



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS**  
**NATURAIS**

**ALEXANDRE LOPES ANDRADE**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE COMPLEXOS DE**  
**RUTÊNIO DO TIPO  $cis-[RuCl_2(dppb)(NN-R)]^{2+}$  SOBRE BACTÉRIAS RESISTENTES**  
**E O EFEITO DESTES COMBINADOS AOS ANTIBIÓTICOS AMPILICINA E**  
**TETRACICLINA**

**FORTALEZA**

**2018**

ALEXANDRE LOPES ANDRADE

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO  
DO TIPO *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppb)(NN-R)]<sup>2+</sup> SOBRE BACTÉRIAS RESISTENTES E O EFEITO  
DESTES COMBINADOS AOS ANTIBIÓTICOS AMPILICINA E TETRACICLINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Vassiliepe  
Sousa Arruda

Coorientador: Prof. Dr. Mayron Alves de  
Vasconcelos

FORTALEZA

2018

---

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

---

A565a Andrade, Alexandre Lopes.  
Atividade antibacteriana e antibiofilme de complexos de rutênio do tipo cis-[RuCl<sub>2</sub>(dppb)(NN-R)]<sub>2</sub>+ sobre bactérias resistentes e o efeito destes combinados aos antibióticos ampicilina e tetraciclina / Alexandre Lopes Andrade. – 2018.  
103 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. Francisco Vassiliepe Sousa Arruda.  
Coorientação: Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos.

1. Resistência antimicrobiana. 2. Complexos de rutênio. 3. Antibacteriana. 4. Biofilme. 5. Sinergismo. I. Título.

---

CDD 660.6

ALEXANDRE LOPES ANDRADE

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO DO TIPO *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppb)(NN-R)]<sup>2+</sup> SOBRE BACTÉRIAS RESISTENTES E O EFEITO DESTES COMBINADOS AOS ANTIBIÓTICOS AMPILICINA E TETRACICLINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Vassiliepe Sousa Arruda

Coorientador: Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Francisco Vassiliepe Sousa Arruda (Orientador)  
Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

---

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos (Coorientador)  
Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN)

---

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

---

Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Nascimento Neto (Membro)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Cláudia Silva Gondim (Membro)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus que nos dá a possibilidade de conhecê-lo, a minha esposa Nívia, a toda minha família, e especialmente a Aline, meu maior tesouro.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por ser Senhor da minha vida, meu guia na tomada de decisões, que julgo difíceis, mas que o resultado é melhor do que o esperado.

À minha esposa Nívia Soares Scarcela Andrade pela compreensão e força nos momentos mais difíceis de nossas vidas, e a minha filha Aline Scarcela Andrade, que foi o maior presente que ganhei durante o mestrado.

Aos meus familiares que também têm contribuído com minha formação pessoal: minha mãe Ana Cleide, meu pai José William, irmãos – Marcelo, Júnior e Élcio, assim como os demais familiares

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Francisco Vassiliepe Arruda, por todos os ensinamentos dispensados a minha pessoa, assim como ao meu Coorientador, Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos a quem considero meu “pai científico”, por acreditar em meu potencial e ter me ensinado os caminhos para se fazer Ciência.

Ao Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira, que muito admiro pela sua curiosidade científica, e pela forma como conduz tão bem seu grupo de pesquisa e por todos os ensinamentos compartilhados em nossas reuniões do grupo.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Neto belas boas conversas que sempre tínhamos, e também pelos ensinamentos e dúvidas que sempre me tirava em alguns experimentos.

Aos colegas que me sempre me ajudaram na parte teórica bem como nos procedimentos de bancada: Rafael, Anna Luísa, Alisson, Aryane, Patrícia, Leonardo, Renally, Joel, Sarah, Evelline, Kaline, Eduarda bem como os novos ICs Caio, Gabriele, Jhennyfer, as duas Lívias, e a Lais.

A Ana Cláudia Gondim (Aninha) pela parceria que temos trilhado, ao Prof. Dr. Eduardo Henrique Sousa, pela genialidade em construir moléculas biologicamente ativas, o que me fez ver a Química por um outro ângulo.

A minha PNPD Kalina, pela amizade e ajuda com os dados e a escrita desta dissertação.

Aos meus colegas de moradia: Messias, pelo companheirismo e alegria de compartilhar tudo que sabe, além de instigar novos conhecimentos; Cássia e outra vez o Rafael, por completarem também essa parte.

A Prefeitura Municipal de Tauá através da Secretaria Municipal de Educação – SME e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, pelo investimento e apoio na minha qualificação.

“Porque, onde está o teu tesouro,  
estará também o teu coração”.

(Mateus 6. 21)

## RESUMO

A resistência antimicrobiana é um problema crítico de saúde pública global, que vem aumentando o número de mortes causadas por bactérias multirresistentes. Muitas infecções bacterianas estão associadas a capacidade que estes 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, constitu-se como um alvo a ser atingido, para superar os problemas atuais de resistência aos antibióticos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de complexos de rutênio do tipo  $\text{cis-[RuCl}_2(\text{dppb})(\text{NN-R})]^{2+}$ , denominados de RuNN, RuNN-F e RuNN-Br e o efeito destes combinados aos antibióticos ampicilina e tetraciclina, contra as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e *Escherichia coli* ATCC 11303. Para determinar a atividade antibacteriana, os compostos foram diluídos em concentrações variando de 500 a 7,8  $\mu\text{g/mL}$  e distribuídos em placas de 96 poços de poliestireno e fundo plano, com cada suspensão bacteriana ajustada ( $1 \times 10^6$  UFC/ mL) em meio TSB e, em seguida, incubadas durante 24 horas a 37 °C. O efeito aos complexos de rutênio foi avaliado pela concentração inibitória mínima (CIM) e pela concentração bactericida mínima (CBM). Os valores da CIM foram combinados com os antibióticos ampicilina e tetraciclina e seus efeitos foram avaliados utilizando a técnica do *checkerboard*, ao passo que os valores da CBM foram usados para determinar o tempo de morte das bactérias tratadas com estes complexos. A atividade antibiofilme, foi avaliada pela quantificação da biomassa pelo método de coloração cristal violeta (CV), pela mensuração da atividade metabólica através do ensaio de redução do XTT e pelo o número de células viáveis do biofilme por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). O tratamento com os complexos exibiram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas com valores de CIM variando entre 7,8  $\mu\text{g/mL}$  a 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , e CBM de 31,25  $\mu\text{g/mL}$  a 125  $\mu\text{g/mL}$ , mas não contra bactérias Gram-negativas. O efeito sinérgico contra *Staphylococcus* spp. só foi observado quando estes complexos foram combinados com a ampicilina, exibindo valores de ICIF de 0,187, o que não ocorreu quando associados com a tetraciclina. Os estudos do tempo de morte, demonstraram efeito bactericida já nas primeiras horas de contato, tanto para as cepas de *S. aureus*, quanto para as cepas de *S. epidermidis*, na qual o tempo máximo de morte foi de 24 horas. Em relação a atividade antibiofilme, os complexos avaliados foram capazes de reduzir a biomassa em mais de 30% na concentração de 7,8  $\mu\text{g/mL}$  e quase 100% na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ . O mesmo resultado foi observado quando a atividade metabólica foi avaliada através da redução do XTT, observando-se uma baixa atividade metabólica em concentrações acima de 62,5  $\mu\text{g/mL}$  para todas as cepas de *Staphylococcus* spp. Em adição, o número de células viáveis do biofilme foi reduzido entre 1,2 e 4,9 logs. Em conclusão, os complexos de rutênio do tipo  $\text{cis-[RuCl}_2(\text{dppb})(\text{NN-R})]^{2+}$  mostraram atividade contra bactérias Gram-positivas, tanto isolados, como em combinação com os antibióticos e não se mostraram tóxicos quando testados em *zebrafish*. Esses resultados demonstram que os complexos de rutênio usados neste estudo, constituem novas ferramentas que poderão auxiliar terapias destinadas ao tratamento de infecções bacterianas causadas por *Staphylococcus* spp.

**Palavras-chave:** Resistência antimicrobiana. Complexos de rutênio. Antibacteriana. Biofilme. Sinergismo.

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a critical global public health problem, which is increasing the number of deaths caused by multiresistant bacteria. Bacterial infections are associated with the ability of these microorganisms to form biofilms, that is essential for colonization of the most diverse environments, in addition to conferring high levels of resistance. In the face of this problem, the discovery of new classes of antimicrobial molecules, constitutes a target to be reached, to overcome the current problems of resistance to antibiotics. Currently, studies based on ruthenium (II) complexes have shown the antimicrobial activity of this element when associated with specific ligands, thus representing an alternative for microbial control. The objective of this study was to assess the antibacterial activity, antibiofilm activity and the antibiotic-associated effect of three ruthenium complexes of the type  $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{NN-R})]^{2+}$  called RuNN, RuNN-F and RuNN-Br, against the strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e *Escherichia coli* ATCC 11303. To determine the antibacterial activity, the compounds were diluted in concentrations ranging from 500 to 7.8  $\mu\text{g/ml}$  and distributed into 96-well plates of polystyrene and flat bottom with each bacterial suspension adjusted ( $1 \times 10^6$  CFU/ml) in TSB medium and then incubated for 24 hours at 37 ° C. The susceptibility of the ruthenium complexes was evaluated by the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC). CIM values were combined with antibiotics ampicillin and tetracycline and their effect was evaluated using the checkerboard technique, whereas the MBC values were used to determine the time of death of the bacteria treated with these complexes. The antibiofilm activity, evaluated by biomass quantification, metabolic activity and cell viability were evaluated by staining (CV), XTT reduction assay and enumeration of viable biofilm cells (CFU). The results showed that the three complexes exhibited antimicrobial activity against Gram-positive bacteria with MIC values ranging from 7.8  $\mu\text{g/ml}$  to 62.5  $\mu\text{g/ml}$ , and CBM from 31.25  $\mu\text{g/ml}$  to 125  $\mu\text{g/ml}$ , but not against Gram-negative bacteria. The synergistic effect against *Staphylococcus* spp., was only observed when these complexes were combined with ampicillin, exhibiting ICIF values of 0.187, which did not occur when associated with tetracylin. The time of death studies demonstrated bactericidal effect in the first hours of contact, both for *S. aureus* strains and *S. epidermidis* strains, with a maximum death time of 24 hours. In relation to the antibiofilm activity, the three complexes were able to reduce the biomass by more than 30% to the concentration of 7.8  $\mu\text{g/ml}$  and almost 100% to the concentration of 500  $\mu\text{g/mL}$ . The same result was observed when the metabolic activity was evaluated through reduction XTT, observing a low metabolic activity at concentrations above 62.5  $\mu\text{g/ml}$  for all strains of *Staphylococcus* spp. In addition, the number of viable cells of the biofilm was reduced between 1.2 and 4.9 logs. In conclusion, the three  $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{NN-R})]^{2+}$  ruthenium complexes showed activity against Gram-positive bacteria, either alone or in combination with antibiotics. These findings are fundamental for the implantation of new therapies designed to treatment bacterial infections caused by *Staphylococcus* spp.

**Keywords:** Antimicrobial resistance. Ruthenium complexes. Antibacterial. Biofilm. Synergistic.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Sulfa. Em a) Sulfanilamida, em b) seu análogo PABA .....	17
Figura 2 – Taxa de mortalidade para as principais causas de mortes nos Estados Unidos .....	18
Figura 3 – Alvo dos principais agentes antibacterianos .....	19
Figura 4 – Síntese de peptidoglicano. Em a) transporte de peptidoglicano e b) transpeptidação .....	19
Figura 5 – Principais antibióticos descobertos até o final da década de 1980 .....	20
Figura 6 – Mecanismo de resistência bacteriana .....	21
Figura 7 – Resistência de <i>E. coli</i> a cefalosporina de 3 <sup>a</sup> geração em diversas partes do mundo .....	23
Figura 8 – Mortes atribuídas a RAM a cada ano em comparação com outras principais causas de morte .....	24
Figura 9 – Resistência de <i>S. aureus</i> a várias classes de antibióticos .....	26
Figura 10 – Resistência de <i>E. coli</i> a principais classes de antibióticos .....	27
Figura 11 – Resistência de <i>P. aeruginosa</i> ao antibiótico polimixina .....	28
Figura 12 – Estágio de formação de biofilmes bacterianos .....	31
Figura 13 – Estrutura da cisplatina e sua ligação ao DNA .....	34
Figura 14 – Classificação dos complexos de rutênio mononucleares .....	36
Figura 15 – <i>Zebrafish</i> adulto .....	37
Figura 16 – Teste de campo aberto em <i>zebrafish</i> .....	38
Figura 17 – Organograma e estruturação deste estudo .....	41
Figura 18 – Esquematização dos testes de associação entre o complexo de rutênio RuNN e os antibióticos .....	47
Figura 19 – Cinética de morte de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. crescidas na presença do complexo RuNN .....	60

Figura 20 – Cinética de morte de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. crescidas na presença do complexo RuNN–F .....	61
Figura 21 – Cinética de morte de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. crescidas na presença do complexo RuNN–Br .....	62
Figura 22 – Efeito do complexo de rutênio RuNN sobre biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> .....	64
Figura 23 – Efeito do complexo de rutênio RuNN-F sobre biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> .....	66
Figura 24 – Efeito do complexo de rutênio RuNN-Br sobre biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> .....	68
Figura 25 – Eletromicrografias da atividade antibiofilme de complexos de rutênio sobre de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 tratados com 24 horas .....	70
Figura 26. – Efeito do complexo de rutênio RuNN sobre biofilmes pré-formados de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> .....	72
Figura 27 – Efeito do complexo de rutênio RuNN-F sobre biofilmes pré-formados de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> .....	74
Figura 28 – Efeito do complexo de rutênio RuNN-Br sobre biofilmes pré-formados de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> .....	76
Figura 29 – Eletromicrografias da atividade sobre biofilmes pré-formados de do complexo de rutênio de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 tratado após 24 horas de crescimento .....	77
Figura 30 – Efeitos dos complexos de rutênio RuNN, RuNN-F e RuNN-Br sobre a atividade locomotora do <i>zebrafish</i> ( <i>Dario rerio</i> ) adulto no teste de campo aberto (0 a 5 min) .....	78
Figura 31 – Hipótese do mecanismo de ação dos complexos de rutênio baseado em suas propriedades lipofílicas (ligante fosfina) e redutora (ligante quinina) .....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Infecções humanas associadas com a formação de biofilmes e microrganismos comumente envolvidos .....	32
Tabela 2 – Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos complexos de rutênio e dos antibióticos ampicilina (AMP) e tetraciclina (TETRA) sobre bactérias Gram-positivas e Gram negativas.....	53
Tabela 3 – Efeito do complexo RuNN associado aos antibióticos (AMP) e (TETRA), sobre <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> .....	55
Tabela 4 – Efeito do complexo RuNN-F associado aos antibióticos (AMP) e (TETRA) sobre <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> .....	57
Tabela 5 – Efeito do complexo RuNN-Br associado aos antibióticos (AMP) e (TETRA) sobre <i>S.aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> .....	59
Tabela 6 – Resultados dos testes de toxicidade aguda dos complexos de rutênio sobre <i>zebrafish</i> adulto .....	79

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Bactérias padrão para estudos de suscetibilidade .....	42
Quadro 2 – Estrutura dos complexos de rutênio e sua respectiva massa molecular (MM) e potencial redox ( $E_{1/2}$ ) .....	43
Quadro 3 – Estrutura de antibióticos e sua respectiva massa molecular (MM) .....	43
Quadro 4 – Pontos de corte se suscetibilidade aos agentes antimicrobianos .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AMP</b>	Ampicilina
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CDDEP</b>	<i>Center for Disease for Dynamics, Economics &amp; Policy</i>
<b>CIF</b>	Concentração Inibitória Facionada
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CRE</b>	Enterobacteriaceas Resistentes a Carbapenem
<b>CV</b>	Cristal Violeta
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>D.O</b>	Densidade Óptica
<b>ESBL</b>	$\beta$ - Lactamase de Espectro Estendido
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>GSH</b>	Glutationa Reduzida
<b>IAB</b>	Infecções Associadas ao Biofilme
<b>ICIF</b>	Índice de Concentração Inibitória Facionada
<b>MDR</b>	Multidrogas Resistentes
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PMS</b>	<i>Phenazine Methosulfate</i>
<b>RAM</b>	Resistência Antimicrobiana
<b>SPE</b>	Substância Polimérica Extracelular
<b>TETRA</b>	Tetraciclina
<b>TSA</b>	Soja Tríplica Ágar
<b>TSB</b>	Soja Tríplica Caldo
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>XTT</b>	Tetrazólio2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-Tetrazólio-
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1	<b>A Era dos Antibióticos</b> .....	17
2.2	<b>Resistência Antimicrobiana (RAM)</b> .....	20
2.3	<b>Bactérias de interesse clínico: <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	25
2.4	<b>Biofilmes bacterianos</b> .....	28
2.4.1	<b>Processo de formação de biofilmes</b> .....	29
2.4.2	<b>Biofilmes associados a infecções</b> .....	31
2.5	<b>O elemento rutênio</b> .....	33
2.5.1	<b>Atividade antimicrobiana de complexos de rutênio</b> .....	35
2.6	<b><i>Zebrafish</i> como modelo biológico</b> .....	36
2.6.1	<b><i>Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)</i></b> .....	38
2.6.2	<b><i>Teste de toxicidade em zebrafish</i></b> .....	39
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	40
3.1	<b>Objetivo geral</b> .....	40
3.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	40
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	41
4.1	<b>Local de estudo</b> .....	41
4.2	<b>Microrganismos</b> .....	42
4.3	<b>Obtenção dos complexos de rutênio e antibióticos</b> .....	42
4.4	<b>Condições de cultura</b> .....	44
4.5	<b>Solubilização e diluição dos complexos RuNN, RuNN-F, RuNN-Br e antibióticos</b> .....	44
4.6	<b>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)</b> .....	44
4.7	<b>Avaliação do efeito dos complexos de rutênio combinados aos antibióticos padrão</b> .....	46
4.8	<b>Ensaio do tempo de morte</b> .....	47
4.9	<b>Ensaio sobre a formação do biofilme</b> .....	48
4.9.1	<b><i>Quantificação da biomassa</i></b> .....	48

4.9.2	<i>Determinação da atividade metabólica do biofilme</i> .....	48
4.9.3	<i>Contagem de células viáveis dos biofilmes</i> .....	49
4.9.4	<i>Ensaio sobre biofilmes pré-formados</i> .....	49
4.9.5	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i> .....	50
4.9.6	<i>Teste de toxicidade e atividade locomotora em zebrafish</i> .....	50
4.10	<b>Análise estatística</b> .....	51
5	<b>RESULTADOS</b> .....	52
5.1	<b>Atividade antimicrobiana sobre células planctônicas</b> .....	52
5.2	<b>Atividade combinada aos antibióticos</b> .....	54
5.3	<b>Cinética de morte</b> .....	60
5.4	<b>Atividade antibiofilme: inibição da formação de biofilmes, atividade metabólica e enumeração de células viáveis</b> .....	63
5.5	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da inibição da formação de biofilmes</b> .....	69
5.6	<b>Atividade sobre biofilmes pré-formados: quantificação da biomassa, atividade metabólica e enumeração de células viáveis</b> .....	71
5.7	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de biofilmes pré-formados</b> .....	77
5.8	<b>Efeito sobre a atividade motora e toxicidade em zebrafish</b> .....	78
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	80
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	87
8	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	87
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	88
	<b>ANEXO A – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS A2 (BIOTECNOLOGIA)</b> .....	101
	<b>ANEXO B – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS B2 (BIOTECNOLOGIA)</b> .....	102

## 1 INTRODUÇÃO

A descoberta de antibióticos representou um ponto de inflexão na história humana. Além de serem importantes para o tratamento e controle de doenças infecciosas em seres humanos e animais domésticos, os antibióticos foram essenciais para o sucesso de cirurgias complexas, terapia intensiva, transplantes de órgãos, sobrevivência dos imunossuprimidos e produção de animais para consumo (ACAR; MOULIN, 2012).

No entanto, nos últimos anos a propagação de bactérias resistentes vem aumentando, assim como o número de mortes por infecções hospitalares (FOOD, 2017), um fato que pode estar associado ao uso indiscriminado e excessivo de agentes antimicrobianos na clínica médica (WENSLEY, 2016).

A resistência antimicrobiana (RAM) é um fenômeno natural em microrganismos, mas pode ser acelerada pela pressão seletiva do uso de agentes antimicrobianos (NEILL, 2016). De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS) a resistência antimicrobiana é um desafio para a saúde pública global, e nenhuma estratégia simples será suficiente para conter completamente o surgimento e disseminação de organismos infecciosos que tornam-se resistentes aos medicamentos antimicrobianos disponíveis (WHO, 2014).

As infecções nosocomiais são uma das principais causas de doenças evitáveis nos pacientes hospitalares, e geram um dano substancial e desnecessário nos recursos de saúde. Estas infecções são frequentemente causadas por bactérias resistentes a múltiplos antibióticos e o tratamento destas infecções contribui para a seleção de bactérias resistentes (JENKINS, 2017). Dentre os principais microrganismos envolvidos neste tipo de infecção encontramos *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (MOFFA *et al.*, 2017), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Escherichia coli* (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013), *Clostridium difficile*, *Bacteriodes fragilis* e bactérias do gênero *Acinetobacter* (KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017).

Um das formas mais bem estudadas da resistência antimicrobiana é a formação de biofilmes. Essa forma de vida microbiana é caracterizada por comunidades de células ligadas a um substrato abiótico ou biótico, inseridas em uma substância polimérica extracelular (SPE) produzida pelos próprios microrganismos (SULISTYANI *et al.*, 2016).

Os microrganismos que residem em biofilmes podem desenvolver tolerância a antibióticos tradicionais ou agentes antimicrobianos através de programas de dormência metabólica ou de percussão molecular (KOO *et al.*, 2017). Muitos estudos demonstram que as células microbianas em biofilmes (sésseis) podem ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos

antibióticos do que seus exemplares em forma livre (planctônica) (MELCHIOR; VAARKAMP; FINK-GREMMELS, 2006).

Com a crescente ameaça da resistência antimicrobiana, e a preocupação global da iminência de uma era pós-antibiótico, onde lesões e infecções comuns podem voltar a matar (WHO, 2014), um grande esforço tem sido realizado para a descoberta de novas moléculas, tanto de origem natural quanto sintética, para combater os microrganismos multirresistentes e diminuir o número de mortes causadas por infecções bacterianas.

Nessa linha pela busca por novas moléculas com atividade antimicrobiana, destacam-se os metalocompostos, tendo em consideração que os medicamentos à base de metal e metalóides desempenham um papel importante na história da química medicinal (AMINOV, 2010). Dessa forma, nos últimos anos, uma variedade de complexos metálicos com diferentes centros de metal (principalmente elementos de metal de transição) e ligados a diversas estruturas, foram sintetizados e suas atividades biológicas estudadas (LI; COLLINS; KEENE, 2015).

Entre os complexos de metais de transição, os complexos baseados em rutênio foram amplamente estudados e alguns exibem atividade biológica promissoras, como atividade antimicrobiana, antiparasitária e anticâncer, devido à sua capacidade de se ligar fortemente a ácidos nucleicos e proteínas, cinética de troca de ligantes semelhante à de outros metais como a platina, a prevalência de dois estados principais de oxidação (II e III) e sua propriedade de mimetizar moléculas biológicas (GILL; THOMAS, 2012).

Nesse contexto, este estudo buscou avaliar os efeitos de complexos de rutênio mononucleares, estruturados com ligantes fosfina e quinona, que lhe conferem características de interesse em meios biológicos, visando inseri-lo como uma nova alternativa no controle de infecções causadas por microrganismos resistentes, como também associá-los a agentes antimicrobianos clássicos buscando potencializar seus efeitos.

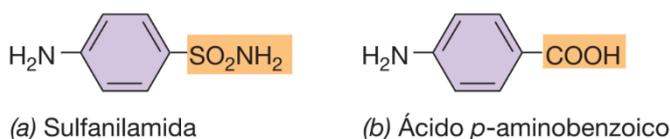
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A era dos Antibióticos

Em meados do século XX, as infecções bacterianas eram as principais causas de morte. Bactérias patogênicas como *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*, estavam associados a epidemias de doenças humanas e causavam altas taxas de morbidade e mortalidade (DAVIES; DAVIES, 2010).

A descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming foi o início do que foi chamado de "Era de Ouro" do desenvolvimento de antibióticos (LUEPKE *et al.*, 2017), no entanto, o tratamento e a prevenção de doenças só se tornaram possíveis a partir do ano de 1937 com a introdução dos primeiros antimicrobianos efetivos, no caso, as sulfonamidas (LIVERMORE, 2012), que como mostrado na figura 1, é um análogo do ácido p-aminobenzoico, um precursor do ácido fólico que é um fator de crescimento para as bactérias.

Figura 1 – Sulfa. Em a) Sulfanilamida, e seu análogo em b) PABA

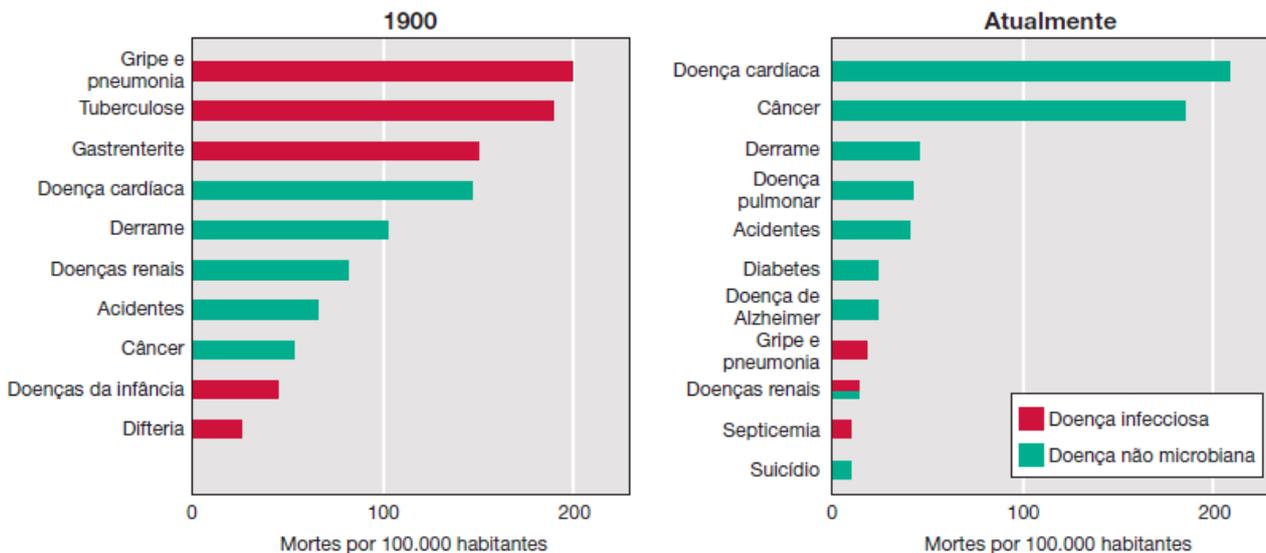


Fonte: MADIGAN *et al.*, (2016).

As doenças bacterianas, principalmente pneumonia e tuberculose, mataram aproximadamente 300 mil americanos em 1930 e representaram 22% do total de mortes (GOTTFRIED, 2005). Quando os antibióticos foram introduzidos no final da década de 1930, a mortalidade secundária à pneumonia pneumocócica diminuiu de 20-40% a 5% à (LEPPER, DOWLING 1951), a mortalidade por bacteremia pneumocócica de 50-80% a 18-20% (BREIMAN *et al.*, 1990; TOMASZ A, 1997; ORTQVIST *et al.*, 2005) e a mortalidade associada a infecções graves (meningite bacteriana e endocardite) reduziu entre 60-75% (IOM, 2010). Nesse aspecto, os antibióticos revolucionaram a medicina e inúmeras vidas foram salvas após sua descoberta (DAVIES; DAVIES, 2010). Durante este período de tempo, a "Era de Ouro" da descoberta antimicrobiana começou oficialmente. No entanto, estamos no meio de uma era pós-antibiótica, (LUEPKE *et al.*, 2017), já que número de aprovações da Food and

Drug Administration (FDA) dos antibióticos sistêmicos diminuiu 90% nos últimos 30 anos (SPELLBERG; GILBERT, 2014). Não se pode negar os ganhos da era de ouro dos antibióticos, pois muitas doenças intratáveis foram reduzidas, um fato que chegou a inverter as principais causas de morte dos anos 1900 aos dias atuais nos Estados Unidos (Figura 2), de acordo com dados do *United States National Center for Health Statistics* e do *Centers for Disease and Prevention*.

Figura 2 - Taxa de mortalidade para as principais causas de mortes nos Estados Unidos

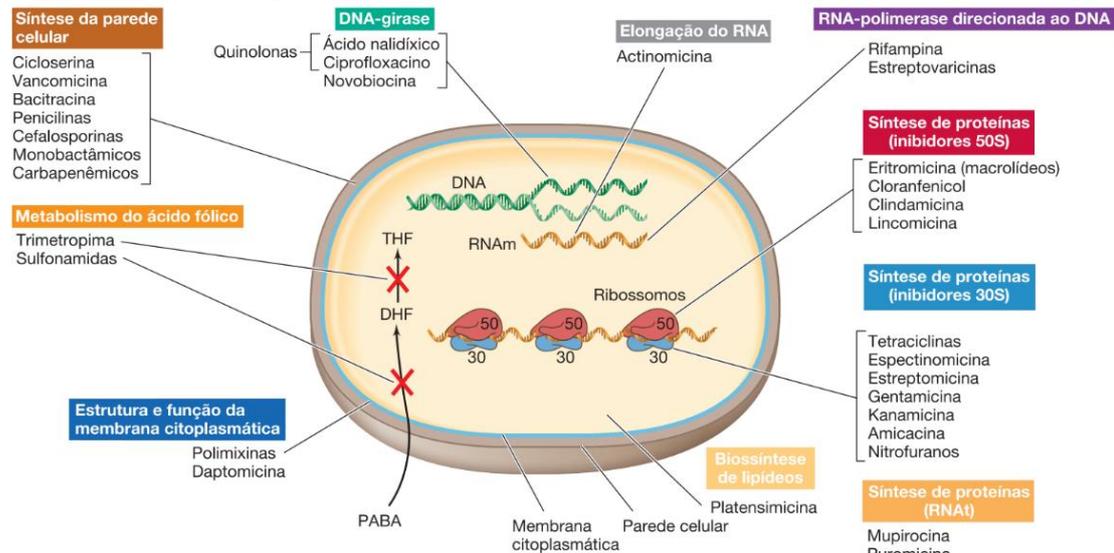


Fonte: MADIGAN *et al.*, (2016).

Os antibióticos também ajudaram a prolongar a expectativa de vida reduzindo os índices das infecções bacterianas (PIDDOCK, 2012), já que foram usados tanto na prevenção quanto no tratamento eficaz de infecções que poderiam ocorrer em pacientes que estavam recebendo tratamentos de quimioterapia; que sofriam de doenças crônicas como diabetes, doença renal terminal ou artrite reumatoide; ou que tinham realizado cirurgias complexas, como transplantes de órgãos, substituições de articulações ou até cirurgias cardíacas (VISWANATHAN, 2014; READ; WOODS, 2014).

Madigan *et al.*, (2016) destacaram que os fármacos antimicrobianos apresentam alta eficiência no tratamento de infecções bacterianas, por exibirem uma toxicidade seletiva, já que inibem e matam os patógenos, sem afetar adversamente o hospedeiro, e como mostrado na figura 3, seu mecanismo de ação age em pelo menos cinco alvos na célula bacteriana.

