



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

ALEXANDRE LOPES ANDRADE

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITO COMBINADO COM ANTIBIÓTICOS
DO NITRO COMPLEXO DE RUTÊNIO [RuCl(NO₂)(dppb)(4,4'-Mebipy)] NA
PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE IRRADIAÇÃO COM LUZ AZUL

FORTALEZA

2023

ALEXANDRE LOPES ANDRADE

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITO COMBINADO COM ANTIBIÓTICOS DO
NITRO COMPLEXO DE RUTÊNIO [RuCl(NO₂)(dppb)(4,4Mebipy)] NA PRESENÇA E
NA AUSÊNCIA DE IRRADIAÇÃO COM LUZ AZUL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira

Coorientador: Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos

FORTALEZA

2023

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

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

- A565a Andrade, Alexandre.
Atividade antimicrobiana e efeito combinado com antibióticos do nitro complexo de rutênio [RuCl(NO₂)(dppb)(4,4'-Mebipy)] na presença e na ausência de irradiação com luz azul / Alexandre Andrade. – 2023.
165 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.
Coorientação: Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos.
1. Resistência antimicrobiana. 2. Biofilmes. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Complexo de rutênio. 5. Luz azul. I. Título.

CDD 616.9

ALEXANDRE LOPES ANDRADE

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITO COMBINADO COM ANTIBIÓTICOS DO
NITRO COMPLEXO DE RUTÊNIO [RuCl(NO₂)(dppb)(4,4Mebipy)] NA PRESENÇA E
NA AUSÊNCIA DE IRRADIAÇÃO COM LUZ AZUL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira

Coorientador: Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos (Coorientador)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof^ª. Dra. Alda Karine Holanda Medeiros (Membro)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira (Membro)
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Profa. Dra. Lília Maria Carneiro Câmara (Membro)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Silvio Cesar Gomes de Lima (Membro)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

*A Deus que nos dá a possibilidade de conhecê-
lo, e especialmente à minha esposa Nívia,
Aline e Alice, minhas heranças do Senhor, a
toda minha família.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a 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. A minha esposa Nívia Soares Scarcela Andrade pela compreensão e força nos momentos mais difíceis de nossas vidas, e as minhas filhas Aline e Alice, que foram os maiores presentes que ganhei durante o mestrado e doutorado.

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. Edson Holanda Teixeira, por todos os ensinamentos dispensados a minha pessoa e por me fazer amar a Imunologia e, em especial as células T reg. Agradeço também ao meu Coorientador Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos que também me fez amar a Microbiologia, por acreditar em meu potencial e, ter me ensinado os caminhos para se fazer Ciência. À Prof^ª. Dra. Alda Karine Holanda, 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.

À Prof^ª. Dra. Lília Câmara, meu agradecimento especial por ter me mostrado os caminhos e a compreensão da aprendizagem significativa, a ressignificar meu papel e funções como professor, por ter ajudado a encurtar minha zona de desenvolvimento proximal (ZDP) e, especialmente, por propiciar os mecanismos necessários para a ancoragem de novos conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Silvio César Gomes de Lima, por fazer parte da minha formação acadêmica e pelos ensinamentos compartilhados. Ao Prof. Dr. Manoel Marques, por todas as contribuições e orientações na melhoria deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Henrique Sousa, pela sua genialidade e inspiração em construir moléculas biologicamente ativas, o que me fez também amar a Química e os complexos de rutênio, à Ana Cláudia Gondim (Aninha) pela parceria e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS) que sempre me ajudaram na parte teórica bem como nos procedimentos de bancada: Aryane, Leonardo, Ellen, Renally, Isa, Alisson, Livia, Gabriel, Kelva, Brenda, Itala, João Pedro, Paula, Tathiane e Carol.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Biotecnologia Marinha (BioMar Lab) nas pessoas dos professores doutores Alexandre Holanda Sampaio, Celso Nagano, Rômulo Farias

e sua esposa Renata e os estudantes de pós Renato, Jéssica, Andressa, Phil, Juliana, Pedro, Vinícius e Levi.

Agradeço também aos meus professores do Programa de Microbiologia Médica (PPGMM) pela formação e o compartilhamento dos conhecimentos em seus níveis mais elevados e, em especial, as Prof^ª. Dra. Rossana Aguiar e Sâmia Brilhante. Agradeço de forma mais que especial a Prof^ª. Dra. Débora Castelo Branco pela forma atenciosa e cuidadosa com que sempre me ensinou e, mesmo próximo do fim do seu período de gestação, também agradeço o tempo que dedicou nas análises da microscopia confocal, o que gerou resultados importantes e até inéditos neste estudo. Aos estudantes e colegas que também passaram pelo PPGMM Jonathas Sales, Vandebegue, Bruno Amando, Rúlio e todos os demais com quem convivi e aprendi.

