAFFONE, W. *In vitro* synergistic activities of essential oils and surfactants in combination with cosmetic preservatives against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Current Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 237–241, 2010.
- PAUL, S.; TODD, O. A.; EICHELBERGER, K. R.; TKACZYK, C.; SELLMAN, B. R.; NOVERR, M. C.; CASSAT, J. E.; FIDEL, P. L.; PETERS, B. M. A fungal metabolic regulator underlies infectious synergism during *Candida albicans-Staphylococcus aureus* intra-abdominal co-infection. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, 2024.
- PENG, Q.; TANG, X.; DONG, W.; SUN, N.; YUAN, W. A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism. **Antibiotics**, v. 12, n. 1, p. 1–21, 2023.
- PEREIRA, R.; SANTOS FONTENELLE, R. O. DOS; BRITO, E. H. S. DE; MORAIS, S. M. DE. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11–22, 2021.
- PÉREZ, L.; PINAZO, A.; MORÁN, M. C.; PONS, R. Aggregation behavior, antibacterial activity and biocompatibility of catanionic assemblies based on amino acid-derived surfactants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 1–23, 1 dez. 2020.
- PIEWNGAM, P.; OTTO, M. *Staphylococcus aureus* colonisation and strategies for decolonisation. **The Lancet Microbe**, v. 5, n. 6, p. e606–e618, 2024.
- PINAZO, A.; MANRESA, M. A.; MARQUES, A. M.; BUSTELO, M.; ESPUNY, M. J.; PÉREZ, L. Amino acid-based surfactants: New antimicrobial agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 228, p. 17–39, 2016.
- PINAZO, A.; PONS, R.; MARQUÉS, A.; FARFAN, M.; SILVA, A. DA; PEREZ, L. Biocompatible catanionic vesicles from arginine-based surfactants: A new strategy to tune the antimicrobial activity and cytotoxicity of vesicular systems. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 9, p. 1–24, 1 set. 2020.

- PISÁRČIK, M.; PUPÁK, M.; LUKÁČ, M.; DEVÍNSKY, F.; HUBČÍK, L.; BUKOVSKÝ, M.; HORVÁTH, B. The synthesis, self-assembled structures, and microbicidal activity of cationic gemini surfactants with branched tridecyl chains. **Molecules**, v. 24, n. 23, 30 nov. 2019.
- POLIDORI, I.; TO, D.; KALI, G.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Histidine-based ionizable cationic surfactants: novel biodegradable agents for hydrophilic macromolecular drug delivery. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 14, n. 9, p. 2370–2385, 1 set. 2024.
- PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; RUJIRAVANIT, R. Rhamnolipid Biosurfactants: Production and Their Potential in Environmental Biotechnology. **Biosurfactants**, p. 211–221, 2010.
- PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, v. 109, p. 309–318, 2015.
- PRISTOV, F.; GHANNOUM M. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, p. 792–798, 2019.
- PUJOL, M.; HORNERO, A.; SABALLS, M.; ARGERICH, M. J.; VERDAGUER, R.; CISNAL, M.; PEÑA, C.; ARIZA, J.; GUDIOL, F. Clinical epidemiology and outcomes of peripheral venous catheter-related bloodstream infections at a university-affiliated hospital. **Journal of Hospital Infection**, v. 67, n. 1, p. 22–29, 2007.
- QUIRINO, A.; CICINO, C.; SCARLATA, G. G. M.; MARASCIO, N.; GENNARO, G. DI; MATERA, G.; LICATA, F.; BIANCO, A. Prevalence of Colonization with Multidrug-Resistant Bacteria: Results of a 5-Year Active Surveillance in Patients Attending a Teaching Hospital. **Antibiotics**, v. 12, n. 10, 2023.
- RAAD, I.; MOHAMED, J. A.; REITZEL, R. A.; JIANG, Y.; RAAD, S.; SHUAIBI, M. AL; CHAFTARI, A. M.; HACHEM, R. Y. Improved antibiotic-impregnated catheters with extended-spectrum activity against resistant bacteria and fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 935–941, 2012.
- RADLINSKI, L. C.; ROWE, S. E.; BRZOZOWSKI, R.; WILKINSON, A. D.; HUANG, R.; ESWARA, P.; CONLON, B. P. Chemical Induction of Aminoglycoside Uptake Overcomes Antibiotic Tolerance and Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Cell Chemical Biology**, v. 26, n. 10, p. 1355–1364.e4, 17 out. 2019.
- RAMOS DA SILVA, A.; MANRESA, M. Á.; PINAZO, A.; GARCÍA, M. T.; PÉREZ, L. Rhamnolipids functionalized with basic amino acids: Synthesis, aggregation behavior, antibacterial activity and biodegradation studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, n. February, p. 234–243, 2019.

- REITER, K. C.; SILVA PAIM, T. G. DA; OLIVEIRA, C. F. DE; D'AZEVEDO, P. A. High biofilm production by invasive multiresistant staphylococci. **Apmis**, v. 119, n. 11, p. 776–781, 2011.
- RICARDO, NÁGILA M.P.S.; RICARDO, NADJA M.P.S.; COSTA, F. DE M. L. L.; BEZERRA, F. W. A.; CHAIBUNDIT, C.; HERMIDA-MERINO, D.; GREENLAND, B. W.; BURATTINI, S.; HAMLEY, I. W.; KEITH NIXON, S.; YEATES, S. G. Effect of water-soluble polymers, polyethylene glycol and poly(vinylpyrrolidone), on the gelation of aqueous micellar solutions of Pluronic copolymer F127. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 368, n. 1, p. 336–341, 2012.
- RIESS, G. Micellization of block copolymers. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 28, n. 7, p. 1107–1170, 2003.
- RODRIGUES, L.; MEI, H. C. VAN DER; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4408–4410, jul. 2004.
- RODRIGUES, L.; MEI, H. VAN DER; BANAT, I. M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 107–112, fev. 2006.
- ROGIER, O.; HOLTAPPELS, M.; SIALA, W.; LAMKANFI, M.; BAMBEKE, F. VAN; LAGROU, K.; DIJCK, P. VAN; KUCHARÍKOVÁ, S. Anidulafungin increases the antibacterial activity of tigecycline in polymicrobial *Candida albicans*/*Staphylococcus aureus* biofilms on intraperitoneally implanted foreign bodies. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 10, p. 2806–2814, 2018.
- ROMO, A.; KUMAMOTO, A. On commensalism of *Candida*. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 16, 2020.
- ROSENTHAL, V. D. *et al.* International Nosocomial Infection Control Consortiu (INICC) report, data summary of 43 countries for 2007-2012. Device-associated module. **American Journal of Infection Control**, v. 42, n. 9, p. 942–956, 2014.
- ROSENTHAL, V. D. *et al.* Six-year multicenter study on short-term peripheral venous catheters-related bloodstream infection rates in 204 intensive care units of 57 hospitals in 19 cities of India: International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) findings. **American Journal of Infection Control**, v. 48, n. 9, p. 1001–1008, 2020.
- ROY, A.; PODDAR, N.; PANIGRAHI, K.; PATHI, B.; NAYAK, S. R.; DANDAPAT, R.; PATTNAIK, D.; PRAHARAJ, A. K.; PATRO, A. R. K. Evaluation of *In-Vitro* Activity of