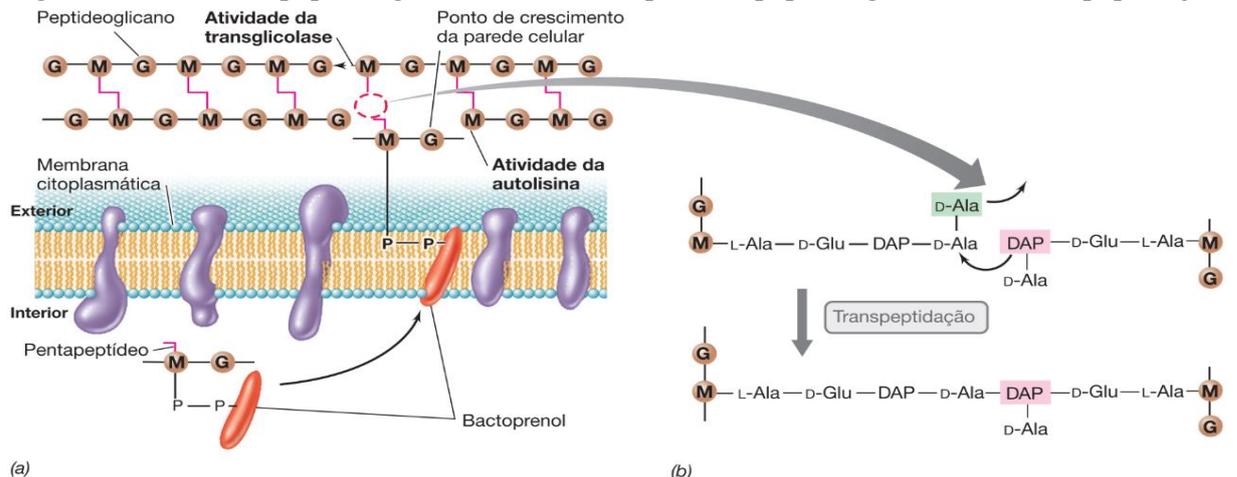
Figura 3 – Alvo dos principais agentes antibacterianos



Fonte: MADIGAN *et al.*, (2016).

Por mais de 60 anos, esses agentes antibacterianos foram considerados como a panaceia para curar infecções, independentemente de sua utilização ser apropriada ou não, e se a infecção foi adquirida na comunidade ou no ambiente hospitalar (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Dentre as classes de fármacos antimicrobianos, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos como as penicilinas, ampicilinas, cefalosporinas, carbapenem, monobactâmicos e alguns inibidores das  $\beta$ -lactamases foram bastante prescritos, dada a sua eficácia terapêutica, baixa toxicidade, e seu mecanismo de ação, pois são agentes inibidores da síntese da parede celular bacteriana (GOODMAN; GILMAN'S, 2008), se ligando as enzimas transpeptidases e carboxipeptidases, classificadas como proteínas de ligação a penicilina (PBP) (NEU; GOOTZ, 1996), impedido assim a transpeptidação (Figura 4) que consiste na ligação cruzada de duas cadeias de peptídeos ligadas ao glicano (MADIGAN *et al.*, 2016).

Figura 4 – Síntese de peptideoglicano. Em a) transporte de peptideoglicano e b) transpeptidação

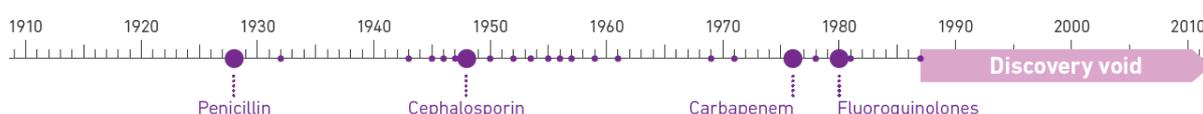


Fonte: MADIGAN *et al.*, (2016).

Até a década de 1970, desenvolveram-se novos medicamentos antibacterianos para os quais os agentes patogênicos mais comuns eram inicialmente totalmente suscetíveis, mas, as últimas novas classes de medicamentos antibacterianos foram descobertas durante a década de 1980, como mostrado na figura 5 (WHO, 2014).

A era dos antibióticos realmente revolucionou e possibilitou o tratamento de doenças infecciosas, pois, a menos de um século atrás, os pacientes ainda estavam morrendo de doenças infecciosas que são completamente tratáveis hoje (LUEPKE *et al.*, 2017), no entanto, ao passo que a descoberta dos antimicrobianos representaram um grande avanço, um problema paralelo se tornou evidente, “a volta da era pré-antibiótica”, causada pela Resistência Antimicrobiana (RAM) (VENTOLA, 2015).

Figura 5 – Principais antibióticos descobertos até o final da década de 1980



Fonte: [www.who.int/drugresistance/who](http://www.who.int/drugresistance/who).

## 2.2 Resistência antimicrobiana (RAM)

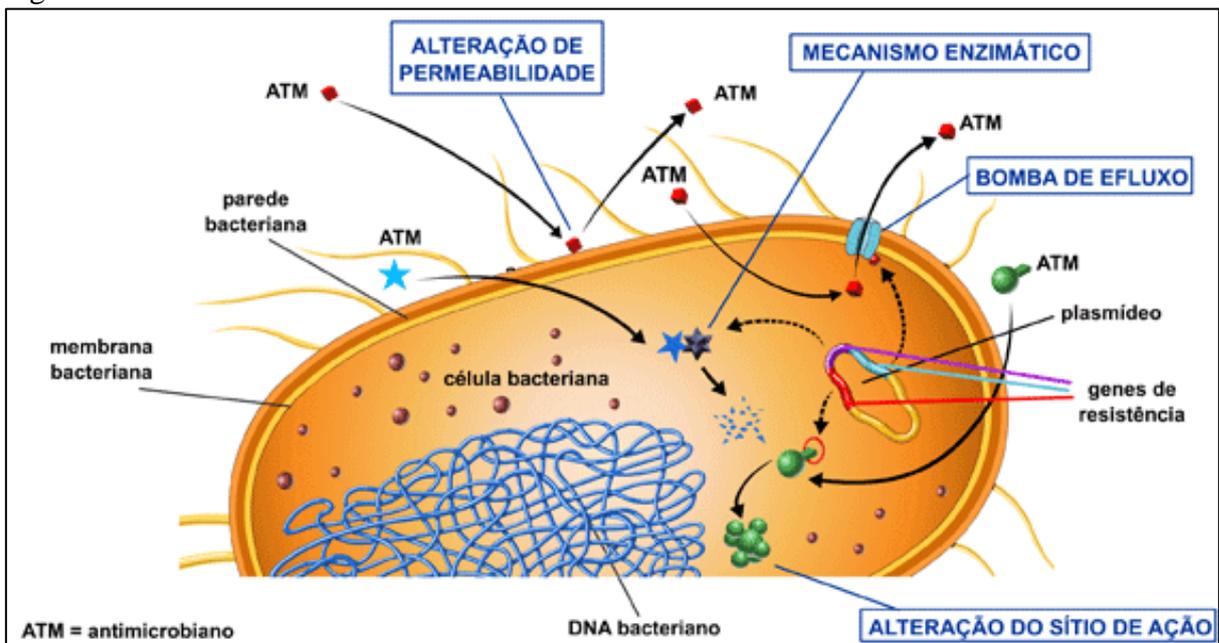
A resistência antimicrobiana (RAM) é um problema crítico de saúde pública global, que vem aumentando o número de mortes causadas por bactérias multirresistentes, como estirpes de pneumonia, tuberculose, gonorreia e outras doenças infecciosas resistentes aos antibióticos atuais, e chega a matar mais de 700 mil pessoas por ano, incluindo cerca de 214 mil óbitos pediátricos por septicemia (WHO, 2014).

A RAM ocorre naturalmente e ao longo do tempo quando microrganismos (como bactérias, fungos, vírus e parasitas) são expostos a substâncias antimicrobianas, resultando em tratamentos que se tornam ineficazes, no agravamento das infecções pelo corpo, e no aumentando do risco de propagação para outros indivíduos (WHO, 2018).

Notadamente, a RAM é a presença de um mecanismo de resistência geneticamente determinado (requerido ou mutado), categorizando o patógeno como resistente ou suscetível, sendo que este mecanismo pode ser inerente (ou seja, característica de todos os isolados dessa espécie) como no caso da resistência de todos os organismos Gram-positivos à colistina, a resistência de Enterobacteriaceae aos glicopeptídeos e linezolida, e a resistência intrínseca de *Pseudomonas aeruginosa* a uma ampla gama de antibióticos. No caso da resistência adquirida

(conforme Figura 6), esta acontece quando bactérias suscetíveis naturalmente ganham os genes que codificam um mecanismo de resistência via mutação ou a transferência de material genético de outras bactérias, da mesma espécie ou de uma espécie diferente (MACGOWAN; MACNAUGHTON, 2017). Nesses casos, a resistência é decorrente, dentre outros fatores da ocorrência de material genético transferível (plasmídeo, transposons e integron), e principalmente do uso indiscriminado e inadequado dos antimicrobianos, não só na saúde humana, mas também na saúde animal e em setores com fins econômicos e comerciais (PENG, 2016).

Figura 6 – Mecanismo de resistência bacteriana



Fonte: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle>.

Mesmo antes da introdução da penicilina, já haviam registros de cepas bacterianas resistentes (ABRAHAM; CHAIN, 1940). Fleming em seu trabalho sobre a ação antibacteriana de culturas de um *Penicillium*, publicado em maio de 1929, relatou que enterococos e muitos dos cocos Gram-negativos encontrados na boca e garganta eram muito insensíveis (FLEMING, 1929).

Um dos casos reportados na década de 40 faz menção a estreptomicina, introduzida em 1944 para o tratamento da tuberculose, onde verificou-se que as cepas mutantes de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes às concentrações terapêuticas do antibiótico, surgiam durante o tratamento do paciente, e que a medida que outros antibióticos foram descobertos e introduzidos na prática clínica, um curso de eventos semelhante se seguiu (DAVIES; DAVIES, 2010). Pouco tempo depois, a resistência à penicilina tornou-se um

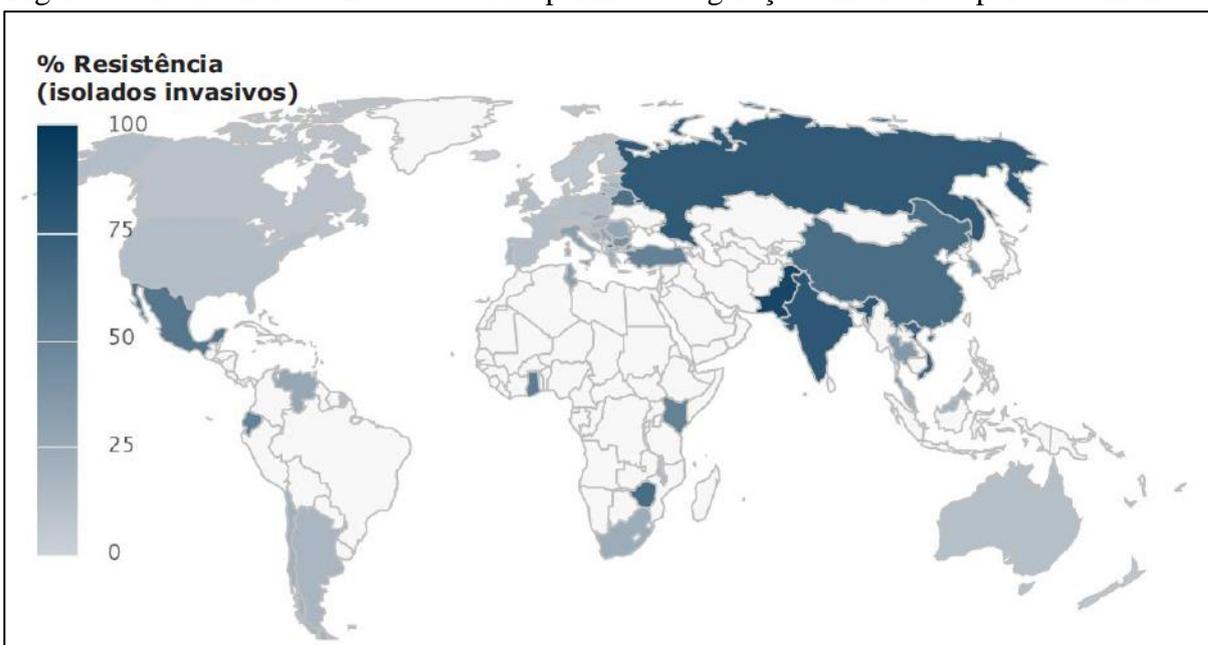
problema clínico substancial, de modo que, na década de 1950, muitos dos avanços da década anterior foram ameaçados (SPELLBERG; GILBERT, 2014). Em resposta, novos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos foram descobertos, desenvolvidos e implantados, restaurando a confiança, no entanto, o primeiro caso de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi identificado durante a década de 60, sendo no Reino Unido em 1962 e nos Estados Unidos em 1968 (SENGUPTA, CHATTOPADHYAY, GROSSART, 2013).

O uso de antibióticos é o principal motor de pressão de seleção que contribui para a resistência, já que oferece uma vantagem competitiva para cepas mutantes. As doses de antibióticos sub-ótimas ajudam a seleção de resistência por etapas. Os genes de resistência são transportados em cromossomos, e cada vez mais, em elementos extra cromossômicos transmissíveis. Os clones resistentes resultantes - por exemplo, *Staphylococcus aureus* (MRSA) EUA 300, *Escherichia coli* ST131 e *Klebsiella pneumoniae* ST258 resistentes a meticilina, são rapidamente propagadas em todo o mundo, e esta propagação é facilitada pela transmissão de genes entre espécies, saneamento e higiene deficientes em comunidades e hospitais e a crescente frequência de transmissão global, de viagens, de comércio e de doenças (LAXMINARAYAN et al., 2016).

Muitos dos patógenos bacterianos associados a epidemias das doenças humanas, evoluíram para formas multidrogas-resistentes (MDR) subsequentes ao uso de antibióticos. Por exemplo, MDR *M. tuberculosis* é um importante agente patogênico encontrado em países desenvolvidos e industrializados e tornou-se a versão do século 20 de um antigo patógeno. Outras infecções graves incluem infecções nosocomiais (relacionadas ao hospital) com *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Enterobacter spp.*, *Enocococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Serratia spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Streptococcus pneumoniae* (DAVIES; DAVIES, 2010).

Dentre estas bactérias mencionadas por Davies & Davies (2010) as bactérias produtoras de ESBL, como as Enterobacteriaceas resistentes ao carbapenem (CRE) emergiram, e nos Estados Unidos, tem sido atribuída a mais de 9.000 infecções por ano e 600 mortes por ano e são resistentes a quase todos os antibióticos disponíveis, inclusive cefalosporina de 3ª geração dentre as quais a estirpe *Escherichia coli* é umas das principais, e tem se espalhado para outros países como mostrado na figura 7 (LUEPKE et al., 2017).

Figura 7 – Resistencia de *E.coli* a Cefalosporina de 3ª geração em diversas partes do mundo



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

Durante várias décadas, a resistência antimicrobiana tem sido uma ameaça crescente para o tratamento efetivo de uma gama cada vez maior de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos. A RAM resulta em eficácia reduzida de medicamentos antibacterianos, antiparasitários, antivirais e antifúngicos, tornando o tratamento de pacientes difícil, dispendioso ou mesmo impossível (WHO, 2014).

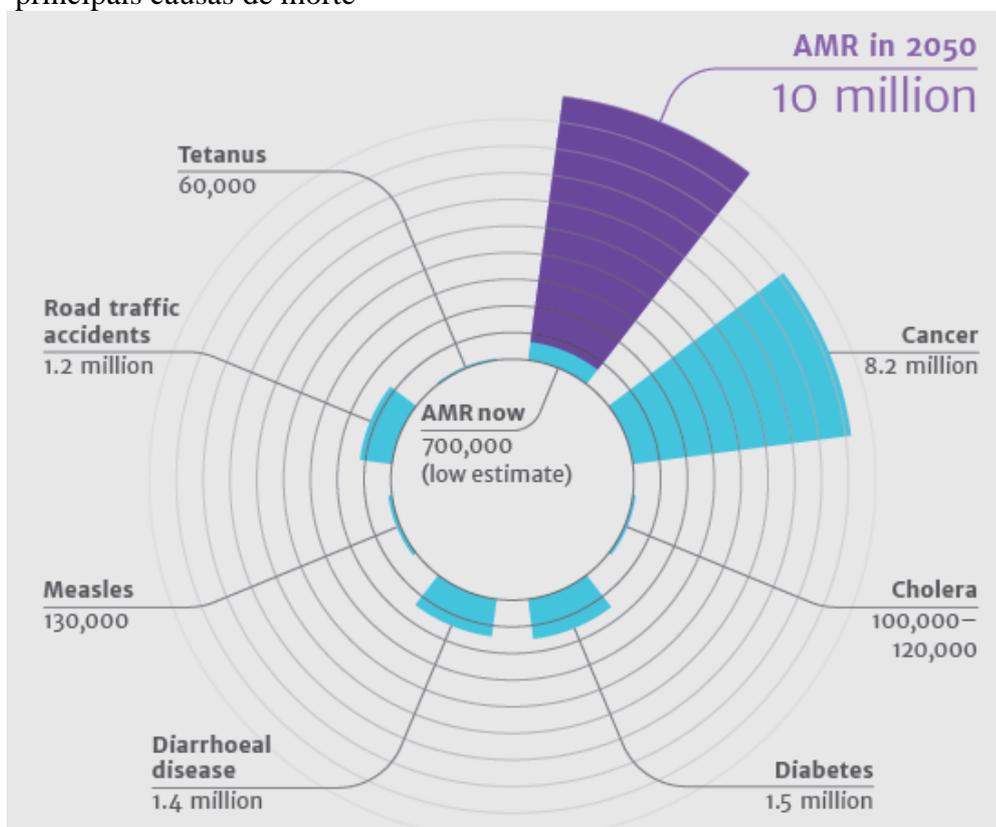
A crise de resistência aos antibióticos foi atribuída ao uso excessivo e uso indevido desses medicamentos, bem como à falta de desenvolvimento de novos medicamentos pela indústria farmacêutica, devido a incentivos econômicos reduzidos e a exigências regulamentares desafiantes (MICHAEL; HOWES; LABBATE, 2014), o que tem se refletido na diminuição da eficácia dos antibióticos no tratamento de infecções comuns, e nos últimos anos, aumentado a incidência de infecções intratáveis, com a chegada de cepas resistentes a várias classes de antibióticos, marcando o início de uma era pós-antibiótica (CDC, 2013).

Nesse sentido, a RAM tem consequências significativas para a saúde da população, bem como implicações econômicas. Por exemplo, o custo anual para o sistema de saúde dos EUA foi estimado em US\$ 21 a US\$ 34 bilhões, acompanhado de mais de 8 milhões de dias adicionais no hospital. Como a RAM tem efeitos muito além do setor de saúde, foi projetado, quase 10 anos atrás, causar uma queda no produto interno bruto real (PIB) de 0,4% a 1,6%, o que se traduz em muitos bilhões de dólares de hoje em todo o mundo (WHO, 2014). Associado a isto, estima-se que cerca de 25 mil pessoas na Europa morram a cada ano de

infecções adquiridas no hospital causadas por bactérias resistentes, custando €1,5 bilhões para saúde e sociedade, incluindo perda de produtividade (ECDC, 2015).

A situação da RAM se agravou ainda mais após o relatório de um estudo encomendado pelo governo britânico, liderado pelo economista Jim O'Neill. Neste relatório, O'Neill sugere um plano que requer bilhões de dólares de investimento para impedir que a medicina seja levada de volta à idade das trevas, e o mundo não enfrente a crise da era pós-antibiótica, o que proporcionaria um aumento gradual de mortes causadas por infecções resistentes que chegaria, em 2050, ao nível de 10 milhões de pessoas mortas por ano, conforme demonstrado na figura 8, e que os custos que a resistência aos antibióticos passaria a representar, chegariam a US\$ 100 trilhões na metade do século, caso não for resolvida (O'NEILL, 2014).

Figura 8 – Mortes atribuíveis a RAM a cada ano em comparação com outras principais causas de morte



Fonte: O' NEILL, (2014).

### 2.3 Bactérias de interesse clínico: *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

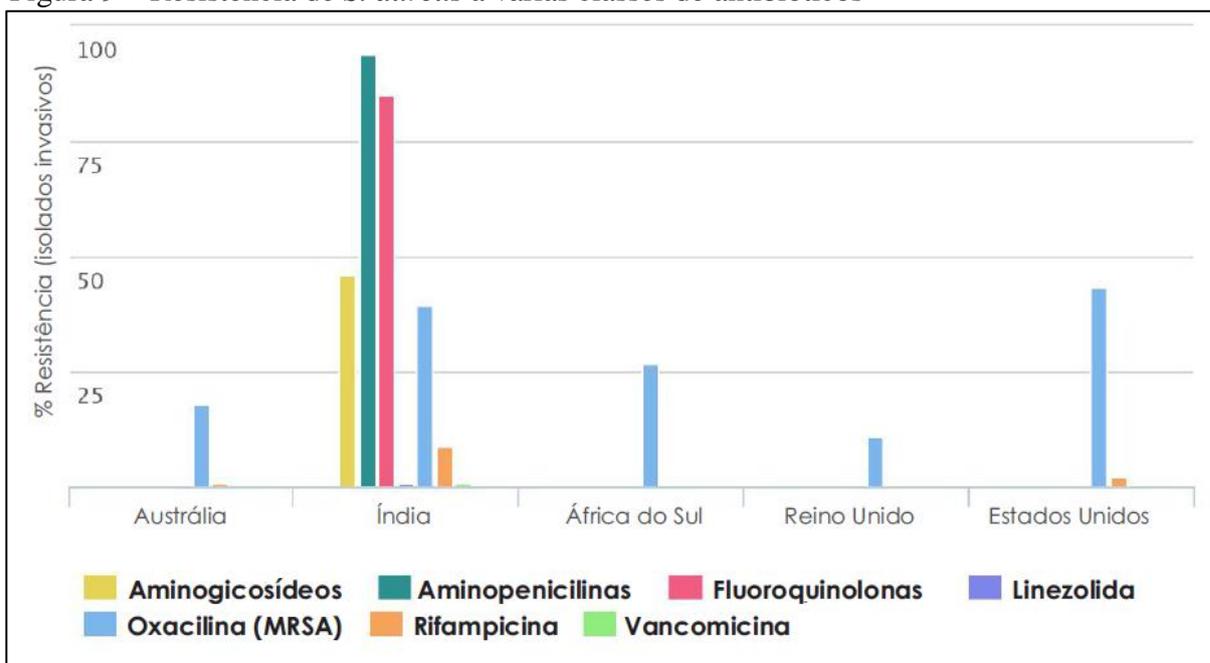
Estafilococos compreendem cocos Gram-positivos pertencentes à família *Staphylococcaceae*, e geralmente são encontrados na forma de aglomerados, mas também podem estar dispostos como células isoladas, aos pares ou cadeias curtas, sendo capazes de crescer em meios contendo alta concentração de sal e a temperaturas que variam de 18 °C a 40 °C, além de serem encontrados como parte integrante da microbiota da pele e das membranas mucosas dos seres humanos (MADIGAN *et al.*, 2016).

O gênero *Staphylococcus* é composto por 48 espécies, 17 das quais podem ser isoladas de amostras biológicas humanas, sendo dividido em dois grandes grupos: os *Staphylococcus* coagulase positiva, onde o principal representante é o *S. aureus* e os *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), onde o principal representante é o *S. epidermidis* (ROSSATTO, 2015).

*Staphylococcus aureus* é um comensal humano que coloniza persistentemente as vias orais anteriores de aproximadamente 20 a 25% da população adulta saudável, enquanto que até 60% são colonizados intermitentemente (ELLIS *et al.*, 2014). *S. aureus* desenvolveu mecanismos de resistência contra antibióticos. A vancomicina, a daptomicina, a clindamicina e o linezolida são aprovados para o tratamento de infecções com cepas resistentes aos antibióticos (*S. aureus* resistente à meticilina - MRSA), no entanto, os isolados de MRSA desenvolveram resistência mesmo contra terapias de último recurso e muitas classes de antibióticos, como os mostrados na figura 6, e a resistência está associada à falha terapêutica e ao aumento da mortalidade (DAVID; DAUM, 2010; LIU *et al.*, 2011).

A produção de biofilme em *S. aureus* pode estar associada a altas taxas de mortalidade. Isso poderia ser explicado indiretamente pela relação entre a produção de biofilmes e outras características genéticas, como a resistência à meticilina ou a produção de exotoxinas, que são consideradas como responsáveis por infecções persistentes de *S. aureus* (ABDELHADY *et al.*, 2014; KEYNAN E RUBINSTEIN, 2013; VAN HAL *et al.*, 2012). Os biofilmes produzidos por *S. aureus* são compreendidos como a chave para o desenvolvimento da resistência a uma gama de antibióticos, apresentados na figura 9.

Figura 9 – Resistência de *S. aureus* a várias classes de antibióticos



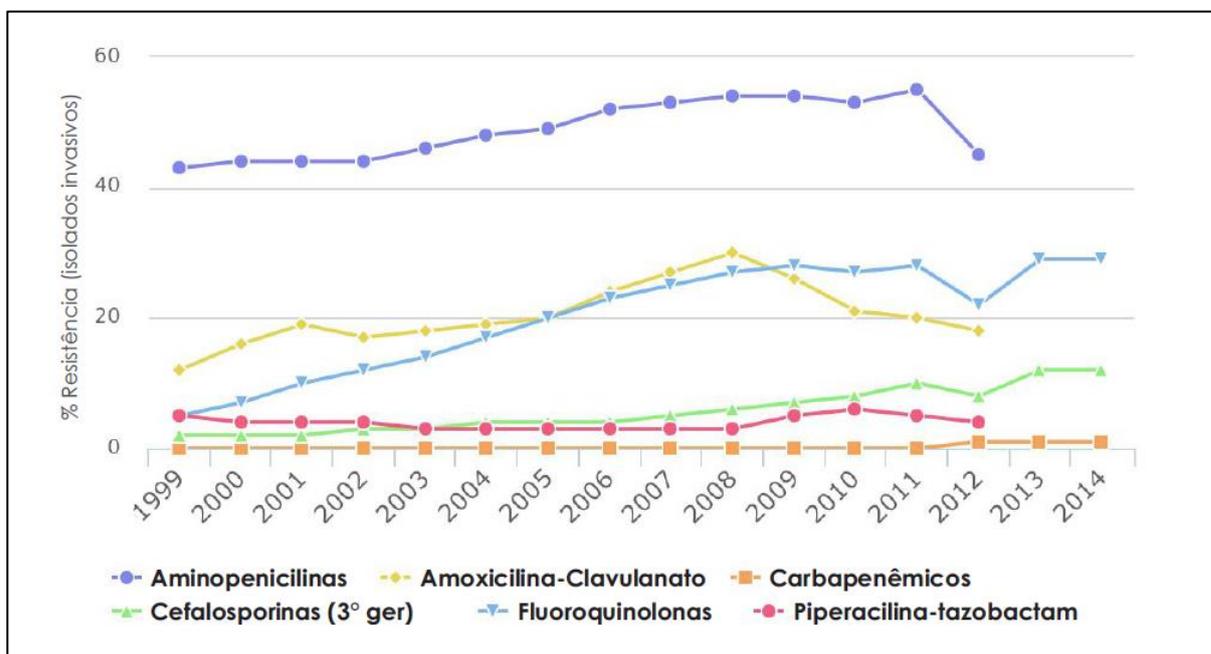
Fonte: <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php>.

*Staphylococcus epidermidis* como já descrito, é um *Staphylococcus* coagulase-negativo que faz parte da mucosa normal e microflora da pele de humanos e outros mamíferos (OTTO, 2008). Apesar de ser uma bactéria saprófita e um agente patógeno oportunista, comensal da pele, sendo frequentemente isolada de a partir de dispositivos médicos infectados por microrganismos (OTTO, 2009), a disseminação desta bactéria a partir de biofilmes formados em cateteres apresenta a fonte mais comum de infecções graves, como sepses (ROGERS; FEY; RUPP, 2009). Infecções generalizadas causadas por *S. epidermidis*, são a causa mais comuns de morte hospitalar em crianças recém-nascidas, principalmente as de baixo peso (WANG *et al.*, 2011).

*Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastão e classificada como membro da família Enterobacteriaceae dentro da classe Gammaproteobacteria, sendo uma das bactérias mais bem estudadas no meio científico. *E. coli* pode crescer rapidamente em condições ideais de crescimento, replicando em aproximadamente 20 min. Muitos sistemas de manipulação de genes foram desenvolvidos usando *E. coli* como a bactéria hospedeira, produzindo inúmeras enzimas e outros produtos industriais. A análise de sequência de genoma de *E. coli* foi relatada pela primeira vez em 1997. Desde então, mais de 4800 genomas de *E. coli* foram sequenciados (TENAILLON *et al.*, 2016). Uma vez que *E. coli* geralmente reside nos intestinos de animais de sangue quente, é submetida a encontros frequentes com antibióticos, proporcionando-lhe pressão de seleção alta, levando a resistência contra várias

classes de antibióticos consumidos pelo hospedeiro (LOOFT *et al.*, 2012), conforme mostrado na figura 10.

Figura 10 – Resistência de *E. coli* a principais classes de antibióticos



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

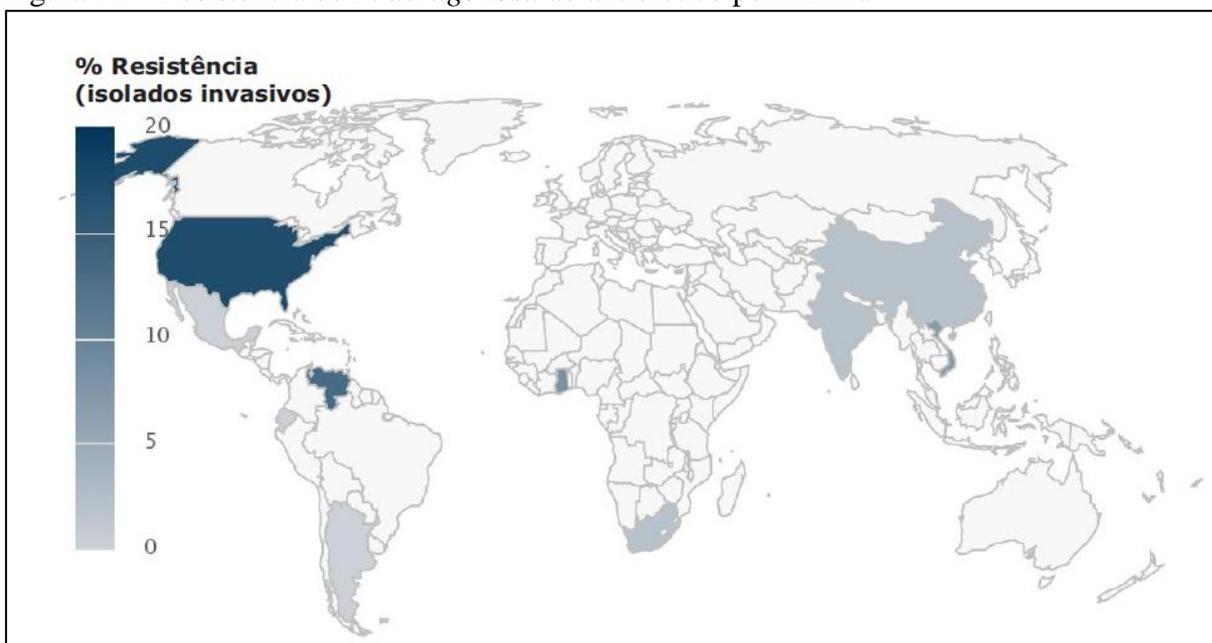
*Pseudomonas aeruginosa* também é uma bactéria Gram-negativa baciliforme e aeróbia. Dentro do gênero *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* é mais frequentemente associada a causar infecção humana; no entanto, existe naturalmente no ambiente (COGGAN; WOLFGANG, 2014). A bactéria é considerada um patógeno oportunista, causando principalmente infecções nosocomiais em pacientes imunocomprometidos (BROWN; CORNFORT; MIDEO, 2012). No entanto, é capaz de causar um amplo espectro de infecções quando a função fisiológica normal é interrompida, incluindo barreiras epiteliais danificadas (ENGEL; BALACHANDRAN, 2008). *P. aeruginosa* raramente é associada a causar infecções crônicas em pacientes previamente saudáveis, embora tenham sido relatados casos fatais de infecções por *P. aeruginosa* em pessoas anteriormente saudáveis (HUHLESCU, *et al.*, 2001; HATCHETTE; GUPTA; MARRIE, 2000).

