



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITO SINÉRGICO DE COMPLEXOS DE
RUTÊNIO FOTOIRRADIADOS CONTRA CÉLULAS PLANCTÔNICAS E
BIOFILMES DE *Staphylococcus* spp.**

JESSICA BARROS ARRAIS CRUZ LOPES

FORTALEZA – CE

2022

JESSICA BARROS ARRAIS CRUZ LOPES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITO SINÉRGICO DE COMPLEXOS DE
RUTÊNIO FOTOIRRADIADOS CONTRA CÉLULAS PLANCTÔNICAS E
BIOFILMES DE *Staphylococcus* spp.**

**Dissertação apresentado à Banca do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Médica da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal do
Ceará, como pré-requisito parcial do
processo de seleção para o nível Mestrado do
referido Programa.**

**Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda
Teixeira**

**Co-orientador: Dr. Mayron Alves de
Vasconcelos**

FORTALEZA – CE

2022

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)

- L853a Lopes, Jessica Barros Arrais Cruz.
Atividade antimicrobiana e efeito sinérgico de complexos de rutênio fotoirradiados contra células planctônicas e biofilmes de *Staphylococcus* spp. / Jessica Barros Arrais Cruz Lopes. – 2022.
58 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.
Coorientação: Prof. Dr. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos .
1. Resistência antimicrobiana. 2. Complexos de rutênio. 3. Terapia fotodinâmica. 4. Biofilme. I. Título.

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus que esteve do meu lado durante todas as adversidades e que me deu força e saúde para prosseguir.

Agradeço a minha família, Daniela, Nelson, Flávio, Renata, Anna Cecília, Matheus, Lia, Rodrigo, meus avós, tios e primos, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram. Em especial a minha mãe, Daniela, e ao meu noivo, Rodrigo, que são meu porto seguro e estiveram ao meu lado me dando apoio e puxões de orelha quando era necessário.

Aos meus amigos, Regina, Isabelle, Louise, Vanessa, Diego, Ismael, Anna Beatriz, Marina, que me acalmavam falando besteira quando minha cabeça estava cheia de estresse.

Aos meus colegas do LIBS, especialmente Aryane e Léo, que tanto me ensinaram e ajudaram durante todo o mestrado.

Ao doutorando, Alexandre, que me ensinou todas as metodologias, que esteve comigo em várias cadeiras, me ajudou quando tive problemas de saúde e foi de extrema importância para a conclusão da minha dissertação.

Ao meu orientador e coorientador, Edson e Mayron, que, com muita paciência, me ajudaram a crescer como cientista e pessoa, me incentivam a melhorar cada vez mais.

A coordenação do curso de pós graduação em Microbiologia Médica e veterinária, que estava sempre preparada para tirar dúvidas e resolver problemas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A resistência antimicrobiana é um problema crítico de saúde pública global. Muitas infecções bacterianas estão associadas a capacidade que os microrganismos tem de formarem biofilmes, o que é essencial para colonização dos mais diversos ambientes, além de conferirem altos níveis de resistência. Frente a este problema, a descoberta de novas classes de moléculas que apresentem efeito antimicrobiano, constitui-se como um alvo a ser atingido. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana, antibiofilme e efeito sinérgico de complexos de rutênio $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$, denominados de Ru-P e Ru-B, e seus efeitos combinados com antibióticos contra as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984. Para determinar a atividade antibacteriana, 100 μL de complexo de rutênio em diferentes concentrações (250- 1,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima, e (125- 1,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$), para os demais ensaios de quantificação de biomassa (CV) e contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), foram distribuídos em placas de 96 poços de fundo plano não irradiado, para ensaios de CIM, e irradiado com LED azul por 60 minutos. Para testar a citotoxicidade dos complexos, foram utilizadas linhagens de fibroblastos murinos, L929, juntamente com diferentes concentrações dos complexos (125- 1,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e avaliados por 24, 48 e 72 horas. O efeito antimicrobiano dos complexos de rutênio foi avaliado pela CIM e pela CBM. Para realização do efeito da combinação entre complexos e antibióticos, os valores da CIM foram combinados com os antibióticos ampicilina e tetraciclina e seus efeitos foram avaliados utilizando a técnica *checkboxboard*. A atividade antibiofilme dos complexos Ru-P e de Ru-B foi verificada sobre a formação de biofilme e biofilmes pré-formados através da quantificação da biomassa pelo método de coloração com cristal violeta (CV) e pelo número de células viáveis dos biofilmes por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os complexos Ru-P e Ru-B exibiram diferenças na atividade antimicrobiana entre irradiados com LED azul, com valores de CIM e CBM variando entre 1,9 e 3,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e não irradiados com valores de CIM variando entre 15,6 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O efeito sinérgico contra *Staphylococcus* spp. foi observado quando estes complexos foram combinados com a ampicilina e tetraciclina, exibindo valores de Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) que variam de 0,125 a 1,0. Em relação a atividade sobre formação de biofilmes, os complexos foram capazes de reduzir a biomassa em mais de 30% na concentração de 1,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 100% na concentração de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O número de células viáveis dos biofilmes foi reduzido entre 1,5 a 8 logs. Em relação a atividade sobre biofilmes pré formados, os complexos foram capazes de reduzir a biomassa de 12 a 41 % na maior concentração testada. O número de células viáveis dos biofilmes teve redução menor que 1 log. O complexo Ru-P apresentou citotoxicidade maior que 50%, nas concentrações acima de 31,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e acima de 30%, nas concentrações de 125 a 62,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nos tempos de exposição testados, 24, 48 e 72 horas. O complexo Ru-B apresentou citotoxicidade abaixo de 50% em todas as concentrações testadas e em todos os tempos de exposição testados. Os complexos de rutênio mostraram atividade antimicrobiana e antibiofilme contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e apresentaram efeito sinérgico quando combinados com antibióticos ampicilina e tetraciclina. Esses resultados demonstram que os complexos de rutênio testados neste estudo, possuem potencial que poderá auxiliar terapias destinadas ao tratamento de infecções bacterianas causadas por *Staphylococcus* spp.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana; complexos de rutênio; Terapia fotodinâmica; Biofilme.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a critical global public health problem. Many bacterial infections are associated with the ability of microorganisms to form biofilms, which is essential for colonization of the most diverse environments, in addition to conferring high levels of resistance. Faced with this problem, the discovery of new classes of molecules that have an antimicrobial effect constitutes a target to be achieved. The aim of this study was to evaluate the antibacterial, antibiofilm and synergistic effect of ruthenium complexes $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$, called Ru-P and Ru-B, and their combined effects with antibiotics against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 strains. To determine antibacterial activity, 100 μL of ruthenium complex in different concentrations (250-1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration, and (125-1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$), for the other biomass quantification (CV) and Colony Forming Units counts (UFC), were distributed in non-irradiated flat-bottomed 96-well plates for MIC assays, and irradiated with blue LED for 60 minutes. To test the cytotoxicity of the complexes, strains of murine fibroblasts, L929, were used together with different concentrations of the complexes (125-1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and evaluated for 24, 48 and 72 hours. The antimicrobial effect of ruthenium complexes was evaluated by CIM and CBM. To realize the effect of the combination between complexes and antibiotics, the MIC values were combined with the antibiotics ampicillin and tetracycline and their effects were evaluated using the checkboard technique. The antibiofilm activity of the Ru-P and Ru-B complexes was verified on the formation of biofilms and preformed biofilms by quantifying the biomass by the crystal violet (CV) staining method and by the number of viable cells of the biofilms by means of colony forming units (CFU) counts. The Ru-P and Ru-B complexes exhibited differences in antimicrobial activity between irradiated with blue LED, with MIC and CBM values ranging between 1.9 and 3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and non-irradiated with MIC values ranging between 15, 6 and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The synergistic effect against *Staphylococcus* spp. was observed when these complexes were combined with ampicillin and tetracycline, exhibiting Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) values ranging from 0.125 to 1.0. Regarding the activity on biofilm formation, the complexes were able to reduce biomass by more than 30% at a concentration of 1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 100% at a concentration of 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The number of viable cells of biofilms was reduced between 1.5 and 8 logs. Regarding the activity on pre-formed biofilms, the complexes were able to reduce the biomass from 12 to 41% at the highest concentration tested. The number of viable cells in the biofilms was reduced by less than 1 log. The Ru-P complex presented cytotoxicity greater than 50%, at concentrations above 31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and above 30%, at concentrations from 125 to 62.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, at the tested exposure times, 24, 48 and 72 hours. The Ru-B complex showed cytotoxicity below 50% at all tested concentrations and at all tested exposure times. The ruthenium complexes showed antimicrobial and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, and showed a synergistic effect when combined with ampicillin and tetracycline antibiotics. These results demonstrate that the ruthenium complexes tested in this study have the potential to help therapies for the treatment of bacterial infections caused by *Staphylococcus* spp.

Keywords: Antimicrobial resistance, ruthenium complex, photodynamic therapy, biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da formação do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
Figura 2: Eventos para dispersão do biofilme.....	15
Figura 3: Atividade metabólica em um biofilme	15
Figura 4: As dez principais causas de morte nos Estados Unidos em 1900 e 1997.	17
Figura 5: Resistência a antibióticos do <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Figura 6: Consumo de antibióticos em gado no mundo (2013).....	19
Figura 7: Mecanismos de resistência bacteriana.....	20
Figura 8: Estrutura da cisplatina e sua ligação ao DNA.	22
Figura 9: Mecanismo da Terapia Fotodinâmica.	24
Figura 10: Esquematização dos testes de associação entre o complexo de rutênio e os antibióticos.	29
Figura 11: Efeito do complexo Ru-P sobre formação de biofilmes de <i>S.aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	40
Figura 12: Efeito do complexo Ru-B sobre formação de biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	41
Figura 13: Efeito do complexo Ru-P sobre biofilmes pré-formados de <i>S.aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	42
Figura 14: Efeito do complexo Ru-B sobre biofilmes pré-formados de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	43
Figura 15: Eletromicrografias da atividade antibiofilme dos complexos de rutênio sobre a cepa <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984 tratados por 24 horas.	44
Figura 16: Efeito do complexo de rutênio Ru-P sobre fibroblastos murinos (L929).	45
Figura 17: Efeito do complexo de rutênio Ru-B sobre fibroblastos murinos (L929).....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos complexos de rutênio e antibióticos ampicilina e tetraciclina sobre bactérias Gram-positivas	37
Tabela 2	– Efeito do complexo Ru-P associado aos antibióticos ampicilina (AMP) e tetraciclina (TETRA), sobre cepas de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	36
Tabela 3	– Efeito do complexo Ru-B associado aos antibióticos ampicilina (AMP) e tetraciclina (TETRA), sobre <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Infecções humanas associadas com a formação de biofilmes e microrganismos comumente envolvidos	17
Quadro 2	- Bactérias padrão para estudos de suscetibilidade	28
Quadro 3	-Estrutura dos complexos de rutênio.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Ampicilina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ANOVA	Análise de Variância
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDDEP	<i>Center for Disease for Dynamics, Economics & Policy</i>
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CV	Cristal Violeta
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O	Densidade Óptica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GSH	Glutathiona Reduzida
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
MHB	<i>Miller Hinton Broth</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PMS	<i>Phenazine Methosulfate</i>
RAM	Resistência Antimicrobiana
SPE	Substância Polimérica Extracelular
TETRA	Tetraciclina
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Biofilmes e Resistência antimicrobiana	13
2.2. Bactérias do gênero <i>Staphylococcus</i> spp.	20
2.3. Complexos de rutênio	22
2.4. Terapia fotodinâmica	24
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo Geral	26
3.2. Objetivos Específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Microrganismos	27
4.2. Síntese dos complexos de rutênio	28
4.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)	28
4.4. Avaliação do efeito dos complexos de rutênio associados a antibióticos	28
4.5. Avaliação do efeito dos complexos de rutênio sobre formação do biofilme	30
4.6. Avaliação sobre o efeito dos complexos de rutênio sobre biofilmes pré-formados	31
4.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
4.8. Ensaio de citotoxicidade sobre fibroblastos	32
4.8.1. Linhagens celulares e condições de cultura	32
4.8.2. Ensaio de viabilidade celular	32
4.9. Análise estatística	33
5. RESULTADOS	34
5.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)	34
5.2. Avaliação do efeito combinado dos complexos de rutênio com antibióticos	36
5.3. Efeito dos complexos de rutênio sobre a formação de biofilmes	39
5.4. Efeito dos complexos de rutênio sobre biofilmes pré-formados	41
5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura	43
5.6. Ensaio sobre viabilidade celular dos complexos de rutênio em fibroblastos murinos	44
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÕES	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

.1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a resistência a antimicrobianos é um problema de saúde pública sendo uma das 10 ameaças sanitárias que põem em risco a população mundial. Resistência antimicrobiana ocorre quando bactéria, vírus, fungos e/ou parasitas, mudam com o tempo e não respondem mais aos antimicrobianos, deixando as infecções difíceis de serem tratadas e aumentando o risco da doença se tornar severa ou, levar a morte (WHO, 2021). A resistência antimicrobiana é um problema complexo que dificulta ou impossibilita o tratamento de pacientes, levando a uma maior taxa de mortalidade e altos custos para a saúde pública (WHO, 2014).

A formação de biofilme é uma forma de resistência bacteriana bastante estudada, essa comunidade microbiana tem como característica a imobilidade, colonizar e crescer na superfície de implantes médicos, como suturas, catéteres, e produção de uma substância polimérica extracelular (SPE), também chamada matriz, na qual estão inseridas (SULISTYANI *et al.*, 2016; SHARMA; MISBA; KHAN, 2019). A matriz confere proteção às células microbianas para tolerar condições de estresse e também resistir à ação de antibióticos, o que leva à resistência aos antimicrobianos (SHARMA; MISBA; KHAN, 2019). Aproximadamente 80% das infecções crônicas e recorrentes no ser humano são devido aos biofilmes microbianos, como periodontite, infecções crônicas do trato urinário, otite média crônica. O tratamento de infecções causadas por biofilmes são necessárias estratégias diferentes pois os microrganismos em biofilmes apresentam um modo de vida que permite sua sobrevivência em um ambiente hostil (DUFOUR; LEUNG; LÉVESQUE, 2012; SHARMA; MISBA; KHAN, 2019).

Acompanhar o ritmo da resistência a multidrogas encontrado nas infecções bacterianas se torna uma atividade difícil de ser realizada (FREI *et al.*, 2020). Poucos novos antibióticos têm sido descobertos ou desenvolvidos. Em 2019, a Organização Mundial da Saúde identificou 32 antibióticos em desenvolvimento clínico específicos para a lista de patógenos prioridades e apenas 6 foram considerados inovadores (WHO, 2021).

Com o objetivo de diminuir o número de mortes causadas por infecções bacterianas, e devido à preocupação global de uma era pós-antibiótico, várias pesquisas tem sido realizadas com o objetivo de descobrir e/ou desenvolver novas moléculas com ação antimicrobiana (WHO, 2014). Assim, os metalocompostos tem se destacado uma vez que alguns apresentam claramente atividade antimicrobiana (AMINOV, 2010; FREI *et al.*, 2020).

Vários complexos metálicos com diferentes centros de íons metálicos (principalmente elementos de metal de transição), e ligados a diversas estruturas, foram sintetizados e suas atividades antimicrobianas estudadas (FREI *et al.*, 2020). Além disso, complexos metálicos tem acesso a modos únicos de ação: troca ou liberação de ligante, geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), ativação redox e geração catalítica de espécies tóxicas ou depleção de substratos essenciais (FREI *et al.*, 2020). Os complexos de rutênio têm um modo de ação complexo, que envolve múltiplos mecanismos que agem em sinergia. O conhecimento que se tem hoje, sugere que sua atividade contra as células microbianas é baseada na sua capacidade de interagir com alvos intracelulares, causar estresse oxidativo, interagir com material genético e causar danos nas membranas celulares (MUTEANU; UIVAROS, 2021).