Agradecimento mais que ESPECIAL ao meu amigo e irmão em Cristo Messias Vital, sua esposa Ana Paula e seu filho João, que me acolheram e permitiram o início, a jornada e a conclusão do meu doutoramento.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo investimento e apoio na minha qualificação e por permitir que um jovem do interior do estado do Ceará, oriundo de escola pública, receba o maior título da carreira acadêmica. Aos demais órgãos de fomento da pesquisa, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro aos projetos através dos quais essa pesquisa teve como base para sua realização.

Por fim agradeço à nossa Universidade Federal do Ceará (UFC), universidade pública que possibilita a realização de sonhos e cumpre a sua missão, oferecendo formação a nível de excelência à todas que por ela passam.

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

(Mateus 6. 21)

RESUMO

A resistência antimicrobiana (RAM) representa um problema crítico de saúde pública global. A formação de biofilme é um dos principais fatores de virulência da RAM e desempenha um papel importante em mais de 80% das infecções bacterianas e 65% das infecções hospitalares. Neste estudo, investigou-se a atividade antimicrobiana, o efeito combinado a antibióticos, a interação com DNA e a atividade citotóxica do nitro complexo de rutênio [RuCl(NO₂)(dppb)(4,4-Mebipy)] (designado RuNO₂) irradiado com luz azul e na ausência de irradiação. O efeito do complexo contra células planctônicas foi avaliado através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM). O efeito combinado com antibióticos foi verificado pela técnica de *checkerboard*. A atividade antibiofilme foi avaliada pela quantificação da biomassa total, contagem de células viáveis, microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Por fim, a interação com DNA e a citotoxicidade contra eritrócitos humanos e fibroblastos murinos (L929), foram verificados por eletroforese, atividade hemolítica e ensaio de viabilidade celular (MTT), respectivamente. De modo geral, o composto apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com valores da CIM e CBM que variaram de 4 a 256 µg/mL, tanto fotoirradiado quanto sem irradiação. Quando RuNO₂ foi combinado com ampicilina, observou-se efeito sinérgico contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, com valores de ICIF que variaram entre 0,186 a 0,311, no entanto, quando associado à tetraciclina, RuNO₂ mostrou efeito sinérgico apenas contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. No ensaio sobre biofilmes, observou-se entre 65% e 99,8% de redução da biomassa total e diminuição entre 1 a 4 ordens na escala logarítmica no número de células viáveis. As análises de MEV e Confocal revelaram alterações na morfologia celular, danos à parede e à membrana plasmática de *S. aureus* e *E. coli*. Nos ensaios de clivagem de DNA, o composto não apresentou efeito na ausência de fotoirradiação, mas promoveu a clivagem eficiente do DNA quando irradiado por luz azul. Sobre eritrócitos humanos, RuNO₂ apresentou percentual de hemólise entre 2 e 4% apenas nas maiores concentrações testadas e, sobre células murinas L929, não houve toxicidade, visto que nos dois tempos avaliados (24 e 48 h), as células tratadas não apresentaram viabilidade menor que 50 %. Em conjunto, esses resultados resumem o potencial desse complexo, que merece maiores investigações.

Palavras-chave: resistência antimicrobiana; biofilmes; atividade antimicrobiana; complexo de rutênio; luz azul.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) is a critical global public health problem. The biofilm formation is one of the main virulence factors of AMR and plays an important role in more than 80% of bacterial infections and 65% of hospital infections. In this study, we investigated the antimicrobial activity, the combined effect with antibiotics, the interaction with DNA and the cytotoxic activity of the ruthenium nitro complex [RuCl(NO₂)(dppb)(4,4-Mebipy)] (designated RuNO₂) irradiated with blue light and in the absence of irradiation.. The effect of the complex against planktonic cells was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC). The combined effect with antibiotics was verified by the checkerboard technique. Antibiofilm activity was evaluated by total biomass quantification, viable cell counting, confocal microscopy and scanning electron microscopy (SEM). Finally, the interaction with DNA and cytotoxicity against human erythrocytes and murine fibroblasts (L929) were verified by electrophoresis, hemolytic activity and cell viability assay (MTT), respectively. In general, the compound showed antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, with MIC and MBC values ranging from 4 to 256 µg/ml, both photoirradiated and without irradiation. The synergistic effect against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* was observed when the complex was combined with ampicillin, presenting FICI values between 0.186 and 0.311, however, when associated with tetracycline, RuNO₂ showed a synergistic effect only against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. In the biofilm assay, a reduction of between 65% and 99.8% in total biomass and a decrease of between 1 and 4 orders on the logarithmic scale in the number of viable cells were observed. SEM and Confocal analyzes revealed changes in cell morphology, damage to the wall and plasma membrane of *S. aureus* and *E. coli*. In DNA cleavage assays, the compound showed no evidence of effect in the absence of photoirradiation but promoted efficient DNA cleavage when irradiated by blue light. On human erythrocytes RuNO₂, it presented a percentage of hemolysis between 2 and 4% only at the highest concentrations tested and, on murine L929 cells, there was no toxicity since at both times evaluated, the treated cells did not show viability less than 50%. Taken together, these results summarize the potential of this complex, which deserves further investigation.