A adesão das bactérias à superfície da célula hospedeira é o primeiro passo para a colonização e início da doença (Pizarro, 2006). Em *P. aeruginosa*, a adesão é mediada por pili tipo IV, e a formação de biofilmes (BERTRAND; WEST; ENGEL, 2010). Pili tipo IV são os apêndices filamentosos ligados à superfície celular da bactéria. Mais de 40 genes envolvidos na

biogênese e na função do pili tipo IV foram previamente identificados em *P. aeruginosa* (BURROWS, 2012).

De acordo com dados do Center for Disease for Dynamics, Economics & Policy (CDDEP), mostrado na figura 11, *P. aeruginosa* atualmente apresenta níveis altíssimos de resistência a polimixicina, com maior número de registro na América do Norte.

Figura 11 – Resistência de *P. aeruginosa* ao antibiótico polimixina



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

## 2.4 Biofilmes bacterianos

Na natureza, os microrganismos encontram-se em dois modos de vida distintos, a forma de vida livre (planctônico) ou sésil, preso a um substrato (biofilme) (LI; LEE, 2017). Os biofilmes são comunidades microbianas sésseis ligadas a superfícies bióticas ou abióticas e geralmente incluídas em uma matriz composta de substâncias poliméricas extracelulares autoproduzidas (SPE), como polissacarídeos, DNAs extracelulares (eDNAs), proteínas e lipídeos (KIM; LEE, 2016). Entretanto, Hall-Stoodley *et al.*, (2012) observaram que os biofilmes podem ou não aderir a superfícies, mas predominantemente estão situados em tecido ou em secreções, quando infectam hospedeiros.

As células microbianas nos biofilmes exibem fenótipos que diferem daquelas de células planctônicas (DONLAN E COSTERTON, 2002), e os fenótipos de biofilme mais notórios, são cerca de 1.000 vezes mais resistentes aos tratamentos com antibióticos do que seus exemplares na forma planctônica (FUX *et al.*, 2005; HENGZHUANG *et al.*, 2011).

Segundo Soto (2014), estima-se que aproximadamente 65% das infecções nosocomiais e 80% de todas as infecções microbianas sejam causadas pela formação e persistência de biofilmes no hospedeiro ou em dispositivos médico-hospitalares.

Os biofilmes são sistemas complexos que possuem altas densidades celulares, variando de  $10^8$  a  $10^{11}$  células  $g^{-1}$  de peso húmido (BALZER, *et al.*, 2010; MORGANET *et al.*, 2008) tipicamente compreendem muitas espécies. Uma outra fonte de heterogeneidade é a capacidade das células nos biofilmes de se submeterem a diferenciação, que pode ser desencadeada por condições locais e ciclos de vida coordenados que incluem o estágio específico expressão de genes e proteínas, como é típico para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos em ecossistemas espacialmente heterogêneos (SINGER *et al.*, 2010).

As propriedades emergentes das comunidades de biofilmes compreendem novas estruturas, atividades, padrões e propriedades que surgem durante o processo e, como consequência, de auto-organização em sistemas complexos (CORNING *et al.*, 2002), ocorrem concomitantemente e conduzem à formação de habitat biogênico. Fundamentais para essas propriedades emergentes que incluem a formação de interações físicas e sociais (como em microconsórcio sinérgico), uma taxa de troca de genes melhorada e uma maior tolerância aos antimicrobianos, papel desempenhado pela matriz SPE autoproduzida que envolve as células do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Essa habilidade para se adaptar e modificar diferentes micronichos, permite que bactérias em biofilmes possam enfrentar condições adversas e estressantes, facilitando a sobrevivência a um nível populacional elevado (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009).

#### **2.4.1 Processo de formação do biofilme**

Biofilmes são ubíquos e sua formação pode ocorrer em superfícies sólidas inanimadas, bem como em tecidos de organismos vivos, tais como dentes e células da epiderme, como um modo de proteção para as células envolvidas sobreviverem a ambientes hostis (KUMAR; MISHRA; SINGH, 2017). Dentro dos biofilmes, as bactérias usam um sistema de detecção de *quórum sensing* (QS) que permite a comunicação célula-célula em meio a matriz de SPE, estando diretamente dependente da densidade celular (MARQUES; DAVIES; SAUER, 2015). Dentre as moléculas de *quórum sensing* mais relatadas na literatura o autoindutor-2 (AI-2) é uma molécula de sinal bem descrita e sabe-se que existe amplamente em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo considerada como uma molécula autoindutora de linguagem universal para a comunicação intraespacial e entre espécies (GOSPODAREK *et al.*, 2009). A

sinalização intercelular, regula funções que contribuem para a persistência e virulência de muitos agentes patogênicos bacterianos, assim, moléculas de QS desempenham um papel vital na regulação da virulência e dos comportamentos relacionados ao biofilme, tanto no ambiente natural como em infecções persistentes, e atualmente é considerado o principal alvo como meio de controle de infecções por biofilme nas infecções pulmonares de pacientes com fibrose cística, bem como outras infecções (LIU et al., 2017).

A formação de biofilme propicia aos microrganismos algumas vantagens para sua sobrevivência uma vez que, esse modo de organização celular confere proteção contra o ambiente, resistência a estresses físicos e químicos, cooperação metabólica e regulação da expressão gênica baseada na comunidade (RAMAGE et al., 2012). Segundo Fernandes *et al.*, (2015), a substância polimérica extracelular (SPE) do biofilme, tem papel essencial na defesa dessa comunidade microbiana contra células fagocitárias, dando suporte a integridade do biofilme e agindo como uma barreira que impede a difusão das substâncias tóxicas. Sandai *et al.*, (2016) destacam também que essas características da SPE junto com a complexidade arquitetônica, conferem proteção contra as defesas do hospedeiro.

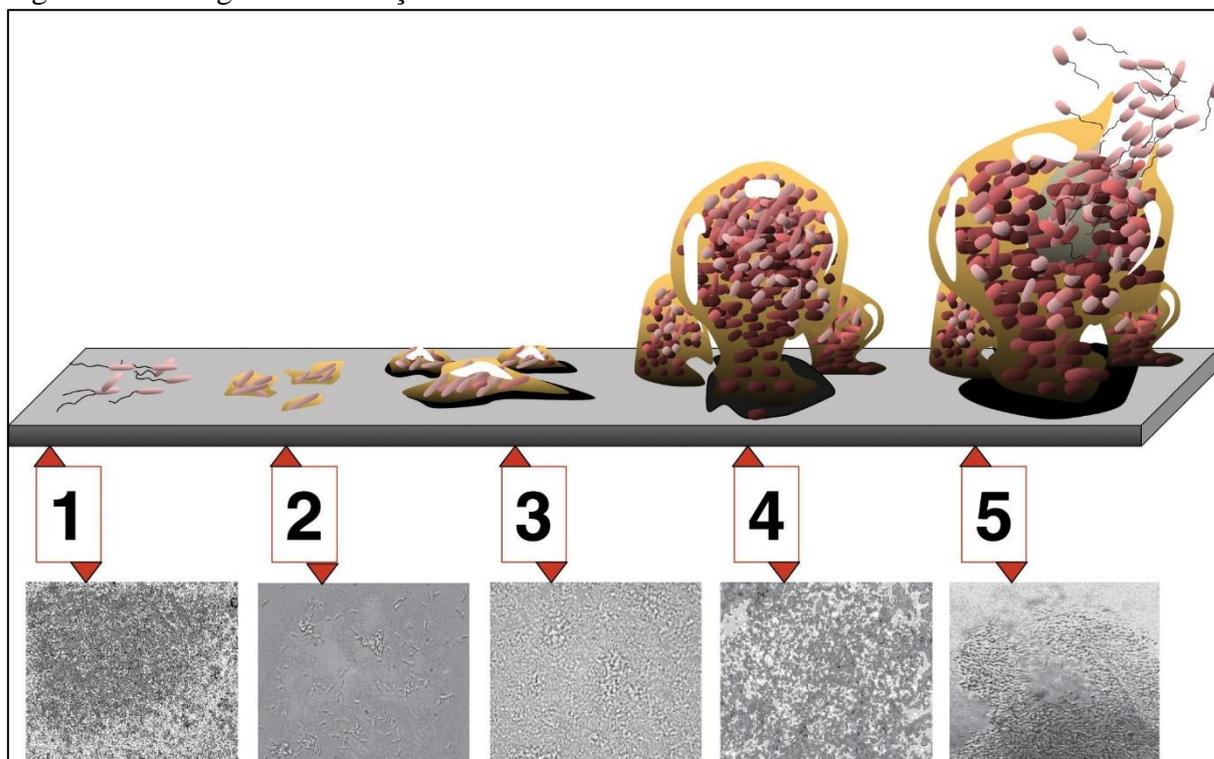
De acordo com Hirota *et al.*, (2016), a quantidade de nutrientes disponíveis, moléculas de *quorum-sensing* liberadas pelo microrganismo e o contato com superfícies são alguns dos fatores que contribuem para a formação do biofilme.

Para que ocorra a formação do biofilme há, inicialmente, a fase de fixação dos microrganismos denominados de colonizadores primários. Zobell (1943) propôs a primeira teoria sobre a fase de adesão, que seria composta por duas etapas. Na primeira etapa ocorre a adesão primária, reversível, e na segunda etapa, a adesão torna-se irreversível.

Esta ideia prévia de irreversibilidade se manteve, no entanto, um modelo atual para a formação de biofilme propõe que o processo ocorre, mais detalhadamente, em cinco fases que estão apresentadas na figura 12. Assim sendo, na fase **1**, ocorre o ataque reversível de células planctônicas que se aproximam da superfície por fluido ou por motilidade. Nessa fase, a adesão é mediada por interação hidrofóbica forças de Van der Waals, ou mesmo por moléculas adesivas, denominadas de adesinas, que em sua maioria tem a capacidade de reconhecer carboidratos estando presentes em estruturas bacterianas denominadas de pili. Nesse estágio, os microrganismos ainda são facilmente removidos por lavagem da superfície; **2**, há a transição para a forma irreversível de adesão, a qual se dá por meio de interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, ligações iônicas, covalentes e por mecanismos moleculares específicos. **3**, desenvolve-se a estrutura do biofilme, na qual a SPE irá caracterizar a sua arquitetura; **4**, refere-se ao desenvolvimento e maturação do biofilme. Nessa etapa, SPE continua a ser formada,

juntamente, com canais de água e poros. O objetivo desses canais é permitir o fornecimento de nutrientes e gases, de forma igualitária, bem como a remoção de produtos residuais. **5.** acontece a dispersão de células do biofilme para que ocorra a formação de um novo biofilme (MITCHELL; ZARNOWSKI; ANDES, 2016; VILA; ROZENTAL, 2016).

Figura 12 – Estágios de formação de biofilmes bacterianos



Fonte: Adaptado de MONROE, (2007).

#### 2.4.2 Biofilmes associados a infecções

Os biofilmes são responsáveis por diversas doenças, como fibrose cística, feridas, otite média, pneumonia e osteomielite, quando se formam nos tecidos e dispositivos implantados (COSTERTON et al., 1999), e são estimados como associados a 80% das infecções microbianas (BRACKMAN; COENYE, 2015). Além disso, infecções baseadas em biofilmes em implantes médicos, como válvulas, marca-passos e outros invariavelmente, podem exigir remoção cirúrgica, e biofilmes em dispositivos médicos, como cateteres e endoscópios frequentemente medeiam infecções nosocomiais (COSTERTON *et al.*, 1999). Nos Estados Unidos, o custo anual de cuidados para infecções associadas aos cuidados de saúde excede US\$ 25 bilhões de dólares (NEETHIRAJAN *et al.*, 2014).

Tais infecções são de difícil diagnóstico e não são tratáveis com as abordagens convencionais, pois os biofilmes tem mecanismos intrínsecos responsáveis pela sua alta resistência aos agentes antimicrobianos (COX; WRIGHT, 2013). Portanto, os meios de tratamento de infecções relacionadas ao biofilme são mais urgentes, e despertam o interesse em muitos setores da sociedade, já que conforme mostrado na tabela 1, muitas infecções associadas a biofilmes são recorrentes e persistentes.

Tabela 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).

As infecções associadas ao biofilme (IAB) apresentam desafios significativos para as diretrizes atuais da prática clínica devido à dificuldade inerente em determinar se a infecção está relacionada ao biofilme ou é devido a uma infecção aguda com microrganismos planctônicos. Portanto, critérios funcionais e clinicamente relevantes ajudariam: (1) melhor distinguir IAB de infecções agudas planctônicas, (2) obter amostras clínicas apropriadas, e (3) fornecer foco para o desenvolvimento de testes clínicos de rotina. Os critérios para infecções por biofilmes foram previamente propostos e modificados, com base nos critérios iniciais de Parsek-Singh (PARSEK, SINGH, 2003; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009).

## 2.5 O elemento rutênio

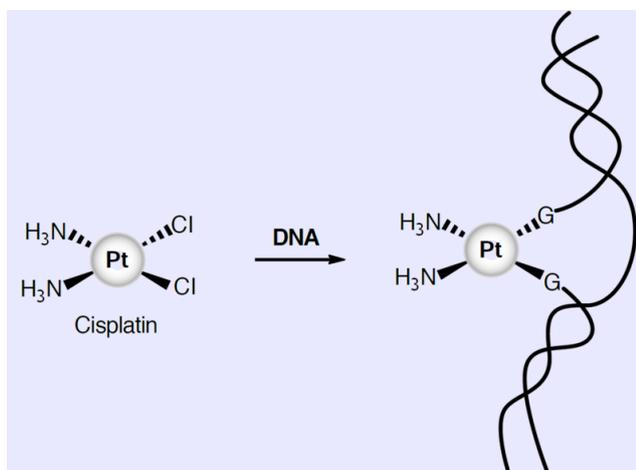
Rutênio (Ru) é um metal raro, duro, denso ( $12,1 \text{ g.cm}^{-3}$ ), lustroso, brilhoso e prateado e muito resistente a temperatura ambiente. Com um número atômico de 44 possui uma massa atômica relativa de 101,07, e está no Grupo 8, período 5 da Tabela Periódica. Os primeiros relatos da descoberta do rutênio datam do século 18, e tratam de um químico polaco chamado de Jędrzej Sniadecki que ao investigar minérios de platina na América do Sul e, em maio de 1808, teria descoberto um novo metal, que ele chamou de vestium. No entanto, em 1825, Gottfried Osann, da Universidade de Dorpat (agora Tartu) no Báltico, investigou a platina das Montanhas Urais e relatou encontrar três novos elementos, que ele chamou de plurânio, polínio e rutênio. Enquanto os dois primeiros nunca foram verificados, o terceiro foi genuíno e, em 1840, Karl Karlovich Klaus na Universidade de Kazan extraiu, purificou e confirmou que era um novo metal em 1844. Ele manteve o nome de rutênio, derivado de "Ruthenia", o nome latino para a Rússia (POOLE, 2017).

O emprego de compostos à base de metal como agentes antimicrobianos não é um novo conceito, pois há registros do uso destes complexos metálicos antes mesmo da aplicação dos antibióticos clássicos, já que no início do século XX, a busca de Paul Ehrlich por uma "bala mágica" que seria seletivamente alvo do agente causador da sífilis, *Treponema pallidum*, sobre células hospedeiras, levou ao desenvolvimento do composto organoarsênico comercializado como Salvarsan ou composto 606 (AMINOV, 2010). Salvarsan tornou-se o mais frequente fármaco prescrito para o tratamento de infecções antimicrobianas até sua substituição pela penicilina na década de 1940, resultante dos trabalhos de Fleming, Florey e Chain (CHAIN *et al.*, 2005). Na década de 1960, a descoberta serendipica de Rosenberg que os complexos de platina inibiram a divisão celular de *E. coli*, eventualmente, levaram a aplicação clínico da cisplatina como quimioterápico antitumoral na década de 1970. Após o sucesso da penicilina e outros antibióticos nas décadas de 1940 a 1960, os compostos orgânicos substituíram os antimicrobianos à base de metal.

O interesse pelos biólogos no rutênio pode ser atribuído a uma das mais conhecidas aplicações na medicina contemporânea: o câncer, que inicialmente era tratado pelo diamino-dicloro-platina que foi originalmente identificado como um agente antimicrobiano potencial na década de 1960 por Rosenberg e colaboradores. Mais tarde, demonstrou-se que a cisplatina era um agente quimioterapêutico anticancerígeno altamente eficaz especialmente no tratamento de tumores sólidos primários da bexiga, pulmão, testículos, ovários, cabeça e pescoço (SIDDIK, 2003). Estudos posteriores, demonstraram que a cisplatina liga-se ao resíduo N7 de purinas de

DNA (Figura 13), resultando em reticulação intracelular que bloqueia a replicação do DNA, evita a divisão celular e resulta em morte por apoptose (DASARI, TCHOUNWOU, 2014).

Figura 13 – Estrutura da cisplatina e sua ligação ao DNA



Fonte: FONTES *et al.*, 2005

Como é típico dos metais de transição, o rutênio pode existir em muitos estados de oxidação, pois ele é o único entre os metais do grupo da platina que possui três estados de oxidação (+2, +3 e +4) que são acessíveis biologicamente, já que se verificou que em sistemas biológicos, glutathiona (GSH), ascorbato e proteínas de transferência de um único elétron podem reduzir o Ru (III) e o Ru (IV) enquanto o oxigênio molecular e o citocromo c oxidase podem oxidar Ru (II) (HOKE *et al.*, 1999; WINKLER, GRAY, 1992). Os complexos Ru (II) podem ainda ser reduzidos *in vivo*, por exemplo, em ambientes de metabolismo anormal e rico em GSH de tecidos de câncer. Outros exemplos da utilidade dos compostos de Ru são como imunossuppressores, em ligas dentárias, como agentes antimicrobianos e em choque séptico (ALLARDYCE, DYSON, 2001).

Baseado nestas características, vê-se no elemento químico rutênio um bom candidato para atuar como um novo fármaco, ou mesmo auxiliar na síntese de novos agentes quimioterápicos de interesse clínico, tendo como pontos fortes sua configuração tridimensional que permite a coordenação de vários tipos de ligantes que são direcionados a alvos moleculares definidos, e seu ajuste cinético que permite a acessibilidade de três estados redox do metal, garantindo seu envolvimento em várias reações redox mediadas por células que podem influenciar sua dose e a biodisponibilidade (POOLE, 2017).

### 2.5.1 Atividade antimicrobiana de complexos de rutênio

Complexos de rutênio, constituem um grupo de metalocompostos, que tem localizado no seu centro metálico, o átomo de rutênio (Ru) em um dos seus estados de oxidação (II, III, IV) coordenando todas as interações moleculares, geralmente apresentando em suas extremidades laterais de dois a três ligante de uma variedade de tipos (piridina, polipiridina, fosfina, difenilfosfina, etc), podendo apresentar de um, até quatro núcleos (LI, F.; COLLINS, 2015).

O potencial antimicrobiano dos complexos de rutênio cineticamente inertes, foi primeiramente demonstrado pelo trabalho pioneiro de Dwyer e colaboradores na década de 1950 para 1960 (DWYER, GYARFAS, ROGERS E KOCH, 1952; DWYER, MELLOR, 1964), onde complexos mononucleares, bidentados e bipyridina foram desenvolvidos e mostraram notável atividade antimicrobiana. Gorle *et al.*, (2015) ao ensaiarem com os complexos de Dwyer  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  e  $[\text{Ru}(\text{Me}_4\text{phen})_3]^{2+}$  mostraram que estes se ligaram ao DNA *in vitro*, de maneira vinculativa, mas não intercalar no sulco menor do DNA duplex.

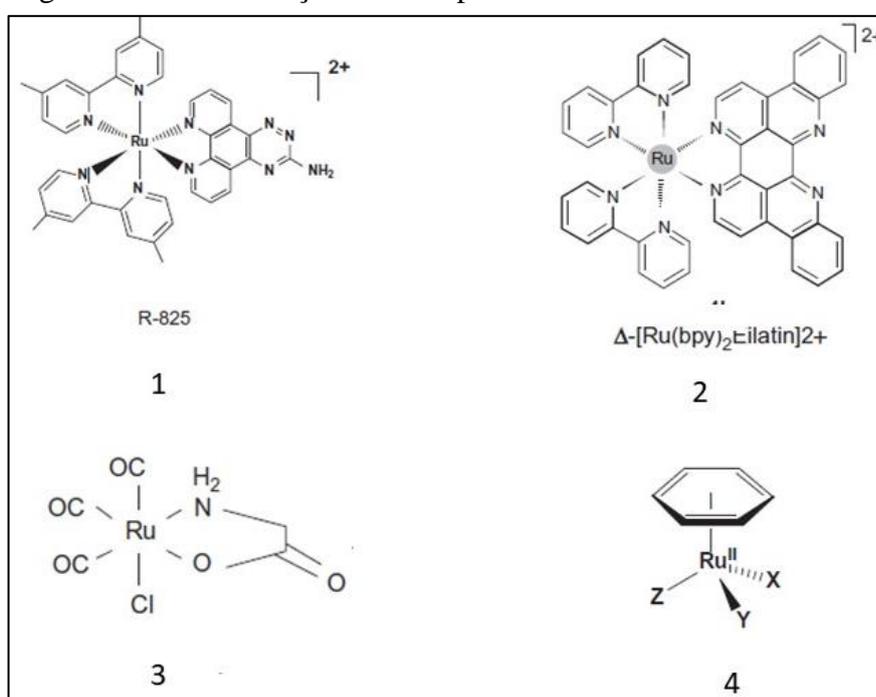
O estudo de outros complexos mononucleares de Ru (II) polypyridina, mostrou uma relação com a diminuição dramática dos níveis de ferro intracelular em cepas de *S. pneumoniae* (YANG *et al.*, 2014). A síntese de vários complexos quelatos de rutênio por Satyanarayana e colaboradores, mostrou atividade antimicrobiana, demonstrando também se ligar ao DNA, bem como promover a geração de oxigênio singleto  $^1\text{O}_2$  (DEEPIKA *et al.*, 2013). Em adição, há relatos na literatura de complexos de rutênio afetando a atividade das enzimas glutamato desidrogenase de *E. coli*, e lactato desidrogenase em cardiócitos primários (TAVARES *et al.*, 2011; WINBURN *et al.*, 2012).

Trabalhos realizados por Yang *et al.*, (2014) relataram a atividade antimicrobiana moderada de complexos de rutênio polipiridina mononuclear sobre *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, e *Staphylococcus aureus*. No entanto, Li *et al.*, (2011) e Paez *et al.*, (2013) ao examinarem complexos mononucleares de Dwyer, verificaram que este complexo apresentou baixa atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, e foi inativo contra *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Dada a diversidade de complexos de rutênio relatados na literatura, Gianferrara, Bratsos e Alessio (2009), propuseram uma classificação dos complexos de rutênio antimicrobianos com base nas diretrizes para a categorização de compostos de metal com atividade anticancerígenos. Atualmente Poole (2017), apresentou uma classificação dos complexos de rutênio baseada no papel do íon Ru subjacente à atividade antimicrobiana do

composto, sendo divididos em quatro classes por com base em seu mecanismo de ação, ficando organizados conforme figura 14, e distribuídos nas seguintes classes: **(I) Estrutural:** O (s) íon (s) de Ru têm um papel estrutural, isto é, fornece forma para o composto ativo através de uma esfera de coordenação de ligantes; **(II) Transportador:** O (s) íon (s) de Ru simplesmente funcionam como transportadores para o fármaco ativo, mais comumente um composto orgânico como um antibiótico; **(III) Funcional:** O (s) íon (s) de Ru têm um papel funcional, isto é, a atividade antimicrobiano do composto é mediada pela coordenação direta do Ru para alvos biológicos; **(IV) Fotoativado:** o composto Ru está ativo apenas após a iluminação onde pode atuar como um fotossensibilizador.

Figura 14 – Classificação dos complexos de rutênio mononucleares.



Fonte: Adaptado de Poole, Robert K. (2017). 1- complexo estrutural; 2- complexo transportador; 3- complexo funcional e 4- complexo fotoativado.

## 2.6 Zebrafish como modelo biológico

O *zebrafish* (ZF) conhecido também como paulistinha ou peixe-zebra (Figura 15), é um pequeno teleosteo (3 a 4 cm), da espécie *Danio rerio*, tropical de água doce, que nos últimos anos vem atraindo a atenção da comunidade científica, pois constitui um excelente modelo experimental para estudos comportamentais, genéticos, toxicológicos e para desvendar o mecanismo de diversas doenças humanas bem como testar novos agentes terapêuticos

(LIESCHKE; CURRIE, 2007). *Danio rerio* é um peixe pertencente à família *Cyprinidae* e sua informação genética é decodificada, apresentando um alto nível de homologia (em torno de 70%) às contrapartes humanas (HOWE *et al.*, 2013).

Figura 15 – *Zebrafish* adulto



Fonte:<http://www.abc.net.au/news/2017-04-11/zebrafish/8433206>

Algumas características do peixe, tais como embriões transparentes, prole numerosa (200-300 ovos cada 2 a 3 dias) e desenvolvimento rápido (em 48 a 72 horas evolui do estado de ovo para larva e se torna adulto aos 3 meses de vida) são atributos aproveitados para utilizar o ZF na investigação de inúmeras doenças humanas, e devido ao curto ciclo de vida (vivem cerca de 3 anos), estudos que envolvem diferentes períodos do desenvolvimento podem ser realizados com relativa rapidez (WESTERFIELD, 2007).

Devido a seus mecanismos genéticos e bioquímicos evolutivamente conservados, o uso do peixe-zebra na triagem reduz o uso de animais de maior tamanho, em uma primeira instância, bem como a quantidade de compostos necessários para os ensaios, uma vez que estes podem ser administrados por via intraperitoneal a uma dose menor (ROSEMBERG *et al.*, 2011).

Este teleósteo possui grande sensibilidade quando exposto a produtos químicos por ser capaz de absorver de forma rápida os compostos que são diretamente adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos, principalmente no Sistema Nervoso Central, como demonstrado em estudos com o cobre (GROSSEL & WOOD, 2002).

As bases moleculares da neurobiologia têm sido extensivamente estudadas em *zebrafish* resultando na caracterização de muitos genes. Entre estes estão os envolvidos na formação de circuitos neuronais, em padrões de comportamento e em mecanismos envolvidos

na neuropatogênese (GUO, 2004). A toxicidade sobre a neurotransmissão purinérgica foi demonstrada para os pesticidas Carbofuran e Malation (SENGER *et al.*, 2005), metais neurotóxicos zinco e cádmio (SENGER *et al.*, 2006a), metanol (RICO *et al.*, 2006), etanol (RICO *et al.*, 2007), metais pesados como o mercúrio e chumbo (SENGER *et al.*, 2006b) e cobre (ROSEMBERG *et al.*, 2007).

### **2.6.1 Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)**

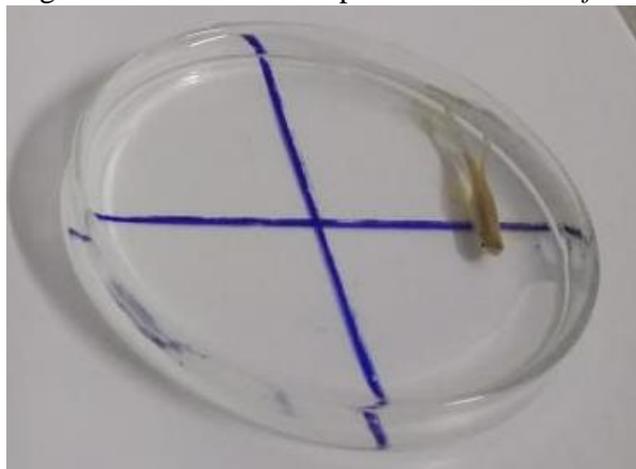
A atividade locomotora é um dos parâmetros de análise comportamental que vem sendo utilizado para avaliar ação de drogas que podem atuar sob o sistema nervoso central do zebrafish (*Danio rerio*) adulto e causar comprometimento locomotor ou não (KURTA; PALESTIS, 2010; GEBAUER *et al.*, 2011; TAYLOR *et al.*, 2017).

Tal atividade pode ser explorada através do Teste de Campo Aberto, em um aquário simples, (ROSEMBERG *et al.*, 2011), bem como placas de Petri (AHMAD; RICHARDSON, 2013). Diferentes parâmetros podem ser avaliados tais como *freezing* (imobilidade), entre outros. O comportamento natural do zebrafish em campo aberto é caracterizado por atividade natatória constante e manifestações de imobilidade, são pouco observadas em condições naturais do zebrafish (CACHAT *et al.*, 2011).

Segundo Resende e Soccol (2015), a análise da atividade locomotora explorada através de um campo aberto pode ser um modelo empregado para avaliar hiperatividade como sendo indicativo de ansiedade (RESENDE e SOCCOL, 2015). O tratamento do zebrafish com fármacos ansiolíticos, como benzodiazepínicos, pode aumentar da atividade exploratória no campo aberto (CACHAT *et al.*, 2011), bem como causar efeito sedativo e diminuir atividade locomotora (GUPTA *et al.*, 2014; BENNEH *et al.* 2017).

Recentemente, o teste de campo aberto em zebrafish proposto por Ahmad e Richardson (2013), foi adaptado em placas de Petri (Figura 16) para avaliar atividade locomotora de zebrafish adulto sob ação de drogas analgésicas.

Figura 16 – Teste de campo aberto em *zebrafish*



Fonte: Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais

### 2.6.2 Teste de toxicidade em *zebrafish*

O *zebrafish* adulto vem sendo empregado como modelo animal complementar ao uso de roedores em testes genéticos, biologia do desenvolvimento, neurobiológicos e toxicológicos (RESENDE e SOCCOL, 2015), pois apresenta baixo custo, adaptabilidade diversa, ciclo de reprodução curto, alta fecundidade e embriões transparentes (DAI *et al.*, 2014). Seu pequeno tamanho na fase adulta requer diminuição da quantidade das substâncias a serem testadas e dosadas, bem como as quantidades de reagentes e materiais utilizados no tratamento e manutenção dos animais (HILL, 2005). Desde muito tempo o *zebrafish* adulto vem sendo empregado em testes de toxicidade no monitoramento de contaminantes ambientais.