Ceftaroline Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. **Cureus**, 3 dez. 2023.

RUIZ-GIARDIN, J. M.; OCHOA CHAMORRO, I.; VELÁZQUEZ RIÓS, L.; JAQUETI AROCA, J.; GARCÍA ARATA, M. I.; SANMARTÍN LÓPEZ, J. V.; GUERRERO SANTILLÁN, M. Blood stream infections associated with central and peripheral venous catheters. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2019.

SABARINATHAN, D.; VANARAJ, S.; SATHISKUMAR, S.; POORNA CHANDRIKA, S.; SIVARASAN, G.; ARUMUGAM, S. S.; PREETHI, K.; LI, H.; CHEN, Q. Characterization and application of rhamnolipid from *Pseudomonas plecoglossicida* BP03. **Letters in Applied Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 251–262, 1 mar. 2021.

SADER, H. S.; CASTANHEIRA, M.; FARRELL, D. J.; FLAMM, R. K.; MENDES, R. E.; JONES, R. N. Tigecycline antimicrobial activity tested against clinical bacteria from Latin American medical centres: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2011–2014). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 2, p. 144–150, 2016.

SALAM M.;AL-AMIN, M.; SALAM T.;PAWAR J.; AKHTER N.;RABAAN A.;ALQUMBER M. Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. **Healthcare** , v. 11 , 2023.

SALMANOV, A.; LITUS, V.; VDOVYCHENKO, S.; LITUS, O.; DAVTIAN, L.; UBOGOV, S.; BISYUK, Y.; DROZDOVA, A.; VLASENKO, I. Healthcare-associated infections in intensive care units. **Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)**, v. 72, n. 5 cz 2, p. 963–969, 2019.

SAMADI, N.; ABADIAN, N.; AHMADKHANIHA, R.; AMINI, F.; DALILI, D.; RASTKARI, N.; SAFARIPOUR, E.; MOHSENI, F. A. Structural characterization and surface activities of biogenic rhamnolipid surfactants from *Pseudomonas aeruginosa* isolate MN1 and synergistic effects against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Folia Microbiologica**, v. 57, n. 6, p. 501–508, nov. 2012.

SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F. J.; TERUEL, J. A.; ESPUNY, M. J.; MARQUÉS, A.; MANRESA, Á.; ORTIZ, A. Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 341, n. 2, p. 240–247, 15 jan. 2010.

SANTOS, D. D. L. DOS; BESEGATO, J. F.; MELO, P. B. G. DE; JUNIOR, J. A. O.; CHORILLI, M.; DENG, D.; BAGNATO, V. S.; SOUZA RASTELLI, A. N. DE. Effect of curcumin-encapsulated Pluronic® F-127 over duo-species biofilm of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**, v. 37, n. 3, p. 1775–1786, 2022.

- SAQUI, O.; FERNANDES, G.; ALLARD, J. Central venous catheter infection in Canadian home parenteral nutrition patients: A 5-year multicenter retrospective study. **British Journal of Nursing**, v. 29, n. 8, p. S34–S42, 2020.
- SATO, A.; NAKAMURA, I.; FUJITA, H.; TSUKIMORI, A.; KOBAYASHI, T.; FUKUSHIMA, S.; FUJII, T.; MATSUMOTO, T. Peripheral venous catheter-related bloodstream infection is associated with severe complications and potential death: A retrospective observational study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–6, 2017.
- SATPUTE, S. K.; MONE, N. S.; DAS, P.; BANAT, I. M.; BANPURKAR, A. G. Inhibition of pathogenic bacterial biofilms on PDMS based implants by *L. acidophilus* derived biosurfactant. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, 13 fev. 2019.
- SAXENA, D.; MAITRA, R.; BORMON, R.; CZEKANSKA, M.; MEIERS, J.; TITZ, A.; VERMA, S.; CHOPRA, S. Tackling the outer membrane: facilitating compound entry into Gram-negative bacterial pathogens. **npj Antimicrobials and Resistance**, v. 1, n. 1, p. 1–22, 2023.
- SCHILCHER, K.; ANDREONI, F.; HAUNREITER, V. D.; SEIDL, K.; HASSE, B.; ZINKERNAGEL, A. S. Modulation of *Staphylococcus aureus* biofilm matrix by subinhibitory concentrations of clindamycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 5957–5967, 2016.
- SCHILCHER, K.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 3, p. 1–36, 2020.
- SERPA SAMPAIO MORENO, L.; NOBRE JUNIOR, H. V.; RAMOS DA SILVA, A.; AIRES DO NASCIMENTO, F. B. S.; ROCHA DA SILVA, C.; ANDRADE NETO, J. B. DE; CAVALCANTI, B. C.; ODORICO DE MORAES, M.; PINAZO, A.; PÉREZ, L. Arginine-phenylalanine and arginine-tryptophan-based surfactants as new biocompatible antifungal agents and their synergistic effect with Amphotericin B against fluconazole-resistant *Candida* strains. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 207, 1 nov. 2021.
- SHAO, B. *et al.* Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: A review. **Microbiological Research**, v. 200, n. February, p. 33–44, 2017.
- SHE, P.; LIU, Y.; WANG, Y.; TAN, F.; LUO, Z.; WU, Y. Antibiofilm efficacy of the gold compound auranofin on dual species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* sp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 88–101, 2020.