Keywords: antimicrobial resistance; biofilms; antimicrobial activity; ruthenium complex; blue light.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mortes em milhões atribuídas à RAM comparada com outras causas de mortes em 2019	21
Figura 2 – Mortalidade prevista para RAM em 2050 comparada com causas comuns de mortes atuais	22
Figura 3 – Predição global de mortes por RAM em 2050 projetada por continentes	23
Figura 4 – Formas de espalhamento da RAM na interface humano-animal-alimentar e ambiental	25
Figura 5 – Visão geral dos mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos	29
Figura 6 – <i>Staphylococcus aureus</i> e fatores de virulência associados	33
Figura 7 – Resistência antimicrobiana pelo mecanismo de alteração de alvo (PBP2a)	34
Figura 8 – Resistência de <i>E. coli</i> as principais classes de antibióticos em alguns países pelo mundo	37
Figura 9 – A) Distribuição geográfica de cepas de <i>E. coli</i> (n = 167) circulantes na interface homem-animal-ambiente-alimento em todas as regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Sudeste); (B) Representação dos principais clones internacionais circulando nas regiões brasileiras	38
Figura 10 – Resistência de <i>P. aeruginosa</i> a diversas classes de antibióticos em alguns países pelo mundo	40
Figura 11 – Modelo tradicional de formação de biofilmes bacterianos	43
Figura 12 – Modelo conceitual expandido de formação de biofilmes	44
Figura 13 – Quorum sensing. a) estrutura de uma acil-homosserina lactona e b) uma célula que expressa a acil-homosserina lactona sintase	46
Figura 14 – Produção de fator virulência em <i>E. coli</i> produtoras de toxina Shiga	47
Figura 15 – Representação esquemática dos efeitos mais comuns dos níveis de c-di-GMP na dinâmica do biofilme. MEC: matriz extracelular	48
Figura 16 – Locais de infecções clínicas comuns associadas ao biofilme e os patógenos mais frequentes	50

Figura 17 – Tolerância e resistência no estilo de vida planctônico e em biofilme	52
Figura 18 – Os mecanismos de tolerância antimicrobiana de um biofilme	54
Figura 19 – Molécula de nitroprussiato de sódio que consiste em um sal de sódio contendo Fe complexado com cinco ânions cianeto e um grupo NO	56
Figura 20 – Tabela periódica destacando os elementos classificados como metais (marcados em laranja) que são considerados de interesse clínico para desenvolvimento de metalocompostos	57
Figura 21 – Visão geral dos mecanismos de ação dos antibióticos e dos metalocompostos Re-1 e Re-2	58
Figura 22 – Efeito Exemplos da estrutura química de um complexo de rutênio mono (1), di (2), tri (3) e tetranuclear (4)	60
Figura 23 – Estrutura de cinco complexos metálicos com atividade antitumoral. (A) cisplatina; (B) NAMI-A; (C) KP1019; (D) KP1339 e (E) TLD1443	62
Figura 24 – Exemplo de ligantes polipiridínicos	63
Figura 25 – Estrutura do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO ₂) ₂ (dppb)(5,5'-mepipy)]	65
Figura 26 – Classificação dos complexos de rutênio de acordo com seu mecanismo de ação	66
Figura 27 – Alvos celulares bacterianos de complexos estruturais e funcionais de rutênio. (A) alvos celulares bacterianos de complexos "estruturais" de Ru; (B) alvos células bacterianos de complexos "funcionais"	69
Figura 28 – Mecanismo das reações tipo I e II da terapia fotodinâmica (TFD)	70
Figura 29 – Estruturas químicas de complexos de rutênio desenvolvidas para Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	71
Figura 30 – Mecanismos propostos para a atividade antimicrobiana do composto nitrosil mostrando a liberação de NO e seus possíveis alvos biológicos	72
Figura 31 – Configuração de iluminação para TFDa. Representação esquemática	73
Figura 32 – Organograma e estruturação deste estudo	76
Figura 33 – Estrutura do complexo RuNO ₂ e antibióticos e sua respectiva massa molar (MM)	78
Figura 34 – Esquematização da técnica de <i>checkerboard</i> para o ensaio de combinação entre o complexo RuNO ₂ e antibióticos	80
Figura 35 – Efeito do complexo RuNO ₂ sobre a formação de biofilmes de <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	92