Como por exemplo, Huang *et al.*, (2014) utilizaram o *zebrafish* adulto para avaliar a ação de um agente agroquímico (Deltametrin), empregando-se o comportamento locomotor e mortalidade (CL<sub>50</sub>) em 24 hora como parâmetros de toxicidade aguda. Vale salientar que o *zebrafish* adulto, também é utilizado para avaliar a toxicidade de compostos farmacêuticos (HILL, 2005), bem como biomonitoramento toxicológico no desenvolvimento de medicamentos (CABALLERO e CANDIRACI, 2018).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de complexos de rutênio do tipo  $cis-[RuCl_2(dppb)(NN-R)]^{2+}$  sobre bactérias resistentes e o seu efeito combinado aos antibióticos ampicilina e tetraciclina.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos complexos de rutênio sobre as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*;
- Avaliar o efeito da combinação dos complexos de rutênio com os antibióticos ampicilina ( $\beta$ -lactâmico) e tetraciclina (amplo espectro) sobre as bactérias supracitadas;
- Determinar o tempo de morte em bactérias sob as quais os complexos de rutênio exibirem ação bactericida;
- Avaliar a atividade dos complexos de rutênio sobre a inibição da formação da biomassa de biofilmes e sobre biofilmes pré-formados das cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*;
- Avaliar o efeito dos complexos de rutênio sobre a atividade metabólica e o número de células viáveis tanto na formação de biofilmes, quanto em biofilmes pré-formados de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*;
- Avaliar através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) modificações morfológicas e estruturais na formação de biofilmes e nos biofilmes pré-formados das bactérias utilizadas no estudo;
- Avaliar a atividade comportamental e toxicidade sobre *zebrafish* (*Danio rerio*), nas concentrações que exibirem efeito bacteriostático.

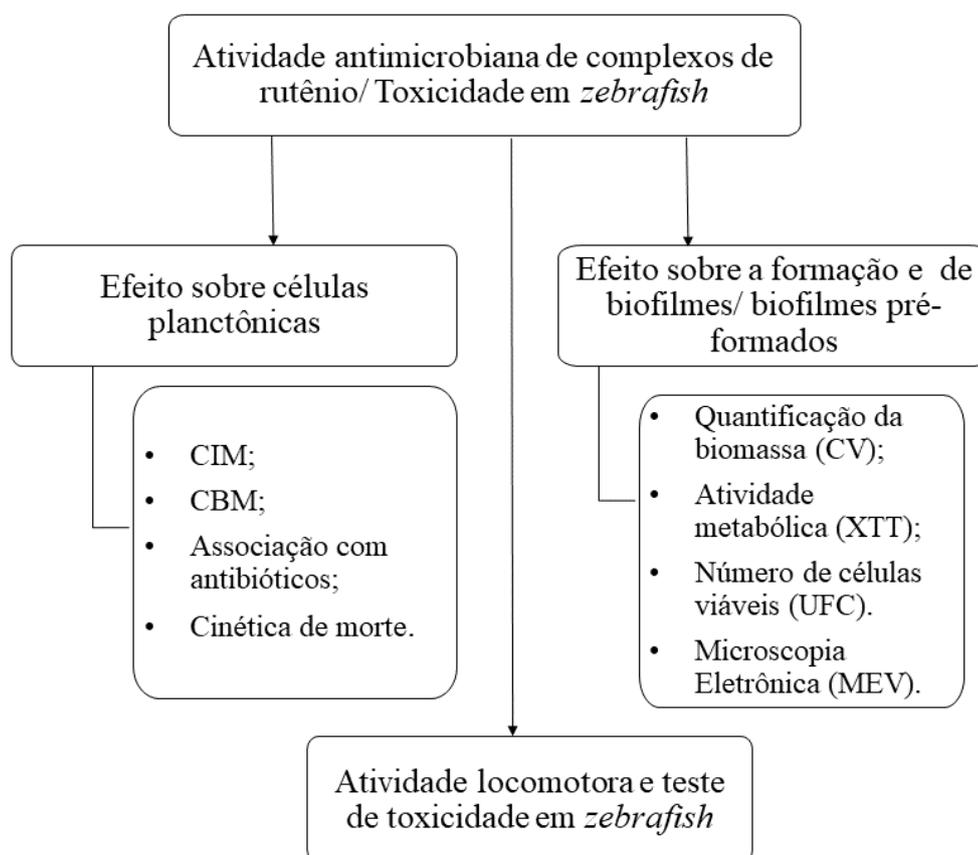
## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Local do estudo

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS), da Universidade Federal do Ceará – UFC, com a participação do Laboratório de Bioinorgânica para a síntese e obtenção dos compostos e do Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB) da Universidade Estadual do Ceará – UECE, campus de Tauá para realização dos testes de toxicidade em modelo *zebrafish*.

Os ensaios foram realizados em triplicatas e repetidos pelo menos três vezes em dias distintos, seguindo o organograma proposto na figura 17.

Figura 17 – Organograma e estruturação deste estudo



Fonte: Próprio autor.

## 4.2 Microrganismos

Para o presente estudo foram utilizadas cepas padrão que integram o acervo da *American Type Culture Collection* (ATCC) exibidas no quadro 1. Estas cepas estão apresentadas com o nome da espécie, seguida de um código de identificação, e algumas características e/ou uso.

Quadro 1 – 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 susceptibilidade 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
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	Não documentada	Facilmente produz mutantes coloniais. Hospedeira de bacteriófago
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	Não documentada	Pesquisa prospectiva de patógenos/Detecção de aerossóis

Fonte: [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

## 4.3 Obtenção dos complexos de rutênio e antibióticos

Todos os complexos de rutênio avaliados neste estudo, foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Eduardo Henrique Sousa, do Laboratório de Bioinorgânica do Departamento de Química Orgânica Inorgânica da UFC.

Foram cedidos três complexos do tipo  $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{NN-R})]^{2+}$ . O primeiro complexo  $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{NN})]^{2+}$  foi denominado de **RuNN**, o segundo complexo  $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{NN-F})]^{2+}$ , denominado de **RuNN-F** e o terceiro complexo  $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{NN-Br})]^{2+}$  designado como **RuNN-Br**. A estrutura química contendo a massa molecular (MM) e o potencial redox ( $E_{1/2}$ ) destes complexos, estão apresentadas no quadro 2.

Os dois antibióticos (ampicilina e tetraciclina) usados neste estudo, foram adquiridos junto a empresa Sigma Aldrich. A Ampicilina sódica (Sigma Aldrich, A0166-5G) foi escolhida por se tratar de um antibiótico  $\beta$ -lactâmico que age na parede celular de bactérias Gram-positivas, e o Cloridrato de Tetraciclina (Sigma Aldrich, T7660-5G), por ser um antibiótico de amplo espectro, usado tanto no tratamento de infecções de bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. A estrutura química e massa molecular está descrita no quadro 3.

Quadro 2 – Estrutura dos complexos de rutênio e sua respectiva massa molecular (MM) e potencial redox ( $E_{1/2}$ )

Complexo RuNN	Complexo RuNN-F	Complexo RuNN-Br
$cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{NN})]^{2+}$	$cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{NN-F})]^{2+}$	$cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{NN-Br})]^{2+}$
MM= 704,06 g/mol $E_{1/2}=0,50\text{V}$	MM= 722,05 g/mol $E_{1/2}=0,72\text{V}$	MM= 791,97 g/mol $E_{1/2}=0,75\text{V}$

Fonte: Laboratório de Bioinorgânica – (UFC).

Quadro 3 – Estrutura dos antibióticos e sua respectiva massa molecular (MM)

Antibiótico Ampicilina sódica	Antibiótico Cloridrato de Tetraciclina
MM = 371,39 g/mol	MM = 480,90 g/mol

Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/87128?lang=pt&region=BR>

#### 4.4 Condições da cultura

Para as condições de crescimento das espécies bacterianas adotou-se a metodologia proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, (2015), com algumas modificações. Armazenados em uma solução de meio Soja Tríplica Caldo (TSB) e glirescol 20% a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , os microrganismos foram estriados em placas de petri contendo meio Soja Tríplica Ágar (TSA) e incubados por 24 h, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após o crescimento nas placas, 5 colônias isoladas foram removidas e inoculada em 5 mL de meio TSB e incubadas sobre as mesmas condições por mais 24 h. Em seguida, a cultura foi transferida para tubos tipo *falcon* de 50 mL e centrifugada a  $8.603\text{ G}$ , a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 min, sendo ressuspensa em novo meio TSB (10mL). Posteriormente, com o auxílio do espectrofotômetro (Amersham Biosciences), a concentração celular da suspensão bacteriana foi ajustada a  $2 \times 10^6$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), através da turbidimetria (620 nm) e curvas de calibração previamente determinada para cada bactéria.

#### 4.5 Solubilização e diluição dos complexos RuNN, RuNN-F, RuNN-Br e antibióticos

Tanto a solubilização dos complexos de rutênio, quanto dos antibióticos, também seguiram as normas de padronização pelo CLSI, (2015) e modificações. Inicialmente, os complexos RuNN, RuNN-F e RuNN-Br, foram solubilizados em meio Soja Tríplica Caldo (TSB) e Dimeltilsulfóxido (DMSO) P.A, e preparado uma solução estoque de 10 mg/mL, sendo submetida ao banho ultrassônico por oito minutos. Logo depois, diluições foram realizadas em tubos *falcon* de 15 mL a uma concentração final de 1 mg/mL para os complexos de rutênio e 4% para o DMSO. Os antibióticos foram solubilizados em meio TSB, com suas concentrações também ajustadas 1 mg/mL. Ressalta-se que logo após as diluições, todas as soluções foram esterilizadas por filtro  $0,22\text{ }\mu\text{m}$ .

#### 4.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)

A avaliação da atividade antibacteriana dos complexos de rutênio e dos antibióticos, foi realizada segundo o ensaio de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 poços de fundo plano de acordo com as normas sugeridas pelo CLSI, (2017), com algumas modificações.

Para a determinação da CIM, os poços da linha A (1 a 5) da placa foram preenchidos inicialmente com 200  $\mu\text{L}$  de um dos complexos de rutênio avaliado naquele momento, sendo a concentração inicial de 1 mg/mL. Em seguida, realizou-se a diluição seriada na base dois para obtenção de diferentes concentrações, que variaram entre 1 mg/mL a 15,6  $\mu\text{g/mL}$ .

Posteriormente, 100  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana já previamente ajustada na concentração de  $2 \times 10^6$  UFC/mL, foi adicionada na placa, com conseqüente diminuição na concentração do complexo de rutênio e da suspensão bacteriana, ficando as concentrações finais entre 500 e 7,8  $\mu\text{g/mL}$  para o rutênio e de  $1 \times 10^6$  UFC/mL para a suspensão bacteriana, obtendo-se um volume final de 200  $\mu\text{L}$ , sendo as placas 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. Para a determinação da CBM (Concentração Bactericida Mínima) 24 horas depois da incubação, foram removidos 10  $\mu\text{L}$  da solução contida nos poços que não apresentaram crescimento microbiano, seguido de inoculação em placas de petri com meio TSA. As placas de petri foram incubadas novamente sobre as mesmas condições já descritas. Após o período de 24 horas avaliou-se a presença de unidades formadoras de colônias (UFC) e considerou-se como CBM, a menor concentração da substância teste que inibiu o crescimento visível das UFCs. Os mesmos procedimentos também foram realizados para montagem das placas dos antibióticos ampicilina e tetraciclina, no entanto, os valores da CIM destes antibióticos foram classificados de acordo com os níveis de suscetibilidade baseados no quadro 4, propostos pelo CLSI, (2015).

Quadro 4 – Pontos de corte de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos.

	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diâmetro da zona
Sensível (S)	$\leq 4$	$\geq 20$
Intermediário (I)	8 - 16	15 -19
Resistente (R)	$\geq 32$	$\leq 14$

Fonte: Adaptado de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M07-A10 2015).

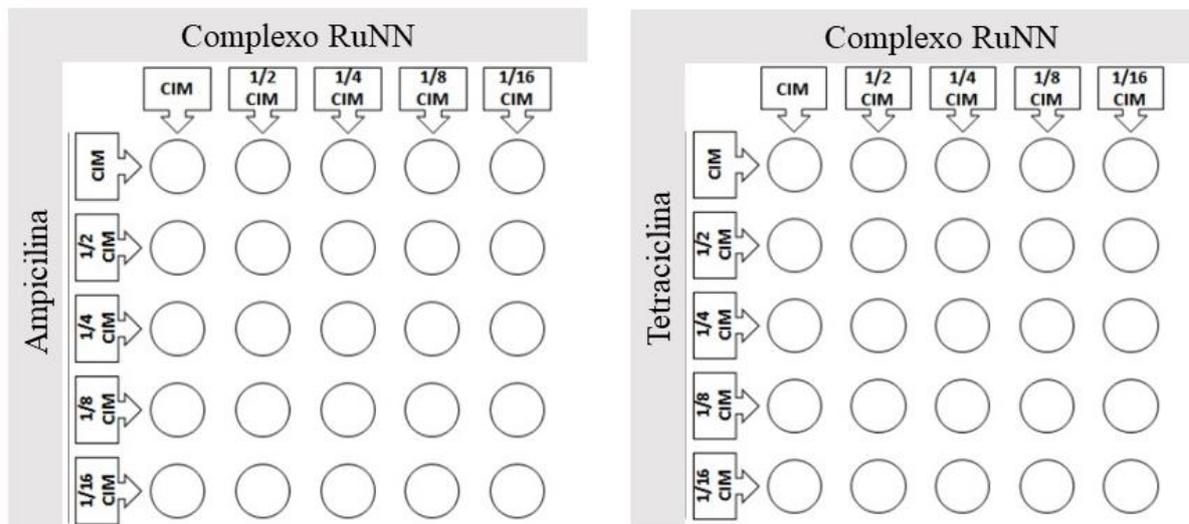
#### 4.7 Avaliação do efeito dos complexos de rutênio associados aos antibióticos padrão

As avaliações dos efeitos resultantes das associações entre os complexos e os antibióticos, foram realizadas através da metodologia *checkerboard*, descrita nos trabalhos realizados por Rosato *et al.*, (2007) e Lechartier, Hartkoom e Cole (2012). O termo *checkerboard* refere-se a múltiplas diluições com dois agentes antimicrobianos em concentrações equivalentes, abaixo ou acima das CIMs para os microrganismos testados. Este método 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 RuNN + AMP, e RuNN + TETRA; complexo RuNN-F + AMP e RuF + TETRA; complexo RuNN-Br + AMP e RuNN-Br + TETRA, sendo que tanto os complexos de rutênio, quanto os antibióticos, foram preparados em concentração 4 vezes a da CIM.

Para cada associação testada foram usados 5 poços da microplaca de 96 e poliestireno de fundo plano, 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 (conforme figura 18). No total, 25 poços foram utilizados, 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 microdiluição 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  $\mu$ L do antibiótico, 50  $\mu$ L dos complexos de rutênio e 100  $\mu$ L do inóculo 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 18 – Esquematização dos testes de associação entre o complexo de rutênio RuNN e os antibióticos



Fonte: Próprio autor.

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 D.O 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:

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

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 antagonista ( $\text{ICIF} > 4$ ) (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2013; ODDS, 2003).

#### 4.8 Ensaio do tempo de morte

Para o presente ensaio utilizou-se a metodologia descrita por Kim *et al.* (2011), com modificações. Após as etapas do crescimento das bactérias em caldo, 100 µL de suspensão bacteriana na concentração  $2 \times 10^6$  UFC/mL mais 100 µL de cada complexo nas concentrações da CBM e duas vezes a CBM, foram adicionados nas placas de microtitulação de 96 poços e incubadas a 37°C. Nos tempos de 0, 30min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, e 24 horas, alíquotas de 20 µL

das suspensões bacterianas foram coletadas e em seguida, submetidas a uma diluição decimal seriada na base dez, com 180  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril, em placas de 96 poços de fundo em “U”, para posterior plaqueamento de três alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  em meio TSA, e incubação por 24h, a 37°C. Após o tempo de incubação, o número de UFCs foi determinado e os resultados apresentados em termos de  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL em uma curva de cinética de morte.

#### **4.9 Ensaio sobre a formação do biofilme**

O ensaio foi realizado baseado nos testes de microdiluição seriada, coloração com Cristal de Violeta (CV) e contagem de UFCs, em placas de poliestireno de 96 poços de acordo com Stepanovic *et al.* (2000) com algumas modificações propostas por Vasconcelos *et al.*, (2014). Além das duas metodologias mencionadas acima com relação a formação dos biofilmes, neste ensaio, também avaliou-se a atividade metabólica do biofilme, por meio da redução do sal de tetrazólio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5- sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT) de acordo com metodologia proposta por Xu *et al.*, (2016). A preparação das placas para os testes foi similar ao procedimento usado no ensaio de CIM.

##### **4.9.1 Quantificação da biomassa**

A quantificação da biomassa dos biofilmes foi determinada pelo método de coloração com cristal de violeta (CV). Após as 24 horas de incubação as placas foram lavadas com água destilada estéril por três vezes para a retirada das células fracamente aderidas. Posteriormente os poços foram preenchidos com 200  $\mu\text{L}$  de metanol a 95% por 5 minutos para fixação dos biofilmes. Adicionou-se, então, 200  $\mu\text{L}$  de cristal de violeta 1 % por mais 5 minutos, a 25 °C. Em seguida, o excesso de corante foi removido e as placas lavadas com água destilada. O corante remanescente foi removido com ácido acético a 33% e então a biomassa foi quantificada através da medição da densidade óptica a 590 nm ( $\text{D.O}_{590}$ ) com o auxílio de um leitor de microplacas (SpectraMax i3).

##### **4.9.2 Determinação da atividade metabólica no biofilme**

A atividade metabólica do biofilme foi quantificada utilizando o ensaio de redução do sal de tetrazólio XTT (Sigma Chemical Co., EUA) em cristais de formazan. A princípio foi preparada uma solução estoque de XTT e de PMS de 10 mg/mL e estocado a -20°C, ambos

diluídos em PBS (Fosfato 10 mM; NaCl 150 mM; KCl 2,7 mM; pH 7.2 – 7.4) e estocados na ausência de luz. A montagem das placas de XTT foi realizada conforme a mesma metodologia da montagem de placas para CV. Após 24 horas de incubação as placas foram lavadas duas vezes com PBS, e posteriormente foi adicionado em cada poço 200  $\mu$ L de uma solução de XTT (150  $\mu$ g/mL e 10  $\mu$ g/mL de PMS). Após a adição da solução, as placas foram incubadas novamente a 37° C durante 3 horas na ausência da luz. A densidade óptica foi mensurada no comprimento de onda de 490 nm com auxílio de um leitor de microplacas (SpectraMax i3).

#### **4.9.3 Contagem de células viáveis dos biofilmes**

Após a formação dos biofilmes o meio de cultura foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com água destilada estéril, para remoção das células fracamente aderidas. Posteriormente, cada poço foi preenchido com 200  $\mu$ L de água destilada estéril e submetido ao banho ultrassônico (Cristófoli/EQM-CF) por 8 minutos para o desprendimento das células incrustadas nos biofilmes. Em seguida, uma diluição decimal seriada das amostras em suspensão foram plaqueadas em meio TSA e incubadas sobre as mesmas condições acima citadas, mas por um período de 24 horas. O número de Unidades Formadoras de Colônias foi determinado e os resultados expressos em termos de Log<sub>10</sub> UFC/mL.

#### **4.9.4 Ensaio sobre biofilmes pré-formados**

Os ensaios de biofilmes pré-formados também foram realizados em placas de 96 poços de poliestireno e fundo plano. As suspensões de células (200  $\mu$ L de  $1 \times 10^6$  UFC/mL) foram adicionadas a cada poço e incubadas a 37° C durante 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi removido de cada poço e um volume igual dos complexos de rutênio nas concentrações que variaram de 500 a 7,8  $\mu$ g/mL foi adicionada aos poços, sendo que no controle de bactéria não tratada com estes complexos, foi adicionado 200  $\mu$ L de meio de cultura. Após a formação dos biofilmes durante mais 24 horas, o meio foi retirado e cada poço foi lavado com água destilada estéril para remoção das células fracamente aderidas. As mesmas metodologias de cristal violeta, contagem de células viáveis e atividade metabólica utilizadas para avaliação da inibição da formação de biofilmes, também foram usadas para avaliar a ação dos complexos de rutênio sobre os biofilmes pré-formados.

#### **4.9.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Para a observação de modificações morfológicas dos biofilmes, foram analisadas fotomicrografias obtidas por MEV, de acordo com Vasconcelos *et al.* (2014). Os biofilmes das cepas bacterianas resistentes foram cultivados, tanto para os testes de inibição da formação do biofilme, quanto para os testes de biofilmes pré-formados, 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 µg/mL para os testes de inibição da formação de biofilme, e a concentração de 250 µg/mL foi usada para tratar os biofilmes pré-formados. 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, posteriormente, terem os fundos das placas cortados e removidos. Subsequentemente, os biofilmes foram revestidos com ouro e visualizados no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG (Central Analítica da UFC, Brasil).

#### **4.9.6 Teste de toxicidade e atividade locomotora em zebrafish**

Foram utilizados zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa), selvagens, ambos os sexos com idade de 60-90 dias, tamanhos de  $3.5 \pm 0.5$  cm e peso  $0.4 \pm 0.1$  g, obtidos da Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA, um fornecedor em Fortaleza (Ceará, Brasil). Grupos de 66 peixes foram aclimatados por 24 h em aquários de vidro (40 x 20 x 25 cm), contendo água desclorada (anticloro *ProtecPlus*<sup>®</sup>) e bombas de ar com filtros submersos, a 25 °C e pH 7.0, com ciclo cicardiano de 14:10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração (*Spirulina*<sup>®</sup>) ad libitum 24 h antes dos experimentos. Após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada (2-4 °C), por 10 minutos, até a perda de movimentos operculares (MATHEWS; VARGA, 2012; CONCEA, 2018). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), sob protocolo nº 3344801/2017.

Os testes com *zebrafish* foram realizados baseando-se em metodologias propostas por Magalhães *et al.* (2017). No dia dos experimentos, os peixes foram selecionados randomicamente, transferidos para uma esponja úmida, tratados com as amostras testes ou

controles, via intraperitoneal (*i.p.*) (EKAMBARAM *et al.*, 2017). Em seguida, os animais foram acondicionados individualmente em copos de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Para os tratamentos via intraperitoneal (*i.p.*) foi utilizada seringa de insulina (0,5 mL; UltraFine® BD) com uma agulha de calibre 30G.

Foi realizado o teste de campo aberto (AHMAD; RICHARDSON, 2013) para avaliar alteração ou não da coordenação motora dos peixes, seja por sedação e/ou relaxamento muscular. Inicialmente, os animais foram tratados via intraperitoneal com 20 µL (baseado em sua massa corporal) de RuNN (15,6 ou 31,2 ou 62,5 µg/mL) ou RuNN-F (7,8 ou 15,6 ou 31,2 µg/mL) ou RuNN-Br (15,6 ou 31,2 ou 62,5 µg/mL), ou veículo (DMSO 3%, 20 µL *i.p.*). Um grupo de animais sem tratamentos foi incluído (Naive). Após 30 min dos tratamentos, os animais foram adicionados em placas de Petri de vidro (10 x 15 cm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL). Usando o valor de CL do grupo Naive como linha de base (100%), foi calculado a porcentagem de atividade locomotora (AL%) individualmente durante 0-5 minutos.

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao zebrafish (*D. rerio*) adulto conforme metodologias propostas pela OECD (OECD, 1992) e Huang *et al.* (2014). Os animais (n=6/cada) tratados conforme descrito anteriormente, após o Teste de Campo Aberto, foram deixados em repouso para analisar a taxa de mortalidade. O grupo veículo (DMSO 3%) foi utilizado como controle. Após 24 horas dos tratamentos, foi anotado o número de peixes mortos em cada grupo e determinado a concentração letal capaz de matar 50 % dos animais (CL<sub>50</sub>) através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUILAR *et al.*, 2015). A toxicidade foi avaliada por um período de 24 horas.

#### **4.10 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, executados com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (San Diego, California, USA). Foram considerados estatisticamente significativos valores de  $p < 0,001$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Atividade antimicrobiana sobre células planctônicas

Os resultados da atividade antimicrobiana dos complexos de rutênio sobre o crescimento planctônico dos microrganismos testados, foram avaliados através dos ensaios de determinação de CIM, CBM, efeito sinérgico associado quando associados aos antibióticos e a determinação do tempo de morte. Em termos gerais, todos os complexos de rutênio (RuNN, RuNN-F, RuNN-Br) tiveram ação bacteriostática, bactericida, efeito sinérgico, aditivo e/ou antagônico quando em combinação com antibióticos, e redução do número de UFCs, a partir das primeiras horas de contato com os microrganismos. Ressalta-se que todos os complexos, só mostraram atividade sobre a bactérias Gram-positivas (Tabela 2).

Observou-se que o complexo RuNN apresentou valores de CIM para as cepas de *S. aureus* a partir de 15,6 µg/mL e sobre as cepas de *S. epidermidis* de 31,2 µg/mL (Tabela 2). Ainda para estas duas cepas a CBM foi de 125 µg/mL. O complexo RuNN-F teve um efeito mais eficaz, apresentando CIM de 7,8 µg/mL e CBM com variações de 62,5 e 31,2 µg/mL sobre a cepas de *Staphylococcus* spp.. Na avaliação do complexo RuNN-Br observou-se valores de CIM entre 15,6 e 62,5 µg/mL e CBM entre 62,5 e 125 µg/mL (Tabela 2).

Conforme a tabela 3, três cepas mostraram índices de suscetibilidade resistentes frente aos antibióticos AMP e TETRA de acordo as recomendações e pontos de cortes (Quadro 3) do CLSI (CLSI, 2015). As cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *P. aeruginosa* ATCC 10145, mostraram ser menos suscetíveis 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).

**Tabela 2** – Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos complexos de rutênio e antibióticos ampicilina (AMP) e tetraciclina (TETRA) sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

BACTÉRIAS	COMPLEXOS DE RUTÊNIO (µg/mL)						ANTIBIÓTICOS (µg/mL)			
	RuNN		RuNN-F		RuNN-Br		Tetraciclina		Ampicilina	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	15,6	125	7,8	31,2	15,6	62,5	0,39 <sup>S</sup>	3,12	0,04 <sup>S</sup>	0,19
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	62,5	125	7,8	31,2	31,2	62,5	50 <sup>R</sup>	100	25 <sup>R</sup>	25
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	31,2	125	15,6	125	31,2	62,5	0,39 <sup>S</sup>	3,56	1,56 <sup>S</sup>	1,56
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	62,5	125	15,6	62,5	62,5	125	0,19 <sup>S</sup>	3,12	1.000 <sup>R</sup>	1.000
<i>E. coli</i> ATCC 11303	-	-	-	-	-	-	0,39 <sup>S</sup>	25	0,39 <sup>S</sup>	0,78
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	-	-	-	-	-	-	12,5 <sup>R</sup>	50	50 <sup>R</sup>	-

Fonte: Próprio autor: (<sup>S</sup>): bactérias consideradas sensíveis; (<sup>R</sup>): bactérias consideradas resistentes (CLSI, 2015; EUCAST, 2015). (-): valor não determinado

## 5.2 Atividade combinada aos antibióticos

De posse dos valores da CIM, os complexos de rutênio foram avaliados em combinação com os dois antibióticos também testados neste estudo, no intuito de potencializar o efeito bacteriostático de ambos.

Conforme a tabela 3, o complexo RuNN associado com ampicilina apresentou efeito sinérgico sobre as cepas *S. aureus* ATCC 25923 (ICIF = 0,312), *S. aureus* ATCC 700698 (ICIF = 0,312), *S. epidermidis* ATCC 35984 (ICIF = 0,187), e efeito indiferente sobre a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 (ICIF = 0,562).

Observando a CIM individual da ampicilina, percebemos sua considerável redução quando combinada com a CIM do complexo RuNN, especialmente em relação as duas cepas que tinham mostrado níveis de suscetibilidade resistente. Uma dessas cepas foi a *S. aureus* ATCC 700698, que apresentou CIM individual para ampicilina no valor de 25 µg/mL, e quando combinada com o complexo RuNN, esse valor foi reduzido para 6,25 µg/mL (1/4 da CIM) (Tabela 3). No entanto, os melhores resultados da combinação entre o complexo RuNN e o antibiótico ampicilina, ocorreram sobre a cepa de *S. epidermidis* ATCC 35984, que apesar de ter apresentado resistência contra a ampicilina (CIM de 1.000 µg/mL), quando associada ao complexo, teve seus efeitos bacteriostáticos potencializados, passando a exibir uma nova CIM de 62,5 µg/mL (Tabela 3), o que representou uma redução de 1/16 do valor da CIM individual.

Em associação com a tetraciclina, este mesmo complexo apresentou somente efeito indiferente (Tabela 3) com ICIF de 1,0 e 0,562 para as cepas de *S. aureus* e ICIF de 1,0 para cepas de *S. epidermidis*. Ao contrário do efeito de redução da CIM observado na combinação deste complexo com ampicilina, sua associação com a tetraciclina só reduziu a CIM deste antibiótico a 1/2, sobre todas as cepas testadas.

Tabela 3 – Efeito do complexo RuNN associado aos antibióticos AMP e TETRA, sobre *S. aureus* e *S. epidermidis*

BACTÉRIAS	COMPLEXO DE RUTÊNIO			ANTIBIÓTICO				EFEITO
	RuNN			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	15,6	0,975	0,0625	0,048	0,012	0,25	0,312	Sinergismo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	31,2	1,95	0,0625	25	6,25	0,25	0,312	Sinergismo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	31,2	1,95	0,0625	0,390	0,195	0,5	0,562	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	62,5	7,81	0,125	1.000	62,5	0,0625	0,187	Sinergismo
	RuNN			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	15,6	7,8	0,5	0,195	0,097	0,5	1,0	Indiferente
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	31,2	1,95	0,0625	50	25	0,5	0,562	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	31,2	15,6	0,5	0,097	0,048	0,5	1,0	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	62,5	31,2	0,5	0,390	0,195	0,5	1,0	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. (\*) Perca da atividade bacteriostática.

Os resultados da combinação do complexo RuNN-F com a ampicilina indicaram efeito sinérgico sobre as cepas de *S. aureus*, e efeito aditivo sobre as cepas de *S. epidermidis*. Para as duas cepas de *S. aureus* avaliadas, o valor do ICIF foi de 0,3125 (Tabela 4) com redução da CIM individual da ampicilina (1/4), e da CIM individual do complexo RuNN-F para 1/16 (Tabela 4).

Já na sua associação com a tetraciclina, observou-se que todas as cepas apresentaram efeito antagônico com valores do ICIF de 1,25, sendo que sobre a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, tanto o complexo quanto o antibiótico, não apresentaram mais atividade bacteriostática (Tabela 4). Os resultados ainda demonstraram uma redução da CIM individual do complexo RuNN-F, variando de 1/4 a 1/8 quando em combinação, no entanto a CIM individual da tetraciclina permaneceu inalterada.

Tabela 4 – Efeito do complexo RuNN-F associado aos antibióticos AMP e TETRA, sobre *S. aureus* e *S. epidermidis*

BACTÉRIAS	COMPLEXO DE RUTÊNIO			ANTIBIÓTICO				EFEITO
	RuNN-F			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	7,8	0,487	0,0625	0,048	0,012	0,25	0,312	Sinergismo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	7,8	0,487	0,0625	25	6,25	0,25	0,312	Sinergismo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	15,6	7,81	0,5	0,390	0,195	0,5	1,0	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	15,6	7,81	0,5	1.000	250	0,25	0,75	Indiferente
	RuNN-F			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	7,8	1,95	0,25	0,195	0,195	1,0	1,25	Indiferente
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	7,8	1,95	0,25	50	50	1,0	1,25	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	15,6	*	*	0,097	*	*	*	Antagônico
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	15,6	1,95	0,125	0,390	0,390	1,0	1,125	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. (\*) Perca da atividade bacteriostática.