- SHEKHAR, S.; SUNDARAMANICKAM, A.; BALASUBRAMANIAN, T. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 14, p. 1522–1554, 2015.
- SHEN, Y.; LI, P.; CHEN, X.; ZOU, Y.; LI, H.; YUAN, G.; HU, H. Activity of Sodium Lauryl Sulfate, Rhamnolipids, and N-Acetylcysteine against Biofilms of Five Common Pathogens. **Microbial Drug Resistance**, v. 26, n. 3, p. 290–299, 1 mar. 2020.
- SHRESTHA, P.; COOPER, B. S.; COAST, J.; OPPONG, R.; THI THUY, N. DO; PHODHA, T.; CELHAY, O.; GUERIN, P. J.; WERTHEIM, H.; LUBELL, Y. Enumerating the economic cost of antimicrobial resistance per antibiotic consumed to inform the evaluation of interventions affecting their use. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, n. 1, 9 ago. 2018.
- SIDRIM, J. J. C.; AMANDO, B. R.; GOMES, F. I. F.; AMARAL, M. S. M. G. DO; SOUSA, P. C. P. DE; OCADAQUE, C. J.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A. DE; ROCHA, M. F. G.; SCM CASTELO-BRANCO, D. DE. Chlorpromazine-impregnated catheters as a potential strategy to control biofilm-associated urinary tract infections. **Future Microbiology**, v. 14, n. 12, p. 1023–1034, 2019.
- DA SILVA, A.; NOBRE, H.; SAMPAIO, L.; NASCIMENTO, B.; DA SILVA, C.; DE ANDRADE NETO, J.; MANRESA, Á.; PINAZO, A.; CAVALCANTI, B.; DE MORAES, M.; RUIZ-TRILLO, I.; ANTÓ, M.; MORÁN, C.; PÉREZ, L. Antifungal and antiprotozoal green amino acid-based rhamnolipids: Mode of action, antibiofilm efficiency and selective activity against resistant *Candida* spp. strains and *Acanthamoeba castellanii*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 193, n. May, p. 111148, 2020.
- DA SILVA, C.; DE ANDRADE NETO, J.; COSTA SIDRIM, J.; FERREIRA ÂNGELO, M.; FERREIRA MAGALHÃES, H.; CAVALCANTI, B.; NOGUEIRA BRILHANTE, R.; MACEDO, D.; DE MORAES, M.; PINTO LOBO, M.; GRANGEIRO, T.; NOBRE, H. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691–1700, 2013.
- DA SILVA, L.; ANDRADE, Y.; OLIVEIRA, A.; CUNHA, B.; OLIVEIRA, E.; CUNHA, T.; MAFRA, S.; ALMEIDA, J.; CARVALHO, S.; NASCIMENTO, F.; SANTOS JÚNIOR, M.; CHAMON, R.; SANTOS, K.; CAMPOS, G.; MARQUES, L. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among healthcare workers at a tertiary care hospital in northeastern Brazil. **Infection Prevention in Practice**, v. 2, n. 4, p. 1–10, 2020.
- SILVA, S. G.; PINHEIRO, M.; PEREIRA, R.; DIAS, A. R.; FERRAZ, R.; PRUDÊNCIO, C.; EATON, P. J.; REIS, S.; VALE, M. L. C. DO. Serine-based surfactants as effective

antimicrobial agents against multiresistant bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1864, n. 9, 1 set. 2022.

SILVEIRA, P.; NOME, F.; GESSER, C.; SÁ, M.; TERENCE, H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 844–855, 2006.

SINGH, A.; AMOD, A.; PANDEY, P.; BOSE, P.; PINGALI, M. S.; SHIVALKAR, S.; VARADWAJ, P. K.; SAHOO, A. K.; SAMANTA, S. K. Bacterial biofilm infections, their resistance to antibiotics therapy and current treatment strategies. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 17, n. 2, 1 mar. 2022.

SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 1, p. 2–13, 2019.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; GONZÁLEZ-VALDEZ, A.; SOTO-ACEVES, M. P.; COCOTL-YAÑEZ, M. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: from molecular genetics to the market. **Microbial Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 136–146, 2021.

SODAGARI, M.; WANG, H.; NEWBY, B. M. Z.; JU, L. K. Effect of rhamnolipids on initial attachment of bacteria on glass and octadecyltrichlorosilane-modified glass. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 121–128, 1 mar. 2013.

SORIANO, A. Ceftaroline. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v. 34, p. 29–31, 1 set. 2021.

SOUZA, C. M. DE; SANTOS, M. M. DOS; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Adhesion and biofilm formation by the opportunistic pathogen *Candida tropicalis*: What do we know? **Canadian Journal of Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 207–218, 2023.

STAPLETON, P.; TAYLOR, P. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. **Science Progress**, v. 85, n. 1, p. 57–72, 2002.

STEFANI, S.; GOGLIO, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. SUPPL. 4, p. 19–22, 2010.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

SULAIMAN, R.; TRIZNA, E.; KOLESNIKOVA, A.; KHABIBRAKHMANOVA, A.; KURBANGALIEVA, A.; BOGACHEV, M.; KAYUMOV, A. Antimicrobial and Biofilm-Preventing Activity of 1-Borneol Possessing 2(5H)-Furanone Derivative F131 against *S. aureus*—*C. albicans* Mixed Cultures. **Pathogens**, v. 12, n. 26, 2023.