Diversos sistemas metálicos apresentam capacidade de se ligar fortemente a ácidos nucleicos e proteínas, os complexos baseados em rutênio são bastante estudados e alguns exibem atividades biológicas promissoras, como atividade antimicrobiana, antiparasitária e anticâncer (GILL; THOMAS, 2012; PRAKASH *et al.*, 2018). Além disso, os complexos de rutênio podem atuar como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica, reação fotoquímica que envolve o consumo de O₂. A terapia fotodinâmica envolve luz e uma substância química fotossensibilizadora que, junto com oxigênio molecular, gera oxigênio singleto e outras EROs (SOUTHAM *et al.*, 2017; MUTEANU; UIVAROS, 2021). Essa terapia tem sido usada contra uma variedade de patógenos microbianos, vírus, bactérias e fungos, e se baseia na habilidade do composto, fotossensibilizador de gerar oxigênio singleto e outros EROs sob irradiação, causando a inativação bacteriana (SOLIMAN *et al.*, 2020). Diante disso, é de suma importância que sejam feitas mais pesquisas para buscar novos compostos com efeitos antimicrobianos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biofilmes e Resistência antimicrobiana

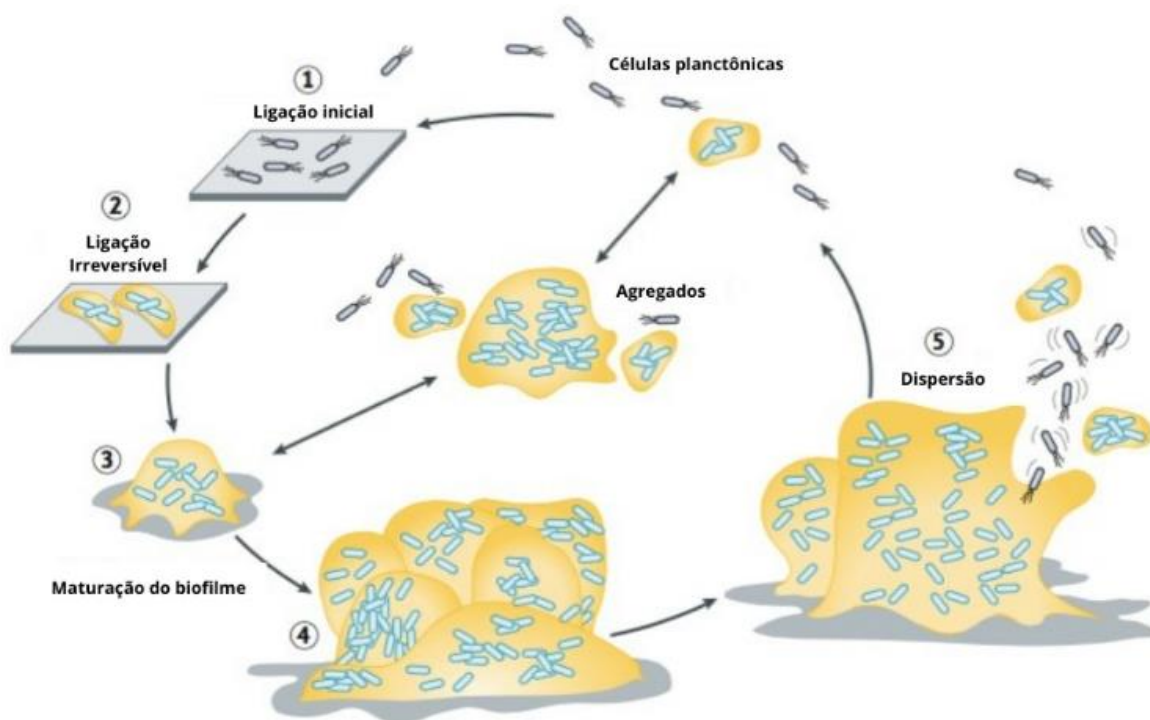
Bactérias podem viver de maneira planctônica, livres no ambiente, ou sésseis, em biofilmes, comunidades estruturadas presas a uma superfície e imersa em uma matriz polimérica autoproduzida (RUMBAUGH; SAUER, 2021).

Na maior parte dos biofilmes, os microrganismos conferem apenas 10% da massa, 90% do restante da massa é oriundo da matriz. A matriz é responsável por manter a coesão, proximidade entre as células, facilitando as interações e comunicação entre elas, centro de reciclagem, mantendo os componentes de células lisadas disponíveis, incluindo DNA, que pode agir como reservatório de genes para transferência horizontal, além de, proteger as células contra dessecação, oxidação, antibióticos, defesa imune do hospedeiro (FLEMMING; WINGENDER, 2012). Davies (2003), reportou que biofilmes são de 10 a 1000 vezes mais tolerantes a vários antibióticos quando comparados aos seus exemplares planctônicos.

A comunicação entre as células do biofilme é muito importante para a realização de vários comportamentos sociais complexos. O "*quorum-sensing*" é um tipo de sinalização célula-célula que ativa vários processos celulares, liberando moléculas sinalizadoras chamadas autoindutoras (CARRADORI, 2020).

O desenvolvimento do biofilme inicia com a ligação de células bacterianas a superfície, mediado por adesinas e alguns produtos da matriz, devido a um aumento no nível intracelular de c-di-GMP, molécula que atua como mensageiro intracelular; (2) formação de colônias, que difere entre espécies e da nutrição que essas células recebem; (3) maturação do biofilme, tem a formação de canais de água e poros, cujo objetivo é fornecer nutrientes e gases para todas as células do biofilme e remoção de produtos residuais, e (4) dispersão do biofilme (MITCHELL; ZARNOWSKI; ANDES, 2016; GHANNOUM *et al.*, 2020) (Figura 1).

Figura 1: Esquema da formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Adaptado de RUMBAUGH E SAUER, 2021.

A dispersão do biofilme é um evento ativo em que células de biofilme enclausuradas em uma matriz que se convertem em massa para a forma de crescimento planctônico (Figura 2). Esse escape do biofilme parece ser impulsionado pelo acentuado gradiente de concentração de nutrientes, oxigênio e produtos residuais, durante o desenvolvimento do biofilme, acontece acúmulo de moléculas que são capazes de induzir a dispersão como também contribuem para a formação de subpopulações no interior do biofilme (RUMBAUGH; SAUER, 2021).

Figura 2: Eventos para dispersão do biofilme.

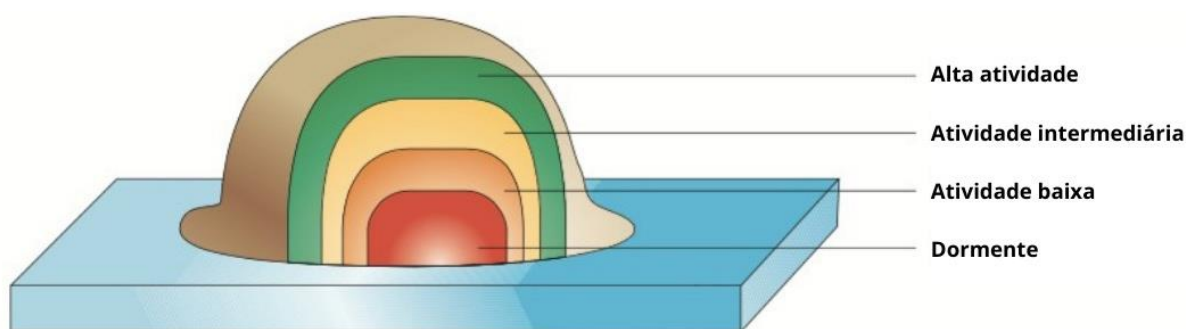


Fonte: Adaptado de RUMBAUGH E SAUER, 2021.

Estudos mostram que nas fases iniciais de desenvolvimento do biofilme todas as células são muito ativas, isso decai quando a colônia aumenta, células no centro de colônias maiores tem taxas metabólicas menores quando comparada com células perto da superfície, isso indica que a disponibilidade de nutrientes pode ser um fator crucial na atividade metabólica (DAVIES, 2003) (Figura 3). Essas células não são mutantes resistentes a antibióticos, apenas são variantes fenotípicas do tipo selvagem formada estocásticamente em uma população de células geneticamente idênticas (LEVIN; ROZEN, 2006).

Nos biofilmes, a formação de células persistentes é um mecanismo de tolerância a antibióticos, essas células especializadas entram em estado de dormência, o que permite a sobrevivência mesmo em condições de estresse e previne sua morte pois os antimicrobianos agem geralmente na fase de crescimento bacteriano, como síntese proteica, síntese de ácidos nucleicos e formação de parede celular (STEWART, 2002; LEWIS, 2012; DUFOUR, LEUNG, LÉVESQUE, 2012).

Figura 3: Atividade metabólica em um biofilme



Fonte: Adaptado de DAVIES, 2003.

Aproximadamente 80% das infecções crônicas e recorrentes no corpo humano são devido à biofilmes bacterianos (MAH *et al.*, 2012) (Quadro 1). Grande parte de infecções adquiridas em hospitais são devido aos biofilmes, pois podem colonizar aparelhos médicos, como respiradores, cateteres, valvas prostéticas e aparelho ortopédicos (DUFOUR; LEUNG; LÉVESQUE, 2012). Os gêneros estafilococos e enterococcos são habitantes comensais da flora bacteriana humana da pele, trato genitourinário, trato respiratório superior, trato gastrointestinal, por isso, são mais comuns de serem encontrados colonizando aparelhos médicos (EBREY *et al.*, 2004).

Quadro 1 – Infecções humanas associadas com a formação de biofilmes e microrganismos comumente envolvidos.

TIPO DE INFECÇÃO	MICROORGANISMO	REFERÊNCIAS
Cárie dental	<i>Streptococcus parasanguinis</i> , <i>Streptococcus mutans</i>	Zijinge <i>et al.</i> , (2010)
Periodontites	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Marsh <i>et al.</i> , (2011)
Fibrose cística	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bjarnsholt <i>et al.</i> , (2011)
Otite média crônica	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hall-Stootle <i>et al.</i> , (2006)
Infecções urinárias	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Nickel & Costerton (1992)
Endocardites	<i>Staphylococcus aureus</i>	Moter (2010)
Artrite séptica aguda	<i>Staphylococcus aureus</i>	Chole & Faddis (2003)
Prostatite crônica	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Li <i>et al.</i> , (2011)

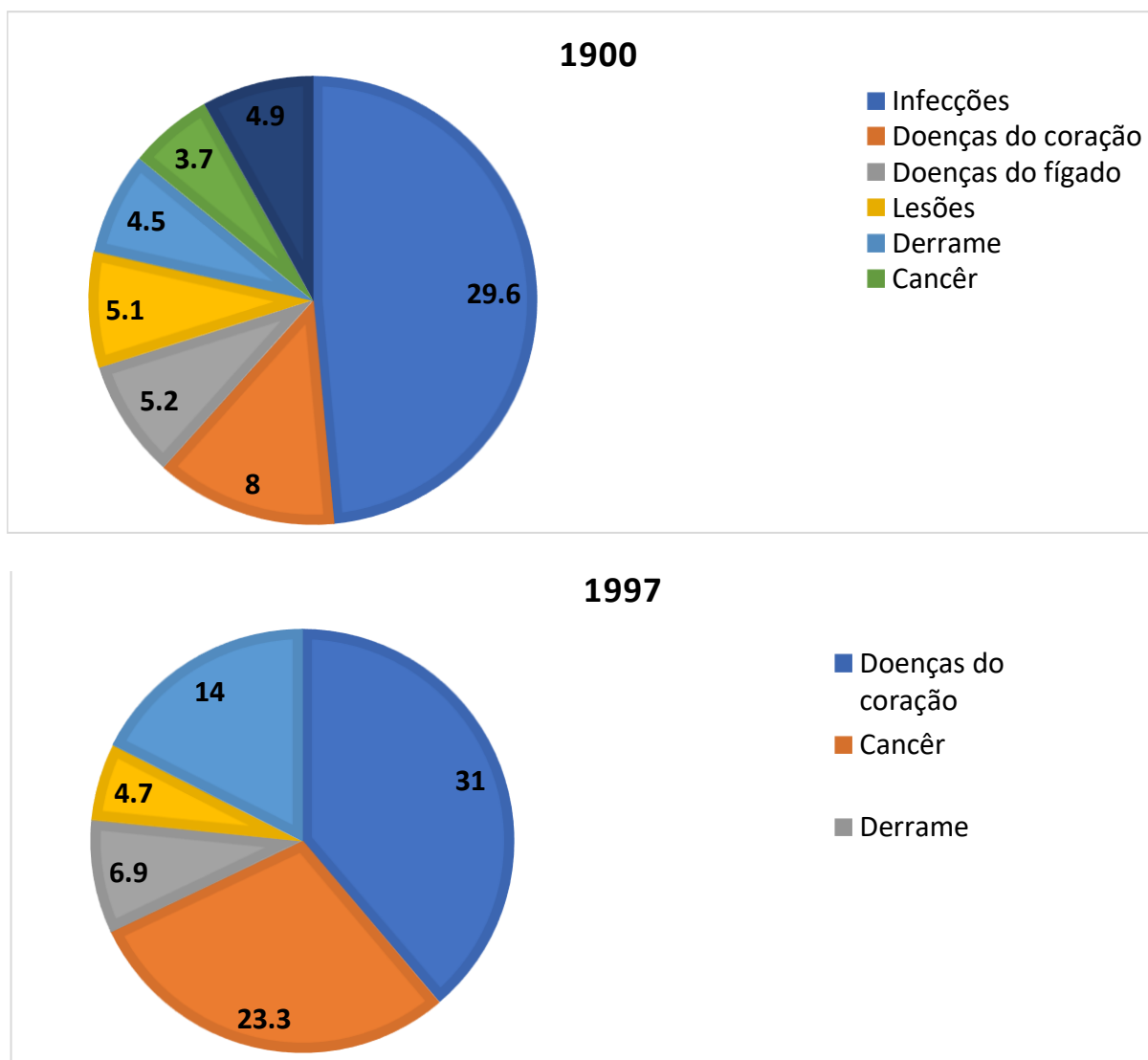
Fonte: Adaptado de HALL-STOOTLE *et al.*, (2012).

Os biofilmes tem como característica significativa a alta tolerância a drogas. Embora o antibiótico reduza o número de células bacterianas, ele não consegue erradicar completamente o patógeno, isso leva a uma infecção recorrente. A tolerância de biofilmes depende da espécie de bactéria, estado fisiológico das células do biofilme, indução de

mecanismos específicos de resistência e desenvolvimento de células persistentes (DUFOUR; LEUNG; LÉVESQUE, 2012).

Resistência dos biofilmes aos antibióticos é um dos fatores que contribui para o surgimento de infecções crônicas (SHARMA; MISHA; KHAN, 2019). Antibióticos são uma das ferramentas mais poderosas na luta contra infecções que ameaçam a vida humana (Figura 4). A descoberta desses compostos transformou a saúde humana e animal, contudo, voltamos a viver em uma era em que pessoas em todo o mundo estão morrendo de infecções não tratáveis por causa da emergência e propagação de resistência a antibióticos (CDC, 2019). morrendo de infecções não tratáveis por causada emergência e propagação de resistência a antibióticos (CDC, 2019).

Figura 4: As dez principais causas de morte nos Estados Unidos em 1900 e 1997.