Os resultados do complexo RuNN-Br quando em combinação com a ampicilina, demonstraram tanto efeito sinérgico e aditivo quanto antagônico (Tabela 5). Sobre as cepas de *S. aureus*, o valor do ICIF foi 0,312 o que representa efeito sinérgico. No entanto, sobre a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, o valor do ICIF foi 0,562, indicando efeito aditivo, e sobre a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, os resultados indicaram efeito antagônico, já que ambas as substâncias testadas não exibiram mais atividade bacteriostática quando avaliadas em combinação (Tabela 5). Ainda para este ensaio, observou-se a redução para 1/16 da CIM do complexo RuNN-Br, quando associado ao antibiótico sobre três cepas. A CIM individual da ampicilina foi reduzida para 1/2 e 1/4 quando em combinação com este complexo (Tabela 5).

Quando associado a tetraciclina, os resultados demonstraram apenas efeito aditivo e antagônico. Como pode-se observar na tabela 8, os valores do ICIF sobre as cepas de *S. aureus* foram de 1,125 e 0,562, configurando ao primeiro valor, efeito antagônico, e ao segundo, efeito aditivo. Para as cepas de *S. epidermidis*, os resultados da associação entre as substâncias apresentaram efeito antagônico, *S. epidermidis* ATCC 35984 por exibir ICIF de 1,062 e *S. epidermidis* ATCC 12228 por não exibir mais sua atividade bacteriostática.

Tabela 5 – Efeito do complexo RuNN-Br associado aos antibióticos AMP e TETRA, sobre *S. aureus* e *S. epidermidis*

BACTÉRIAS	COMPLEXO DE RUTÊNIO			ANTIBIÓTICO				EFEITO
	RuNN-Br			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	15,6	0,975	0,0625	0,048	0,012	0,25	0,312	Sinergismo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	31,2	1,95	0,0625	25	6,25	0,25	0,312	Sinergismo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	31,2	1,95	0,0625	0,390	0,195	0,5	0,562	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	62,5	*	*	1.000	*	*	0,75	Antagônico
	RuNN-Br			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	15,6	1,95	0,125	0,195	0,195	1,0	1,125	Indiferente
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	31,2	1,95	0,0625	50	25	0,5	0,562	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	31,2	*	*	0,097	*	*	*	Antagônico
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	62,5	3,90	0,0625	0,390	0,390	1,0	1,062	Indiferente

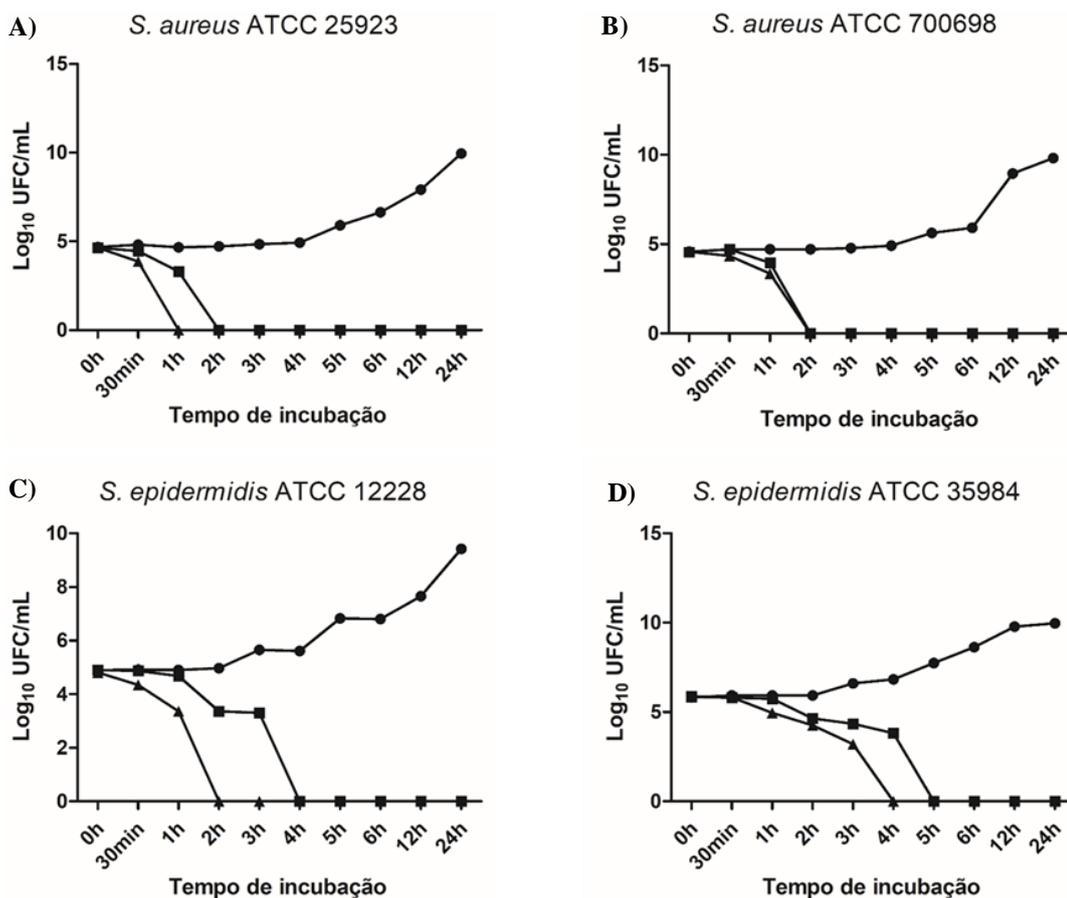
Fonte: Próprio autor. Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (CIM), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM), Concentração Inibitória Fracionada (CIF) e do Índice da Combinação Inibitória Fracionada (ICIF). ICIF  $\leq$  0,5 efeito sinérgico, ICIF  $>$  0,5  $\leq$  4,0 efeito indiferente,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

### 5.3 Cinética de morte

Nas figuras 19, 20 e 21, são apresentadas as cinéticas do crescimento bacteriano na presença dos complexos de rutênio.

Para o complexo RuNN, as concentrações testadas foram 125  $\mu\text{g/mL}$  (valor da CBM) e 250  $\mu\text{g/mL}$  (2x a CBM). Como pode se observar, a redução no número de UFCs se deu a partir de 1 hora de contato com as cepas de *Staphylococcus spp.* testadas neste ensaio (Figuras 119A). A cepa *S. aureus* ATCC 25923 se mostrou mais sensível a ação bactericida deste complexo, tendo a redução completa (100%) do número de UFCs entre 1 e 2 horas para as concentrações testadas (Figura 19A). As cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 12228, também se mostraram sensíveis a maior concentração (250  $\mu\text{g/mL}$ ) do complexo RuNN, tendo a redução total do número de UFCs a partir das 2 horas de contato com o mesmo (Figura 19B e C).

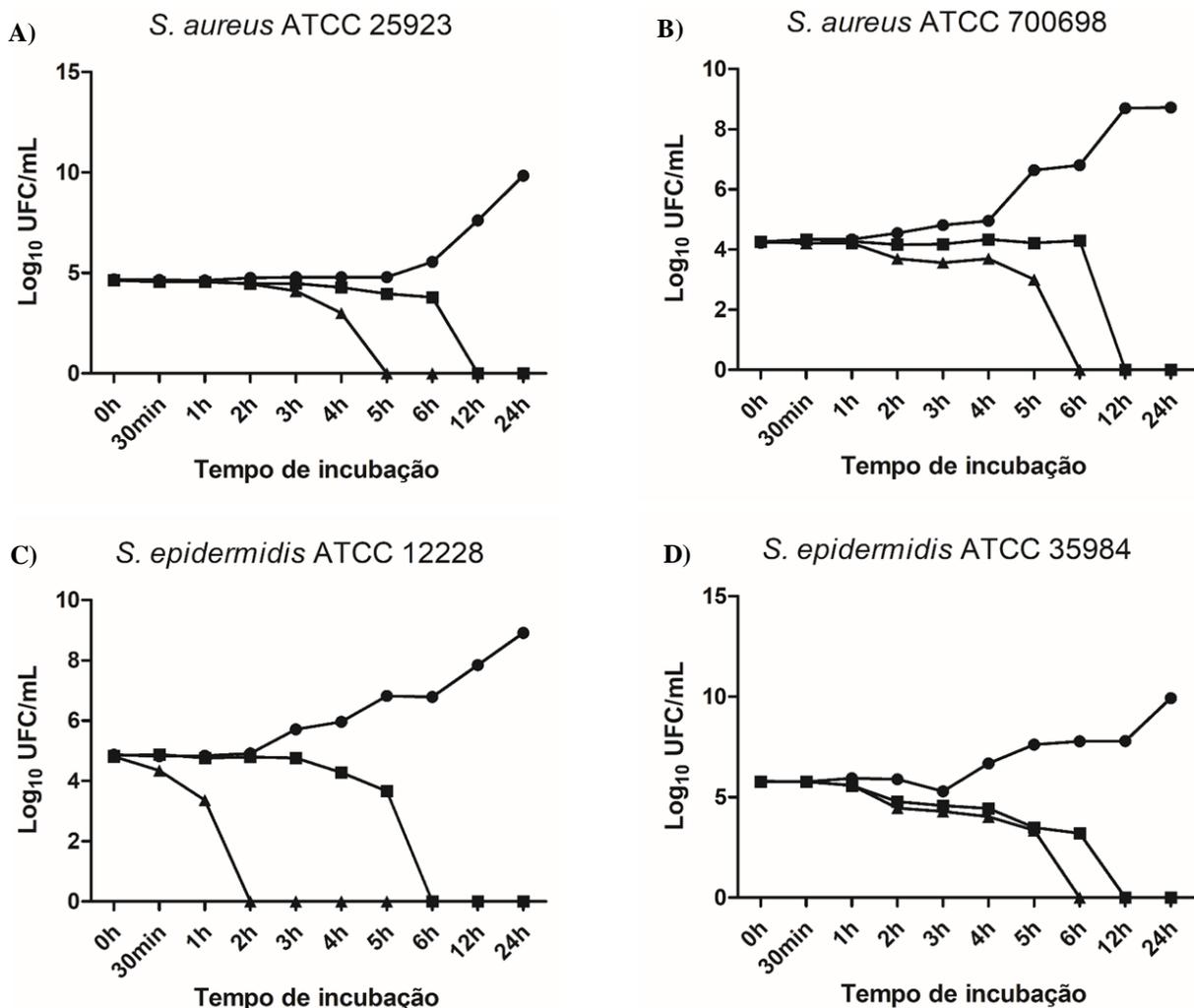
Figura 19 – Cinética de morte de cepas *Staphylococcus spp.* crescidas na presença do complexo RuNN.



Fonte: Próprio autor: Exposição das bactérias ao complexo RuNN nas concentrações de 250  $\mu\text{g/mL}$  (▲) e 125  $\mu\text{g/mL}$  (■). (●) controle de bactérias não expostas.

O complexo RuNN-F apresentou os menores valores da CBM, variando de 31,2  $\mu\text{g/mL}$  a 125  $\mu\text{g/mL}$ . Sobre as cepas de *S. aureus*, este complexo apresentou redução progressiva do número de UFCs a partir das 3 horas de contato (Figuras 20A e B), sendo que a redução total se deu entre 5 e 12 horas de incubação (Figuras 20A e D). Contra a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, observou-se uma maior sensibilidade desta, frente ao completo em questão, apresentando redução de pelo menos 40% no número de UFCs por volta de 1 hora de contato na concentração de 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , bem como redução total em 2 horas de contato (Figura 20C). Apesar da cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 apresentar redução de mais ou menos 1,0 log por volta das 2 horas de contato, a redução total de UFCs só ocorreu as 6 horas para a concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$ , e as 12 horas para a concentração de 125  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 20D).

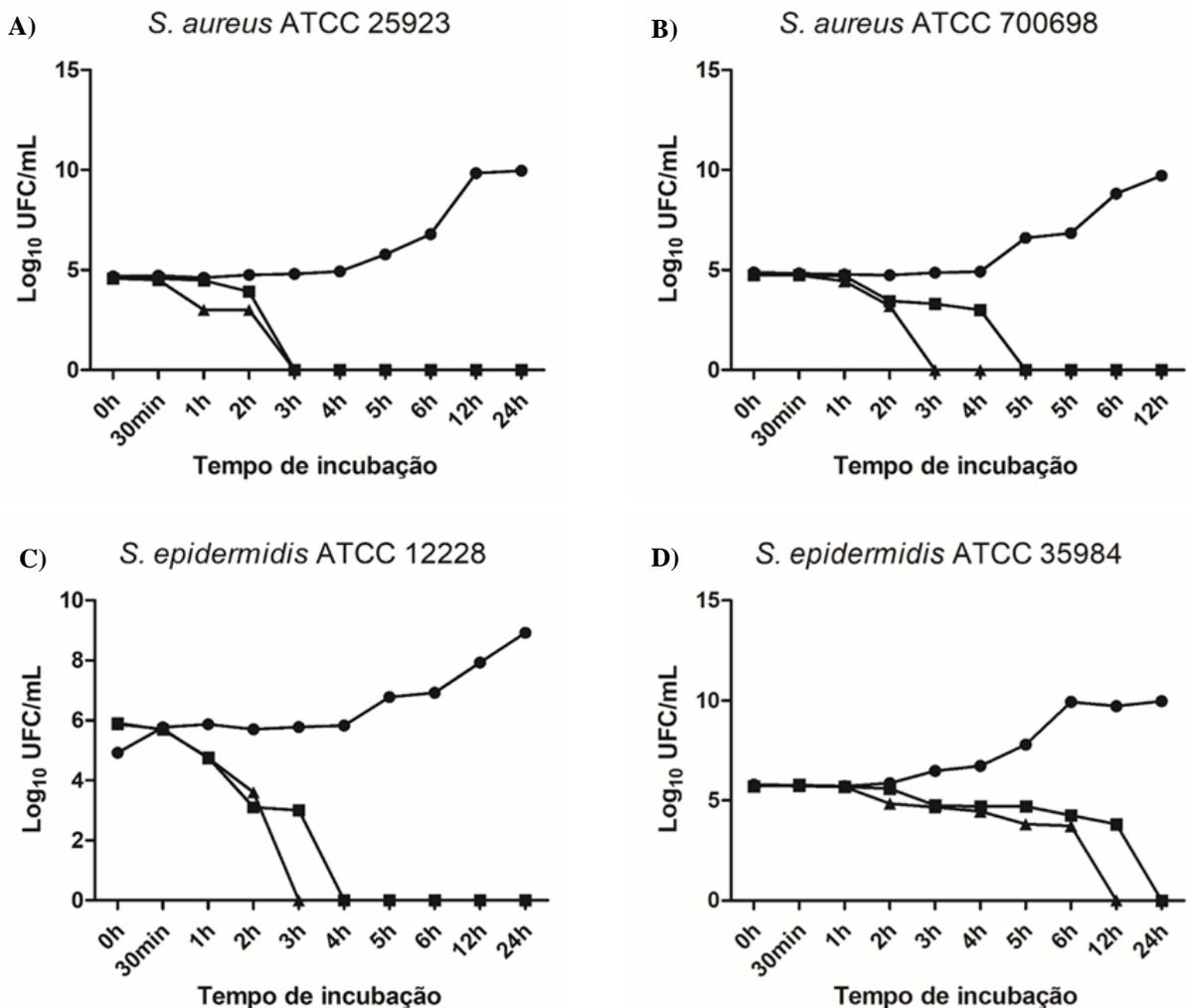
Figura 20 – Cinética de morte de cepas *Staphylococcus* spp. crescidas na presença do complexo RuNN-F.



Fonte: Próprio autor: Exposição das bactérias ao complexo RuNN-F. Em A e B [62,5  $\mu\text{g/mL}$  (▲) e 31,2  $\mu\text{g/mL}$  (■)] em C [125  $\mu\text{g/mL}$  (▲) e 62,5  $\mu\text{g/mL}$  (■)] e D [250  $\mu\text{g/mL}$  (▲) e 125  $\mu\text{g/mL}$  (■)]. (●) controle de bactérias não expostas.

Em relação ao complexo RuNN-Br, foi observado que ambas as cepas de *S. aureus* tiveram a redução total do número de UFCs, por volta das 3 horas de contato, na concentração de 125  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 21A e B), no entanto, a cepa *S. aureus* ATCC 25923, também apresentou redução total no número de UFCs em sua menor concentração testada (62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) com 3 horas de contato (Figura 21A). Para a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, a redução total no número de UFCs ocorreu as 3 horas na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  e as 4 horas para a concentração de 125  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 21C). A cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, demonstrou uma certa resistência em relação ao tempo de morte quando tratada com o complexo RuNN-Br. Conforme a figura 21D, percebemos que a redução total de UFCs só ocorreu a partir das 12 horas de contato com o complexo para a maior concentração, e as 24 horas para a menor.

Figura 21 – Cinética de morte de cepas *Staphylococcus* spp. crescidas na presença do complexo RuNN-Br.



Fonte: Próprio autor: Exposição das bactérias ao complexo RuNN-Br. Em A, B e D [125  $\mu\text{g/mL}$  (▲) e 62,5  $\mu\text{g/mL}$  (■)] em C [250  $\mu\text{g/mL}$  (▲) e 125  $\mu\text{g/mL}$  (■)]. (●) controle de bactérias não expostas.

#### 5.4 Atividade antibiofilme: inibição da formação de biofilmes, atividade metabólica e enumeração de células viáveis

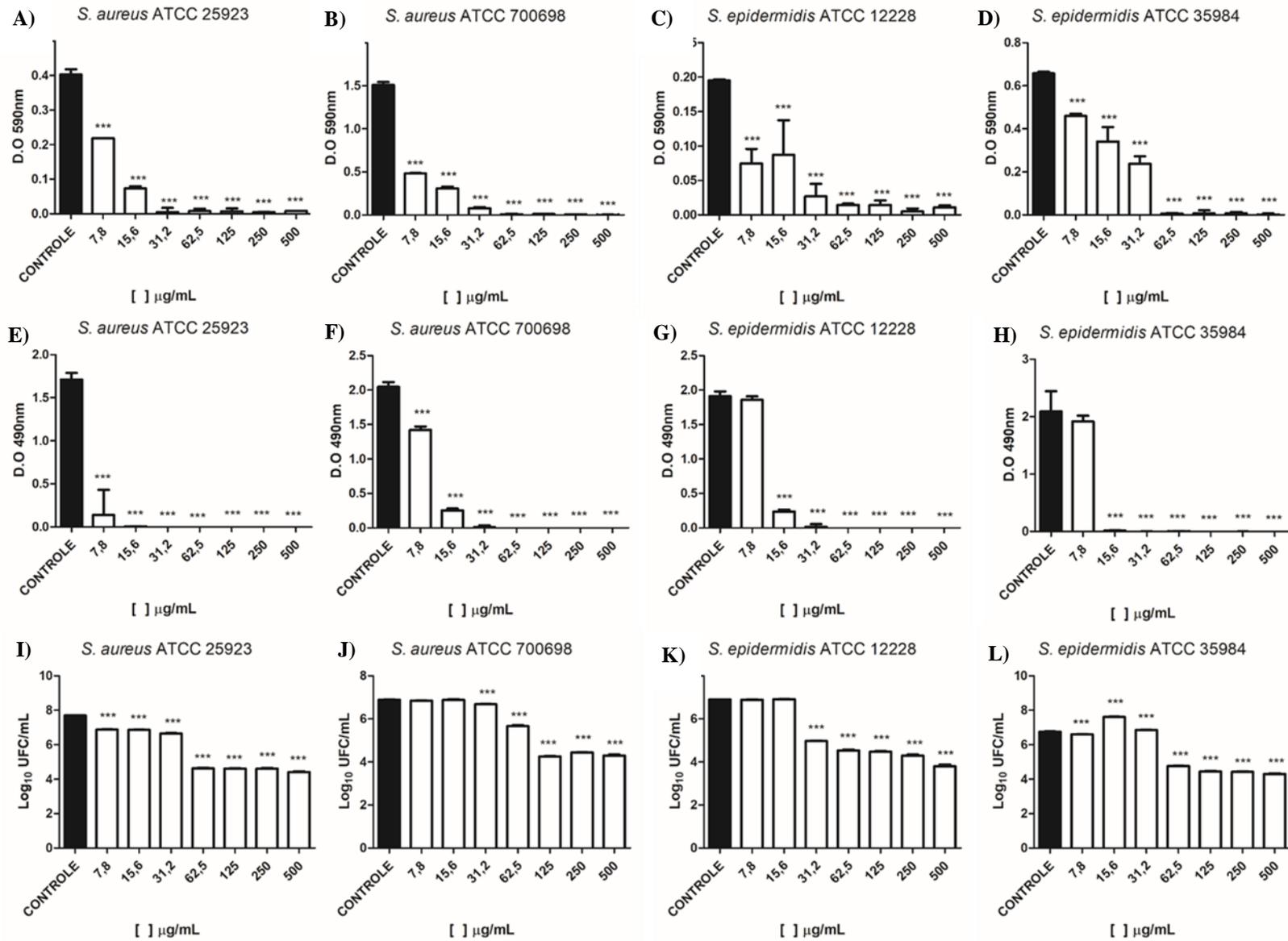
Nas figuras 22, 23 e 24 encontram-se os resultados dos complexos de rutênio em termos de inibição da formação de biofilmes, quantificados pelo método colorimétrico CV, da atividade metabólica, através do ensaio de redução do XTT, e da enumeração do número de células viáveis do biofilme, pelo método de contagem das UFCs.

O complexo RuNN reduziu a formação da biomassa em todas as concentrações, com níveis de redução entre 30 e 99% (Figuras 22A, B, C e D). A cepa *S. aureus* ATCC 700698 se mostrou mais sensível a este complexo, apresentado redução de 68% de sua biomassa na concentração de 7,8 µg/mL e de 99,8% na concentração de 500 µg/mL (Figura 22B). Entretanto, as cepas de *S. epidermidis* mostraram uma maior resistência ao contato com o complexo, sendo que a média da inibição da formação da biomassa foi em torno de 48% para as concentrações mais baixas que variaram de 15,6 e 7,8 µg/mL (Figura 22C e D).

Em relação a atividade metabólica deste complexo, como pode ser observado nas figuras 22E, F, G, e H, houve uma diminuição abrupta da atividade metabólica das células do biofilme nas concentrações que variaram entre 500 e 31,2 µg/mL. Tanto para a cepa *S. aureus* ATCC 25923 como para a cepa *S. aureus* ATCC 700698, houve uma redução da atividade metabólica para quase todas as concentrações testadas, já que na concentração de 7,8 µg/mL a redução foi de 91 e 30% respectivamente (Figuras 22E e F). No entanto, as cepas de *S. epidermidis* apresentaram as maiores taxas de atividade metabólica (entre 91 e 97%), para a concentração de 7,8 µg/mL (Figura 22G e H), a menor concentração testada neste estudo. Uma observação importante para este complexo, foi a de quase 100% da atividade metabólica na concentração de 31,2 µg/mL (1/4 do valor da CBM) sobre todas as cepas testadas (Figuras 22E, F, G e H).

Para este complexo, percebeu-se também uma redução significativa no número de UFCs dos biofilmes das cepas de *Staphylococcus* spp. (Figuras 22I, J, K e L) Como se pode notar, sobre a cepa *S. aureus* ATCC 23923 houve redução do número de células viáveis na ordem de 0,8 log para a concentração de 7,8 µg/mL, e de 3,2 logs para a concentração de 500 µg/mL (Figura 22I). Percebeu-se também para esta cepa que, na concentração de 62,5 µg/mL (1/2 do valor da CBM) a redução no número de UFCs foi de 3,0 logs (Figura 22I), o que representou uma diminuição de 1.000 vezes na quantidade de células viáveis do biofilme.

Figura 22 – Efeito do complexo de rutênio RuNN sobre biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis*



Fonte: Próprio autor. Quantificação da biomassa (A, B, C, D), atividade metabólica (E, F, G, H) e número de células viáveis (I, J, K, L). Barras brancas representam bactérias tratadas com RuNN, barras pretas representam bactérias sem tratamento. \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

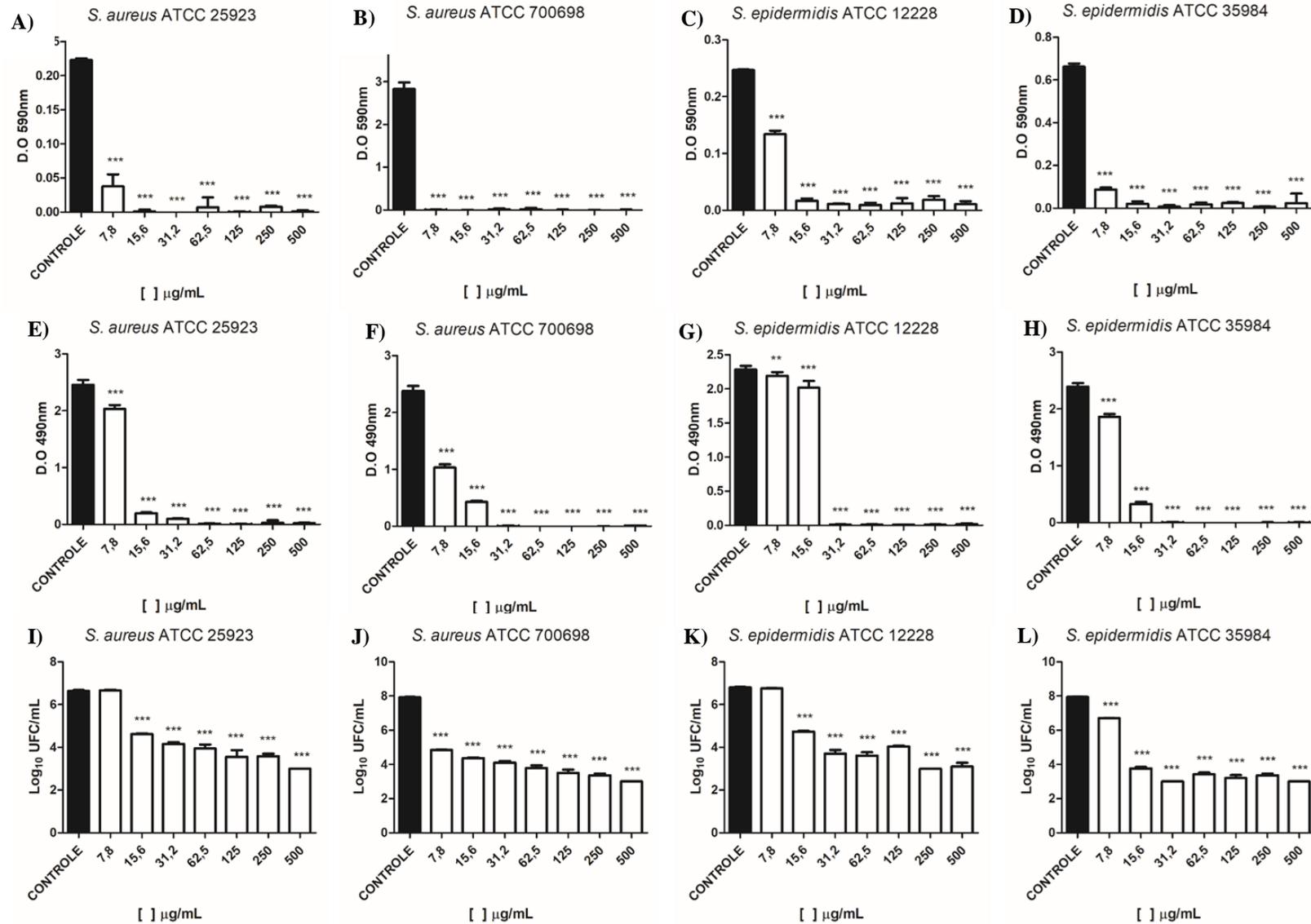
Para as demais cepas, a redução no número de células viáveis também foi da ordem de 2,0 a 3,0 logs acima da concentração de 62,5 µg/mL (Figura 22J, K e L).

Em relação a inibição da formação de biofilmes pelo complexo RuNN-F, todas as cepas de *Staphylococcus* spp. foram mais suscetíveis a este complexo, apresentando reduções que variaram de 45 a 99,9% (Figuras 23A, B, C e D). Assim como para o complexo anterior, a cepa *S. aureus* ATCC 700698, se mostrou mais suscetível, pois tanto para a concentração de 500 µg/mL, quanto para a de 7,8 µg/mL, a redução da biomassa foi acima de 99,8% (Figura 23B). A cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, no entanto, se mostrou menos suscetível apresentando redução da biomassa de 45,7% para a concentração de 7,8 µg/mL e de 95,6% para a concentração de 500 µg/mL (Figura 23C). Um fato interessante para este complexo, foi que concentrações a partir de 15 µg/mL, reduziram a produção da biomassa entre 93-100% (Figura 23A, B, C e D).

A avaliação da atividade metabólica para o complexo RuNN-F, também mostrou reduções significativas do metabolismo celular das bactérias tratadas em relação ao controle. Nas figuras 23E, F, G e H, pode se perceber a diminuição da atividade metabólica a partir da concentração de 15,6 µg/mL sobre todas as cepas avaliadas. A cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, apresentou uma alta atividade metabólica para as concentrações de 15,6 e 7,8 µg/mL (Figura 23G), com taxas na formação de formazan de 88,2 a 95,9% respectivamente.

No ensaio sobre a quantificação de células viáveis, todas as cepas testadas mostraram-se suscetíveis, com redução no número de UFCs que variaram de 1,2 a 4,9 logs (Figura 23I, J, K e L). Dentre as cepas usadas neste ensaio, *S. aureus* ATCC 700698, já relata na literatura como resistente a meticilina (MRSA), chamou a nossa atenção por ter apresentado os melhores resultados em relação a redução do número de células viáveis. Contra esta cepa, o complexo RuF foi capaz de reduzir em 3 logs o número de células viáveis na concentração de 7,8 µg/mL (Figura 23J), e para a concentração de 500 µg/mL, a maior usada neste ensaio, a redução foi de 4,9 logs, o que representa uma diminuição de quase 100.000 vezes, no número de células do biofilme. Percebeu-se também para este complexo que, na concentração de 31,2 µg/mL (mesmo valor da CBM), a redução no número de UFCs foi acima de 2,4 logs para todas cepas avaliadas neste estudo (Figuras 23I, J, K e L).