TAMBONE, E.; BONOMI, E.; GHENSI, P.; MANIGLIO, D.; CERESA, C.; AGOSTINACCHIO, F.; CACIAGLI, P.; NOLLO, G.; PICCOLI, F.; CAOLA, I.; FRACCHIA,

- L.; TESSAROLO, F. Rhamnolipid coating reduces microbial biofilm formation on titanium implants: an in vitro study. **BMC Oral Health**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2021.
- TANG, Y. W.; STRATTON, C. W. *Staphylococcus aureus*: An old pathogen with new weapons. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 179–208, 2010.
- TANTAWY, A. H.; ABO-RIYA, M. A.; ABDALLAH, S. M.; EL-DOUGDOUG, W. Novel cationic surfactants based on waste frying oil for cleaning water surface from petroleum films: Synthesis, antimicrobial and surface properties. **Journal of Molecular Liquids**, v. 253, p. 36–44, 1 mar. 2018.
- THAKUR, P.; SAINI, N. K.; THAKUR, V. K.; GUPTA, V. K.; SAINI, R. V.; SAINI, A. K. Rhamnolipid the Glycolipid Biosurfactant: Emerging trends and promising strategies in the field of biotechnology and biomedicine. **Microbial Cell Factories**, v. 20, p. 1-15, 2021.
- THOMER, T.; SCHNEEWIND, T.; MISSIAKAS, D. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 100–106, 2017.
- TORRE, F. P. F. LA; BALDANZI, G.; TROSTER, E. J. Risk factors for vascular catheter-related bloodstream infections in pediatric intensive care units. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 30, n. 4, p. 436–442, 2018.
- TORRES, A.; KURAIEVA, A.; STONE, G. G.; CILLÓNIZ, C. Systematic review of ceftaroline fosamil in the management of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. **European Respiratory Review**, v. 32, n. 170, 2023.
- TORRES, C. J.; RUPP, M. E.; CAWCUTT, K. A. Intravascular Catheter-Related Bloodstream Infections: Contemporary Issues Related to a Persistent Problem. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 10, n. 24, p. 00053–9, 2024.
- TORRES, V. J.; SCHERR, T. D.; HANKE, M. L.; HUANG, O.; JAMES, D. B. A.; HORSWILL, A. R.; BAYLES, K. W.; FEY, P. D.; TORRES, V. J.; KIELIAN, T. *Staphylococcus aureus* Biofilms Induce Macrophage Dysfunction Through Leukocidin AB and Alpha-Toxin. **mBio**, v. 6, n. 4, p. 25–27, 2015.
- TSUZUKI, S.; YU, J.; MATSUNAGA, N.; OHMAGARI, N. Length of stay, hospitalisation costs and in-hospital mortality of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in Japan. **Public Health**, v. 198, p. 292–296, 1 set. 2021.
- UL HAQ, I.; KHAN, T. A.; KRUKIEWICZ, K. Etiology, pathology, and host-impaired immunity in medical implant-associated infections. **Journal of Infection and Public Health**, v. 17, n. 2, p. 189–203, 2024.
- US-FDA. Antibiotic Resistance Threats in The United States 2019. **Cdc**, v. 10, n. 1, 2019.

- VALENTINE M.; WILSON D.; GRESNIGT MS.; HUBE B. Vaginal *Candida albicans* infections: host-pathogen-microbiome interactions. **FEMS Microbiol**, v. 10, n. 49, p. uaf013, 2025.
- WAGENLEHNER, F. M. E.; DITTMAR, F. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. **European Urology**, v. 82, n. 6, p. 658, 2022.
- WATAMOTO, T.; SAMARANAYAKE, L. P.; EGUSA, H.; YATANI, H.; SENEVIRATNE, C. J. Transcriptional regulation of drug-resistance genes in *Candida albicans* biofilms in response to antifungals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 1241–1247, 2011.
- WATKINS, R. R.; BONOMO, R. A. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 313–322, 2016.
- WEISS, E. C.; SPENCER, H. J.; DAILY, S. J.; WEISS, B. D.; SMELTZER, M. S. Impact of *sarA* on antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* in a catheter-associated in vitro model of biofilm formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2475–2482, 2009.
- WELTE, T.; KANTECKI, M.; STONE, G. G.; HAMMOND, J. Ceftaroline fosamil as a potential treatment option for *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia in adults. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 54, n. 4, p. 410–422, 2019.
- WHO. **WHO bacterial priority pathogens list, 2024.**
- WILHELM, M. P. Vancomycin. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 66, n. 11, p. 1165–1170, 1991.
- WILLIAMS, D. the structure and modie of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 38, p. 339–357, 1984.
- WILLIAMS, D. H. the structure and modie of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 38, p. 339–357, 1984.
- WILLIAMS, P.; HILL, P.; BONEV, B.; CHAN, W. C. Quorum-sensing, intra-and inter-species competition in the staphylococci. **Microbiology**, v. 169, n. 8, p. 1–20, 2023.
- WU, S.; PISCITELLI, C.; LENCASTRE, H. DE; TOMASZ, A. Erratum: Tracking the evolutionary origin of the Methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *MecA* from a Methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri* (Microbial Drug Resistance 2:4 (435–441)). **Microbial Drug Resistance**, v. 3, n. 2, p. 212, 1997.
- YANG, W.; CHEN, T.; ZHOU, Q.; XU, J. Resistance to linezolid in *Staphylococcus aureus* by mutation, modification, and acquisition of genes. **Journal of Antibiotics**, p. 4–13, 2024.
- YU, K. C.; JUNG, M.; AI, C. Characteristics, costs, and outcomes associated with central-line-associated bloodstream infection and hospital-onset bacteremia and fungemia in US hospitals. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 44, n. 12, p. 1920–1926, 2023.