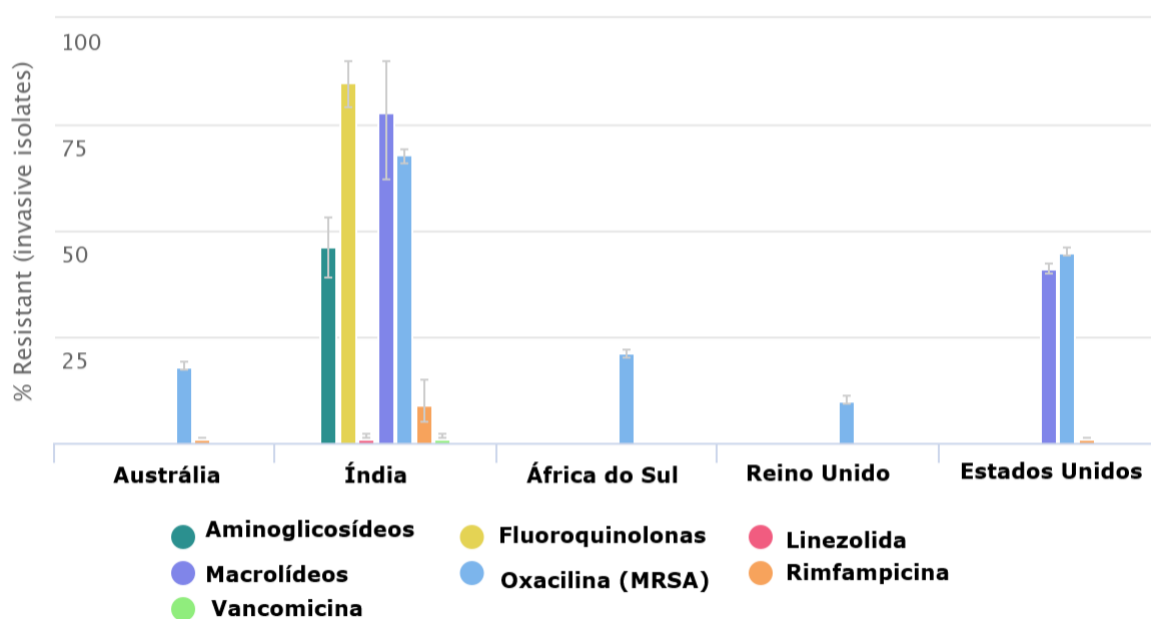


Fonte: Modificado de COHEN, 2000.

A resistência a antimicrobianos já foi descrita como uma pandemia silenciosa que resulta em milhões de mortes, grande sofrimento e aumento nos custos com saúde, além de perdas de vidas animais, efeitos severos no meio de sustento das pessoas e perda de segurança de alimentos (WHO *et al.*, 2021).

Segundo a CDC, mais de 2,8 milhões de infecções resistentes a antibióticos acontecem por ano nos Estados Unidos, resultando em 35 000 mortes (Figura 5).

Figura 5: Resistência a antibióticos do *Staphylococcus aureus*.



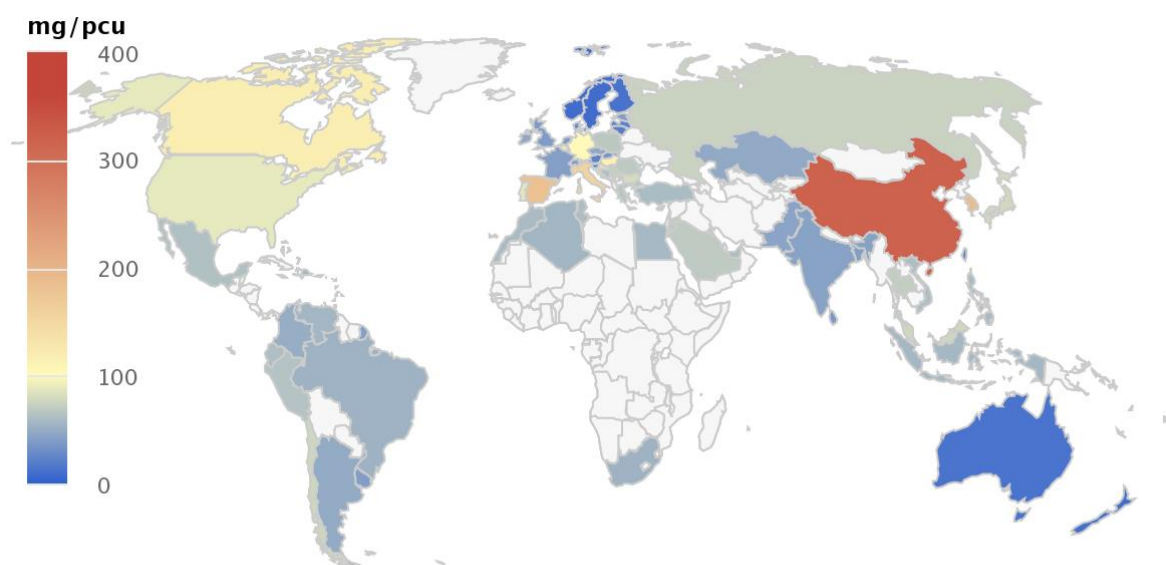
* Fonte: <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticUse.php>

Devido à obstáculos científicos e dificuldades em incentivos nos negócios, muitas companhias farmacêuticas estão abandonando a pesquisa por novos antibióticos. Desde 1990, 78% das maiores companhias farmacêuticas vem reduzindo os investimentos no desenvolvimento de pesquisas de antibióticos devido a dificuldades no seu desenvolvimento (COOPER; SHLAES, 2011). Nos últimos 30 anos, os antimicrobianos presentes no mercado são associações ou melhoramento de moléculas já existentes, o último antibiótico aprovado pelo FDA foi a daptomicina em 2003 (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019).

O aumento e propagação da resistência não é restrita aos hospitais, a presença de cepas resistentes no esgoto, água, comida, solo e outros, demonstra a participação da pressão ambiental nessas cepas, juntamente com a presença de antibióticos na terapia veterinária e agricultura (BALSALOBRE; DROPA; MATTÉ, 2014).

Os antibióticos são utilizados na pecuária de modo terapêutico, tratamento de doenças, profilático, prevenção de doenças, e como promotor de crescimento (Figura 6). Devido ao constante aumento populacional, a produção de alimentos deve ter um igual acréscimo, para isso, o uso de antibióticos deve aumentar, o que provavelmente agravará a problemática da resistência antimicrobiana relacionada a esse setor (LALOUČKOVÁ; SKŘIVANOVÁ, 2019).

Figura 6: Consumo de antibióticos em gado no mundo (2013).



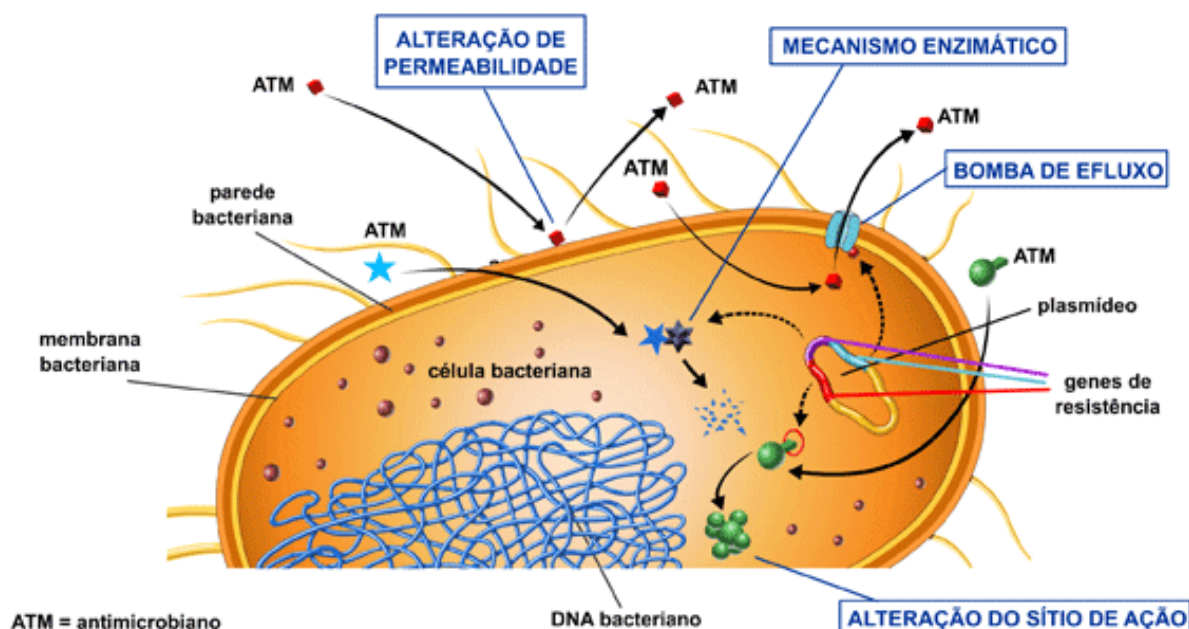
Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (cddep.org)

Fonte: <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticUse.php>

As bactérias possuem mecanismos de resistência que combatem a droga ao longo de seu caminho desde a entrada, acúmulo e a ligação ao alvo até a toxicidade (Figura 7). A linha de defesa mais externa é a prevenção da entrada da droga na célula, uma mudança na composição química ou espessura da célula bacteriana pode impedir a difusão de antibióticos na célula (permeabilidade). Além disso, as membranas celulares geralmente contêm bombas de efluxo. Na próxima linha de defesa tem a prevenção do acúmulo de drogas ao modificar quimicamente a droga, enzimas designadas modificam as moléculas da droga (reação de substituição) ou as hidrolisam (degradação). Essas reações podem ocorrer dentro da célula ou preventivamente fora da célula se as enzimas forem secretadas. Mesmo que as drogas se acumulem não modificadas no citoplasma bacteriano, a inibição de ligação ao seu alvo pode ser dificultada por uma mudança no alvo, modificação química do próprio alvo (substituição

de resíduo), ligação do alvo por um fator de proteção (proteção do alvo) ou mudança na abundância do alvo (nível de expressão) (YELIN; KISHONY, 2018).

Figura 7: Mecanismos de resistência bacteriana.



Fonte: Anvisa

2.2. Bactérias do gênero *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* é classificado dentro da família *Staphylococcaceae*, ordem Bacillales, filo Firmicutes, possui células esféricas (0,5 a 1,5 μ m), Gram-positivas que podem ser encontradas isoladas, aos pares ou em agrupamentos irregulares. São bactérias que não possuem motilidade e não produzem esporos, anaeróbias facultativas, quimiorganotróficas com metabolismo fermentativo e respiratório. Estão presentes na pele e nas membranas mucosas de animais vertebrados de sangue quente, mas eventualmente, podem ser isoladas de produtos alimentares, poeira e água. Muitas espécies são patogênicas para humanos e animais e produzem toxinas extracelulares (MORETTI *et al.*, 2015; PROCOP *et al.*, 2018).

As espécies de maior interesse clínico são *Staphylococcus aureus*, conhecida como coagulase positiva, e *Staphylococcus epidermidis*, conhecida como coagulase

negativa. (TAYLOR; UNAKAL, 2021). São as principais responsáveis por infecção em implantes ortopédicos e outros aparelhos médicos (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

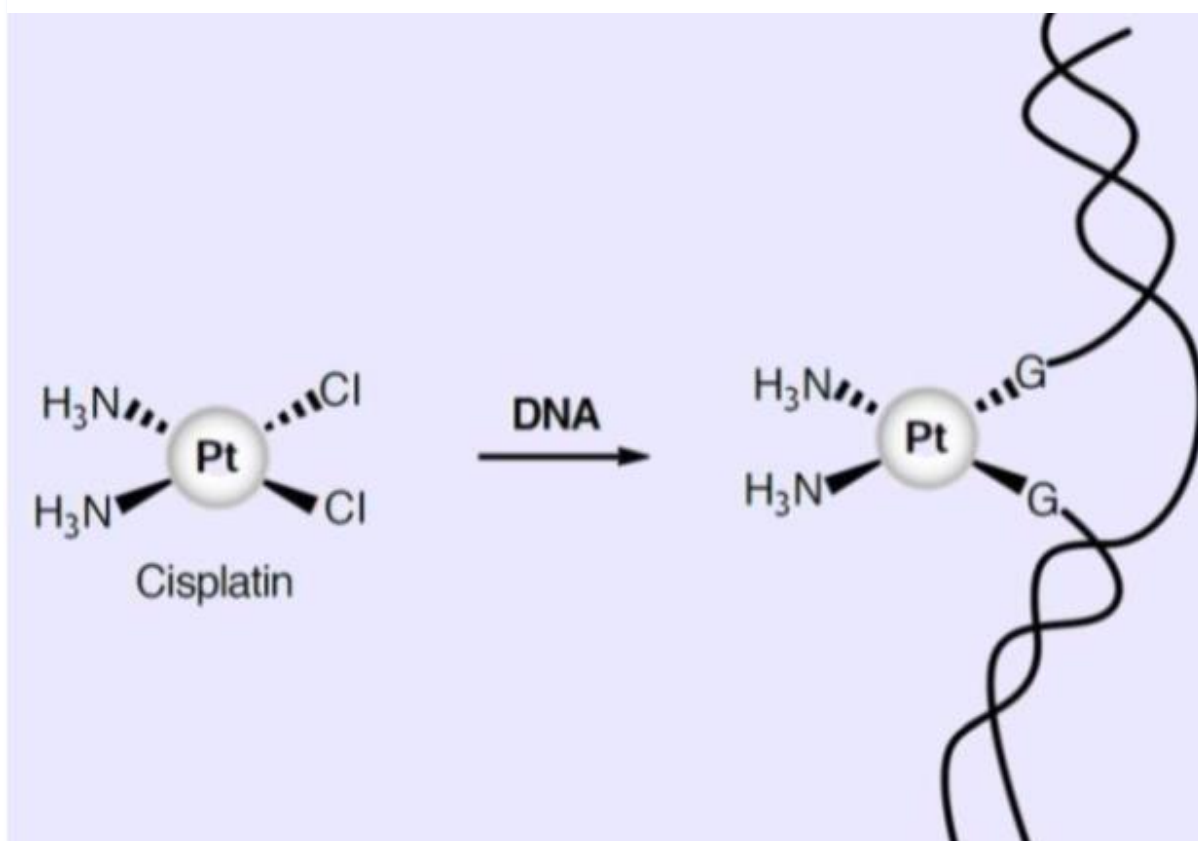
A *Staphylococcus aureus* é um dos agentes causadores de infecções mais comuns em humanos pode ser responsável por bacteremias, endocardites, infecções de pele e tecidos moles (TAYLOR; UNAKAL, 2021). Essa bactéria produz várias enzimas que contribuem pra sua virulência, como a coagulase, que pode existir na forma livre no meio ou em uma forma ligada à célula, liga-se à protrombina e a ativa e promove a conversão do fibrinogênio em fibrina. Essa atividade enzimática pode atuar para recobrir as células bacterianas com fibrina, tornando-as mais resistentes à opsonização e à fagocitose, e a catalase, que pode atuar inativando o peróxido de hidrogênio e radicais livres tóxicos formados no interior das células fagocíticas após a ingestão dos microrganismos (PROCOP *et al.*, 2018). Além disso, possui diversos mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro, como produção de cápsula antifagocitária, formação de biofilme, sobrevivência intracelular, bloqueio da quimiotaxia dos leucócitos, dentre outros (TAYLOR; UNAKAL, 2021). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), comumente causam infecções de pele e, alguns casos infecções de pulmão, se não tratado pode levar a sepse. Essas cepas carregam um gene mec no cromossomo bacteriana que é um componente de um cromossomo maior, região cassete mec (SCCmec), conferindo resistência a múltiplos antibióticos dependendo do tipo de SCCmec (MAREE *et al.*, 2007; CDC, 2019).

Dentre os estafilococos coagulase-negativa (ECN), maior componente da microflora humana, a *Staphylococcus epidermidis* é a espécie de maior patogenicidade, identificado em cerca de 70 a 92% das bacteremias hospitalares causadas por ECN. Essa bactéria pode produzir biofilme que facilita a aderência da bactéria à superfície de cateteres e próteses, facilitando a ocorrência de infecções (MORETTI *et al.*, 2015)

2.3. Complexos de rutênio

O elemento Rutênio, descoberto no século 18, por um químico polonês em jazidas de platina na América do Sul, possui símbolo atômico Ru, é um metal raro, denso (12.1 g cm^{-3}), duro, lustroso e com coloração prateada. Seu número atômico é 44 e massa atômica relativa é de 101,07. Pertence ao grupo 8, Período 5 da Tabela Periódica. Os seis metais de transição do grupo da platina são rutênio, ródio, paládio, ósmio, irídio e platina. A platina ocupa um nicho especial na biologia devido a cisplatina um complexo baseado em platina com propriedades anticâncer (SHOUTHAM *et al.*, 2017) (Figura 8).

Figura 8: Estrutura da cisplatina e sua ligação ao DNA.



Fonte: FONTES *et al.*, 2005

O uso de composto a base de metal como agentes antimicrobianos não é algo recente, sendo anterior ao uso de antibióticos clássicos. Em 1900, Paul Ehrlich liderou o

desenvolvimento da "bala mágica", que ia ter como alvo o causador de sífilis, *Treponema pallidum*, desenvolvendo compostos de arsênio (AMINOV, 2010).