Figura 23 – Efeito do complexo de rutênio RuNN-F sobre biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis*



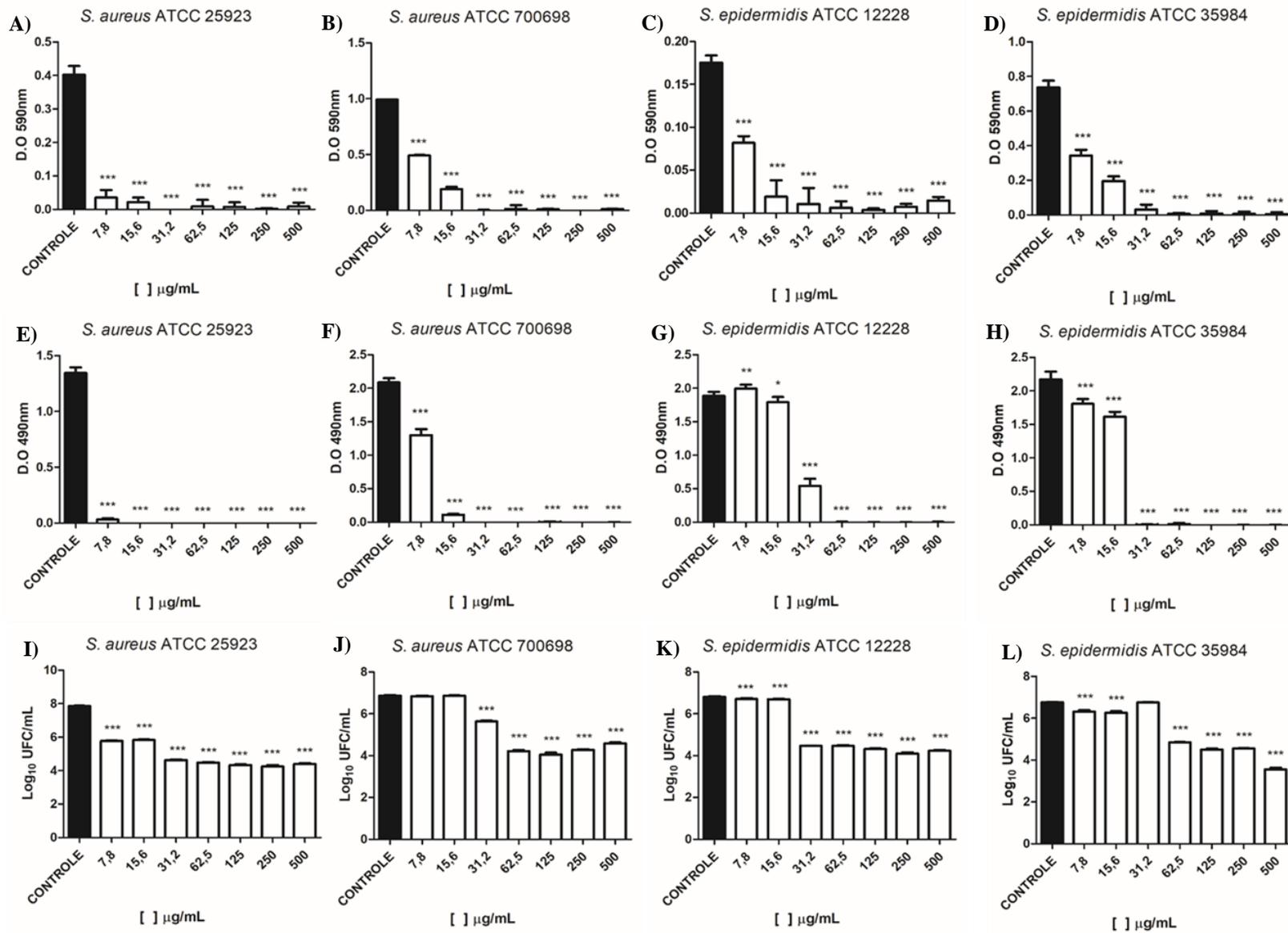
Fonte: Próprio autor. Quantificação da biomassa (A, B, C, D), atividade metabólica (E, F, G, H) e número de células viáveis (I, J, K, L). Barras brancas representam bactérias tratadas com RuNN-F, barras pretas representam bactérias sem tratamento. \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

Assim como os demais, o complexo RuNN-Br também exibiu atividade antibiofilme alcançando diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle. Sobre a cepa *S. aureus* ATCC 25923, este complexo foi capaz de inibir a formação de biomassa entre 91 e 100% desde a menor até a maior concentração (Figura 24A). Também para este complexo a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 se mostrou menos suscetível, já que houve redução da biomassa na concentração de 7,8 µg/mL de 53% e de 91% para a concentração de 500 µg/mL (Figura 24C). Para as demais cepas, a inibição da formação da biomassa atingiu quase 100% para as maiores concentrações (Figura 24B e D).

Assim como para o complexo RuNN, a cepa *S. aureus* ATCC 25923, também mostrou-se suscetível aos efeitos antimicrobianos do complexo RuBr, já que sua atividade metabólica foi extremamente baixa em todas as concentrações, inclusive para a concentração de 7,8 µg/mL, que apresentou 93% de redução da atividade metabólica (Figura 24E). Por outro lado, a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 exibiu as maiores taxas de atividade metabólica (Figura 24G) chegando inclusive a ultrapassar o controle, em cerca de 5% a mais na taxa de atividade metabólica. Diferentemente das demais, esta mesma cepa só diminuiu significativamente sua atividade metabólica na concentração de 62,5 µg/mL.

Conforme as figuras 24I, J, K e L, os efeitos do complexo RuNN-Br também reduziram o número de células viáveis nos biofilmes das cepas de *Staphylococcus* spp. A cepa *S. aureus* ATCC 25923 foi mais sensível a estes efeitos, tendo a redução do número de células viáveis na ordem de 2,0 logs na concentração de 7,8 µg/mL e 3,4 logs na concentração de 500 µg/mL (Figura 24I). Sobre as demais cepas, também houve uma considerável redução no número de UFCs nas concentrações acima de 62,5 µg/mL (valor da CBM para cepas de *S. aureus*, e 1/2 do valor da CBM para cepas de *S. epidermidis*) que variaram de 2,4 a 2,8 logs (Figuras 24J, K e L).

Figura 24 – Efeito do complexo de rutênio RuNN-Br sobre biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis*



Fonte: Próprio autor. Quantificação da biomassa (A, B, C, D), atividade metabólica (E, F, G, H) e número de células viáveis (I, J, K, L). Barras brancas representam bactérias tratadas com RuNN-Br, barras pretas representam bactérias sem tratamento. \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

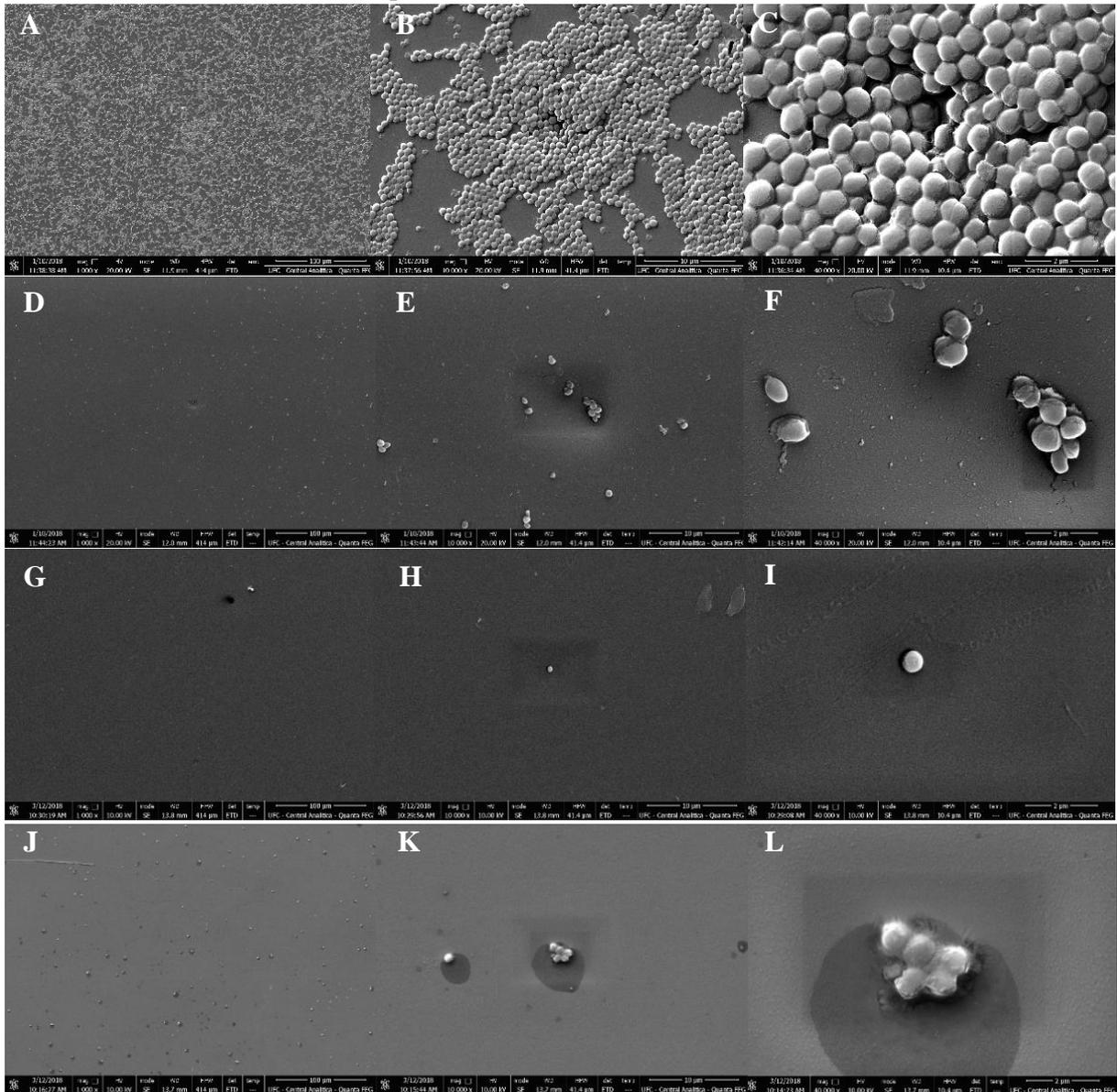
### 5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da inibição da formação de biofilmes

Com a finalidade de analisar os efeitos dos complexos de rutênio sobre a formação dos biofilmes das cepas de *Staphylococcus* spp., os biofilmes da cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 foram avaliados por MEV. As imagens obtidas (eletromicrografias) na figura 25, mostram a interferência de todos os complexos testados sobre a formação dos biofilmes para esta espécie em questão.

Como se pode ver, todos os complexos (Figura 25 de D a L) foram capazes de inibir a formação do biofilme da cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, na concentração de 125  $\mu\text{g/mL}$ , quando comparado com o controle de bactérias não tratadas (Figura 25A, B e C). As eletromicrografias do controle de bactérias, mostraram a alta densidade celular embebidas na matriz polimérica, que estavam crescendo na forma de tapete microbiano e formação de alguns aglomerados celulares (Figura 25A, B e C), o que não foi observado quando as bactérias foram tratadas com os complexos de rutênio (Figura 25 de D a L).

Aparentemente nenhuma modificação morfológica foi observada no controle de bactéria sem tratamento, e nas bactérias tratadas com os complexos de rutênio na concentração de 125  $\mu\text{g/mL}$ . No entanto, essas imagens obtidas confirmam os resultados da avaliação da quantificação da biomassa, atividade metabólica e número de células viáveis no biofilme, já que em nestes ensaios houve uma redução bastante significativa.

Figura 25 – Eletromicrografias da atividade antibiofilme de complexos de rutênio sobre cepas de *S. aureus* ATCC 25923 tratados por 24 horas



Fonte: Próprio autor. Imagens A, B e C (biofilmes não tratados) nas magnificações de 1.000x, 10.000x e 40.000x. Imagens D, E e F, biofilmes tratados com RuNN, imagens G, H e I, biofilmes tratados com RuNN-F, imagens J, K e L, biofilmes tratados com RuNN-Br, nas magnificações de 1.000x, 10.000x e 40.000x. Todos os complexos foram testados na concentração de 125 µg/mL (maior valor da CIM).

## 5.6 Atividade sobre biofilmes pré-formados: quantificação da biomassa, atividade metabólica e enumeração de células viáveis

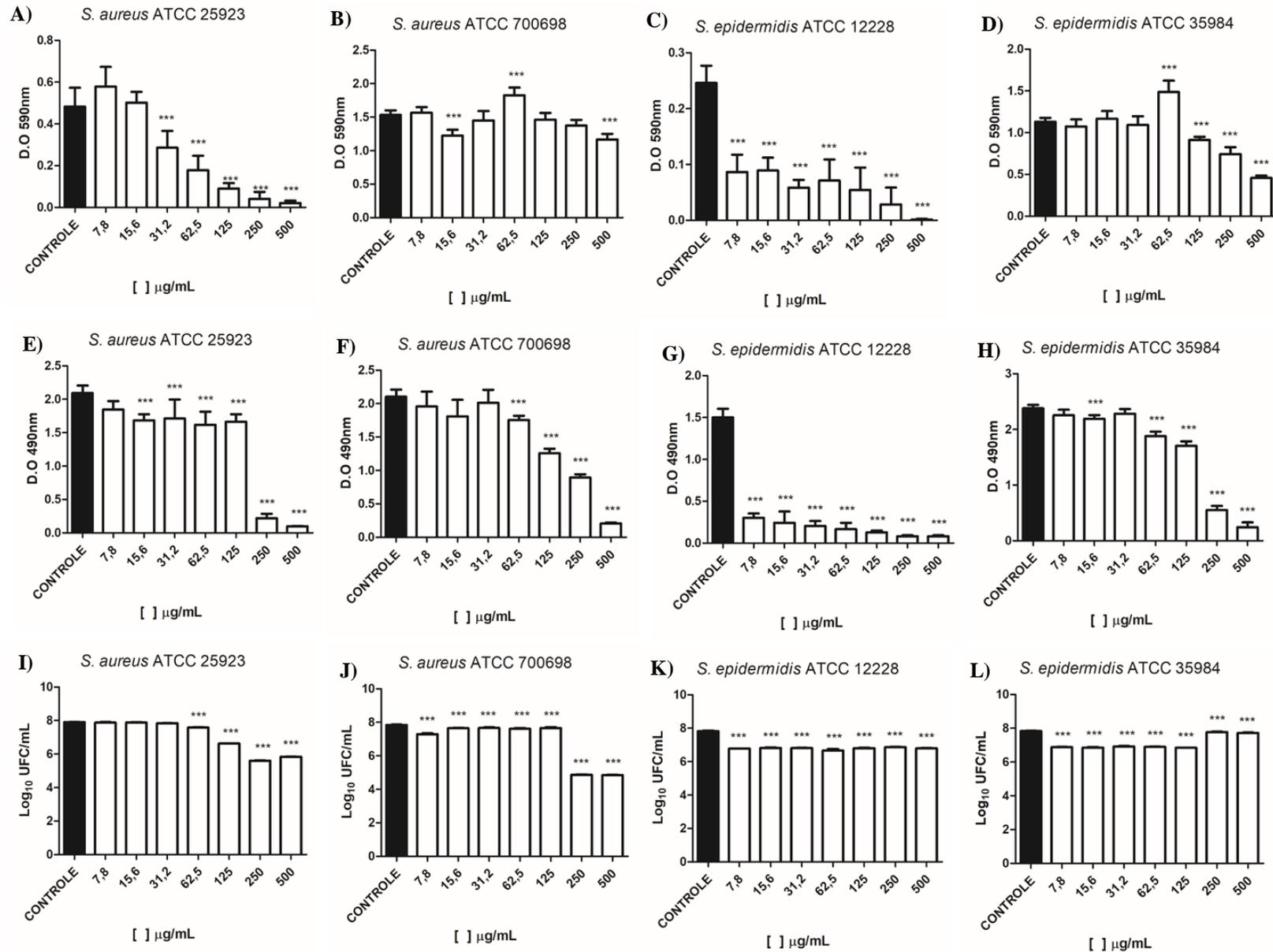
Além dos ensaios sobre a avaliação da inibição da formação de biofilmes na presença dos complexos de rutênio, estes compostos também foram adicionados para tratar os biofilmes pré-formados, no intuito de verificar sua ação na redução da biomassa, atividade metabólica e número de células viáveis.

Para o complexo RuNN (Figura 26 de A a L), os resultados mostraram que este composto foi capaz de reduzir a biomassa de todos os biofilmes tratados na concentração de 500 µg/mL. Observou-se que as cepas *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228 se mostraram mais sensíveis, com redução de pelo 50% de sua biomassa nas concentrações a partir de 31,2 µg/mL (Figura 26A e C). As cepas *S. aureus* ATCC 700698 se mostrou mais resistente exibindo uma redução de 23% na concentração de 500 µg/mL, no entanto, também houve uma redução de 20% na concentração de 15,6 µg/mL.

Para a atividade metabólica (Figura 26E, F, G e H), este complexo também reduziu o metabolismo celular de todos os biofilmes nas concentrações acima de 62,5 µg/mL. *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentou os níveis mais baixos de metabolismo, já que mostrou redução da atividade metabólica de quase 80% a partir da concentração de 7,8 µg/mL (Figura 26F). As cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984 apresentaram os maiores níveis de atividade metabólica, porém todas as cepas testadas, exibiram redução de mais de 90% na concentração de 500 µg/mL.

Em relação ao número de células viáveis dos biofilmes pré-formados (Figura 26I, J, K e L), RuNN reduziu o número de UFCs em quase todas as concentrações testadas. A cepa *S. aureus* ATCC 700698 mostrou os maiores níveis de redução, já que exibiu a diminuição de pelos 3,0 logs (Figura 26J) em relação ao controle nas concentrações de 500 e 250 µg/mL. As demais cepas também exibiram redução que variaram de 2,0 a 0,1 logs.

Figura 26 – Efeito do complexo de rutênio RuNN sobre biofilmes pré-formados de *S. aureus* e *S. epidermidis*



Fonte: Próprio autor. Quantificação da biomassa (A, B, C, D), atividade metabólica (E, F, G, H) e número de células viáveis (I, J, K, L). Barras brancas representam bactérias tratadas com RuNN, barras pretas representam bactérias sem tratamento. \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

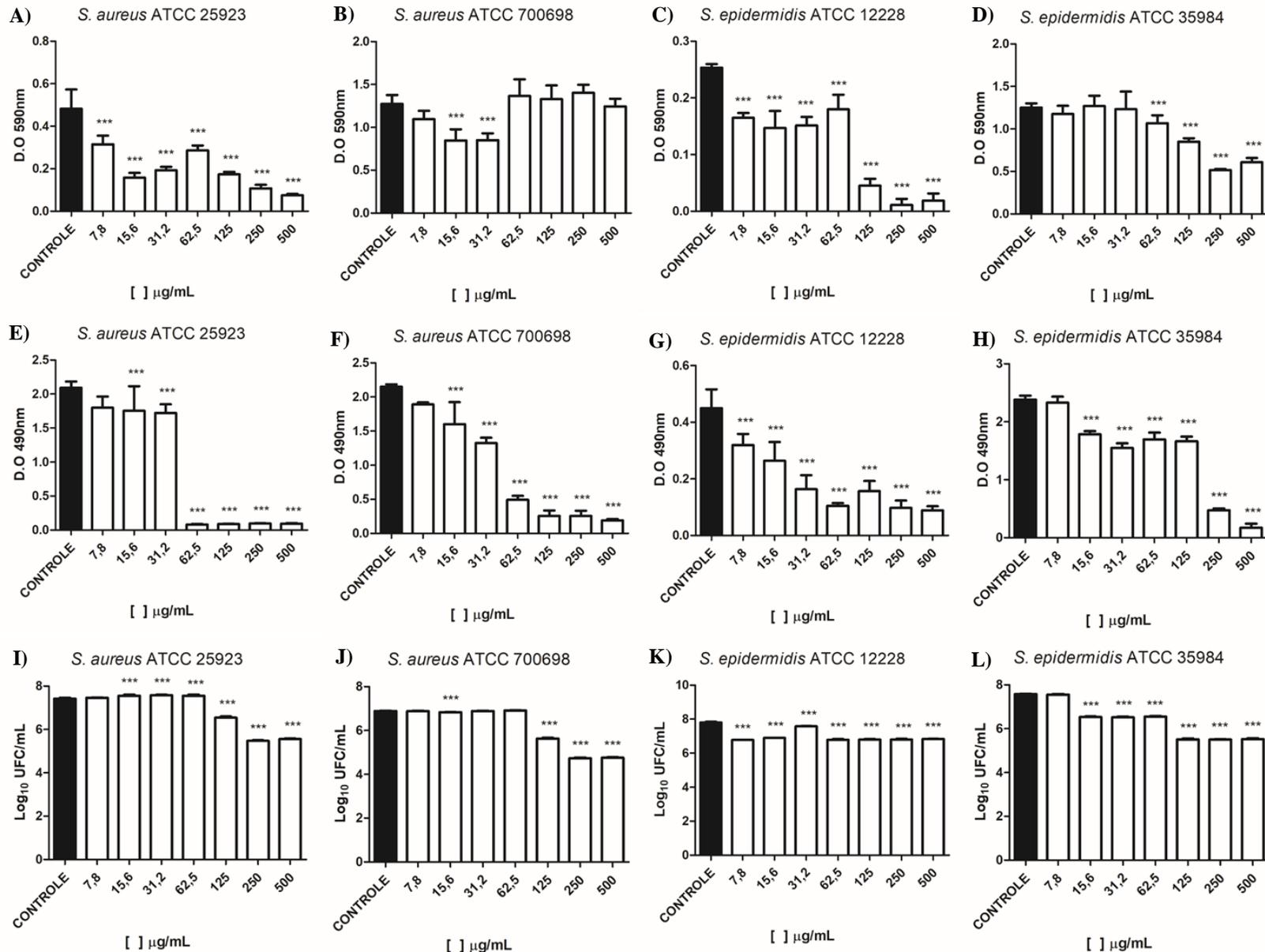
Assim como na inibição da formação de biofilmes, o complexo RuNN-F também apresentou resultados significantes sobre os biofilmes pré-formados, especialmente em relação a redução da biomassa e da atividade metabólica.

Conforme a figura 27 de A a L, podemos observar que este complexo também reduziu a biomassa das cepas de *Staphylococcus* spp., tendo seu efeito mais acentuado sobre a cepa *S. aureus* ATCC 25923 que exibiu redução acima de 30% na concentração de 7,8 µg/mL, chegando a quase 85% na concentração de 500 µg/mL. A cepa *S. aureus* ATCC 700698 se mostrou muito mais resistente frente a este complexo, pois apresentou uma quantidade maior de biomassa nas maiores concentrações, chegando a ultrapassar o controle de bactéria sem tratamento, fato que pode estar relacionado ao estresse causado por RuNN-F sobre as bactérias testadas, levando-as a produzir mais matriz extracelular, no entanto, RuNN-F registrou reduções de 33 e 22% nas concentrações de 31,2 e 15,6 µg/mL respectivamente (Figura 27A, B, C e D).

Sobre a atividade metabólica, este complexo apresentou os melhores resultados com reduções que variaram de 95 a 17% (Figura 27E, F, G e H). A partir da concentração de 62,5 µg/mL, RuNN-F foi capaz de reduzir o metabolismo dos biofilmes de *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 12228 acima de 75%, o que não foi observado a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, que só apresentou redução de sua atividade metabólica nas concentrações de 500 e 250 µg/mL. Por sua vez, RuNN-F mostrou os melhores resultados sobre a cepa *S. aureus* ATCC 25923, pois apresentou diminuição do metabolismo do biofilme em mais de 95% a partir da concentração de 62,5 µg/mL (Figura 27E).

Na enumeração de células viáveis, as cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984 consideradas resistentes e boas produtoras de biofilme, exibiram reduções no UFCs na ordem de 2,0 logs (Figura 27J e L) nas concentrações acima de 125 µg/mL, sendo que as outras duas cepas, as reduções alcançaram 1,5 log.

Figura 27 – Efeito do complexo de rutênio RuNN-F sobre biofilmes pré-formados de *S. aureus* e *S. epidermidis*



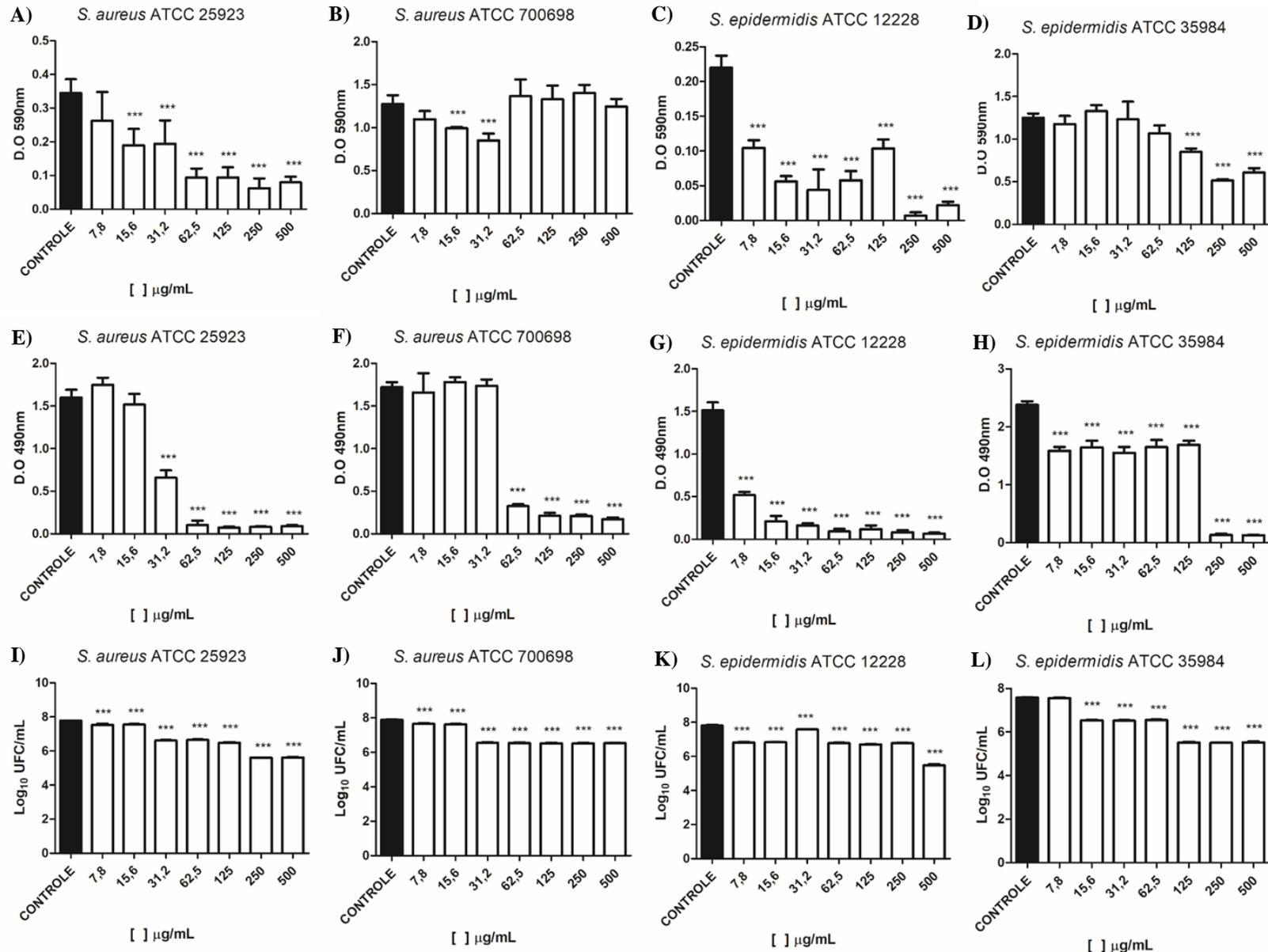
Fonte: Próprio autor. Quantificação da biomassa (A, B, C, D), atividade metabólica (E, F, G, H) e número de células viáveis (I, J, K, L). Barras brancas representam bactérias tratadas com RuNN-F, barras pretas representam bactérias sem tratamento. \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

Com relação ao complexo RuNN-Br, este composto também foi capaz de reduzir a biomassa das cepas de *Staphylococcus* spp., de forma similar ao complexo RuNN-F. Como se pode observar na figura 26, todas cepas tiveram uma redução da biomassa de mais 30% nas concentrações acima de 125 µg/mL, chegando a mais de 75% nas concentrações de 500 e 250 µg/mL. A cepa *S. aureus* ATCC 700698 (Figura 28B) também se mostrou mais resistente frente a este complexo, apresentando redução de mais de 20% somente em duas das três menores concentrações (31,2 e 15,6 µg/mL).

Sobre a atividade metabólica (Figura 28), RuNN-Br mostrou redução do metabolismo na concentração de 62,5 µg/mL que variaram de 32 a 93%. No entanto, os melhores resultados foram sobre as cepas *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228 que exibiram redução da atividade metabólica acima de 58% na concentração de 31,2 µg/mL. Para as concentrações de 500 e 250 µg/mL RuNN-Br reduziu o metabolismo dos biofilmes entre 87 e 95%.

RuNN-Br também mostrou efeito na diminuição do número de células viáveis nos biofilmes das cepas tratadas. A figura 28J e L mostrou que sobre as cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984, consideradas boas produtoras de biofilmes, o complexo reduziu entre 1,3 e 2,0 logs no número de UFCs nas concentrações acima de 125 µg/mL. As outras duas cepas avaliadas também mostraram reduções de 2,0 logs na concentração de 500 µg/mL.

Figura 28 – Efeito do complexo de rutênio RuNN-Br sobre biofilmes pré-formados de *S. aureus* e *S. epidermidis*



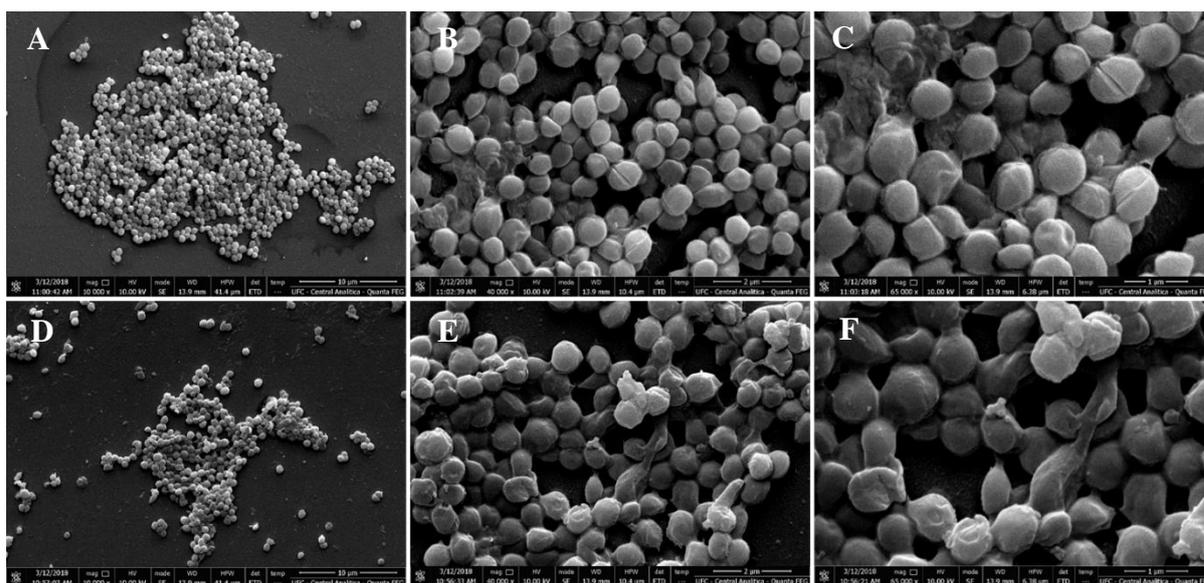
Fonte: Próprio autor. Quantificação da biomassa (A, B, C, D), atividade metabólica (E, F, G, H) e número de células viáveis (I, J, K, L). Barras brancas representam bactérias tratadas com RuNN-Br, barras pretas representam bactérias sem tratamento. \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

### 5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de biofilmes pré-formados

No intuito de verificar modificações na estrutura celular bacteriana ou mesmo na matriz do biofilme, assim como o número de células viáveis, o efeito do complexo RuNN-F foi avaliado sobre o biofilme pré-formado de *S. aureus* ATCC 25923 na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$ .

Conforme a figura 29 pode-se perceber uma redução no número de células que compõem o biofilme quando esta cepa foi tratada com o complexo RuNN-F em comparação ao controle de bactérias sem tratamento (Figura 29). Percebeu-se também que as bactérias não tratadas apresentaram morfologia regular, cocos na forma arredondada, e exibindo paredes celulares intactas e lisas. Entretanto, quando tratadas com RuNN-F na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$ , as cepas mostraram mudanças em sua morfologia, exibindo paredes celulares enrugadas e danificadas, mudando de forma celular globular para irregular.