Figura 36 – Efeito do complexo RuNO ₂ sobre o número de células viáveis em biofilmes de <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	94
Figura 37 – Efeito do complexo RuNO ₂ sobre a biomassa de biofilmes pré-formados de <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	96
Figura 38 – Efeito do complexo RuNO ₂ sobre o número de células viáveis em biofilmes pré-formados de <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	98
Figura 39 – Eletromicrografias mostrando o efeito do complexo RuNO ₂ sobre células planctônicas e biofilmes de <i>S. aureus</i> ATCC 700698 após 24 h de tratamento	100
Figura 40 – Eletromicrografias mostrando o efeito do complexo RuNO ₂ sobre células planctônicas e biofilmes de <i>E. coli</i> ATCC 11303 após 24 h de tratamento ...	101
Figura 41 – Micrografias da avaliação do efeito do complexo RuNO ₂ sobre a formação de biofilmes de <i>S. aureus</i> ATCC 700698 tratados por 24 h	103
Figura 42 – Micrografias da avaliação do efeito do complexo RuNO ₂ sobre a formação de biofilmes de <i>E. coli</i> ATCC 11303 tratados por 24 h	104
Figura 43 – Micrografias da avaliação do efeito do complexo RuNO ₂ sobre biofilmes pré-formados de <i>S. aureus</i> ATCC 700698 tratados após 24 h de crescimento	105
Figura 44 – Ensaio de fotoclivagem de DNA plasmidial pBR322	106
Figura 45 – Atividade hemolítica de RuNO ₂ em eritrócitos humanos	107
Figura 46 – Efeito de RuNO ₂ sobre a viabilidade de células L929	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista das espécies bacterianas alvos deste estudo	77
Tabela 2 – Pontos de corte e suscetibilidade aos agentes antimicrobianos	80
Tabela 3 – Sensibilidade antimicrobiana de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ao complexo RuNO ₂ e antibióticos	88
Tabela 4 – Efeito do complexo RuNO ₂ combinado aos antibióticos Amp e Tetra contra <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i>	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação das enzimas β -lactamases	30
Quadro 2 – Lista de agentes patogênicos prioritários da OMS para a P&D de novos antibióticos	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	Autoindutor
AHL	Acil-Homoserino Lactona
Amp	Ampicilina
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDDEP	<i>Center for Disease for Dynamics, Economics & Policy</i>
CEMB	Concentração de Erradicação Mínima do Biofilme
CIF	Concentração Inibitória Facionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMB	Concentração Inibitória Mínima do Biofilme
C-di-GMP	di Guanosina Monofosfato Ciclica
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CoNS	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa
CRE	Enterobacteriaceas Resistentes a Carbapenem
CV	Cristal Violeta
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O	Densidade Óptica
DNR	Divisão Nodular de Resistência
DPOV	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva
EGMs	Elementos Genéticos Móveis
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
ESBL	β - Lactamase de Espectro Estendido
ERO	Espécies reativas de Oxigênio
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
FC	Fibrose Cística
FS	Fotossensibilizador
GRA	Genes de Resistência Antimicrobiana
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Facionada