- ZAKHAROVA, L. Y.; PASHIROVA, T. N.; DOKTOROVOVA, S.; FERNANDES, A. R.; SANCHEZ-LOPEZ, E.; SILVA, A. M.; SOUTO, S. B.; SOUTO, E. B. Cationic surfactants: Self-assembly, structure-activity correlation and their biological applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5534, 2019.
- ZANELLA, M. C. *et al.* Increased Peripheral Venous Catheter Bloodstream Infections during COVID-19 Pandemic, Switzerland. **Emerging Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 159–162, 2024.
- ZARNOWSKI, R.; SANCHEZ, H.; COVELLI, A. S.; DOMINGUEZ, E.; JAROMIN, A.; BERNHARDT, J.; MITCHELL, K. F.; HEISS, C.; AZADI, P.; MITCHELL, A.; ANDES, D. R. *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. **PLoS Biology**, v. 16, n. 10, p. 1–18, 2018.
- ZEZZI DO VALLE GOMES, M.; NITSCHKE, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 441–447, 2012.
- ZHANG, L.; CAO, S.; MARSH, N.; RAY-BARRUEL, G.; FLYNN, J.; LARSEN, E.; RICKARD, C. M. Infection risks associated with peripheral vascular catheters. **Journal of Infection Prevention**, v. 17, n. 5, p. 207–213, 2016.
- ZHANG, L.; MORRISON, M.; NIMMO, G. R.; SRIPRAKASH, K. S.; MONDOT, S.; GOWARDMAN, J. R.; GEORGE, N.; MARSH, N.; RICKARD, C. M. Molecular investigation of bacterial communities on the inner and outer surfaces of peripheral venous catheters. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 8, p. 1083–1090, 2013.
- ZHANG, S.; LIANG, X.; GADD, G. M.; ZHAO, Q. Marine microbial-derived antibiotics and biosurfactants as potential new agents against catheter-associated urinary tract infections. **Marine Drugs**, v. 19, n. 5, p. 255, 2021.
- ZHOU, Y.; YU, S.; SU, C.; GAO, S.; JIANG, G.; ZHOU, Z.; LI, H. Molecular Characteristics of Methicillin-Resistant and Susceptible *Staphylococcus aureus* from Pediatric Patients in Eastern China. **Pathogens**, v. 12, n. 4, 1 abr. 2023.
- ZINGG, W.; PITTET, D. Peripheral venous catheters: an under-evaluated problem. **International journal of antimicrobial agents**, v. 34, p. S38-S42, 2009.

ANEXOS

ANEXO I – ARTIGOS PUBLICADOS

ARTIGO 1

Revista: *Future Microbiology*

Qualis: A3 (Ciências biológicas III)

Biosurfactant complexed with arginine has antibiofilm activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Fatima Daiana Dias Barroso^{1,2}, Lisandra Juvêncio da Silva^{1,2}, Helaine Almeida Queiroz^{1,2}, Livia Gurgel do Amaral Valente Sá^{1,2,5}, Anderson Ramos da Silva⁴, Cecília Rocha da Silva^{1,2}, João Batista de Andrade Neto^{1,2,5}, Bruno Coêlho Cavalcanti^{1,3}, Manoel Odorico de Moraes^{1,3}, Aurora Pinazo⁴, Lourdes Pérez⁴ & Hélio Vitoriano Nobre Júnior^{*,1,2}

¹Drug Research & Development Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

²School of Pharmacy, Laboratory of Bioprospection of Antimicrobial Molecules (LABIMAN), Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

³Department of Physiology & Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

⁴Department of Surfactants & Nanobiotechnology, IQAC-CSIC, Barcelona, Spain

⁵Christus University Center (UNICHRISTUS), Fortaleza, CE, Brazil

*Author for correspondence: labelufc@yahoo.com.br

Aim: The present study investigated the antimicrobial effectiveness of a rhamnolipid complexed with arginine (RLMIX_Arg) against planktonic cells and biofilms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Methodology:** Susceptibility testing was performed using the Clinical & Laboratory Standards Institute protocol: M07-A10, checkerboard test, biofilm in plates and catheters and flow cytometry were used. **Result:** RLMIX_Arg has bactericidal and synergistic activity with oxacillin. RLMIX_Arg inhibits the formation of MRSA biofilms on plates at sub-inhibitory concentrations and has antibiofilm action against MRSA in peripheral venous catheters. Catheters impregnated with RLMIX_Arg reduce the formation of MRSA biofilms. **Conclusion:** RLMIX_Arg exhibits potential for application in preventing infections related to methicillin-resistant *S. aureus* biofilms.

First draft submitted: 1 December 2023; Accepted for publication: 1 February 2024; Published online: 22 May 2024

Keywords: biofilms • medical catheter • MRSA • *Staphylococcus aureus* • surfactants

ARTIGO 2

Revista: *Biofouling*

Qualis: A1 (Ciências biológicas III)

BIOFOULING
2024, VOL. 40, NO. 2, 165–176
<https://doi.org/10.1080/08927014.2024.2324028>



Check for updates

Antimicrobial potential of a biosurfactant gel for the prevention of mixed biofilms formed by fluconazole-resistant *C. albicans* and methicillin-resistant *S. aureus* in catheters

Cecília Rocha da Silva^{a,b}, Livia Gurgel do Amaral Valente Sá^{a,b,c}, João Batista de Andrade Neto^{a,b,c}, Fátima Daiana Dias Barroso^{a,b,c}, Vitória Pessoa de Farias Cabral^{a,b}, Daniel Sampaio Rodrigues^{a,b}, Lisandra Juvêncio da Silva^{a,b}, Iri Sandro Pampolha Lima^d, Lourdes Pérez^e, Anderson Ramos da Silva^e, Denise Ramos Moreira^f, Nágila Maria Pontes Silva Ricardo^f and Hélio Vitoriano Nobre Júnior^{a,b}

^aSchool of Pharmacy, Laboratory of Bioprospection in Antimicrobial Molecules (LABIMAN), Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil; ^bCenter of Drug Research and Development, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil; ^cChristus University Center (UNICHRISTUS), Fortaleza, CE, Brazil; ^dDepartment of Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceará, Barbalha, CE, Brazil; ^eDepartment of Surfactants and Nanobiotechnology, IQAC-CSIC, Barcelona, Spain; ^fLaboratory of Polymers and Materials Innovation, Department of Organic and Inorganic Chemistry, Sciences Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

ABSTRACT

Dual-species biofilms formed by *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* have high virulence and drug resistance. In this context, biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* have been widely studied, of which a new derivative (RLmix_Arg) stands out for possible application in formulations. The objective of this study was to evaluate the antibiofilm activity of RLMix_Arg, both alone and incorporated in a gel prepared with Pluronic F-127, against dual-species biofilms of fluconazole-resistant *C. albicans* (FRCA) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in impregnated catheters. Broth microdilution tests, MTT reduction assays of mature biofilms, impregnation of RLMix_Arg and its gel in peripheral venous catheters, durability tests and scanning electron microscopy (SEM) were performed. RLMix_Arg showed antimicrobial activity against *Candida* spp. and *S. aureus*, by reducing the cell viability of mixed biofilms of FRCA and MRSA, and preventing their formation in a peripheral venous catheter. The incorporation of this biosurfactant in the Pluronic F-127 gel considerably enhanced its antibiofilm activity. Thus, RLMix_Arg has potential application in gels for impregnation in peripheral venous catheters, helping to prevent development of dual-species biofilms of FRCA and MRSA.