Figura 29 – Eletromicrografias da atividade sobre biofilmes pré-formados do complexo de rutênio RuNN-F sobre cepas de *S. aureus* ATCC 25923 tratado após 24 horas de crescimento



Fonte: Próprio autor. Imagens A, B e C (biofilmes não tratados) nas magnificações de 10.000x, 40.000x e 65.000x. Imagens D, E e F, biofilmes tratados com RuNN-F na concentração de 205  $\mu\text{g/mL}$  (2x o maior valor da CIM).

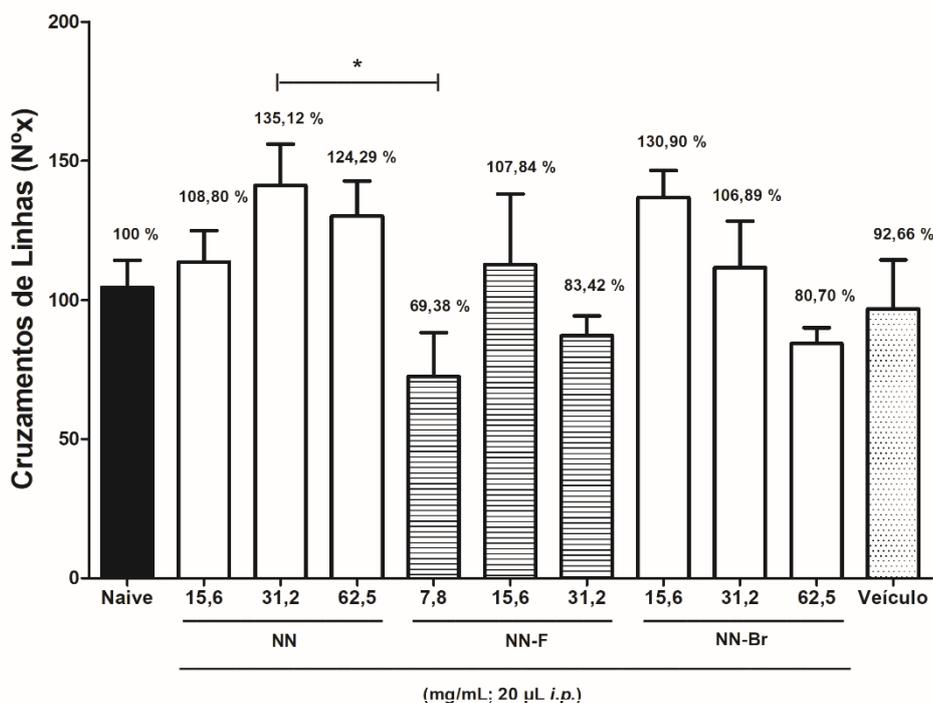
## 5. 8 Efeito sobre a atividade motora e toxicidade em *zebrafish*

A atividade locomotora é um dos parâmetros de análise comportamental que vem sendo utilizado para avaliar ação de drogas que podem atuar sob o sistema nervoso central do *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto e causar comprometimento locomotor ou não.

O comportamento natural do *zebrafish* em campo aberto é caracterizado por atividade natatória constante e manifestações de imobilidade, são pouco observadas em condições naturais do *zebrafish*.

Desta forma, empregou-se o mesmo método com os complexos de rutênio RuNN, RuNN-F e RuNN-Br, para avaliar suas ações sobre o sistema locomotor do ZFa. Como resultado, nenhuma amostra testada causou comprometimento locomotor dos animais, pois apresentaram atividade locomotora (%AL) variando de 69,38 a 135,12%, significativamente ( $p > 0,05$ ) semelhante entre cada grupo, bem como em relação ao naive (AL = 100%) e o veículo (AL = 92,66%), conforme apresentado na figura 30.

Figura 30 - Efeito complexos de rutênio RuNN, RuNN-F e RuNN-Br sob a atividade locomotora do *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5min)



Fonte – Próprio autor - Naive - animais não tratados. *i.p.* – administração via intraperitoneal. Veículo – DMSO 3% (20  $\mu$ L; *i.p.*). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (\* $p < 0,05$  vs. NN 31,2  $\mu$ g/mL). Os números acima de cada coluna indicam porcentagem de atividade locomotora (% AL).

O *zebrafish* adulto vem sendo empregado como modelo animal complementar ao uso de roedores em testes genéticos, biologia do desenvolvimento, neurobiológicos e toxicológicos, pois apresenta baixo custo, adaptabilidade diversa, ciclo de reprodução curto, alta fecundidade e embriões transparentes. Seu pequeno tamanho na fase adulta requer diminuição da quantidade das substâncias a serem testadas e dosadas, bem como as quantidades de reagentes e materiais utilizados no tratamento e manutenção dos animais.

Nesse contexto, empregamos o *zebrafish* adulto como modelo animal para avaliar a toxicidade aguda dos compostos antimicrobianos sintéticos RuNN, RuNN-F e RuNN-Br. Como resultado, constatou-se que todas as amostras testadas se mostraram seguras, pois não foram tóxicas frente a ZFa em 24 h de análise ( $CL_{50-24h} > 31,2 \mu\text{g/mL}$  para NN-F;  $CL_{50-24h} > 62,50 \mu\text{g/mL}$  para NN e NN-Br), conforme tabela 6.

Tabela 6 - Resultados dos testes de toxicidade aguda dos complexos de rutênio sobre *zebrafish* adulto

Amostra	Mortalidades do Zebrafish Adulto				24h
	CN	C1	C2	C3	$CL_{50} (\mu\text{g/mL}) / \text{IV}$
RuNN	0	0	0	0	> 62,5
RuNN-Br	0	0	0	0	> 62,5
RuNN-F*	0	0	0	0	> 31,2

Fonte: Próprio autor; CN- Grupo controle negativo: DMSO 3%; RuNN; NN-Br; NN-F; C1 – concentração 1 (15,6  $\mu\text{g/mL}$ ; 20  $\mu\text{L}$  *i.p.*); C2 – concentração 2 (31,2  $\mu\text{g/mL}$ ; 20  $\mu\text{L}$  *i.p.*). C3 – concentração 3 (62,5  $\mu\text{g/mL}$ ); \*C1 – concentração 1 (7,8  $\mu\text{g/mL}$ ; 20  $\mu\text{L}$  *i.p.*); \*C2 – concentração 2 (15,6  $\mu\text{g/mL}$ ; 20  $\mu\text{L}$  *i.p.*); \*C3 – concentração 3 (31,2  $\mu\text{g/mL}$ ; 20  $\mu\text{L}$  *i.p.*);  $CL_{50}$ -concentração letal para matar 50% dos *zebrafish* adulto; IV – intervalo de confiança;

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliadas as atividades antibacteriana, antibiofilme, e o efeito associado a antibióticos, dos complexos de rutênio RuNN, RuNN-F e RuNN-Br, sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Para a atividade antibacteriana sobre células planctônicas, conforme dados mostrados na tabela 2, os complexos de rutênio não exibiram nenhuma atividade frente as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli*, em nenhuma das concentrações testadas, por outro lado, bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* mostraram-se suscetíveis a estes complexos apresentando CIM e CBM a partir das concentrações de 7,8 e 31,2 µg/mL respectivamente, sendo que o complexo RuNN-F, se mostrou mais eficaz, em relação aos complexos RuNN e RuNN-Br, apresentado os menores valores de CIM e CBM em sobre o crescimento de células planctônicas.

Os resultados obtidos em nosso estudo, corroboram com os resultados apresentados por De Sousa *et al.*, (2018) que ao avaliarem a atividade antimicrobiana de três complexos de rutênio do tipo cis-[Ru(bpy)<sup>2</sup>(clbzpy)(Cl)](PF<sub>6</sub>) tanto com a irradiação como na ausência de luz, verificaram que dois dos complexos apresentaram atividade moderada contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis*, sendo que o terceiro complexo não, e que nenhum dos três complexos mostrou atividade contra a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*, sendo que a irradiação de luz não promoveu nenhuma alteração importante na atividade antimicrobiana, o que levou esses pesquisadores a relacionarem atividade antimicrobiana à ruptura da membrana bacteriana e não a danos do DNA, como imaginavam.

Um estudo realizado por Da Silveira Carvalho *et al.*, (2017), que também avaliação a atividade antimicrobiana do complexo cis-[RuCl(CO)(dppb)(dppz)]<sup>+</sup> com e sem a irradiação de luz azul, sobre bactérias e leveduras, apresentou resultados contra Gram-positivo *S. aureus* e *S. epidermidis*, cujas CIMs variaram de 1,23 a 9,82 mmol/L, bem próximos das CIMs da amicacina, um agente antimicrobiano de referência, e uma excelente atividade que inibiu a cepa *Candida albicans*, no entanto, este complexo não apresentou atividade contra bactérias Gram-negativas mesmo em sua maior concentração de 39 mmol/L, e nenhuma alteração da atividade antimicrobiana foi verificada com a irradiação da luz. Paulo *et al.*, (2017) entretanto, obteve resultados similares, mas a atividade antimicrobiana foi aprimorada pela irradiação de luz azul.

Assim como nos resultados dos estudos mencionados, nossos resultados apontaram uma aparente preferência dos complexos RuNN, RuNN-F e RuNN-Br em agir sobre cepas de bactérias Gram-positivas, apresentando CIMs razoavelmente baixas (7,8 µg/mL). Esse

fenômeno pode estar relacionado ao fato dos complexos de rutênio geralmente serem carregados positivamente, o que pode ajudá-los a interagir com muitos alvos bacterianos como os fosfolipídios (por exemplo, fosfatidil-glicerol, ácidos teicóicos e lipoteicóicos) na membrana bacteriana e na parede celular de bactérias Gram-positivas (DA SILVEIRA CARVALHO *et al.*, 2017).

Baseados nas características catiônicas que os complexos de rutênio RuNN, RuNN-F e RuNN-Br exibem, associado a propriedade lipofílicas conferidas pelos ligantes fosfina e quinona, nossa hipótese é que estes complexos, são absorvidos pela células bacterianas Gram-positivas, acumulados no citoplasma e, à medida que permanecem inalterados *in vivo*, podem interagir de forma reversível com alvos intracelulares como DNA, RNA, proteínas, membranas ou outros metabólitos, agindo sobre o metabolismo bacteriano, de modo a exercer uma atividade bacteriostática ou bactericida.

Corroborando com essa hipótese, Keene, Collins e colaboradores, ao reexaminarem o complexo de  $[\text{Ru}(\text{Me}_4\text{phen})_3]^{2+}$  observaram que este, apresentava alta atividade bactericida em relação a bactérias Gram-positivas, e atividade moderada contra bactérias Gram-negativas (LI *et al.*, 2011), e concluíram que o complexo foi acumulado pela bactéria, com a extensão da acumulação mais ou menos correlacionada com a atividade bactericida (*S. aureus* > MRSA > *E. coli* > *P. aeruginosa*) (LI, FETERL *et al.*, 2012). Como  $[\text{Ru}(\text{Me}_4\text{phen})_3]^{2+}$  mostrou-se ser mais facilmente acumulado por células Gram-positivas, concluíram que a extensão dos efeitos antimicrobianos seja dependente da extensão da acumulação intracelular e consequente ligação reversível a alvos moleculares (LI; COLLINS, *et al.*, 2015).

O fato de bactérias Gram-negativas apresentarem uma certa resistência a ação de agentes antimicrobianos, inclusive dos complexos rutênio testados em nosso estudo, e por outros pesquisadores, pode estar relacionado a estas bactérias possuírem resistência inerente, intrínseca a sua atividade metabólica, ou adquirida por meio de transmissão de horizontal de genes (MACGOWAN; MACNAUGHTON, 2017). Livermore (2012), atribui essa resistência a essa classe de bactérias, pelo fato de possuírem mecanismos de defesa contra os antimicrobianos, seja por meio de alterações nas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), seja pela produção de  $\beta$ -lactamases periplasmáticas ou o aumento no número de bombas de efluxo na membrana citoplasmática, mas, especialmente pela presença da membrana externa de LPS, altamente complexa, constituída inclusive com monossacarídeos de 7 carbonos (heptoses), além de serem semipermeável a uma gama de substâncias.

Atualmente, os complexos de rutênio têm sido estudados como agentes antimicrobianos alternativos, em especial, tendo seus efeitos avaliados contra bactérias que já

apresentam resistência aos antibióticos comerciais, sendo poucos os trabalhos que fazem referência a sua associação com antibióticos. Em nosso estudo, tanto os complexos RuNN, RuNN-F e RuNN-Br, quanto os antibióticos ampicilina e tetraciclina, tiveram sua atividade antibacteriana avaliada individualmente e em combinação através do método *checkerboard*.

Em nossos resultados, observamos que os efeitos dos complexos de rutênio assim com os efeitos dos antibióticos, foram potencializados quando avaliados em combinação, exibindo efeito sinérgico e indiferente, como também perderam sua ação bacteriostática indicando um efeito antagônico. Conforme demonstrado na tabela 3, o efeito sinérgico foi significativo quando se avaliou a associação do complexo RuNN com os antibióticos. Os dados nos mostram que este complexo interagiu de maneira satisfatória com o antibiótico ampicilina, de forma que reduziu abruptamente os valores individuais da CIM deste antibiótico, sobre as cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984, que segundo norma aprovada do CLSI (2017), são cepas resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, e efeito indiferente sobre a *S. aureus* ATCC 700698 quando associado a tetraciclina. Em adição, os complexos RuNN-F e RuNN-Br também exibiram efeito sinérgico sobre a cepa *S. aureus* ATCC 700698.

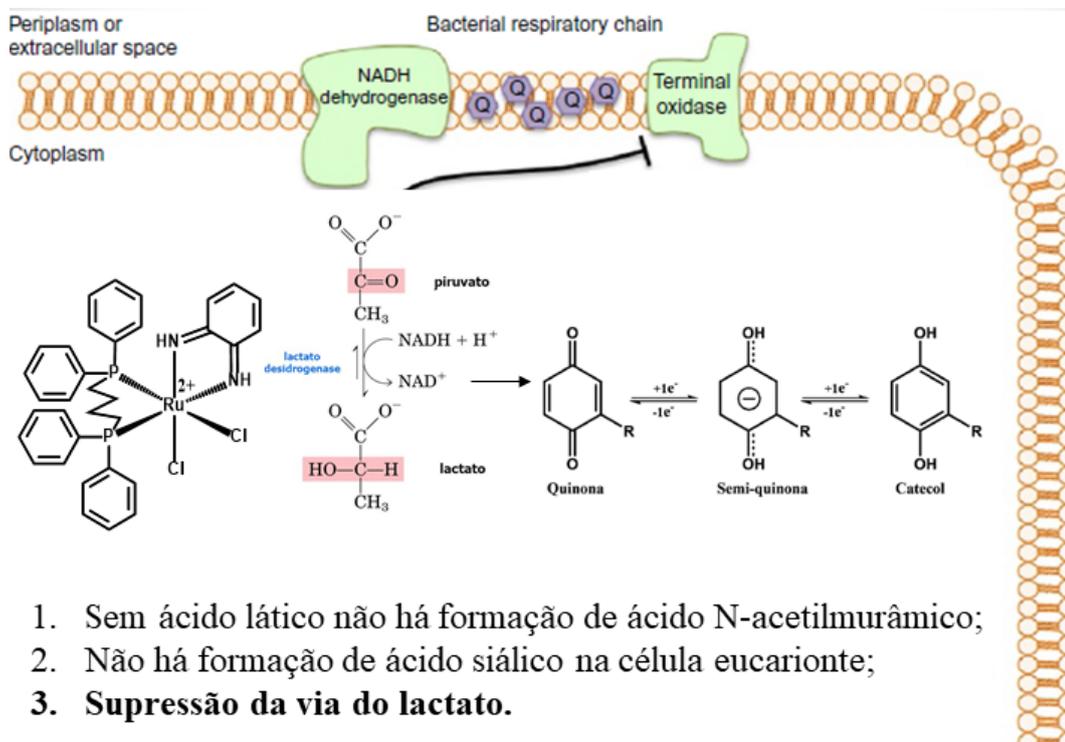
Em comparação com nossos resultados, Demirezen *et al.* (2012) relataram a síntese e as atividades antimicrobianas de um quelato de Ru(III)-trimethoprim:  $\text{Ru(III)(Cl)}^3\text{TMP[H}_2\text{O]}\#\text{H}_2\text{O}$ , onde a adição de um ligante de Ru(III) a TMP aumentou significativamente a atividade antimicrobiana da TMP quando avaliada através do método de disco difusão.

Por sua vez, Sadler e colaboradores, recentemente relataram a síntese dos complexos de classe II de Ru(II)-areno com o antibiótico ciprofloxacina, e avaliando seus efeitos com o derivado de ciprofloxacina, CipA, verificaram que o complexo apresentou maior atividade contra *E. coli* e *S. aureus* do que CipA sozinho, mas também demonstraram ser mais instáveis em soluções aquosas, mesmo assim, sugeriram que a atividade destes complexos resultou da combinação aditiva ou sinérgica do complexo Ru (II)-areno e CipA, chegando a caracterizar estes complexos como antimicrobianos de rutênio "funcionais" em vez de "transportador" (UDE *et al.*, 2016). Colina-Vegas *et al.*, (2016) demonstraram a atividade de quelatos de Ru (II) de clotrimazol contra micobactérias, no entanto, estes complexos apresentaram também citotoxicidade significativa para células de mamíferos.

Como os complexos de rutênio interagiram potencializando a ação do antibiótico ampicilina, e este é um agente antimicrobiano que age impedindo a formação da parede celular bacteriana bloqueando a transpeptidação (MADIGAN *et al.*, 2016), nós hipotetizamos (conforme figura 31) que os complexos de rutênio avaliados neste estudo também têm ação de

bloqueio sobre a síntese da parede celular, inibindo a via da fermentação láctica, através da modulação da atividade das enzimas desidrogenases. Devido a características lipofílicas e por apresentarem potencial redox positivo (em torno de + 0,700 V), os complexos RuNN, RuNN-F e RuNN-Br são moléculas altamente reativas (CARVALHO, 2018) e uma vez dentro da célula bacteriana os complexos podem vir a inibir a atividade da enzima lactato desidrogenase, ou mesmo sendo reduzidos por esta ganhando hidrogênios e elétrons do NADH+H, diminuindo a produção de lactato, que é um grupo essencial para conversão de N-acetilglicosamina em ácido N-acetilmurâmico (VOET, D; VOET, J; PRATT, 2014), levando ao comprometimento da síntese da parede celular bacteriana, pela falta do ácido N-acetilmurâmico que é um dos precursores da parede celular bacteriana, e dependendo da fase em que a bactéria se encontra, os resultados do efeito se manifestaram através da atividade bactericida ou bacteriostática.

Figura 31 – Hipótese do mecanismo de ação dos complexos de rutênio baseado em suas propriedades lipofílicas (ligante fosfina) e redutora (ligante quinona)



Fonte: Adaptado de Poole (2017) – Complexos de rutênio sendo reduzidos pela lactato desidrogenase, impedindo a formação de ácido láctico e consequentemente a formação de ácido N-acetilmurâmico, e as três implicações ocasionadas por este processo.

Dissertando sobre isso, Lobritz *et al.*, (2015) observaram que os efeitos bacteriostáticos e bactericidas do tratamento com antibióticos, apresentam-se como dois resultados fenotípicos fundamentalmente diferentes. Segundo eles, a maioria dos antibióticos

inibe os processos principais de produção de energia celular, sugerindo que o tratamento com antibióticos pode ter consequências importantes sobre o metabolismo bacteriano, o que os levou a hipotetizarem que a inibição do crescimento bacteriano por antibióticos bacteriostáticos foi associada à respiração celular suprimida, enquanto que a morte celular da maioria dos antibióticos bactericidas foi associada à respiração acelerada.

Em apoio a essa noção, a resposta proteômica ao antibiótico bacteriostático clorotetraciclina relatado por Lin X *et al.*, (2014), envolveu a redução da regulação das principais vias metabólicas, sendo que os agentes bactericidas podem aumentar as taxas metabólicas celulares (RITTERSHAUS *et al.*, 2013), assim pode-se concluir que a perturbação metabólica se constitui uma nova via para ação de agentes antimicrobianos.

Para a cinética de morte bacteriana, os complexos testados neste estudo, também apresentaram resultados significativos. Para desempenhar ação bactericida sobre as cepas de *Staphylococcus* spp. o complexo RuNN levou o tempo mínimo de 1 hora e o máximo de 5 horas, o que foi relativamente rápido, em comparação com alguns antibióticos, como a telavancina e a vancomicina que apresentaram tempo de morte após as 8 horas de contato (redução de 2 Log<sub>10</sub> UFC/mL) e redução total do número de UFCs, as 24 horas redução de 3 Log<sub>10</sub> UFC/mL), sobre cepas de *S. aureus* MRSA nas concentrações acima de 16 µg/mL (ROLSTON *et al.*, 2017). Os complexos RuNN-F e RuNN-Br, também apresentaram tempo de morte no intervalo de 2 a 24 horas de contato com as cepas. Bolhuis *et al.*, (2011) ao ensaiarem a curva de morte de um complexo denominado de [Ru(2,9-Me<sub>2</sub>phen)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup>, verificaram que as cepas de *S. aureus* MRSA, passavam a morrer após 120 minutos de contato com este complexo na concentração de 32 µg/mL, e que essa taxa de morte era dependente das concentrações usadas, já que a 4 µg/mL as células continuavam a crescer, e a 8 µg/mL as células só passavam a morrer após as 3 h de contato, mas com uma redução de 10 vezes no número de UFCs.

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são reconhecidos como microrganismos virulentos, que causam infecções nosocomiais, sendo que esta virulência é principalmente adquirida pela capacidade que essas bactérias têm de formar biofilme (ABDALLAH *et al.*, 2014). Além disso, a associação entre a produção de biofilme de *S. aureus* e a resistência a antibióticos está bem documentada (BHATTACHARYA *et al.*, 2015; MCCARTHY *et al.*, 2015; NAICKER *et al.*, 2015).

No tocante a produção da biomassa, todos os complexos exibiram atividade antibiofilme, com redução de pelo menos 30% para a menor testada (7,8 µg/mL) e acima de 63% para a concentração de 31,2 µg/mL. Como foi observado atividade bacteriostática e

bactericida destes complexos, a redução da biomassa pode estar relacionada com a diminuição de células planctônicas, ou mesmo a danos ocasionados a membrana plasmática pelos complexos de rutênio, já que segundo Sharma *et al.*, (2012), esses danos inibem a capacidade das bactérias de se ligarem a células hospedeiras, e inibem a capacidade das bactérias para se ligarem umas as outras para formar biofilmes.

Ainda com relação a atividade antibiofilme de complexos de rutênio, em nosso estudo, a redução do número de UFCs expressou diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,001$ ), onde em alguns casos, a redução no número de células viáveis chegou a quase 5 logs em relação ao controle, o que representou uma diminuição de 100.000 vezes no número de células viáveis no biofilme. Estudos reportados na literatura fazem a relação entre a contagem de células viáveis no biofilme, para determinar se a morte celular bacteriana contribuiu para mudanças na produção e estabilidade da matriz de SPE do biofilme (MURRAY *et al.*, 2012), assim, os resultados encontrados em nosso estudo sugerem que a diminuição no número de UFCs, provavelmente ocasionada pela CIM ou mesmo pela CBM, interfere na densidade celular e conseqüentemente na produção da matriz de SPE do biofilme.

Os resultados da atividade metabólica (XTT), demonstraram uma redução significativa do metabolismo das células dos biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis*, em percentuais que chegaram a quase 100% de redução, quando comparadas com o controle. Associando os resultados do metabolismo celular com a diminuição do número de células viáveis, verificamos que estas técnicas foram complementares e exibiram um efeito diretamente proporcional, já que a diminuição do número de células viáveis nos biofilmes, também representou a redução da atividade metabólica.

Em relação aos biofilmes pré-formados, os complexos também exibiram atividade antibiofilme com reduções estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle de bactérias sem tratamento, mesmo diante dos microrganismos em biofilmes que podem ser até 1000 vezes mais resistentes do que as bactérias planctônicas, para terapias antimicrobianas convencionais, tais como antibióticos (KARYGIANNI *et al.*, 2014). Do mesmo modo, a atividade metabólica que sofre variações na superfície e no interior do biofilme e o número de células viáveis que mesmo estando protegidas no interior da matriz contra a dessecação, a ação de biocidas oxidantes, alguns antibióticos, (FLEMMING; WINGENDER, 2010), sofreram a ação dos complexos de rutênio com redução da atividade metabólica em até 95% e diminuição do número de células viáveis na ordem de 3,0 logs.

Através das análises das eletromicrografias da inibição da formação dos biofilmes, pode-se confirmar a redução da matriz de SPE, que corresponde a mais de 80% da matéria

orgânica da massa seca do biofilme (RHOADS, 2008), o que se refletiu na redução da quantificação da biomassa, atividade metabólica e número de células viáveis, já que segundo Anderson e O'Toole (2008), a matriz protege as células de agressões externas e age como barreira para difusão de pequenas moléculas, nesse sentido, a redução da matriz pelos complexos de rutênio pôde tornar as células mais suscetíveis, considerando que é um dos mecanismos de resistência dos biofilmes.

Por sua vez as eletromicrografias dos biofilmes pré-formados mostraram modificações na morfologia da parede celular bacteriana, mostrando células com superfícies irregulares, enrugadas e aparentemente rompidas. Sun *et al.*, (2015) investigando os efeitos antibacterianos do complexo de rutênio (II) RuBP e o mecanismo de ação de RuBP em bactérias, concluíram que o complexo RuBP pode inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus tetragenus*, sendo que observações de MEV das morfologias de *M. tetragenus* e *S. aureus* tratadas com RuBP confirmam ainda que o contato direto de ambas as bactérias com RuBP pode danificar a parede celular e a integridade da membrana, o que pode eventualmente induzir inibição do crescimento e morte bacteriana.

Com relação aos testes sobre a atividade locomotora e toxicidade, os dados obtidos no presente trabalho revelaram que os complexos de rutênio, são considerados seguros, pois não alteraram sistema locomotor e nem foram tóxicas frente a *zebrafish* adulto até 24h de análise.

Como as infecções crônicas resultantes da formação de biofilmes estão se tornando difíceis de erradicar com os agentes antimicrobianos atuais (MURRAY *et al.*, 2012), os resultados encontrados dos efeitos destes complexos em bactérias do gênero *Staphylococcus*, podem ser aplicados no desenvolvimento de novas terapias, visando um tratamento mais eficaz contra infecções causadas por biofilmes das espécies que compõem este gênero.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os complexos de rutênio RuNN, RuNN-F e RuNN-Br, apresentaram atividade antibacteriana e antibiofilme, sobre bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus*., mas não contra bactérias Gram-negativas. Os resultados da associação destes complexos com os antibióticos ampicilina e tetraciclina, exibirem efeito sinérgico, aditivo e/ou antagônico, sendo que cepas que mostraram uma certa resistência a estes antibióticos, se mostraram novamente sensíveis quando tratadas com os mesmos antibióticos combinados com os complexos de rutênio, sendo que estes não alteraram o sistema locomotor e nem foram tóxicos quando testados em *zebrafish*.

Em termos gerais, o complexo RuNN-F mostrou um efeito mais eficaz sobre cepas de *Staphylococcus spp.*, exibindo os menores valores da CIM e da CBM e as maiores taxas na redução na biomassa e no número de células viáveis dos biofilmes.

OS resultados apontam que estes complexos de rutênio, são potenciais moléculas, que podem ser utilizadas como agentes antimicrobianos sobre infecções relacionadas a biofilmes de *Staphylococcus*, ou mesmo auxiliar na síntese de novos agentes antimicrobianos de interesse clínico.

## 8. PERSPECTIVAS

- Realizar estudos como a substituição de grupos funcionais ( $\text{NH}_2$  por  $\text{OH}$ ) para melhorar os complexos de rutênio no intuito de diminuir sua concentração inibitória mínima e bactericida mínima;
- Verificar a ação dos complexos de rutênio sobre bactérias Gram-negativas após tratamento com EDTA para retirada da membrana externa;
- Avaliar a atividade antibacteriana sobre outras bactérias de interesse clínico como *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*;
- Avaliar a toxicidade em camundongos e humanos.
- Produzir um produto a base de complexos de rutênio como opção ao tratamento de infecções bacterianas causadas por bactérias resistentes.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, M.; BENOLIEL, C.; DRIDER, D.; DHULSTER, P.; CHIHIB, N. E. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Arch. Microbiol.**, v. 196, n.7, p. 453–472, 2014.
- ABDELHADY, W.; BAYER, A. S.; SEIDL, K.; NAST, C.C.; KIEDROWSKI, M. R.; HORSWILL, A. R.; YEAMAN, M. R.; XIONG, Y.Q. Reduced vancomycin susceptibility in an in vitro catheter- related biofilm model correlates with poor therapeutic outcomes in experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, p. 1447–1454, 2014.
- ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin.. **Rev Infect Dis.**, v. 1988, n. 10, p. 677–78, 1990.
- ACAR, J. F.; MOULIN, G. Antimicrobial resistance : a complex issue Pre-existence of antimicrobial resistance determinants Origin of antimicrobial resistance determinants. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**., v. 31, n. 1, p. 23–31, 2012.
- AHMAD, F.; RICHARDSON, M. K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. **Behav Processes.**, v. 92, p. 88-98, 2013.
- ALLARDYCE, C. S., & DYSON, P. J. Ruthenium in medicine: Current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Review.**, v. 45, p. 62–69, 2001.
- AMINOV, R. I. **Front. Microbiol.**, v. 1, p. 134, 2010.
- ANDERSON, G.G.; O'TOOLE, G. A. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. **Bacterial Biofilms**, Springer, Heidelberg: Ed Romeo T. v. 322, p. 85–105, 2008.
- ARELLANO-AGUIAR, O., SOLIS-ANGELES, S., SERRANO-GARCIA, L., MORALES-SIERRA, E., MENDEZ-SERRANO, A., MONTERO-MONTOYA, R. Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fisheries Sciences.com.**, v. 9, n. 4, p. 052-062, 2015.
- BALZER, M., WITT, N., FLEMMING, H.-C. & WINGENDER, J. Accumulation of fecal indicator bacteria in river biofilms. **Water Sci. Technol.** 61, 1105–1111, 2010.
- BENNEH, C. K.; BINEY, R. P.; MANTE, P. K.; TANDOH, A.; ADONGO, D. W.; WOODE, E. Maerua angolensis stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT systems. **Journal of Ethnopharmacology.**, v. 207, p. 129-145, 2017.
- BERTRAND, J. J.; WEST, J. T.; ENGEL, J. N. Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the chp chemosensory system of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol.**, v. 192, n. 4, p. 994-1010, 2010.

BRACKMAN, G.; COENYE, T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. **Curr. Pharm. Des.**, v. 21, p. 5–11, 2015.

BURROWS, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. **Annu Rev. Microbiol.**, v. 66, p. 493-520, 2012.

BHATTACHARYA, S.; BIR, R.; MAJUMDAR, T. Evaluation of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* and their association with biofilm production in a tertiary care hospital, Tripura, Northeast India. **J. Clin. Diagn. Res.** v. 9, DC01–DC04, 2015.

BOLHUIS, A.; HAND, L.; MARSHALL, J. E.; RICHARDS, A. D.; RODGER, A.; & ALDRICH-WRIGHT, J. Antimicrobial activity of ruthenium-based intercalators. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 313–317, 2011.

BREIMAN, R. F.; SPIKA, J. S.; NAVARRO, V. J.; DARDEN P. M.; DARBY, C. P. Pneumococcal bacteremia in Charleston County, South Carolina. A decade later. **Arch Intern Med.**, v. 150, p. 1401–05, 1990.