Devido a esse histórico, e ao fato de que o fenômeno de resistência a multidrogas gerou um senso de urgência para o desenvolvimento de novas classes de antibióticos. Os complexos metálicos vem sendo alvo de vários estudos para comprovar sua atividade antimicrobiana, por oferecer uma estrutura tridimensional que pode aumentar o espectro de atividade do composto, geração de EROs, ativação Redox, trocas de ligantes. Além disso, quando comparado com moléculas orgânicas, compostos metálicos possuem uma taxa mais alta de acertos contra patógenos resistentes a antibióticos (MUTEANU; UIVAROS, 2021; FREI *et al.*, 2020).

O rutênio é um bom candidato para *design* e síntese de reagente de entrega de drogas devido a sua geometria em três dimensões, que permite seus ligantes coordenação e funcionalização com um alvo molecular, além interagir com macromoléculas como DNA, RNA, proteínas, membranas e outros metabólitos (SHOUTHAM *et al.*, 2017). Gosh *et al.* (2021), mostrou que um simples precursor polimérico de rutênio irradiado com UV-A consegue ser um agente antimicrobiano efetivo, com valores de CIM em nanogramas por mililitro. Gorle *et al.* (2014), mostrou o efeito antimicrobiano de complexos de rutênio tri- e tetra- nucleados frente a *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa*.

Devido ao grande número de complexos de rutênio presente na literatura, Gianferrara, Bratsos e Alessio (2009), utilizaram uma categorização que divide os complexos em 4 classes: (I) Estrutural: o íon Ru tem papel estrutural, o Ru interage com o alvo apenas por vias não covalentes; (II) Carreador: o íon Ru tem a função de carrear a droga ativa, mais comumente um composto orgânico; (III) Funcional: o íon Ru tem um papel funcional, a atividade antimicrobiana é mediada diretamente pelo íon Ru, coordenando os alvos biológicos. Esses compostos são relativamente instáveis, por vezes, pro drogas, que contem ligantes lábeis; (IV) Fotoativado: o composto Ru é ativado apenas com iluminação, onde pode atuar como fotossensibilizador.

Os complexos metálicos à base de rutênio possuem propriedades fotoquímicas e fotofísicas ricas. Os complexos de polipiridina de rutênio são absorvedores de luz eficientes e apresentam baixa toxicidade em relação ao tecido saudável (JAIN; GARRETT; MALONE, 2022).

Feng *et al.* (2019) desenvolveram uma série de complexos baseados em rutênio que apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilina apenas quando fotoativado com 470 nm por 20 minutos. Malik, Ladan e Nitzan, (1992)

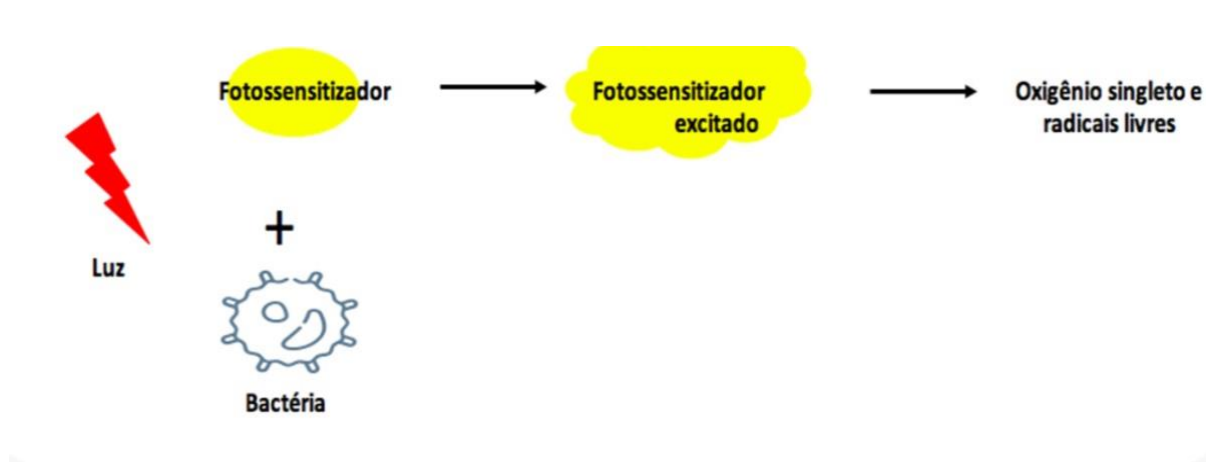
relataram que as bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis à terapia fotodinâmica que bactérias Gram-negativas, pois a membrana citoplasmática das bactérias Gram-positivas é cercada por uma camada relativamente porosa de peptidoglicano e ácido lipoteicóico que permite a entrada de fotossensibilizadores. Os complexos, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{fendiona})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Ru}(\text{fendiona})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ também demonstraram exibir efeitos bactericidas sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas após fotoirradiação (PARAKH; GOKULAKRISHNAN; PRAKASH, 2013).

2.4. Terapia fotodinâmica

O uso de químicos fotossensibilizadores para tratar diversas doenças de pele tem registro desde o Egito Antigo, Índia e Grécia. Extratos de plantas contendo psoraleno e luz eram aplicadas para tratar psoríase e vitiligo (KALKA; MERK; MUKHTAR, 2000). Formalmente, a técnica foi descoberta acidentalmente por Oscar Raab, em Munique, em um estudo envolvendo o corante vermelho acridina em um *Paramecium* spp (RAAB, 1900). Na década de 60, quando R. Lipson e S. Schwartz observaram que injeções de preparação de hematoporfirina levavam a fluorescência de lesões neoplásicas durante cirurgia. Para maximizar a visualização do tumor, Schwartz tratou a hematoporfirina com ácido acético e ácido sulfúrico e obteve uma mistura denominada derivado de hematoporfirina que foi usado por Dougherty; Henderson (1992), para detecção do tumor (DOUGHERTY *et al.* 1998).

O princípio da terapia fotodinâmica é baseado na combinação de 3 elementos: uma molécula não tóxica, fotossensibilizador (luz em um espectro que apropriado para causar excitação no fotossensibilizador) e oxigênio molecular (CIEPLIK *et al.*, 2018) (Figura 9).

Figura 9: Mecanismo da Terapia Fotodinâmica.



FONTE: Modificado de CARRERA, *et al.*, 2016.

Além de ser hábil de eliminar uma grande variedade de vírus e células microbianas (bactérias, fungos), a terapia fotodinâmica também pode ser usada para uma grande variedade de condições médicas, como degeneração macular, psoríase, aterosclerose (SOUTHAM *et al.*, 2017; MUTEANU; UIVAROS, 2021).

Assim como a terapia fotodinâmica aplicada em tumores, usada apenas em tumores com localização mais acessíveis, a terapia fotodinâmica antimicrobiana é limitada em relação ao sistema de entrega de luz. Além disso, existe a possibilidade de efeito colateral, o que pode ser minimizado com o conhecimento de absorção e luz do fotossensibilizador e do local que se encontra a infecção (WAINWRIGHT, 1998).

Para Dharmarate (2020), são necessário estudos *in vivo* e pré-clínicos com o intuito de otimizar as condições, maximizar atividade e minimizar os efeitos sobre células do hospedeiro, isso pode permitir que a terapia fotodinâmica seja uma alternativa efetiva para tratamento de infecções.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme dos complexos de rutênio $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^2$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$, denominados Ru-P e Ru-B respectivamente, irradiados com LED azul (450 nm) sobre o crescimento planctônico, formação de biofilmes e biofilme pré-formados de cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984.

3.2. Objetivos Específicos

- 1) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos complexos de rutênio sobre estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* não irradiados e irradiados com LED azul (450 nm);
- 2) Avaliar o efeito dos complexos de rutênio irradiados sobre a quantificação de biomassa de biofilmes e sobre biofilmes pré-formados de *S. aureus* e *S. epidermidis*;
- 3) Avaliar o efeito dos complexos de rutênio irradiados sobre o número de células viáveis tanto na formação de biofilmes, quanto em biofilmes pré-formados de *S. aureus* e *S. epidermidis*;
- 4) Avaliar através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) modificações morfológicas e estruturais na formação de biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis* tratadas com o complexo Ru-P e Ru-B;
- 5) Avaliar o efeito dos complexos de rutênio sobre fibroblastos murinos (L969) em 24, 48 e 72 horas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismos

Para o presente estudo foram utilizadas cepas padrão (ATCC), que integram o acervo da bacterioteca do Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS), a saber: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (Quadro 2).

Quadro 2 - Bactérias padrão para estudos de suscetibilidade.

CEPA	ORIGEM	CARACTERÍSTICA/USO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Seattle (USA) 1945	Sensível a meticilina/ Exame de produtos lácteos,
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 700698	Não documentada.	Resistente a meticilina (MRSA) e suscetibilidade heterogenia à vancomicina
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Não documentada	Usado em testes de mídia e vários ensaios e utilizado no projeto de sequenciamento do genoma.
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	Sepse de cateter, Tennessee (USA)	Produz polissacarídeos de adesão, genoma completo

Fonte: American Type Culture Collection.

4.2. Síntese dos complexos de rutênio

Os complexos de rutênio, $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$, denominados Ru-P e Ru-B respectivamente, foram cedidos gentilmente pelo professor Dr. Eduardo Henrique Sousa, do Laboratório de Bioinorgânica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

4.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)

A avaliação da atividade antibacteriana dos complexos de rutênio foi realizada segundo as normas padronizadas pelo CLSI (M07-A10, 2015), com modificações (CARVALHO *et al.*, 2017). As cepas bacterianas foram cultivadas em caldo MHB a 37°C em incubadora por 24 horas, e então 100 µL adicionados a uma placa de 96 poços na concentração final de 1×10^6 UFC/mL. Os complexos de rutênio são solubilizados em uma solução de meio de cultura e 1% de DMSO e, posteriormente, 200 µL são adicionados nos primeiros poços e em seguida é realizada diluição seriada com variação de concentrações de 250 a 1,9 µg/mL. Uma parte das placas foi então irradiadas usando a microplaca de LED azul (450 nm) por 60 minutos e incubadas por 24 horas, a 37°C, outra parte das placas não foi irradiada, foram apenas incubadas por 24 horas, a 37°C. A avaliação do crescimento bacteriano foi mensurada através da turbidez dos poços com auxílio do leitor de microplacas (SpectraMax i3), a um comprimento de onda de 620 nm. Considerou-se como CIM (Concentração Inibitória Mínima) a menor concentração da substância teste capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano.

Em relação ao CBM (Concentração Bactericida Mínima), a menor concentração da substância teste capaz de inibir o crescimento visível das UFCs, depois de 24 horas de incubação das placas, os poços que não tiveram crescimento bacteriano, retirou-se uma 10 µl e foi plaqueado em placa de petri com meio TSA, depois foram incubadas por 24 horas, a 37°C. Foi considerado CBM aquelas concentrações que não houve crescimento bacteriano.

4.4. Avaliação do efeito dos complexos de rutênio associados a antibióticos

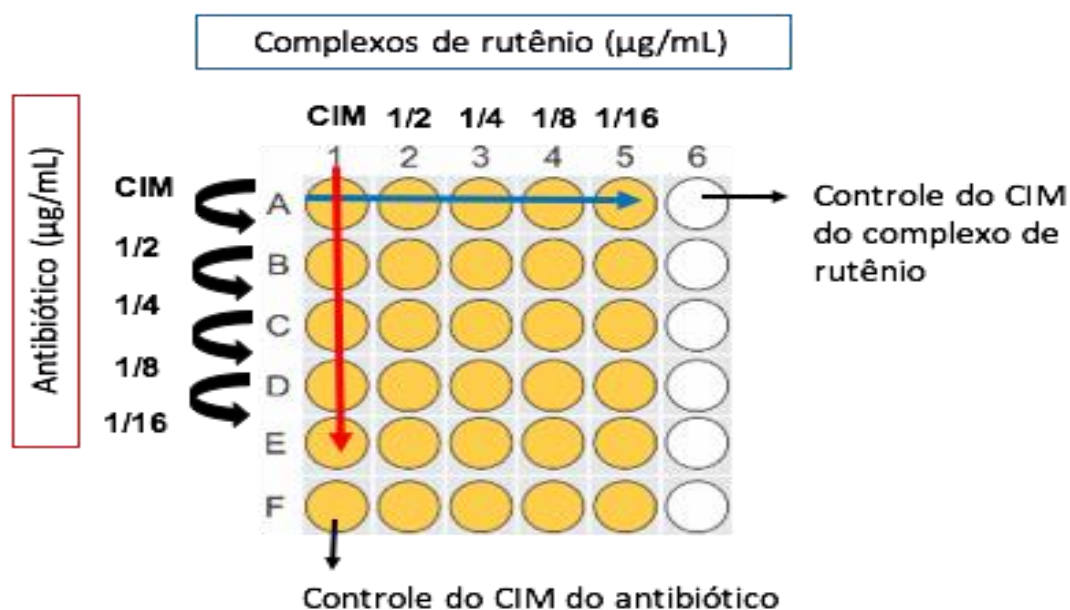
Utilizando o método *checkboxboard*, foram avaliados os efeitos dos complexos de rutênio, Ru-P e Ru-B, com antibióticos, ampicilina (AMP) e tetraciclina (TETRA) (ROSATO *et al.*,

2007; LECHARTIER; HARTKOOM; COLE, 2012). Esse método utiliza múltiplas diluições com dois antibióticos em concentrações equivalentes, abaixo ou acima das CIMs para os microrganismos testados. Consiste em colunas contendo concentrações diferentes da droga “A” diluídas ao longo do eixo x, e linhas contendo as concentrações da droga “B” ao longo do eixo y (LORIAN, 2005).

Para este estudo, foram avaliadas duas associações diferentes, totalizando seis combinações, a saber: complexo Ru-P + AMP, e Ru-P + TETRA; complexo Ru-B + AMP e Ru-B + TETRA, sendo que tanto os complexos de rutênio, quanto os antibióticos, foram preparados em concentração 4 vezes a da CIM.

Foram usados 5 poços da microplaca de 96 de poliestireno de fundo plano para cada associação testada, das linhas A a E, sendo o antibiótico diluído no sentido vertical da placa, de A1 a E1 e os complexos de rutênio diluídos no sentido horizontal, de A1 a A5 (Figura 10). Foram utilizados 25 poços de forma que as concentrações finais para cada uma das substâncias usadas foram CIM, $\frac{1}{2}$ da CIM, $\frac{1}{4}$ da CIM, $\frac{1}{8}$ da CIM e $\frac{1}{16}$ da CIM. Os compostos testados foram diluídos separadamente em placas de micro diluição de fundo em U, e logo em seguida foram misturados em nova placa de 96 poços de fundo plano, de maneira que cada poço dessa nova placa, foi preenchido com 50 μ L do antibiótico, 50 μ L dos complexos de rutênio e 100 μ L do inoculo bacteriano previamente ajustado. A linha F foi usada como controle da CIM do antibiótico, e a coluna 6 como controle da CIM dos complexos de rutênio.

Figura 10 :Esquematização dos testes de associação entre o complexo de rutênio e os antibióticos.



Fonte: Própria autora.

Logo após a montagem das placas, estas foram incubadas a 37°C por 24 horas e para a determinação da nova CIM em combinação, a densidade optica foi mensurada a um comprimento de onda de 620 nanômetros em leitor de microplacas (Spectramax).

A interpretação dos resultados foi realizada através da determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), que consiste na soma dos valores da Concentração Inibitória Fracionada (FIC) de cada composto usado na associação, conforme equação abaixo:

$$\text{ICIF} = \text{CIFA} + \text{CIFB},$$

onde:

CIFA= [CIM do complexo na associação/CIM do complexo individual];

CIFB= [CIM do antibiótico na associação/CIM do antibiótico individual].

De acordo com os valores obtidos, foi calculado Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) para cada combinação a fim de avaliar a interação entre as drogas. Sendo assim, a interação foi considerada sinérgica ($\text{ICIF} \leq 0,5$), indiferente ($0,5 < \text{ICIF} \leq 4$) ou antagônica ($\text{ICIF} > 4$) (CASTELO- BRANCO et al., 2013; ODDS, 2003).