ARTICLE HISTORY

Received 8 November 2023
Accepted 21 February 2024

KEYWORDS

Biosurfactant; gel; biofilm;
catheter; *Candida albicans*;
Staphylococcus aureus

ANEXO II – RESULTADOS PARA BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

ANEXOII.1: Avaliação da atividade antimicrobiana do RLMIX_Arg isolado e combinado a meropeném e ciprofloxacino frente a cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae*.

Valores de CIM ^a µg/mL							
Cepas	Fonte	ISOLADOS			COMBINADOS		
		RL-MIX-ARG	Meropeném	Ciprofloxacino	RL-MIX-ARG	Meropeném	Ciprofloxacino
<i>E. coli</i> ATCC 8739	ATCC	>1024	0,0625	0,625	>1024	>0,0625	>32
<i>E. coli</i> 1	Urina	>1024	0,0625	32	>1024	>0,0625	>32
<i>E. coli</i> 2	Hemocultura	>1024	0,0625	>32	>1024	>0,0625	>32
<i>E. coli</i> 3	Urina	>1024	0,0625	>32	>1024	>0,0625	>32
<i>E. coli</i> 4	Urina	>1024	0,0625	32	>1024	>0,0625	>32
<i>E. coli</i> 5	Secreção Abcesso	>1024	0,0625	>32	>1024	>0,0625	>32
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	ATCC	>1024	0,0625	0,0625	>1024	>32	>32
<i>K. pneumoniae</i> 1	Urina	>1024	>32	>32	>1024	>32	>32
<i>K. pneumoniae</i> 2	Urina	>1024	>34	>32	>1024	>32	>32
<i>K. pneumoniae</i> 3	Ponta Cateter	>1024	16	>32	>1024	>32	>32
<i>K. pneumoniae</i> 4	Hemocultura	>1024	>32	>32	>1024	>32	>32
<i>K. pneumoniae</i> 5	Urina	>1024	>32	>32	>1024	>32	>32

CIM: Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 99,9% do crescimento visível.

ANEXO III– TABELAS COM DADOS DO EXEL

ANEXOIII.1. Viabilidade celular em isolados de SARM em biofilme formado após 24 horas de exposição ao RLMIX_Arg.

% viabilidade celular					
Cepas	CIM/2	CIM	2x CIM	8x CIM	10xCIM
SARM 1	105,1 ± (0,4)	111,6 ± (1,4)	70,9 ± (6,8)	5,3 ± (0,7)	3,8 ± (0,5)
SARM 2	101,2 ± (8,2)	94,9 ± (2,5)	92,5 ± (1,2)	43,4 ± (3,5)	15,2 ± (3,5)
SARM 4	94,9 ± (2,8)	87,9 ± (2,7)	90,5 ± (2,7)	4,2 ± (1,8)	2,4 ± (0,2)

Os dados correspondem a média ± desvio padrão médio (DPM) de 3 experimentos diferentes.

ANEXOIII.2. Viabilidade celular em isolados de SARM em biofilme formado após 48 horas de exposição ao RLMIX_Arg.

% viabilidade celular					
Cepas	CIM/2	CIM	2x CIM	8x CIM	10xCIM
SARM 1	93,8 ± (4,24)	47,8 ± (7,8)	85,8 ± (3,1)	8,3 ± (0,8)	4,9 ± (4,2)
SARM 2	103,0± 4,9)	64,8 ± (7,4)	60,2 ± (3,7)	47,5 ± (4,2)	30,6± (6,3)
SARM 4	110,7 ± (8,7)	105,9 ± (3,5)	96,7 ± (3,61)	22,4 ± (8,6)	19,1 ± (5,1)

Os dados correspondem a média ± desvio padrão médio (DPM) de 3 experimentos diferentes.

ANEXOIII.3. Viabilidade celular em isolados de SARM em biofilme em formação após 24 horas de exposição ao RLMIX_Arg.

% viabilidade celular					
Cepas	CIM/2	CIM	2x CIM	8x CIM	10xCIM
SARM 1	112,5 ± (4,84)	94,2 ± (3,5)	5,4 ± (3,1)	3,2 ± (0,2)	3,1 ± (0,10)
SARM 2	83,4 ± (8,5)	84,2 ± (6,41)	76,5 ± (6,49)	3,3 ± (0,7)	2,9 ± (0,41)

SARM 4 | $91,9 \pm (9,3)$ $72,4 \pm (9,4)$ $2,1 \pm (0,34)$ $1,9 \pm (0,44)$ $1,6 \pm (0,15)$

Os dados correspondem a média \pm desvio padrão médio (DPM) de 3 experimentos diferentes.

ANEXOIII.4. Viabilidade celular em isolados de SARM em biofilme em formação após 48 horas de exposição ao RLMIX_Arg.

% viabilidade celular					
Cepas	CIM/2	CIM	2x CIM	8x CIM	10xCIM
SARM 1	$91,3 (\pm 2,3)$	$88,2 (\pm 6,2)$	$51,8 \pm (3,8)$	$3,6 (\pm 0,2)$	$3,5 (\pm 0,2)$
SARM 2	$99,2 (\pm 8,2)$	$84,6 (\pm 3,2)$	$76,1 (\pm 4,5)$	$2,9 (\pm 0,4)$	$2,9 (\pm 0,6)$
SARM 4	$104,1 (\pm 8,3)$	$106,2 (\pm 10,1)$	$76,7 (\pm 10,6)$	$9,2 (\pm 5,4)$	$6,1 (\pm 1,3)$

Os dados correspondem a média \pm desvio padrão médio (DPM) de 3 experimentos diferentes.

ANEXOIII.5. Viabilidade celular em isolados de SARM em biofilme em formação após 24 horas de exposição ao RLMIX_Arg em concentrações subinibitórias.