BROWN SP, CORNFORT DM, MIDEO N. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity and control. **Trends Microbiol.**, v. 20, n. 7, p. 336-42, 2012.

CABALLERO, M.V.; CANDIRACCI, M. 2018. *Zebrafish* as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy. **Journal of Unexplored Medical Data.**, v. 3, n. 4, p. 1-14, 2018.

CACHAT J, STEWART A, UTTERBACK E, HART P, GAIKWAD S, WONG K, *et al.* Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. **PLoS One.** V. 6, n. 3, e. 17597, 2011.

CARVALHO, José Marcos da Silveira. **Desenvolvimento de novos complexos fosfínicos de rutênio com potencial anticancer e bactericida.** 2018. 170f. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CASTELO-BRANCO, D.; BRILHANTE, R. S. N.; PAIVA, M. A. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; CAETANO, E. P.; RIBEIRO, J. F.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. 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.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Vital signs: carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**, v. 3, n. 62, p. 165–70, 2013.

CÉDRIC, H.; LEA, H.; HANSJAKOB, F.; ANDREA, E. Bactericidal activity of penicillin, ceftriaxone, gentamicin and daptomycin alone and in combination against *Aerococcus urinae*, **International Journal of Antimicrobial Agents.**, v. 48, p. 271-276, 2016.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa Nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Diretrizes da Prática de Eutanásia. Disponível em [www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22\\_02\\_18.pdf](http://www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22_02_18.pdf) . Acesso em 22/03/18.

COGGAN, K. A.; WOLFGANG M. C. Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. **Curr Issues Mol Biol.**, v. 14, n. 2, p. 47-70, 2012.

COLINA-VEGAS, L., DUTRA, J. L., VILLARREAL, W., DE A NETO, J. H., COMINETTI, M. R., PAVAN, F. Ru(II)/clotrimazole/diphenylphosphine/bipyridine complexes: Interaction with DNA, BSA and biological potential against tumor cell lines and *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 162, p. 135–145, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**: Approved Standard - 27th ed., M100, Pennsylvania 19087 USA, 2017.

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

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science.**, v. 284, p. 1318–132, 1999.

CORNING, P. A. The re-emergence of “emergence”: a venerable concept in search of a theory. **Complexity.**, v. 7, p. 18–30, 2002.

COX, G.; WRIGTH, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 303, n. 6-7, p. 287-292, 2013.

DAI, Y.J., JIA, Y.F., CHEN, N., BRIAN, W.P., LI, Q.K., MA, Y.B., CHEN, Y.L., PEI, D.S. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry** ., v. 33, n. 1, p. 11-17, 2014.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology.**, v. 740, p. 364–378, 2014.

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, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.

DAVID, M. Z, DAUM, R. S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. **Clin. Microbiol. Ver.**, v. 23, p. 616–87, 2010.

DEEPIKA, N., KUMAR, Y. P., SHOBHA DEVI, C., REDDY, P. V., SRISHAILAM, A., & SATYANARAYANA, S. Synthesis, characterization, and DNA binding, photocleavage, cytotoxicity, cellular uptake, apoptosis, and on-off light switching studies of Ru(II) mixed-ligand complexes containing 7-fluorodipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine. **Journal of Biological Inorganic Chemistry.**, v. 18, p. 751–766, 2013.

DEMIREZEN, N.; TARINC, D.; POLAT, D.; CESME, M.; GOLCU, A.; & TUMER, M. Synthesis of trimethoprim metal complexes: Spectral, electrochemical, thermal, DNA-binding and surface morphology studies. *Spectrochimica Acta. Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy.*, v. 94, p. 243–255, 2012.

DE SOUSA, A. P. et al. Antimicrobial activity of cis -[Ru(bpy) 2 (L)(L')] n+ complexes, where L=4-(4-chlorobenzoyl)pyridine or 4-(benzoyl)pyridine and L'= Cl - or CO. *Polyhedron*, v. 2, n. L, 2018

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 15, p. 167–19, 2002.

DWYER, F. P.; GYARFAS, E. C.; ROGERS, W. P.; & KOCH, J. H. Biological activity of complex ions. *Nature.*, v. 170, p. 190–191, 1952.

DWYER, F. P.; MELLOR, D. P. Chelating agents and metal chelates. New York: **Academic Press**, 530p, 1964.

ECDC. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015**. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). [s.l: s.n.].

EKAMBARAM, S.P., PERUMAL, S.S., PAVADAI, S. Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. *Inflammopharmacology.*, v. 25, n. 1, p. 147-158, 2017.

ENGEL, J.; BALACHANDRAN, P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol.*, v. 12, n. 1, p. 61-6, 2008.

EUCAST. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. p. 0–77, 2015.

FERNANDES, T.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida tropicalis* biofilm's matrix — involvement on its resistance to amphotericin B. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 83, n. 2, p. 165–169, 2015.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B.influenzae. *British journal of experimental pathology.*, v. 10, n. 1923, p. 226–236, 1929.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 8, p. 623–633, 2010.

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T. A química inorgânica na terapia do câncer. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola.* n. 6. p. 13-18, 2005.

FOOD, E. **Combate à Resistência Antimicrobiana é Tema de Debate no Paraná.**, p. 1–2, 2017.

FUX, C.; COSTERTON, J.; STEWART, P.; STOODLEY, P. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends Microbiol.**, v. 13, p. 34–40, 2005.

GEBAUER, D.L., PAGNUSSAT, N., PIATO, A.L., SCHAEFER, I.C., BONAN, C.D., LARA, D.R. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 99, p. 480-486, 2011.

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.

GOODMAN & GILMAN'S. **Manual of Pharmacology and Therapeutics**. Nova Iorque: McGraw Hill. 2008.

GORLE, A. K.; FETERL, M.; WARNER, J. M.; PRIMROSE, S.; CONSTANTINOIU, C. C.; KEENE, F. R., *et al.* Mononuclear polypyridylruthenium(II) complexes with high membrane permeability in Gram-negative bacteria in particular *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemistry—A European Journal**, v. 21, p. 10472–10481, 2015.

GOTTFRIED J. **History Repeating? Avoiding a Return to the Pre- Antibiotic Age** (2005 Third Year Paper), Harvard University's DASH repository; 2005.

GODEKE, J.; HEUN, M.; BUBENDORFER, S.; PAUL, K.; AND THORMANN, K. M. (2011). Roles of two *Shewanella oneidensis* MR-1 extracellular endonucleases. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, p. 5342–5351, 2011.

GROSELL, M.; WOOD, C. M. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. **J. Exp. Biol.**, v. 205, p. 1179-1188, 2002.

GUO, S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish ? **Genes, Brain and behavior.**, v. 3, p. 63-74, 2004.

GUPTA, P.; KHOBRADE, S. B.; SHINGATGERI, V. M.; RAJARAM, S. M. Assessment of locomotion behavior in adult *Zebrafish* after acute exposure to different pharmacological reference compounds. **Drug Development and Therapeutics.**, v. 5, n. 2, p. 127-133, 2014.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Microreview Evolving concepts in biofilm infections. v. 11, n. April, p. 1034–1043, 2009.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P.; KATHJU, S.; HØIBY, N.; MOSER, C.; MOSER, A. *et al.* Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 65, p. 146–57, 2012.

HARDS, K. *et al.* Bactericidal mode of action of bedaquiline. **J Antimicrob Chemother.**, v. 70, n. 7, p. 2028-2037, 2015.

HATCHETTE, T. f.; GUPTA, R.; MARRIE, T. J. *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia in previously healthy adult: case report and review of the literature. **Clin Infect Dis.**, v. 31, n. 6, p. 1349-56, 2000.

- HENGZHUANG, W.; WU, H.; CIOFU, O.; SONG, Z.; AND HØIBY, N. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 55, p. 4469–4474, 2011.
- HILL, A.J., TERAOKA, H., HEIDEMAN, W., PETERSON, R.E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological sciences.**, v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.
- HIROTA, K.; YUMOTO, H.; SAPAAR, B.; MATSUO, T.; ICHIKAWA, T.; MIYAKE, Y. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. **J. Appl. Microbiol.**, v. 122, p. 321–330, 2016.
- HOKE, K. R.; KISER, C. N.; DI BILIO, A. J.; WINKLER, J. R.; RICHARDS, J. H.; GRAY, H. B. Electron transfer in ruthenium-modified CuA from *Thermus thermophilus*. **Journal of Inorganic Biochemistry.** v. 74, p. 165, 1999.
- HOWE, K.; CLARK, M. D.; TORROJA, C. F.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M.; *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature.**, v. 496, p. 498–503, 2013.
- HUANG, Y., ZHANG, J., HAN, X., HUANG, T. The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin. **International Journal of Environmental Research and Public Health.**, v. 11, p. 3650-3660, 2014.
- HUHLESCU, S.; SIMON, M.; LUBNOW, M.; KAASE, M.; WEWALKA, G.; PIETZKA, A. T. *et al.* Fatal *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in a previously healthy woman was most likely associated with a contaminated hot tub. **Infect.** v. 39, n. 3, p. 265-9, 2001.
- INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Antibiotic resistance: implications for global health and novel intervention strategies: work- shop summary.** Washington, DC: The National Academies Press; 2010.
- JENKINS, D. R. Nosocomial infections and infection control. **Medicine (United Kingdom).**, v. 45, n. 10, p. 629–633, 2017.
- KARYGIANNI, L., RUF, S., FOLLO, M., HELLWIG, E., BUCHER, M., ANDERSON, A. C., VACH, K.; AL-AHMAD, A. Novel broad-spectrum antimicrobial photoinactivation of *in situ* oral biofilms using visible light plus water-filtered infrared-A (VIS + wIRA). **Applied Environmental Microbiology**, v. 80, p. 7324–7336, 2014.
- KEYNAN, Y., RUBINSTEIN, E. *Staphylococcus aureus* bacteremia, risk factors, complications, and management. **Crit. Care Clin.**, v. 29, p. 547–562, 2013.
- KEYNAN, Y., RUBINSTEIN, E. *Staphylococcus aureus* bacteremia, risk factors, complications, and management. **Crit. Care Clin.**, v. 29, p. 547–562, 2013.
- KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.**, v. 7, n. 5, p. 478–482, 2017.

KIM, S. K.; LEE, J. H. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Microbiol.**, v. 54, p. 71–85, 2016.

KIM, M. J. *et al.* “Antimicrobial effects of ursolic acid against *Streptococcus mutans* isolated from Koreans,” **International Journal of Oral Science.**, v. 36, n.1, p. 7-11, 2011.

KOO, H. *et al.* Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nature Publishing Group.**, 2017.

KUMAR, P.; MISHRA, S.; SINGH, S. Advanced acuity in microbial biofilm genesis, development, associated clinical infections and control. **J. des Anti-infectieux.**, v. 19, n. 1, p. 20–31, 2017.

KURTA, A.; PALESTIS, B. G. Effects of ethanol on the shoaling behavior of zebrafish (*Danio rerio*). **Dose-Response.**, v. 8, n. 4, p. 527-533, 2010.

LAXMINARAYAN, R. *et al.* Antibiotic resistance-the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases.**, v. 13, n. 12, p. 1057–1098, 2013.

LAXMINARAYAN, R. *et al.* Access to effective antimicrobials: A worldwide challenge. **The Lancet.**, v. 387, n. 10014, p. 168–175, 2016.

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.

LEPPER, M. H.; DOWLING, H. F. Treatment of pneumococcal meningitis with penicillin compared with penicillin plus aureomycin: Studies including observations on an apparent antagonism between penicillin and aureomycin. **AMA Arch Intern Med** v. 88, n. 4, p. 489–494. 1951.

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.

LI, F. F.; FETERL, M.; MULYANA, Y.; WARNER, J. M.; COLLINS, J. G., & KEENE, F. R. In vitro susceptibility and cellular uptake for a new class of antimicrobial agents: Dinuclear ruthenium(II) complexes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.**, v. 67, p. 2686–2695, 2012.

LI, F.; MULYANA, Y.; FETERL, M.; WARNER, J. M.; COLLINS, J. G.; & KEENE, F. R. The antimicrobial activity of inert oligonuclear polypyridylruthenium(II) complexes against pathogenic bacteria, including MRSA. **Dalton Transactions.**, v. 40, p. 5032–5038, 2011.

LIESCHKE, J.G.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view”. **Nature Reviews-Genetics.**, v. 8, n.5. 2007.

LIN, X; KANG, L; LI, H; PENG, X. Fluctuation of multiple metabolic pathways is required for *Escherichia coli* in response to chlorotetracycline stress. **Mol Biosyst.**, v. 10, n. 4, p. 901–908, 2014.

LIVERMORE, D. M. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. **Korean J Intern Med.**, v. 27, p. 128-142, 2012.

LIU, L. *et al.* D -Ribose Interferes with Quorum Sensing to Inhibit Biofilm Formation of *Lactobacillus paraplantarum*. **Frontiers in Microbiology.**, v. 8, n. September, p. 1–13, 2017.

LIU, C.; BAYER, A. S.; COSGROVE, S. E.; DAUM, R. S.; FRIDKIN, S. K, *et al.* Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. **Clin. Infect. Dis.**, v. 52, p. 285–292, 2011.

LI, X.; LEE, J. **Antibiofilm agents : A new perspective for antimicrobial strategy.** v. 55, n. 10, p. 753–766, 2017.

LOBRITZ, M. A. *et al.* Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 27, p. 8173–8180, 2015.

LOOFT, T.; JOHNSON, T. A.; ALLEN, H. K.; BAYLES, D. O.; ALT, D. P.; STEDTFELD, R. D.; SUL, W. J.; STEDTFELD, T. M. *et al.* In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 109, p. 1691–1696, 2012.

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

LUEPKE, K. H. *et al.* Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. **Pharmacotherapy.**, v. 37, n. 1, p. 71–84, 2017.

MACGOWAN, A.; MACNAUGHTON, E. Antimicrobial therapy: principles of use. **Medicine (United Kingdom).**, v. 45, n. 10, p. 614–621, 2017.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock.** 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAGALHÃES, F.E.A., DE SOUSA, C.A.P.B., SANTOS, S.A.A.R., MENEZES, R.B., BATISTA, F.L.A., ABREU, A.O., DE OLIVEIRA, M.V., MOURA, L.F.W.G., Raposo, R.S., Campos, A.R., Adult zebrafish: an alternative behavioral model of formalin-induced nociception., v. 4, n. 5, p. 422-429, 2017.

MARQUES, C. N. H.; DAVIES, D. G.; SAUER, K. Control of Biofilms with the Fatty Acid Signaling Molecule cis-2-Decenoic Acid. **Pharmaceuticals.**, p. 816–835, 2015.

MATTHEWS, M.V.; VARGA, Z.M.; Anesthesia and euthanasia in zebrafish. **ILAR Journal.**, v. 53, n. 2, p. 192-204, 2012.

MCCARTHY, H.; RUDKIN, J. K.; BLACK, N. S.; GALLAGHER, L.; O'NEILL, E.; O'GARA, J. P. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. **Front. Cell Infect. Microbiol.** v. 5, p. 1, 2015.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? **Vet. J.**, v.171, n. 3, p. 398-407, maio 2006.

- MICHAEL, C. A.; DOMINEY-HOWES, D.; LABBATE, M. The antibiotic resistance crisis: causes, consequences, and management. **Front Public Health.**, v. 2, n. 145, 2014.
- MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. Fungal super glue: the biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. **PLoS Pathog.**, v. 12, n. 9, p. e1005828, 2016.
- MOFFA, M. et al. A systematic review of nosocomial waterborne infections in neonates and mothers. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 220, n. 8, p. 1199–1206, 2017.
- MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biology**, v. 5, n. 11, p. 2458–2461, 2007.
- MORGAN-SASTUME, F.; LARSEN, P.; NIELSEN, J. L.; NIELSEN, P. H. Characterization of the loosely attached fraction of activated sludge bacteria. **Water Res.** v. 42, p. 843–854, 2008.
- MURRAY, T. S. et al. The carbon monoxide releasing molecule CORM-2 attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **PLoS ONE.**, v. 7, n. 4, p. 1–11, 2012.
- NAICKER, P. R.; KARAYEM, K.; HOEK, K. G.; HARVEY, J.; WASSERMAN, E. Biofilm formation in invasive *Staphylococcus aureus* isolates is associated with the clonal lineage. **Microb. Pathog.**, v. 90, p. 41–49, 2015.
- NEETHIRAJAN, S.; CLOND, M. A.; VOGT, A. Medical biofilms nanotechnology approaches. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 10, p. 2806–2827, 2014.
- NEILL, J. O. Jim O’Neill. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 15, n. 8, p. 526, 2016.
- NEU, H; GOOTZ, T. Antimicrobial Chemotherapy. Em Baron S (Eds.), **Medical Microbiology**. 4<sup>a</sup> ed., Cap. 11, Galveston, 1996.
- ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003.
- OECD guideline for testing acute toxicity in fishes, Test No. 1992.  
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf>. Acesso em 17/03/2018
- O’NEILL, J. **Review on Antimicrobial Resistance**. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations., v. 4, December, 2014.
- ORTQVIST, A.; HEDLUND, J.; KALIN, M. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and clinical features. **Semin Respir Crit Care Med.**, v. 26, p. 563–74, 2005.
- OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol.**, v. 322, p. 207–228, 2008.
- OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental pathogen’. **Nat Rev Microbiol.**, v. 7, p. 555–567, 2009.

- PAEZ, P. L.; BAZAN, C. M.; BONGIOVANNI, M. E.; TONEATTO, J.; ALBESA, I., BECERRA, M. C.; *et al.* (2013). Oxidative stress and antimicrobial activity of chromium (III) and ruthenium (II) complexes on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **BioMed Research International.**, v. 906912, 2013.
- PARSEK M. R.; SINGH P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annu Rev Microbiol.**, v. 57: 677–701, 2003.
- PAULO, T. D. F. *et al.* Aryl-Substituted Ruthenium(II) Complexes: A Strategy for Enhanced Photocleavage and Efficient DNA Binding. n. 2, 2017.
- PENG, D. World's largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher c. **Agricultural and Biological Sciences Grain Legumes**, 2016.
- PIDDOCK, L. J. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? **Lancet Infect Dis.**, v. 12, n. 3, p. 249–253, 2012.
- POOLE, ROBERT, K. (edt). **Advances in the microbial physiology**. v. 71, San Diego. 1ª ed, 268p. 2017.
- READ, A. F.; WOODS, R. J. Antibiotic resistance management. **Evol Med Public Health.**, v. 2014, n. 1, p. 147, 2014.
- RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. Vol. 1, : Blucher, São Paulo, p. 22, 2015.
- RICO, E. P.; ROSEMBERG, D. B.; SENGER, M. R.; ARIZI M. B.; BERNARDI, G. F.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in *zebrafish* brain. **Neurotoxicol teratol.** v. 28, p. 489-496, 2006.
- RICO, E. P.; ROSENBERG, D. B.; DIAS, R. D.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. 2007. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in *zebrafish* brain. **Toxicol. let.** v. 174, p. 25-30, 2007.
- RITTERSHAUS, E. S.; BAEK, S. H.; SASSETTI, C. M. The normalcy of dormancy: Common themes in microbial quiescence. **Cell Host Microbe.**, v. 13, n. 6, p. 643–651, 2013.
- RHOADS, *et al.* Biofilmes in Wounds: management strategies. In: **Journal of Wound Care**. vol .1 7, no 11, november, 2008.
- ROGERS, M. K. L.; FEY, P. D.; RUPP, M. E. Coagulase-negative staphylococcal infections. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 23, 1, p. 73-98, mar. 2009
- ROLSTON, K. V. *et al.* Time-kill determination of the bactericidal activity of telavancin and vancomycin against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from cancer patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 4, p. 338–342, 2017.
- 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.

ROSENBERG, D. B.; RICO, E. P.; MUSSULINI, B. H. M.; PIATO, A. L.; CALCAGNOTTO, M. E.; BONAN, C. D.; *et al.* Differences in spatio-temporal behavior of *zebrafish* in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PLoS One.**, v. 6, p. 1–11, 2011.

ROSENBERG, D. B.; RICO, E. P.; SENGER, M. R.; ARIZI, M.B.; DIAS, R. D.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. 2007. Acute and subchronic copper treatments alter extracellular nucleotide hydrolysis in *zebrafish* brain membranes. **Toxicology.** v. 236, p. 132-139, 2007.

ROSSATTO, Fernanda Cristina Possamai. **Avaliação da formação de biofilme por *Staphylococcus* sp. e diversidade genética de estafilococos coagulase-negativos.** 2015. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SANDAI, D.; TABANA, Y. M.; EL OUWEINI, A.; AYODEJI, I. O. Resistance of *Candida albicans* biofilms to drugs and the host immune system. **Jundishapur J. Microbiol.**, v. 9, n. 11, p. e37385, 2016.

SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M. K.; GROSSART, H. P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Front Micro- biol.**, v. 4, p. 47, 2013.

SENGER, M.; RICO E.; ARIZI, M.; ROSENBERG, D. B.; DIAS, R.; BOGO, M.; BONAN, C. Carbofuran and Malathion Inhibit Nucleotide Hydrolysis in *Zebrafish (Danio rerio)* Brain Membranes. **Toxicology.** v. 212, p. 107-115, 2005.

SENGER, M.; ROSENBERG, D.; RICO, E., ARIZI, M.; DIAS, R.; BOGO, M.; BONAN, C. In Vitro Effect of Zinc and Cadmium on Acetylcholinesterase and Ectonucleotidase Activities in *Zebrafish (Danio rerio)* brain. **Toxicology in Vitro.**, v. 20, p. 954-958, 2006a.

SENGER, M. R.; RICO, E.; ARIZZI, M.; FRAZZON, A. P.; DIAS, R. D.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. Exposure to Hg<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> changes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in central nervous system of *zebrafish (Danio rerio)*. **Toxicology.** v. 226, p. 229-37, 2006b.

SHARMA, A.; GUPTA, S.; SARETHY, I. P.; DANG, S.; GABRANI, R. Green tea extract: possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens. **Food Chemistry**, v. 135, p. 672–675, 2012.

SINGER, S. W. *et al.* Posttranslational modification and sequence variation of redox-active proteins correlate with biofilm life cycle in natural microbial communities. **ISME J.** 4, 1348–1409, 2010.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene.**, v. 22, p. 7265–7279, 2003.

SPELLBERG, B.; GILBERT, D. N. The future of antibiotics and resistance: A tribute to a career of leadership by John Bartlett. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. Suppl 2, p. S71–S75, 2014.

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.

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.

SOTO, S. M. Importance of biofilms in urinary tract infections: new therapeutic approaches. **Adv. Biol.**, v. 2014, n. 543974, p. 1–13, 2014.

TAVARES, A. F. N., TEIXEIRA, M., ROMAO, C. C., SEIXAS, J. D., NOBRE, L. S., & SARAIVA, L. M. Reactive oxygen species mediate bactericidal killing elicited by carbon monoxide-releasing molecules. **Journal of Biological Chemistry.**, v. 286, p. 26708–26717, 2011.

TAYLOR, J.C., DEWBERRY, L.S., TOTSCH, S.K., YESSICK, L.R, DEBERRY, J.J., WATTS, S.A., SORGE, R.E., 2017. A novel zebrafish-based model of nociception. **Physiology & Behavior.**, v. 174, p. 83-88, 2017.

TENAILLON, O.; BARRICK, J. E.; RIBECK, N.; DEATHERAGE, D. E.; BLANCHARD, J. L.; DASGUPTA, A.; WU, G.C.; WIELGOSS, S. *et al.* Tempo and mode of genome evolution in a 50,000-generation experiment. **Nature.**, v. 536, p. 165–170, 2016.

TOMASZ, A. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Clin Infect Dis.**, v. 24 (suppl1): S85–88, 1997.

UDE, Z. *et al.* A novel dual-functioning ruthenium(II)-arene complex of an anti-microbial ciprofloxacin derivative - Anti-proliferative and anti-microbial activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 160, p. 210–217, 2016.

VAN HAL, S.J., JENSEN, S.O., VASKA, V.L., ESPEDIDO, B.A., PATERSON, D.L., GOSBELL, I.B. Pre-dictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Clin. Microbiol. Rev.** 25, p. 362–386, 2012.

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

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T : A peer-reviewed journal for formulary management.** v. 40, n. 4, p. 277–83, 2015.

VISWANATHAN, V. K. Off-label abuse of antibiotics by bacteria. **Gut Microbes.**, v. 5, n. 1, p. 3–4, 2014.

VILA, T. V. M.; ROZENTAL, S. Biofilm Formation as a Pathogenicity Factor of Medically Important Fungi. In: **Fungal Pathogenicity**. London: InTech, 2016.

VOET, D.; VOET, J. G; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1200 p.

WANG, R.; KHAN, B. A.; CHEUNG, G. Y.; BACH, T. H.; JAMERON-LEE, M.; KONG, K. F.; QUECK, S.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* surfactante peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofil-associated infection in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 121, n. 1, p. 238-248, jan. 2011.

WANG, J. H. *et al.* Sigma S-dependent antioxidant defense protects stationary- phase *Escherichia coli* against the bactericidal antibiotic gentamicin. **Antimicrob Agents Chemother** 58(10):5964–5975. 2010.

WENSLEY, S. BVA welcomes call for global action on AMR. **Veterinary Record**, v. 178, n. 22, p. 545–545, 2016. WESTERFIELD, M. *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of the zebrafish (Danio rerio)*.:University of Oregon Press. 2007.

WESTERFIELD, M. **The zebrafish book: a guide for the laboratory use of the zebrafish (Danio rerio)**.:University of Oregon Press. 2007.

WINBURN, I. C.; GUNATUNGA, K.; MCKERNAN, R. D.; WALKER, R. J.; SAMMUT, I. A.; & HARRISON, J. C. (2012). Cell damage following carbon monoxide releasing molecule exposure: implications for therapeutic applications. *BCPT.*, v, 111, p. 31-41, 2012.

WINKLER, J. R., & GRAY, H. B. Electron-transfer in ruthenium-modified proteins. **Chemical Reviews.**, v. 92, p. 369–379, 1992.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global action plan on antimicrobial resistance. **WHO Press**, p. 1–28, 2015.

WHO - publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>. Acesso em 03/02/2018.

XU, Z.; LIANG, Y.; LIN, S.; CHEN, D.; LI, B.; LI, L.; *et al.* Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. **Curr. Microbiol.**, v. 73 n. 4, p. 474–482, 2016.

YANG, X. Y.; ZHANG, L.; LIU, J.; LI, N.; YU, G.; CAO, K. *et al.* Proteomic analysis on the antibacterial activity of a Ru(II) complex against *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Proteomics.**, v. 115, p. 107–116, 2015.

YANG, X. Y.; SUN, B.; ZHANG, L.; LI, N.; HAN, J.; ZHANG, J.; SUN, X. & HE, Q. Y. Chemical interference with iron transport systems to suppress bacterial growth of *Streptococcus pneumoniae*. **PLoS One.**, v. 9, p. e105953, 2014.

ZHANG, B. *et al.* NMR analysis of a stress response metabolic signaling network. **J Proteome Res.**, v. 10, n. 8, p. 3743–3754, 2011.

ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **J. Bacteriol.**, v. 46, n. 1, p. 39, 1943.

## ANEXO A – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS A2 (BIOTECNOLOGIA)

International Journal of Biological Macromolecules 109 (2018) 1292–1301



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijbiomac](http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac)

## Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*



Dayara Normando Marques<sup>a</sup>, Alexandra Sampaio de Almeida<sup>a</sup>,  
 Andressa Rocha de Oliveira Sousa<sup>a</sup>, Rafael Pereira<sup>b</sup>, Alexandre Lopes Andrade<sup>b</sup>,  
 Renata Pinheiro Chaves<sup>a</sup>, Rômulo Farias Carneiro<sup>a</sup>, Mayron Alves de Vasconcelos<sup>b,c</sup>,  
 Luiz Gonzaga do Nascimento-Neto<sup>a,b</sup>, Ulisses Pinheiro<sup>d</sup>, Paula Alexandra Videira<sup>e</sup>,  
 Edson Holanda Teixeira<sup>b</sup>, Celso Shiniti Nagano<sup>a</sup>, Alexandre Holanda Sampaio<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Biotecnologia Marinha – BioMar-Lab, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici s/n, bloco 871, 60440-970, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório Integrado de Biomoléculas – LIBS, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Monsenhor Furtado, s/n, 60430-160, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Exatas e Naturais, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, 59625-620, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Zoologia, UFPE – Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof Moraes Rego, 1235, 50670-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>e</sup> UCIBIO, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, 2829-516, Caparica, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 September 2017

Received in revised form

20 November 2017

Accepted 21 November 2017

Available online 22 November 2017

#### Keywords:

Lectin

Antibacterial

Antibiofilm

### ABSTRACT

A new lectin from the marine sponge *Chondrilla caribensis* (CCL) was isolated by affinity chromatography in Sepharose 6B media. CCL is a homotetrameric protein formed by subunits of 15,445 ± 2 Da. The lectin showed affinity for disaccharides containing galactose and mucin. Mass spectrometric analysis revealed about 50% of amino acid sequence of CCL, which showed similarity with a lectin isolated from *Aplysina lactuca*. Secondary structure consisted of 10% α-helix, 74% β-sheet/β-turn and 16% coil, and this profile was unaltered in a broad range of pH and temperatures. CCL agglutinated *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and *Escherichia coli*, and it was able to reduce biofilm biomass, but showed no inhibition of planktonic growth of these bacteria. CCL activity was inhibited by α-lactose, indicating that Carbohydrate Recognition Domain (CRD) of the lectin was involved in antibiofilm activity.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



## Antibacterial effect on mature biofilms of oral streptococci and antioxidant activity of 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene from *Combretum leprosum*

Francisco Flávio Vasconcelos Evaristo<sup>1,2</sup> · Mayron Alves de Vasconcelos<sup>1,3</sup> · Francisco Vassilíepe Sousa Arruda<sup>1,2</sup> · Anna Luísa Pereira<sup>1</sup> · Alexandre Lopes Andrade<sup>1</sup> · Daniel Barroso de Alencar<sup>4</sup> · Mariana Ferreira do Nascimento<sup>5</sup> · Alexandre Holanda Sampaio<sup>4</sup> · Silvana Saker-Sampaio<sup>4</sup> · Paulo Nogueira Bandeira<sup>5</sup> · Hécio Silva dos Santos<sup>5</sup> · Edson Holanda Teixeira<sup>1</sup>

Received: 3 May 2017 / Accepted: 31 July 2017  
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

**Abstract** This study aimed to evaluate the antioxidant effect and antibacterial activity of the triterpene 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene (CLF1) isolated from *Combretum leprosum* leaves on mature biofilms from *Streptococcus mutans* and *S. parasanguinis*, both involved in dental caries. In order to determine the bacterial death time curve promoted by CLF1, minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration were also assessed. The susceptibility of mature biofilms from both species to CLF1 was investigated through total biomass quantification and enumeration of biofilm-entrapped colony forming units. Moreover, the effect of CLF1 on *S. mutans* biofilm architecture was investigated by scanning electron microscopy.

(DPPH) free radical, ferrous ion chelating assay, ferric-reducing antioxidant power, and  $\beta$ -carotene bleaching assay. The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of CLF1 for both species were 3.9 and 15.6  $\mu$ g/mL, respectively, and no bacterial growth was detected at 24 h treatment. Moreover, CLF1 reduced the biomass and viability of biofilms from both species. Electron micrographs of *S. mutans* biofilms confirmed such results and showed damages on bacterial surface. Regarding antioxidant activity, CLF1 showed efficient antioxidant ability in scavenging DPPH radical and inhibiting  $\beta$ -carotene oxidation. In summary, CLF1 should be considered as an effective molecule against infections caused