4.5. Avaliação do efeito dos complexos de rutênio sobre formação do biofilme

Os ensaios sobre os biofilmes foram baseados nas metodologias propostas por Stepanovic *et al.*, (2000) com modificações propostas por Vasconcelos *et al.*, (2014). A quantificação de biomassa será determinada pela coloração com cristal de violeta (CV), e a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs).

A mesma metodologia de montagem de placa para o CIM, com variação de concentração de 125 a 1,9 µg/mL, foi utilizada nos ensaios da inibição da formação de biofilmes, sendo os complexos irradiados com LED azul (450 nm) por um período de 60 minutos.

Para a quantificação de biomassa, depois de 24 horas de incubação a placa de 96 poços é lavada com água destilada estéril 3 vezes para remoção das células fracamente aderidas. Depois, os poços são preenchidos com 200 µL de metanol 95% por 5 minutos, para desidratar o biofilme, depois é feito a coloração com 200 µL de CV a 1% em cada poço durante 5 minutos, depois retirado o excesso com água destilada, posteriormente, é colocado 200 µL de ácido

acético a 33%. A placa então é colocada no leitor de microplacas (SpectraMax i3) com a finalidade de quantificar a biomassa através da densidade óptica a 590 nm.

Para contagem de células viáveis dos biofilmes, depois de incubada por 24 horas, as placas são lavadas duas vezes com água estéril, com a finalidade de remover as células fracamente aderidas. Depois, cada poço é preenchido com 200 μL de água destilada estéril e colocado no banho ultrassônico (Cristófolo/EQM-CF) por 8 minutos para diluição do biofilme. A seguir, foi realizada uma diluição decimal seriada das amostras em suspensão, plaqueadas em meio TSA e incubadas sobre a 24 horas a 37°C. O número de Unidades formados de colônia foi determinado e os resultados expressos em termos de Log_{10} UFC/mL.

4.6. Avaliação sobre o efeito dos complexos de rutênio sobre biofilmes pré-formados

Os ensaios sobre os biofilmes pré-formados foram baseados nas metodologias propostas por Stepanovic *et al.*, (2000) com modificações propostas por Vasconcelos *et al.*, (2014).

Foi utilizado placas de 96 poços, nelas foram adicionadas 200 μL suspensão de células na concentração final de 1×10^6 UFC/mL e incubadas por 24 horas, a 37°C. Após a incubação, foi retirado o meio de cultura das placas e adicionado os complexos de rutênio nas concentrações de 125 a 1,9 $\mu\text{g/mL}$ e 200 μL de meio nos controles. As placas foram então irradiadas com microplaca de LED azul (450 nm) por 60 minutos, e incubadas por 24 horas, a 37°C. Depois da incubação o conteúdo dos poços é desprezado e é realizado a quantificação de biomassa, determinada pela coloração com cristal de violeta (CV), e a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) descritas anteriormente.

4.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foi realizada Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para verificar modificações morfológicas dos biofilmes, de acordo com Vasconcelos *et al.* (2014). Os biofilmes das cepas bacterianas resistentes foram cultivados, testes de inibição da formação do biofilme, pelas metodologias e condições anteriormente citadas, no entanto, foram utilizadas placas de microtitulação de 24 poços. As concentrações dos complexos de rutênio utilizadas foram o valor da CBM que variou de 125 a 31,2 $\mu\text{g/mL}$ para os testes de inibição da formação. Após o tempo de incubação, os biofilmes foram submetidos as seguintes etapas: 1) as células em suspensão foram removidas e os poços lavados com água estéril por duas vezes; 2) os biofilmes

foram desidratados com álcool (etanol a 70% durante 10 minutos, etanol a 95% durante 10 minutos e etanol a 100% durante 20 minutos); 3) as placas foram acondicionadas em dessecador em temperatura ambiente para, depois das placas secas, terem os fundos cortados e removidos. Posteriormente, os biofilmes foram revestidos com ouro e visualizados no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG (Central Analítica da UFC, Brasil).

4.8. Ensaio de citotoxicidade sobre fibroblastos

4.8.1. Linhagens celulares e condições de cultura

As células foram cultivadas em frascos T-75 (Kasvi®) para cultura de células contendo meio Eagle Dulbecco Modificado- DMEM (Sigma®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO® - Life Technologies), 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina (GIBCO® - Life Technologies) e mantidas a 37°C, em uma atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada três dias e ao atingirem 80% de confluência as células foram tripsinizadas (0,025% tripsina/0,1% EDTA) para subcultura e/ou ensaios de viabilidade.

4.8.2. Ensaio de viabilidade celular

Após a tripsinização, foi realizado o ajuste do número de células ($5 \times 10^4/200 \mu\text{L}/\text{poço}$) através da contagem em câmara de Neubauer. As células foram adicionadas em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, mantidas por 24 horas em condições de cultura padrão a 37°C, em uma atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂. O composto testado foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) resultando em uma solução na concentração de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 1% de DMSO que posteriormente foi submetida à diluição seriada gerando sete concentrações testes, 125; 62,5; 31,25; 15,6; 7,8; 3,9 e 1,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 24 horas de adição das células, o meio foi retirado da placa de 96 poços e adicionou-se 200 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de meio DMEM contendo o composto nas concentrações citadas anteriormente. Nos poços controles foram adicionados apenas meio DMEM e DMSO. Com o intuito de padronizar as condições experimentais foi montado em paralelo controles referentes a cada porcentagem de DMSO tendo em vista que este também estará em diferentes concentrações após a diluição seriada do composto. Foram montadas placas para o ensaio nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Para verificação da viabilidade celular, foi aplicado o ensaio de MTT. O MTT é um método colorimétrico baseado na biorredução do composto MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Este processo é realizado por enzimas mitocondriais e a mudança de coloração do meio reflete diretamente a atividade celular, podendo ser medida em termos de absorbância. Decorrido o tempo de exposição ao composto, o meio foi retirado e substituído por 100 μ L de meio DMEM não suplementado no qual adicionou-se 20 μ L da solução de MTT e a densidade ótica foi mensurada em um leitor de microplacas (SpectraMax i3 Multi-Mode Microplate Reader) com comprimento de onda de 570 nm de acordo com especificações do fabricante. Foram realizados três ensaios independentes e em triplicata nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\overline{Abs}_{490 \text{ nm}}(\text{composto})}{\overline{Abs}_{490 \text{ nm}}(\text{controle})} \times 100\%$$

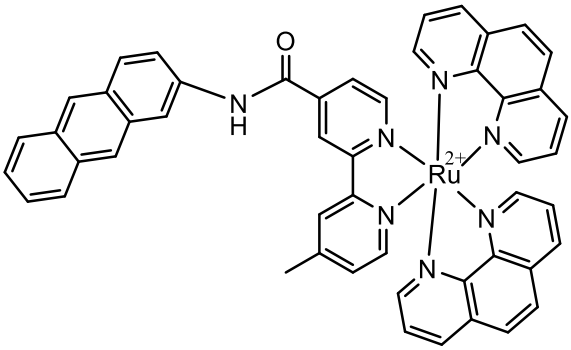
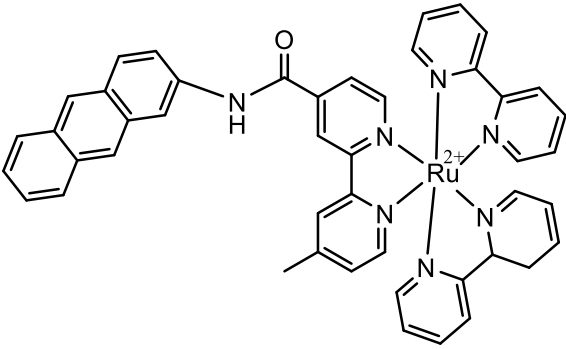
4.9. Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicatas. A diferença entre as médias das triplicatas foi verificada através da aplicação do teste One-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, para os dados de biofilme, e pós teste de Tukey, para análise das diferenças entre as porcentagens de viabilidade celular, os valores são dados como média \pm SD, executados com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (San Diego, California, USA). Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Os complexos $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$, denominados Ru-P e Ru-B respectivamente, desse estudo possuem ligantes com ação antimicrobiana descrita na literatura, bipyridina, fenantrolina e antraceno (KIRAN et al., 2015; ROY et al., 2008; *National Center for Biotechnology Information*, 2022). A bipyridina é um agente quelante, capaz de retirar íons metálicos de uma solução, diminuindo assim sua biodisponibilidade. A fenantrolina é um agente quelante e um agente intercalante, capaz de se inserir nas bases de DNA, deformando-o evitando seu funcionamento apropriado (*National Center for Biotechnology Information*, 2022). A presença do ligante antraceno pode aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio (ABREU et al., 2017).

Quadro 4 – Estrutura dos complexos de rutênio

Complexo Ru-P $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$	Complexo Ru-B $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-ant})]^{2+}$
	
Massa Molar: 1141,12 g/mol	Massa Molar: 1093,12 g/mol

Fonte: Laboratório de Bioinorgânica – (UFC).

5.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)

Sem irradiação, o complexo Ru-P, apresentou valores de CIM e CBM contra as cepas de *S. aureus* ATCC 25923, 62,5 e 125 $\mu\text{g/mL}$, e *S. aureus* ATCC 700698, 250 $\mu\text{g/mL}$ e não apresentou CBM. O complexo Ru-B apresentou valores de CIM e CBM 15,6 e 31,2 $\mu\text{g/mL}$ contra a cepa *S. aureus* ATCC 25923, e valores de 62,5 e 125 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus* ATCC 700698. Contra as cepas *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. epidermidis* ATCC 35984 não foi

possível determinar os valores de CIM e CBM nas concentrações testadas para ambos complexos.

Por outro lado, com irradiação de LED azul, os complexos Ru-P e Ru-B apresentaram valores de CIM e CBM contra as cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* em concentrações com variação de 3,9 e 1,9 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1). Para o complexo Ru-B, observou-se os valores de CIM e CBM para as cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* de 1,9 $\mu\text{g/mL}$ e para a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 CIM e CBM com valores de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos complexos de rutênio sobre bactérias Gram-positivas.

Complexos	LED azul	Bactérias				
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 700698	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	
Ru-P [Ru(phen) ₂ (bpy-ant)] ²⁺	Com	CIM	3,9	1,9	1,9	3,9
		CBM	3,9	1,9	1,9	3,9
	Sem	CIM	62.5	250	ND	ND
		CBM	125	ND	ND	ND
Ru-B [Ru(bpy) ₂ (bpy-ant)] ²⁺	Com	CIM	1,9	1,9	1,9	3,9
		CBM	1,9	1,9	1,9	3,9
	Sem	CIM	15.6	62.5	ND	ND
		CBM	31.2	125	ND	ND

Fonte: Própria autora: (^S): bactérias consideradas sensíveis; (^R): bactérias consideradas resistentes (CLSI, 2015).

5.2. Avaliação do efeito combinado dos complexos de rutênio com antibióticos

A cepa *S. aureus* ATCC 700698 foi a menos suscetível a ambos os antibióticos testados. Em adição, a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 apresentou CIM 500 vezes maior (1.000 µg/mL) do que é recomendado pelo CLSI e EUCAST (CLSI, 2015; EUCAST, 2015).

Os resultados de combinação do complexo Ru-P com a ampicilina indicaram efeito sinérgico sobre as cepas de *S. epidermidis* ATCC 12228 e ATCC 35698; ICFI 0,125, e *S. aureus* ATCC 25923, ICFI 0,312. Sobre a cepa *S. aureus* ATCC 700698 a combinação foi indiferente, ICFI 0,562 (Tabela 2). A combinação do complexo com tetraciclina mostrou resultados semelhantes, com efeito sinérgico sobre as cepas de *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. epidermidis* ATCC 35698, ICIF entre 0,310 e 0,25, respectivamente, *S. aureus* ATCC 25923, ICIF de 0,0675. Sobre a cepa *S. aureus* ATCC 700698, a associação foi indiferente, ICIF 0,562 (Tabela 2).

Os resultados da combinação do complexo Ru-P com a tetraciclina indicaram efeito sinérgico com as cepas de *S. epidermidis*, ICIF de 0,125, e com a *S. aureus* ATCC 25923, ICIF de 0,5. Sobre a *S. aureus* ATCC 700698 a combinação foi indiferente, ICIF de 1,0. A combinação do complexo com a tetraciclina, apresentou sinergismo apenas sobre *S. epidermidis* ATCC 12228, ICIF de 0,313, com as demais cepas a combinação foi indiferente, com ICIF de 0,561 a 0,563 (Tabela 2).

Tabela 2– Efeito do complexo Ru-P associado aos antibióticos ampicilina (AMP) e tetraciclina (TETRA), sobre cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*.

BACTÉRIAS	COMPLEXO DE RUTÊNIO			ANTIBIÓTICO				EFEITO
	Ru-P			AMP				
	CIM µg/mL (individual)	CIM µg/mL (combinado)	CIF	CIM µg/mL (individual)	CIM µg/mL (combinado)	CIF	ICIF	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,9	0,24	0,0615	0,39	0,024	0,0615	0,312	Sinergismo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	1,9	0,12	0,0625	50	25	0,5	0,562	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1,9	0,12	0,0625	1,56	0,097	0,0625	0,125	Sinergismo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	3,9	0,24	0,0625	1.000	62,5	0,0625	0,125	Sinergismo
	Ru-P			TETRA				
	CIM µg/mL (individual)	CIM µg/mL (combinado)	CIF	CIM µg/mL (individual)	CIM µg/mL (combinado)	CIF	ICIF	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,9	0,24	0,0615	0,39	0,024	0,006	0,0675	Sinergismo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	1,9	0,12	0,0625	100	50	0,5	0,562	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1,9	0,12	0,0625	0,39	0,097	0,248	0,310	Sinergismo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	3,9	0,48	0,125	0,78	0,097	0,125	0,25	Sinergismo

Fonte: Próprio autor. Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (CIM), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM), Concentração Inibitória Fracionada (CIF) e do Índice da Combinação Inibitória Fracionada (ICIF). $ICIF \leq 0,5$ efeito sinérgico, $0,5 < ICIF \leq 4,0$ efeito indiferente, $ICIF > 4,0$ efeito antagônico.

Para o complexo Ru-B, os resultados da combinação com a ampicilina indicaram efeito sinérgico com as cepas de *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. epidermidis* ATCC 35984, ICIF de 0,125; e com a *S. aureus* ATCC 25923, ICIF DE 0,5. Sobre a cepa *S. aureus* ATCC 700698 a combinação foi indiferente, ICIF de 1,0 (Tabela 3). A combinação do complexo com a tetraciclina, foi observado sinergismo apenas contra *S. epidermidis* ATCC 12228, ICIF de 0,313, com as demais cepas a associação foi indiferente, com ICIF de 0,561 a 0,563 (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeito do complexo Ru-B associado aos antibióticos ampicilina (AMP) e tetraciclina (TETRA) sobre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

BACTÉRIAS	COMPLEXO DE RUTÊNIO			ANTIBIÓTICO				EFEITO
	Ru-B			AMP				
	CIM µg/mL (individual)	CIM µg/mL (combinado)	CIF	CIM µg/mL (individual)	CIM µg/mL (combinado)	CIF	ICIF	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,9	0,975	0,25	0,39	0,097	0,25	0,5	Sinergismo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	1,9	0,95	0,5	50	25	0,5	1,0	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1,9	0,12	0,0631	1,56	0,097	0,0621	0,125	Sinergismo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	3,9	0,24	0,0615	1.000	62,5	0,0625	0,125	Sinergismo
	Ru-B			TETRA				
	CIM µg/mL (individual)	CIM µg/mL (combinado)	CIF	CIM µg/mL (individual)	CIM µg/mL (combinado)	CIF	ICIF	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,9	0,24	0,0615	0,39	0,195	0,5	0,561	Indiferente
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	1,9	0,12	0,0631	100	50	0,5	0,563	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1,9	0,12	0,0631	0,39	0,097	0,25	0,313	Sinergismo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	3,9	0,24	0,0615	0,78	0,39	0,5	0,561	Indiferente

Fonte: Próprio autor. Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (CIM), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM), Concentração Inibitória Fracionada (CIF) e do Índice da Combinação Inibitória Fracionada (ICIF). $ICIF \leq 0,5$ efeito sinérgico, $ICIF > 0,5 \leq 4,0$ efeito indiferente, $ICIF > 4,0$ efeito antagônico.