% viabilidade celular				
Cepas	0,5 μ g/mL	1 μ g/mL	2 μ g/mL	4 μ g/mL
SARM 1	$73,4 (\pm 3,8)$	$51,1 (\pm 5,1)$	$48,4 \pm (2,2)$	$73 (\pm 7,6)$
SARM 2	$62,5 (\pm 1,5)$	$46,2 (\pm 4,7)$	$55,2 (\pm 7,7)$	$63,8 (\pm 1,1)$
SARM 4	$79,4 (\pm 9,2)$	$83,4 (\pm 4,1)$	$72,2 (\pm 6,0)$	$98,9 (\pm 2,8)$

Os dados correspondem a média \pm desvio padrão médio (DPM) de 3 experimentos diferentes.

ANEXOIII.6. Contagem Logarítmica de Unidades Formadoras de colônia (UFC/mL) de biofilmes em formação em cateteres com exposição ao RLMIX_Arg por 24h.

Cepas	Controle	CIM/2	CIM	2x CIM	8x CIM	10 x CIM
SARM 1	5,22 ($\pm 0,27$)	5,64 ($\pm 0,31$)	5,71 ($\pm 0,07$)	5,56 ($\pm 0,21$)	5,05 ($\pm 0,02$)	0
SARM 2	5,86 ($\pm 0,04$)	5,74 ($\pm 0,02$)	5,49 ($\pm 0,10$)	5,60 ($\pm 0,16$)	5,16 ($\pm 0,08$)	0

SARM 4	6,09 ($\pm 0,22$)	5,75 ($\pm 0,07$)	5,65 ($\pm 0,04$)	5,75 ($\pm 0,10$)	4,67 ($\pm 0,07$)	0
---------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	---

Os dados correspondem a média \pm desvio padrão médio (DPM) de 3 experimentos diferentes.

ANEXOIII.7. Contagem Logarítmica de Unidades Formadoras de colônia (UFC/mL) de biofilmes formados em cateteres após exposição ao RLMIX_Arg por 24h.

Cepas	Controle	CIM/2	CIM	2x CIM	8x CIM	10 x CIM
SARM 1	5,68 ($\pm 0,06$)	4,32 ($\pm 0,09$)	5,55 ($\pm 0,04$)	5,38 ($\pm 0,30$)	3,40 ($\pm 0,39$)	3,84 ($\pm 0,01$)
SARM 2	6,09 ($\pm 0,22$)	5,75 ($\pm 0,07$)	5,65 ($\pm 0,04$)	5,75 ($\pm 0,10$)	4,67 ($\pm 0,07$)	0
SARM 4	5,73 ($\pm 0,06$)	5,31 ($\pm 0,06$)	5,17 ($\pm 0,07$)	5,20 ($\pm 0,05$)	3 (± 0)	3 (± 0)

Os dados correspondem a média \pm desvio padrão médio (DPM) de 3 experimentos diferentes.

ANEXOIII.8. Contagem Logarítmica de Unidades Formadoras de colônia (UFC/mL) de biofilmes formados em cateteres após impregnação com RLMIX_Arg.

Cepas	Controle	CIM/2	CIM	2x CIM	8x CIM	10 x CIM	4 mg	8mg
SARM 1	5,69 ($\pm 1,07$)	5,69 ($\pm 1,68$)	5,06 ($\pm 2,15$)	5,31 ($\pm 1,03$)	5,017 ($\pm 0,15$)	5,01 ($\pm 0,73$)	4,17 ($\pm 0,80$)	5,06 ($\pm 0,10$)
SARM 2	5,692 ($\pm 2,16$)	5,62 ($\pm 0,49$)	5,47 ($\pm 1,75$)	5,37 ($\pm 1,46$)	6,07 ($\pm 2,13$)	5,57 ($\pm 1,03$)	3,60 ($\pm 0,10$)	5,10 ($\pm 1,46$)
SARM 4	5,77 ($\pm 2,46$)	5,90 ($\pm 1,20$)	5,55 ($\pm 2,39$)	5,72 ($\pm 0,90$)	5,77 ($\pm 1,76$)	5,76 ($\pm 1,07$)	4,43 ($\pm 1,13$)	5,11 ($\pm 1,33$)

Os dados correspondem a média \pm desvio padrão médio (DPM) de 3 experimentos diferentes.

ANEXOIII.9. Porcentagem de Biomassa em isolados de SARM em biofilme formado após exposição ao RLMIX_Arg

Cepas	% Biomassa				
	CIM/2	CIM	2x CIM	8x CIM	10xCIM
SARM 1	111,2 (\pm 9,2)	101,6(\pm 2,6)	104,7 \pm (4,5)	125 (\pm 2,6)	87,0 (\pm 7,7)
SARM 2	73,7 (\pm 5,7)	82,4 (\pm 9,1)	92,0 (\pm 9,43)	79,6 (\pm 8,3)	68,0 (\pm 8,9)
SARM 4	83,3 (\pm 2,4)	72,9 (\pm 7,8)	84,1 (\pm 5,4)	71,7 (\pm 8,8)	76,3 (\pm 8,37)

Os dados correspondem a média \pm desvio padrão médio (DPM) de 3 experimentos diferentes.

ANEXOIII.10. Porcentagem de Biomassa de biofilmes de SARM após tratamento da placa de poliestireno com RLMIX_Arg.

Cepas	% Biomassa				
	CIM/2	CIM	2x CIM	8x CIM	10xCIM
SARM 1	100 (\pm 7,9)	90,6(\pm 9,4)	80,1 \pm (4,0)	68,3 (\pm 5,8)	83,6 (\pm 9,3)
SARM 2	55,3 (\pm 3,1)	59,9 (\pm 6,6)	53,5 (\pm 9,2)	66,3 (\pm 9,2)	74,1(\pm 9,9)
SARM 4	74,2 (\pm 1,5)	103,2 (\pm 9,2)	84,2 (\pm 9,9)	93,3 (\pm 9,7)	88,6 (\pm 3,21)

Os dados correspondem a média \pm desvio padrão médio (DPM) de 3 experimentos diferentes.