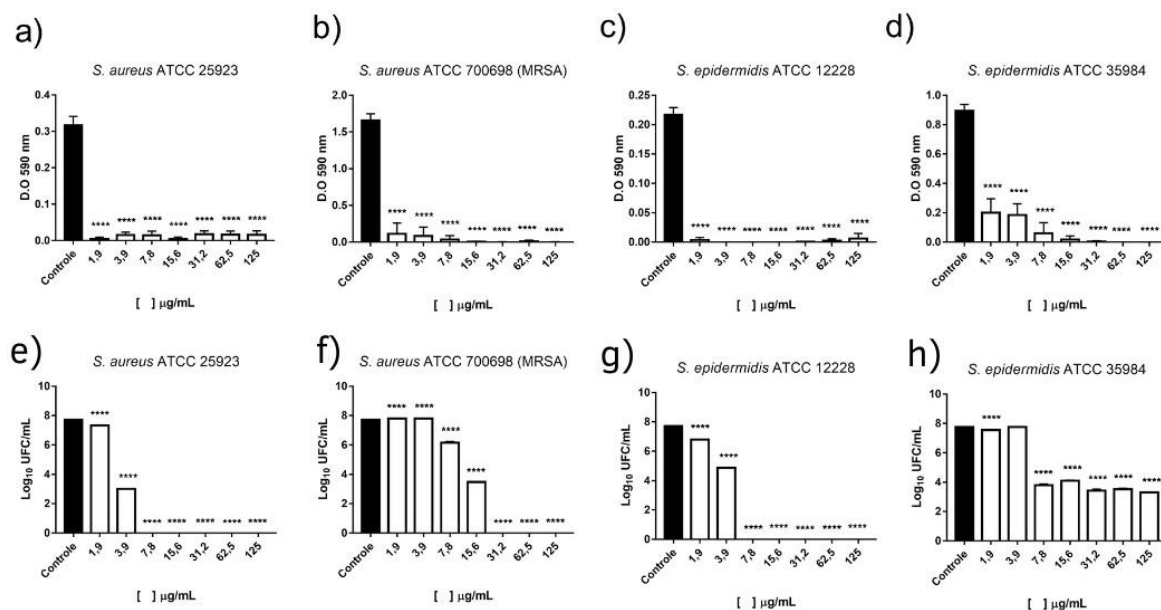
5.3. Efeito dos complexos de rutênio sobre a formação de biofilmes

Os resultados da atividade antimicrobiana dos complexos de rutênio fotoirradiados sobre a formação de biofilmes dos microrganismos testados foi avaliada através dos ensaios de quantificação de biomassa e contagem de UFC.

O complexo Ru-P reduziu a formação de biomassa de maneira significativa em todas as cepas testadas (Figura 11a, b, c e d). A cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 foi a menos suscetível a redução de formação de biomassa, média de 80% (Figura 10c). O complexo Ru-P reduziu de maneira significativa formação de biomassa das cepas *S. epidermidis* ATCC 35984 e *S. aureus* ATCC 700698, com média de inibição de 98,9% (Figura 11d e b). Com as cepas *S. aureus* ATCC 25923, o complexo Ru-P reduziu a formação com variação de 95 a 99% quando comparada com o controle.

O complexo Ru-P também reduziu significativamente o número de UFCs da maioria das cepas (Figura 11e, f, g e h). O complexo reduziu o número de UFCs em 8 logs da cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 nas três primeiras concentrações, 125 a 31,2 µg/mL, e em torno de 2 logs nas concentrações de 15,6 a 1,9 µg/mL (Figura 11h).

Figura 11: Efeito do complexo Ru-P sobre formação de biofilmes de *S.aureus* e *S. epidermidis*.



Fonte: Própria autora. Quantificação de biomassa (a, b, c, d) e número de células viáveis (e, f, g, h).

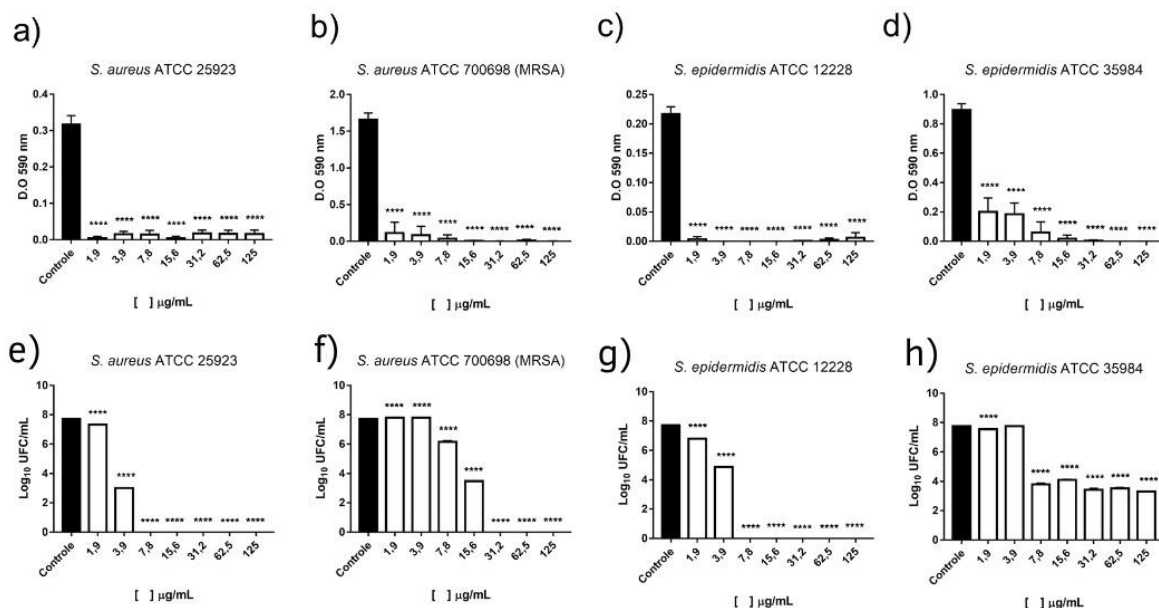
Barras brancas representam bactérias tratadas com Ru-P, barras pretas representam bactérias sem tratamento.

****p<0,001 em relação ao controle.

O complexo Ru-B inibiu a formação de biomassa significativamente em todas as cepas testadas (Figura 12a, b, c e d). A cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 foi mais resistente ao tratamento com os complexos, com média de redução de 92% da biomassa quando tratado com o complexo (Figura 12d). O complexo Ru-B, sobre a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 nas concentrações de 15, a 3,9 μg/mL, inibiu 100% da formação de biomassa (Figura 12c). O complexo reduziu a biomassa das cepas *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984 com variação de 96 a 99%.

Esse complexo, Ru-B, também reduziu significativamente o número de UFCs dos biofilmes das cepas testadas na maior parte das concentrações, 125 μg/mL até 7,8 μg/mL. Sobre *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228, o complexo causou redução de cerca de 8 logs (Figura 12e e g). Contra a cepa *S. aureus* ATCC 700698, o complexo causou redução de 8 logs nas três primeiras concentrações, 125 a 31,6 μg/mL, e aproximadamente de 0,3 a 4 logs nas concentrações de 15,6 a 1,9 μg/mL (Figura 12f). Em relação a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, o complexo reduziu o número de UFCs entre 1 a 4 log (Figura 12h).

Figura 12: Efeito do complexo Ru-B sobre formação de biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis*.



Fonte: Própria autora. Quantificação de biomassa (a, b, c, d) e número de células viáveis (e, f, g, h).

Barras brancas representam bactérias tratadas com Ru-B, barras pretas representam bactérias sem tratamento.

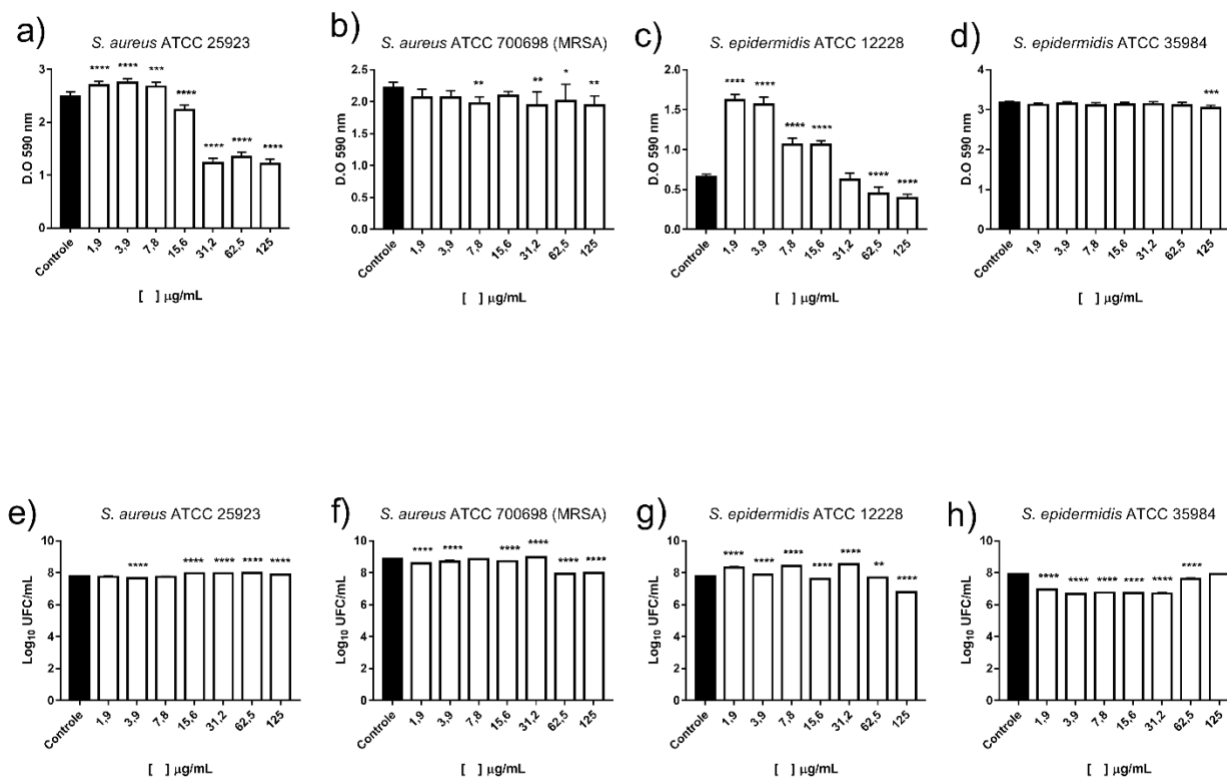
*p<0,5 **p<0,1, ***p<0,001, ****p<0,0001 em relação ao controle .

5.4. Efeito dos complexos de rutênio sobre biofilmes pré-formados

Para o complexo Ru-P, pode-se observar que na maior concentração testada (125 µg/mL) o complexo foi capaz de reduzir significativamente a biomassa das cepas *S. aureus* ATCC 25923 (51%), *S. aureus* ATCC 700698 (12%), *S. epidermidis* ATCC 12228 (41%) (Figura 13a a d). No entanto, para a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, não houve redução significativa de biomassa (Figura 13d).

No que diz respeito a contagem de UFCs, os complexos não foram capazes de reduzir o número de células viáveis dos biofilmes. Por outro lado, em muitas concentrações elas ultrapassam o controle (Figura 13e, f e g). Contra a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, os resultados obtidos foram significativos, o complexo Ru-P foi capaz de reduzir o número de células viáveis, redução menor que 1 log (Figura 13e a h).

Figura 13: Efeito do complexo Ru-P sobre biofilmes pré-formados de *S.aureus* e *S. epidermidis*



Fonte: Própria autora. Quantificação de biomassa (a, b, c, d) e número de células viáveis (e, f, g, h). Barras brancas representam bactérias tratadas com Ru-P, barras pretas representam bactérias sem tratamento.

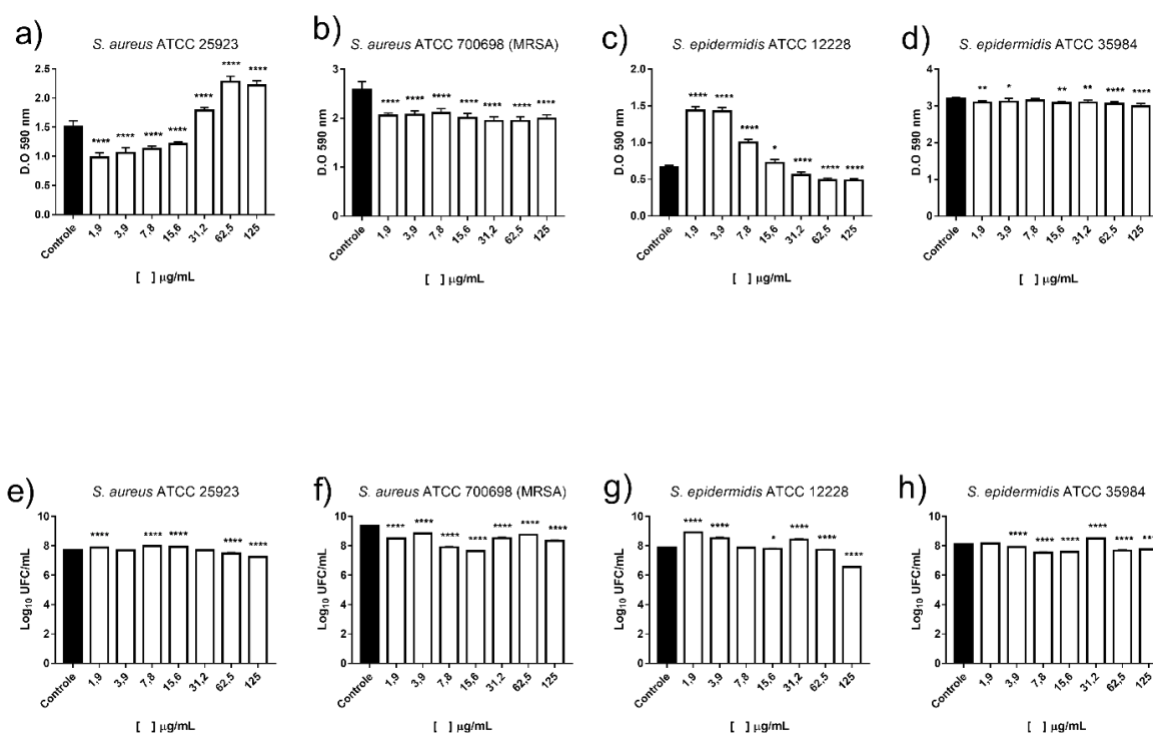
* $p \leq 0,5$ ** $p \leq 0,1$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

Com o complexo Ru-B, em relação redução de biomassa, a cepa com maior redução de biomassa foi *S. aureus* ATCC 700698, com média de redução de 21% (Figura 14b).

Contra a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, o complexo não apresentou resultados significativos, e houve maior produção de biomassa nas maiores concentrações, 125 até 31,2 µg/mL, do que nas menores concentrações, 15,6 a 1,9 µg/mL (Figura 14a). Tal fenômeno é chamado de efeito paradoxal, em que grupos tratados com concentrações maiores não exibem resultados significativos quando comparados com grupos tratados com menores concentrações. Contra a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, o complexo reduziu a biomassa entre 6,2 a 1,5%. Sobre a cepa *S. aureus* ATCC 25923, o complexo Ru-B reduziu de maneira significativa a biomassa nas concentrações de 15,6 a 1,9 µg/mL, 19,5 a 34 %, respectivamente.

O complexo de rutênio Ru-B obteve redução significativa no número de UFCs nas cepas *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 700698, menor que 1 log de redução. Em relação a cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228, nas menores concentrações de Ru-B (1,9 a 3,9 $\mu\text{g/mL}$) houve maior número de células quando comparada ao controle (Figura 14g).

Figura 14: Efeito do complexo Ru-B sobre biofilmes pré-formados de *S. aureus* e *S. epidermidis*.



Fonte: Própria autora. Quantificação de biomassa (a, b, c, d) e número de células viáveis (e, f, g, h). Barras brancas representam bactérias tratadas com Ru-B, barras pretas representam bactérias sem tratamento.

****p<0,001 em relação ao controle.

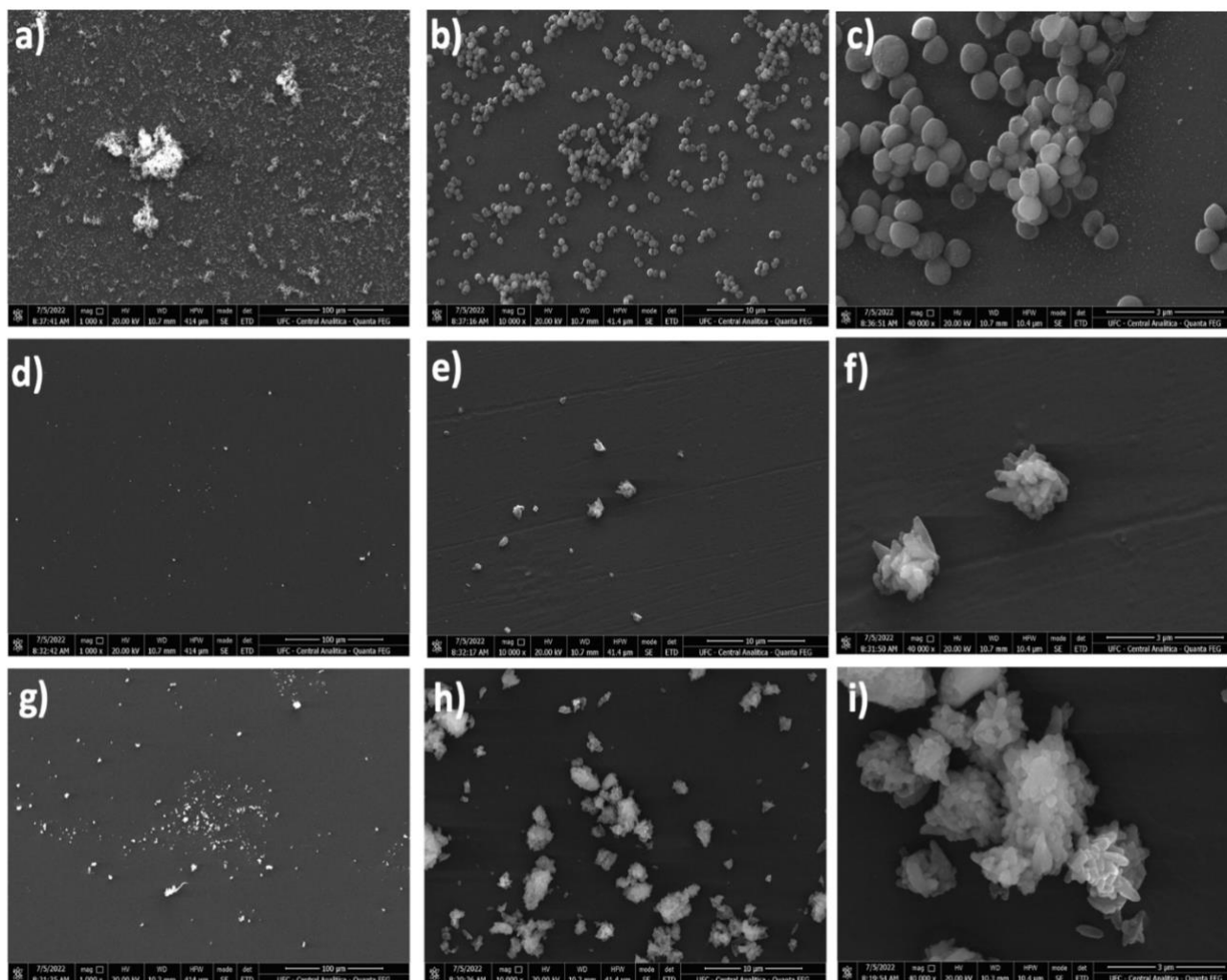
5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

As eletromicrografias mostram que os os complexos Ru-B e Ru-P, nas concentrações de 7,8 e 15,6 $\mu\text{g/mL}$, redução consistente no número de células observadas da cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 quando comparada com o controle de biofilmes não tratados (Figura 15).

Nos biofilmes não tratados (controle), é possível observar uma maior densidade celular e presença de matriz extracelular, característico da formação de biofilme (Figura 15 a,b,c).

Além disso, no controle as células apresentam superfície lisa e regular. Na presença dos complexos Ru-B e Ru-P, observa-se diminuição na densidade celular, redução da presença de matriz e claras modificações na morfologia celular, apresentando superfície irregular, ocasionada pela presença dos complexos de rutênio (Figura 15 d,e,f,g,h,i).

Figura 15: Eletromicrografias da atividade antibiofilme dos complexos de rutênio sobre a cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 tratados por 24 horas.



Fonte: Própria autora. Imagens a,b,c (controle). Imagens d,e,f biofilmes tratados com Ru-B, imagens g,h,i, biofilmes tratados com Ru-P, nas concentrações de 7,8 e 15,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Magnificações de 1.000x, 10.000x e 40.000x. Barras de 100 μm , 10 μm e 1 μm .

5.6. Ensaio sobre viabilidade celular dos complexos de rutênio em fibroblastos murinos

A viabilidade dos fibroblastos murinos com o complexo Ru-P em 24 horas, apresentou significativa diferença em relação ao controle nas duas maiores concentrações, 125 e 62,5

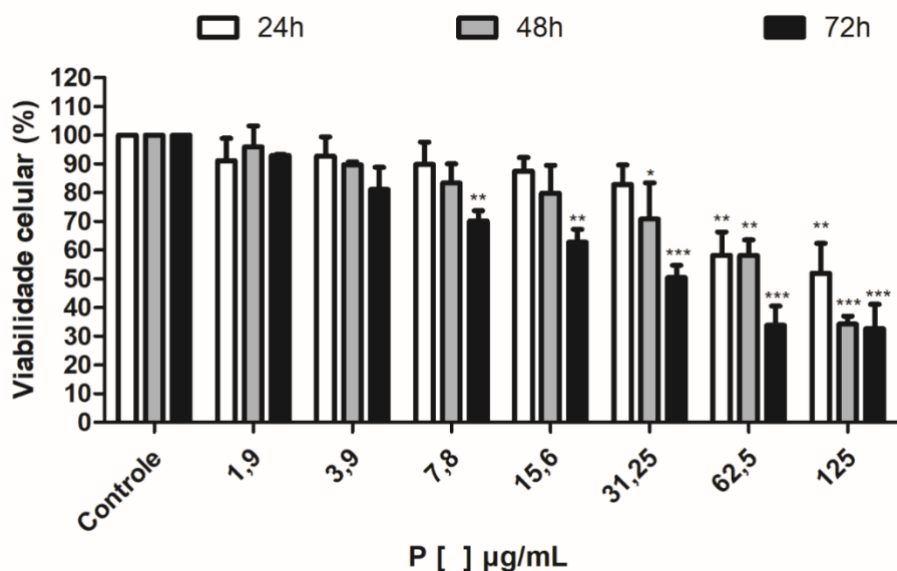
$\mu\text{g/mL}$, reduzindo a viabilidade celular de $51,9\% \pm 10,52$ e $58,21\% \pm 8,17$, respectivamente. Nas demais concentrações, as células apresentaram viabilidade celular variando de $82,8\% \pm 8,17$ a $92,7 \pm 7,7$ (Figura 16).

O efeito de Ru-P sobre fibroblastos murinos em 48 horas, apresentou diferença significativa nas concentrações 125, 62,5 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$, com viabilidade celular $34,3\% \pm 2,7$, $58,1\% \pm 5,40$ e $70,8\% \pm 12,6$, respectivamente. concentrações, as células apresentaram viabilidade celular com variação entre $79,8\% \pm 9,6$ a $95,9\% \pm 7,2$ (Figura 16).

Em 72 horas de exposição, o complexo de rutênio apresentou diferença significativa em relação ao controle no que diz respeito a viabilidade celular nas concentrações de 125 a 7,8 $\mu\text{g/mL}$, com viabilidade que variou de $32,6\% \pm 8,4$ a $70,1\% \pm 3,6$. Nas demais concentrações, 1,9 e 3,9 $\mu\text{g/mL}$ as células apresentaram viabilidade de $81,1\% \pm 7,6\%$ e $92,95 \pm 0,3$, respectivamente.

Pode-se afirmar que a viabilidade celular de fibroblastos murinos em relação ao complexo Ru-P é dose-dependente e tempo dependente, já que quanto maior é a concentração e tempo de exposição, menor a viabilidade celular (Figura 16).

Figura 16: Efeito do complexo de rutênio Ru-P sobre fibroblastos murinos (L929).



Fonte: Própria autora. Barras brancas representam células tratadas com Ru-P por 24 hrs. Barras cinzas representam células tratadas com Ru-P por 48 hrs. Barras pretas representam células tratadas com Ru-P por 72 hrs. *, **, *** $p < 0,05$ quando comparado ao controle DMSO 1%.

Em relação ao complexo Ru-B, em 24hrs de exposição ao complexo, em todas as concentrações, as células tiveram sua viabilidade reduzida significativamente em relação ao controle, com variação de $27,5\% \pm 1,39$ a $47,3\% \pm 5,29$ (Figura 16).

Com 48hrs de exposição ao complexo Ru-B, os fibroblastos murinos tiveram sua viabilidade reduzida em mais de 50% em todas as concentrações, com variação de $21,7\% \pm 0,6$ e $24,1\% \pm 3,5$ (Figura 16).

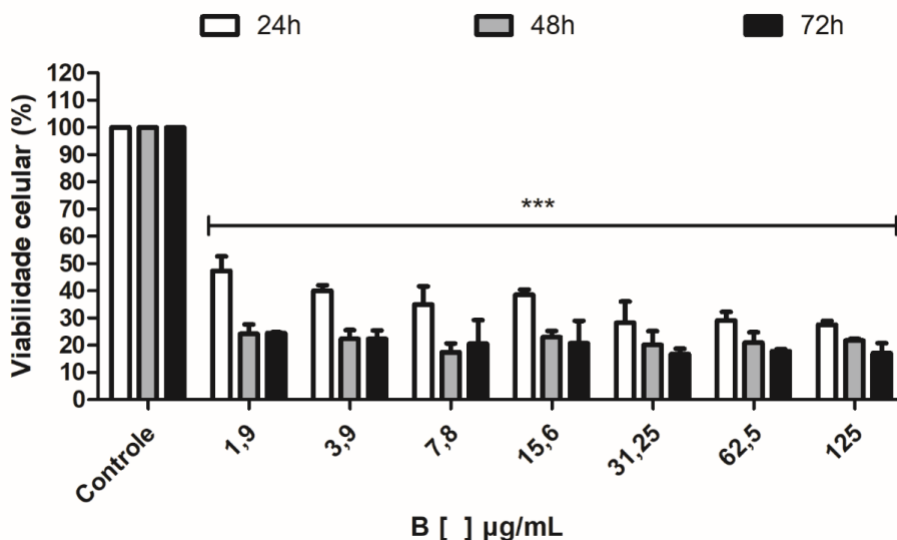
Com 72hrs de exposição ao complexo Ru-B, os fibroblastos murinos também tiveram sua viabilidade celular reduzida em mais de 50% em todas as concentrações, com variação entre $17,1\% \pm 3,6$ e $24,4\% \pm 0,2$ (Figura 17).

Observa-se diferença significativa de viabilidade celular entre o tempo de 48 e 72 hrs das concentrações $125\mu\text{g/mL}$ até $31,5\mu\text{g/mL}$ (Figura 17). Nas concentrações de $15,6$ e $7,8\mu\text{g/mL}$, os fibroblastos tiveram diferença de viabilidade celular no tempo de 72 horas de exposição.

Nas menores concentrações, $1,9$ e $3,9\mu\text{g/mL}$, as células não apresentaram diferença de viabilidade celular em relação ao tempo de exposição ao complexo.

Em relação ao complexo Ru-B, todas as concentrações tiveram diferença entre si nos tempos de exposição testados.

Figura 17: Efeito do complexo de rutênio Ru-B sobre fibroblastos murinos (L929).



Fonte: Própria autoar. Barras brancas representam células tratadas com Ru-B por 24 hrs. Barras cinzas representam células tratadas com Ru-B por 48 hrs. Barras pretas representam células tratadas com Ru-B por 72 hrs. *, **, *** $p < 0,05$ quando comparado ao controle DMSO 1%.

6. DISCUSSÃO

Nesse estudo, foram avaliadas as atividades antibacteriana, antibiofilme e o efeito associado a antibióticos dos complexos de rutênio Ru-P e Ru-B fotoirradiados sobre bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

Os valores de CIM obtidos nesse estudo são aproximados dos valores encontrados por Da Silveira *et al.* (2017), cujos complexos apresentaram valores de CIM de 1,23 a 2,45 µg/mL, e CBM com valor de 4,91 µg/mL contra o mesmo gênero de bactéria testado nesse estudo.

Os resultados obtidos por Lam *et al.* (2014), com complexos bipyridina de rutênio(I), apresentaram valor de CIM de 6,4 µg/mL, no entanto, os valores de CBM encontrados diferem. O fato de que o complexo de rutênio Ru-P e Ru-B terem apresentado resultados significativos frente as cepas do gênero *Staphylococcus* spp., pode estar relacionado ao fato de que esse complexo é carregado positivamente, isso pode facilitar sua interação com alvos bacterianos, como fosfolípidios, ácidos teicóicos e lipoteicóicos presentes na membrana e na parede celular de bactérias Gram-positiva (DA SILVEIRA CARVALHO *et al.*, 2018). Além disso, esse estudo também corrobora com resultados encontrados por Abreu *et al.* (2017) e Oliveira *et al.* (2020), que testaram complexos de rutênio associados a antraceno, fenantrolina e bipyridina na presença e ausência da luz, e observaram aumento na atividade antimicrobiana na presença de LED azul devido a danos causados no DNA dos microrganismos. Assim, pode-se sugerir um mecanismo de ação similar para os complexos testados no presente estudo devido à semelhança nos ligantes e à presença de irradiação por LED.

Observamos em nossos resultados que a combinação com antibióticos potencializou os efeitos dos complexos de rutênio, assim como os efeitos dos antibióticos, exibindo efeito sinérgico ou indiferente. O efeito sinérgico foi significativo quando se avaliou a associação do complexo Ru-P com ampicilina e tetraciclina e do complexo Ru-B com ampicilina. Liao *et al.* (2021), utilizando a mesma técnica utilizada nesse estudo (*checkboard*), relataram não haver sinergismo com os complexos de rutênio com benzotiofeno e ampicilina mas mostrou efeito aditivo com gentamicina, antibiótico da classe dos aminoglicídeos, que possui mecanismo de ação similar da tetraciclina. Devido à realização de outras metodologias, sugeriram que sinergismo com esse antibiótico era devido a interação do ligante do complexo de rutênio e um gene regulatório da atividade catabólica da bactéria, SaCcpA. Andrade *et al.* (2020) relataram haver sinergismo com o complexo por eles testados e a ampicilina.

Em relação a redução na formação de biomassa, no presente estudo obteve-se maiores reduções nas concentrações testadas quando comparado com outros. Liao *et al.* (2021), testaram complexos de rutênio que reduziram de 10,5% e 25% da formação de biofilme em

concentração de 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$. Andrade *et al.* (2020), testou o complexo de rutênio RuNN, os quais inibiram a formação de biomassa em aproximadamente 50%, valor esse menor do que o encontrado no presente estudo. O autor associou esse resultado ao fato de que por serem complexos com atividade bacteriostática e bactericida, essa redução de biomassa pode estar relacionada a diminuição de células planctônicas, ou danos na membrana células, já que células bacterianas com danos nas membranas possuem sua capacidade de se ligar a células hospedeiras e umas às outras reduzidas, inibindo assim a formação de biofilmes (SHARMA *et al.*, 2012).

Andrade *et al.*, 2020, sugeriu que a diminuição na contagem de UFCs, ocasionada pela CIM ou CBM, interfere na densidade celular e conseqüentemente na produção da matriz do biofilme.