ANEXOIII.11. Porcentagem de células de SARM iodeto de propídio positivas após tratamento com diferentes concentrações de RLMIX_Arg.

% células PI positivas						
Cepas	Controle	Oxacilina	CIM/2	CIM	2xCIM	RL-Mix-Arg (8ug) + Oxa (32ug)
SARM 1	3,13 (\pm 1,57)	63,31 (\pm 2,56)	13,03 (\pm 1,44)	27,72 (\pm 4,64)	45,31 (\pm 4,87)	84,54 (\pm 2,80)
SARM 2	2,38 (\pm 1,11)	38,41 (\pm 5,42)	18,20 (\pm 2,93)	34,42 (\pm 7,62)	45,46 (\pm 6,32)	61,69 (\pm 3,32)
SARM 4	2,24 (\pm 0,13)	44,17 (\pm 2,66)	20,73 (\pm 1,86)	35,83 (\pm 3,21)	48,38 (\pm 6,33)	64,51 (\pm 1,85)

Os dados correspondem a média \pm desvio padrão médio (DPM) de 3 experimentos diferentes

ANEXOIII.12. Porcentagem de células de SARM TUNEL positivas após tratamento com diferentes concentrações de RLMIX_Arg.

% células TUNEL positivas						
Cepas	Controle	Oxacilina	CIM/2	CIM	2xCIM	RL-Mix-Arg (8ug) + Oxa (32ug)
SARM 1	1,92 (\pm 1,09)	58,49(\pm 4,55)	17,31 (\pm 4,13)	32,46 (\pm 4,85)	41,07 (\pm 7,30)	70,22 (\pm 2,75)
SARM 2	2,55 (\pm 0,26)	47,27 (\pm 4,91)	14,33 (\pm 2,40)	29,27 (\pm 4,74)	41,35 (\pm 3,20)	65,94 (\pm 3,63)
SARM 4	3,99 (\pm 0,60)	46,98 (\pm 4,06)	13,81 (\pm 2,52)	27,21 (\pm 4,00)	37,72 (\pm 5,99)	61,35 (\pm 3,84)

Os dados correspondem a média \pm desvio padrão médio (DPM) de 3 experimentos diferentes

ANEXOIII.13. Porcentagem de viabilidade celular em biofilmes mistos de SARM e *C. albicans* em placas de poliestireno tratados com diferentes concentrações de RLMIX_Arg.

Combinações de cepas	% Viabilidade Celular				
	CIM	2x CIM	4x CIM	8x CIM	16x CIM
SARM 1 + <i>C. albicans</i> 1	70,07 (± 3,92)	63,62 (± 2,00)	54,26 (± 0,86)	32,73 (± 4,80)	24,20 (± 3,78)
SARM 2 + <i>C. albicans</i> 2	66,80 (± 2,48)	48,92 (± 6,25)	35,90 (± 1,57)	27,06 (± 0,96)	18,00 (± 4,01)

Os dados correspondem a média ± desvio padrão médio (DPM) de 3 experimentos diferentes

ANEXOIII.14. Contagem de Unidades Formadoras de colônias de biofilmes mistos de SARM e *C. albicans* formados em cateteres venosos periféricos impregnados com RLMIX_Arg 10mg/mL.

SARM 1	24H	07 DIA	14 DIA	21 DIA	28 DIA
CONTROLE 24H	10000	14000	24000	14000	15000
TRATAMENTO	0	0	0	0	1000
CONTROLE 48H	14000	15000	29000	16000	19000
TRATAMENTO	0	0	1000	1000	4000
<i>C. albicans</i> 1	24H	07 DIA	14DIA	21 DIA	28 DIA
CONTROLE 24H	5000	22000	24000	29000	18000
TRATAMENTO	2000	2000	0	0	1000
CONTROLE 48H	6000	23000	24000	29000	21000
TRATAMENTO	2000	2000	0	1000	4000
SARM 2	24H	07 DIA	14DIA	21 DIA	28 DIA
CONTROLE 24H	51000	4,732394	59000	54000	155000
TRATAMENTO	0	0	0	4000	7000
CONTROLE 48H	51000	4,732394	66000	70000	157000
TRATAMENTO	0	0	1000	5000	8000
<i>C. albicans</i> 2	24H	07 DIA	14 DIA	21DIA	28 DIA
CONTROLE 24H	41000	56000	61000	24000	150000
TRATAMENTO	3000	10000	0	5000	8000
CONTROLE 48H	41000	57000	63000	26000	155000
TRATAMENTO	4000	10000	1000	7000	8000

Os dados correspondem a média \pm desvio padrão médio (DPM) de 3 experimentos diferentes

ANEXOII.15. Contagem de Unidades Formadoras de colônias de biofilmes mistos de SARM e *C. albicans* formados em cateteres impregnados com gel Pluronic F-127 + RLMIX_Arg.

SARM 1	24H	07 DIA	14DIA	21 DIA	28 DIA
CONTROLE 24H	58000	36000	76000	20000	56000
TRATAMENTO	0	15000	3000	9000	0
CONTROLE 48H	58000	38000	79000	21000	58000
TRATAMENTO	1000	15000	9000	11000	1000
C. albicans 1	24H	07 DIA	14DIA	21 DIA	28 DIA
CONTROLE 24H	77000	13000	28000	21000	35000
TRATAMENTO	0	0	1000	5000	0
CONTROLE 48H	79000	13000	29000	22000	38000
TRATAMENTO	1000	0	1000	3000	0
SARM 2	24H	07 DIA	14DIA	21 DIA	28 DIA
CONTROLE 24H	213000	71000	63000	30000	130000
TRATAMENTO	0	2000	1000	0	0
CONTROLE 48H	215000	71000	70000	32000	132000
TRATAMENTO	0	2000	2000	1000	1000
C. albicans 2	24H	07 DIA	14 DIA	21DIA	28 DIA
CONTROLE 24H	14000	63000	154000	23000	182000
TRATAMENTO	0	1000	7000	0	44000
CONTROLE 48H	14000	65000	172000	28000	185000
TRATAMENTO	0	2000	7000	1000	46000

Os dados correspondem a média \pm desvio padrão médio (DPM) de 3 experimentos diferentes