A redução significativa na formação de biomassa e a diminuição de células viáveis ocasionada pelo complexo Ru-P e Ru-B, podem estar relacionadas aos seus ligantes, antraceno, fenantrolina e biperidina, que possuem comprovada ação antimicrobiana e, apesar de não eliminar completamente a formação de biofilme, facilita consideravelmente sua eliminação. Além disso, Abreu *et al.* (2017) e Oliveira *et al.* (2020) testaram complexos de rutênio associados a antraceno, fenantrolina e biperidina na presença e ausência da luz, e notaram aumento na atividade antimicrobiana com a exposição ao LED azul, resultados que corroboram com o presente estudo.

Podemos observar nas eletrofotomicrografias (Figura 15), que os complexos de rutênio testados reduziram a densidade celular e biomassa, corroborando com os resultados encontrados nos ensaios sobre biofilmes, quantificação de biomassa e enumeração de células viáveis. Os complexos de rutênio causaram morte celular na cepa testada, podemos sugerir que essa morte foi ocasionada pela ação de seus ligantes, fenantrolina, biperidina e antraceno, que tem ação de quelante e intercalantes de DNA. Além disso, como os complexos são usados como fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica, a irradiação por LED azul gera a produção de EROs (GOSH *et al.*, 2020). Foi observado por Oliveira *et al.* (2020) quando irradiou os complexos por eles testados com LED azul, que essa irradiação aumentava a produção de EROs corroborando com a nossa sugestão de mecanismo de ação dos complexos de Ru-B e Ru-P. Além disso, alguns EROs podem reagir com moléculas orgânicas, ácidos graxos polinsaturado das membranas, e iniciar uma reação de cadeia, que resulta em danos na estrutura celular bacteriana (VATANSEVER *et al.*, 2013). Os complexos podem ter causado danos às membranas das bactérias, uma vez que o rutênio pode apresentar capacidade de interagir com membranas biológicas (SOUTHAM *et al.*, 2017). Wang *et al.* (2022), demonstrou que, apesar

de não ser um composto que ataca a membrana, o complexo rutênio contendo fenantrolina por eles testados mata a bactéria destruindo a integridade de sua membrana. Li *et al.* (2022), observou que o complexo de cério também atua na integridade de membrana, causando um significativo efeito antimicrobiano.

Em relação aos biofilmes pré-formados, no que concerne a quantificação de biomassa, a menor redução de biomassa foi de 63%, mas em alguns grupos tratados a quantidade de biomassa superou o controle. A cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 foi a mais resistente a diminuição da biomassa, provavelmente devido ao fato dessa cepa ser uma boa produtora de biofilme. A contagem de UFCs obteve resultados significativos de redução de célula viáveis, redução de 0,9 log a 1,6 logs, mas, também foram observados resultados em que o número de células superou o controle. A dificuldade de redução de biomassa e redução de células viáveis é devido a presença da substância polimérica extracelular (SPE), também conhecida como matriz, pois confere às células do biofilme proteção contra agentes externos (SHARMA; MISBA; KHAN *et al.*, 2019).

Corroborando com Li *et al.* (2011), que relata que bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, desenvolveram resistência aos antibióticos catiônicos alterando a estrutura do ácido teicóico em sua parede celular para diminuir a carga negativa na superfície da célula, talvez, por isso *S. epidermidis* ATCC 35984 tenha apresentada uma maior resistência aos complexos.

Nas concentrações de 125 e 1,9 $\mu\text{g/mL}$, as cepas testadas tiveram a produção de biomassa e o número de UFCs maiores do que o controle. O aumento na quantidade de biomassa e no número de células viáveis pode ser devido ao estresse causado pelos complexos nas células dos biofilmes, que aumentam a produção de SPE como forma de proteção ao estresse externo (CHEN *et al.*, 2022).

Acerca dos resultados de citotoxicidade dos complexos sobre os fibroblastos murinos (L929), o complexo Ru-P, nas concentrações de CIM e CBM, 1,9 e 3,9 $\mu\text{g/mL}$, a viabilidade foi superior a 50% em todos os tempos de exposição testados, viabilidade celular variando de $81,1\% \pm 0,3$ a $95,9\% \pm 7,2$, não apresentando toxicidade para as células L929. O complexo Ru-B apresentou citotoxicidade maior que a observada com o complexo Ru-P, nas concentrações que apresentou CIM e CBM, 1,9 e 3,9 $\mu\text{g/mL}$, a viabilidade celular foi menor que 50%, com variação de $47,3\% \pm 5,2$ a $22,3\% \pm 3,1$. Fandzloch *et al.* (2022), observou viabilidade reduzida, menor que 70%, utilizando a mesma linhagem L929 que a usada no presente estudo e principalmente nas maiores concentrações dos complexos de rutênio, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Oliveira *et al.* (2020), testou a viabilidade de células de carcinoma humano ((MCF-7; HTB-22),

adenocarcinoma de pulmão humano (A549; CCL-185^s), câncer colorretal humano (LS174T; CL188t) e queratinócitos humanos (HaCaT; PCS-200-011) na presença de complexos de rutênio contendo antraceno, e não apresentou citotoxicidade contra nenhuma célula testada. Comparando as estruturas dos complexos de rutênios estudados, podemos sugerir, que a presença de três ligantes bipyridinas no complexo Ru-B, pode ter relação com a alta toxicidade desse composto.

7. CONCLUSÕES

Os complexos de rutênio, Ru-P e Ru-B, apresentaram atividades sobre células planctônicas, biofilmes e biofilmes pré-formados de cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Foram capazes de deformação celular e redução no número de células na cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984. Além disso, os complexos apresentaram efeito aditivo quando combinados com antibióticos os ampicilina e tetraciclina, mesmo com cepas consideradas resistentes. O complexo Ru-P não apresentou citotoxicidade.

Diante do exposto, o complexo de rutênio, Ru-P e Ru-B, sua atividade antimicrobiana e antibiofilme mostrada nesse estudo, se mostraram moléculas promissora no combate às infecções relacionadas à *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e seus biofilmes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. D. *et al.* Aryl-substituted ruthenium (II) complexes: a strategy for enhanced photocleavage and efficient DNA binding. **Inorganic Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 9084-9096, 2017.

AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v.1, p. 134, 2010.

ANDRADE, A. L.*et al.* Antimicrobial activity and antibiotic synergy of a biphosphinic ruthenium complex against clinically relevant bacteria. **Biofouling**, v. 36, n. 4, p. 442-454, 2020.

BALSALOBRE; DROPA; MATTÉ. An overview of antimicrobial resistance and its public health significance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1-6, 2014.

CARRADORI, S. *et al.* Biofilm and quorum sensing inhibitors: The road so far. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 30, n. 12, p. 917-930, 2020.

CASTELO-BRANCO, D. *et al.* Azole-resistant *Candida albicans* from a wild Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*): a sign of an environmental imbalance? **Med. Mycol.**, v. 51, n. 5, p. 555–560, 2013.

CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>.

CDC. Central of disease control. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) **Disponível em <https://www.cdc.gov/mrsa/community/index.html>**. Acesso em 3 de julho de 2022.

COHEN, M. L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 762-767, 2000.

CHEN, M. *et al.* The stress response mechanisms of biofilm formation under sub-lethal photocatalysis. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 307, p. 121200, 2022.

CIEPLIK *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 571-589, 2018.

COOPER, M.A.; SHLAES, D., Fix the antibiotics pipeline. **Nature**. v.472, n.7341, p. 32-3, 2, 2011.

COSTERTON, J. W.; STEWART P.S.; GREENBERG E.P. Bacterial biofilms: a comon cause of persistents infections. **Science**, 284, p.1318-1322, 1999.

DA SILVA TRENTIN, D.e; GIORDANI, R. B.t; MACEDO, A. J.. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013.

DA SILVEIRA CARVALHO, J. M. *et al.* A biphosphinic ruthenium complex with potent anti-bacterial and anti-cancer activity. **New J. Chem.**, v. 41, n. 21, p. 13085–13095, 2017.

DAVIES. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat. Rev. Drug Discov.** 2, 114, 2003.

DHARMARATNE, P. *et al.* Contemporary approaches and future perspectives of antibacterial photodynamic therapy (aPDT) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A systematic review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 200, p. 112341, 2020.

DOLAN, RM. Biofilms and Device-Associated Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.2, p.277-281, 2001.

DOUGHERTY, T. J.; HENDERSON, B. Historical perspective: Schwartz S, Winkelman JW, Lipson RL. **Photodynamic therapy**. New York: Marcel Dekker Inc, p. 1-15, 1992.

DOUGHERTY *et al.*, Photodynamic Therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, Vol. 90, No. 12, June 17, 1998.

DURAND, G. A.; RAOULT, D.; DUBOURG, G.. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. **International journal of antimicrobial agents**, v. 53, n. 4, p. 371-382, 2019.

FANDZLOCH, M. *et al.* Sawhorse-type ruthenium complexes with triazolopyrimidine ligands-what do they represent in terms of cytotoxic and CORM compounds? **Dalton Transactions**, 2022.

FENG, Y. *et al.* Selective Photoinactivation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Highly Positively Charged RuII Complexes. **Chemistry—A European Journal**, v. 25, n. 61, p. 13879-13884, 2019.

FREI *et al.* Metal complexes as a promising source for new antibiotics†, 2020 EBREY, Richard *et al.* Biofilms and hospital-acquired infections. *Microbial biofilms*, p. 294-313, 2004.

GHANNOUM, M. *et al.* (Ed.). **Microbial biofilms**. John Wiley & Sons, 2020.

GHOSH, S. *et al.* Polymeric ruthenium precursor as a photoactivated antimicrobial agent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402, p. 123788, 2021.

GIANFERRARA, T.; BRATSOS, I.; ALESSIO, E. A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action. **Dalton Transactions**, n.37, p. 7588-7598, 2009.

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

GORLE, A. K. *et al.* Tri-and tetra-nuclear polypyridyl ruthenium (II) complexes as antimicrobial agents. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 44, p. 16713- 16725, 2014.

KALKA, K; MERK, H; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, n. 3, p. 389-413, 2000.

KIRAN, T. *et al.* Synthesis, spectroscopic characterization and in vitro studies of new heteroleptic copper (II) complexes derived from 2-hydroxy naphthaldehyde Schiff's bases and N, N donor ligands: Antimicrobial, DNA binding and cytotoxic investigations. **Inorganica Chimica Acta**, v.433, p. 26-34, 2015.

JAIN, A.; GARRETT, N. T.; MALONE, Z. P. Ruthenium-based photoactive metalloantibiotics. **Photochemistry and Photobiology**, v. 98, n. 1, p. 6-16, 2022.

LALOUČKOVÁ, K.; SKŘIVANOVÁ, E. Antibiotic resistance in livestock breeding: a review. **Scientia Agriculturae Bohemica**, v. 50, n. 1, p. 15-22, 2019.

LAM, P.L. *et al.* Development of ruthenium (II) complexes as topical antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 10, p. 3949-3957, 2014.

LECHARTIER, B.; HARTKOONR, R. C.; COLE, S. T. *In vitro* combination studies of benzothiazinone lead compound BTZ043 against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5790-5793, 2012.

LEWIS, K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. **Hand- book of Experimental Pharmacology**, v. 211, p. 121-133, 2012.

LEVIN, B. R.; ROZEN, D. E. Non-inherited antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 556-562, 2006.

LIAO, X. *et al.* Synthesis of ruthenium complexes functionalized with benzothiophene and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. **Dalton Transactions**, v. 50, n. 16, p. 5607-5616, 2021.

LI, D. *et al.* Membrane-active La (III) and Ce (III) complexes as potent antibacterial agents: synthesis, characterization, in vitro, in silico, and in vivo studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1249, p. 131595, 2022

LI, F.; COLLINS, J. G.; KEENE, F. R. Chem Soc Rev Ruthenium complexes as antimicrobial agents. **Chemical Society Reviews**, v. 44, p. 2529–2542, 2015.

LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 5th ed. New Yourk. Williams & Willkins. 851p, 2005.

MAH, T. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1061-1072, 2012.

MALIK, Z.; LADAN, H.; NITZAN, Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 14, n. 3, p. 262-266, 1992.

MAREE CL, *et al.* Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing healthcare-associated infections. **Emerg Infect Dis**. 2007 Feb;13(2):236-42. doi: 10.3201/eid1302.060781. PMID: 17479885; PMCID: PMC2725868.

MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. Fungal super glue: the biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 9, p. e1005828, 2016.

MORETTI, M. L., *et al.* Estafilococcias. In **Veronesi: tratado de infectologia**. 5 Edição. V. 2, 2015. NANDI, Pran Gobinda et al. Synthesis of NNN Chiral Ruthenium Complexes and Their Cytotoxicity Studies. **Inorganic Chemistry**, v. 60, n. 10, p. 7422-7432, 2021.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 1318, 1,10-Phenanthroline**. Disponível em https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_10-Phenanthroline. 2022. Acessado em 8 de junho, 2022.

OLIVEIRA, G. de F.S. et al. An anthracene-pendant ruthenium (ii) complex conjugated to a biotin anchor, an essential handle for photo-induced anti-cancer activity. **New Journal of Chemistry**, v. 44, n. 16, p. 6610-6622, 2020.

OLIVEIRA, W. F. *et al.* Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis infections on implants. **Journal of Hospital Infection**, v. 98, n. 2, p. 111-117, 2018.

PARAKH, P.; GOKULAKRISHNAN, S.; PRAKASH, H. Visible light water disinfection using [Ru (bpy) 2 (phendione)](PF6) 2· 2H2O and [Ru (phendione) 3] Cl2· 2H2O complexes and their effective adsorption onto activated carbon. **Separation and Purification Technology**, v. 109, p. 9-17, 2013.

PIZARRO, A. M.; SADLER, P.r J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1198-1211, 2009.

PROCOP, G. W., *et al.* Diagnóstico microbiológico | texto e atlas. 7. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2018.

RAAB, O. On the effect of fluorescent substances on infusoria. **Z Biol**, v. 39, p. 524-6, 1900.

STEWART, P.S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial bio films. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, p. 107-113, 2002.

ROSATO, A. *et al.* Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. Phytomedicine: **Internacional journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v.14, n.11,p.727-32, nov. 2007.

ROY, S. *et al.* Phenanthroline derivatives with improved selectivity as DNA-targeting anticancer or antimicrobial drugs. **ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 1427-1434, 2008.

SHARMA, D.; MISBA, L.; KHAN, A.U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2019.

SILVER, L.L., Challenges of Antibacterial Discovery, v. 24, n.1, p. 71-109, 2011.

SOLIMAN, Nancy et al. Encapsulation of a Ru (II) polypyridyl complex into polylactide nanoparticles for antimicrobial photodynamic therapy. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 10, p. 961, 2020.

SULISTYANI, H. *et al.* Effect of roselle calyx extract on in vitro viability and biofilm formation ability of oral pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v 9, n. 2, p. 119–124, 2016.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J. Microbiol. Methods.**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

SOUTHAM, H. M. *et al.* The microbiology of ruthenium complexes. In: Advances in microbial physiology. **Academic Press**. p. 1-96, 2017.

TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. Staphylococcus aureus. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2021.

VASCONCELOS, M. A. *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of derriobtusone A isolated from Lonchocarpus obtusus. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

VATANSEVER, F. *et al.* Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species–bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 6, p. 955-989, 2013.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.

WANG, L. *et al.* Ruthenium (II) complexes targeting membrane as biofilm disruptors and resistance breakers in Staphylococcus aureus bacteria. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 114485, 2022.

WHO. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 3, p. 383–94, 2014.

WHO *et al.* **Antimicrobial resistance and the United Nations sustainable development cooperation framework: guidance for United Nations country teams**, 2021.

XU, Z. *et al.* Crystal violet and XTT assays on Staphylococcus aureus biofilm quantification. **Curr. Microbiol**, v. 73 n. 4, p. 474–482, 2016.

YANG, Y.; LIAO, G.; FU, C. Recent advances on octahedral polypyridyl ruthenium (II) complexes as antimicrobial agents. **Polymers**, v. 10, n. 6, p. 650, 2018.

YELIN, I.; KISHONY, R. Antibiotic resistance. **Cell**, v. 172, n. 5, p. 1136-1136. e1, 2018.