IRAS	Infecções Associadas a Assistência à Saúde
ITU	Infecções do Trato Urinário
LPS	Lipopolissacarídeo
MHBCA	Mueller-Hinton Cátion Ajustado
MHA	Mueller-Hinton Ágar
MDR	Multidrogas Resistentes
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
MRSE	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Resistente à Meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Sensível a Meticilina
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OMP	Proteína de Membrana Externa
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PAV	Pneumonia Associada à Ventilação
PBP	Proteínas Ligadoras de Penicilina
PIB	Produto Interno Bruto
PBR	Países de Baixa Renda
PRMB	Países de Renda Média Baixa
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RAM	Resistência Antimicrobiana
SNP	Nitroprussiato de Sódio
SPE	Substância Polimérica Extracelular
Tetra	Tetraciclina
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFDa	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
THG	Transmissão Horizontal de Genes
TVG	Transmissão Vertical de Genes
TSA	Soja Tríplica Ágar
TSB	Soja Tríplica Caldo
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> Intermediário à Vancomicina
XDR	Extensivamente Resistente a Drogas
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Resistência Antimicrobiana (RAM)	21
2.2	A RAM e sua relação com ambiente	24
2.2.1	<i>Mudanças climáticas, perda da biodiversidade e poluição</i>	26
2.3	Mecanismos moleculares de RAM	26
2.4	Bactérias de interesse clínico	31
2.4.1	<i>Bactérias Gram-positivas: S. aureus e S. epidermidis</i>	32
2.4.2	<i>Bactérias Gram-negativas: E. coli e P. aeruginosa</i>	35
2.5	Biofilmes bacterianos	41
2.5.1	<i>Processo de formação de biofilmes</i>	42
2.5.2	<i>Comunicação celular (Quorum sensing) em biofilmes</i>	45
2.5.3	<i>Doenças associadas a biofilmes</i>	48
2.5.4	<i>Mecanismos de tolerância em biofilmes</i>	51
2.6	Metalocompostos	55
2.6.1	<i>Atividade antimicrobiana de metalocompostos</i>	57
2.6.2	<i>Complexos de rutênio</i>	59
2.6.3	<i>Ligantes polipiridínicos, fosfínicos e óxido nítrico (NO)</i>	62
2.6.4	<i>Atividade antimicrobiana de complexos de rutênio</i>	66
2.7	Terapia Fotodinâmica (TFD)	69
2.7.1	<i>Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa)</i>	71
3	HIPÓTESES	74
4	OBJETIVOS	75
4.1	Objetivo geral	75
4.2	Objetivos específicos	75
5	METODOLOGIA	76
5.1	Local de estudo	76
5.2	Microrganismos	77
5.3	Obtenção dos complexos de rutênio e antibióticos	77
5.4	Condições de cultura	78
5.5	Solubilização e diluição do complexo RuNO ₂ e antibióticos	78

5.6	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	79
5.7	Avaliação do efeito de RuNO ₂ combinados aos antibióticos ampicilina e tetraciclina	80
5.8	Ensaio de inibição da formação de biofilmes	81
5.8.1	<i>Quantificação da biomassa</i>	81
5.8.2	<i>Contagem de células viáveis dos biofilmes</i>	82
5.8.3	<i>Ensaio sobre biofilmes pré-formados</i>	82
5.8.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	83
5.8.5	<i>Microscopia Confocal de Varredura a Laser</i>	83
5.9	Fotoclivagem de DNA	84
5.10	Atividade hemolítica	84
5.11	Teste de viabilidade celular	85
5.11.1	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	85
5.12	Análise estatística	86
6	RESULTADOS	87
6.1	Atividade antimicrobiana sobre células planctônicas	87
6.2	Atividade combinada a antibióticos	89
6.3	Atividade antibiofilme: inibição da formação de biofilmes e contagem de células viáveis	91
6.4	Atividade sobre biofilmes pré-formados: quantificação da biomassa e contagem de células viáveis	95
6.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	99
6.6	Microscopia Confocal de Varredura a Laser	102
6.7	Fotoclivagem de DNA	106
6.8	Atividade hemolítica	107
6.9	Efeito citotóxico	108
7	DISCUSSÃO	109
8	CONCLUSÕES	118
	REFERÊNCIAS	119
	APÊNDICES	149
	APÊNDICES “A a P” – PUBLICAÇÕES EM REVISTAS CIENTÍFICAS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO	150

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana (RAM) é responsável por uma crise de saúde pública global crescente e representa um dos mais sérios desafios de saúde para o século XXI (BLAIR, 2023). Estimativas recentes apontaram que em 2019, 4,95 milhões de pessoas morreram de doenças nas quais a RAM desempenhou um papel significativo (MURRAY *et al.*, 2022). Ademais, as previsões para um pior cenário sugerem que esse número aumentará para 10 milhões até 2050 se continuarmos no caminho atual, um fato que pode direcionar a humanidade para uma morte a cada três segundos se medidas urgentes não forem tomadas imediatamente (O' NILL, 2016).

Entre os principais patógenos relacionados a RAM, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* foram os patógenos mais presentes, sendo responsáveis por mais de 80% das 1,27 milhão de mortes atribuídas diretamente à resistência em 2019, algo superior ao número de mortes por HIV/AIDS (864.000 mortes) e malária (643.000 mortes) (MURRAY *et al.* 2022).

Dentre as formas para resistir e tolerar à exposição a antimicrobianos, a formação de biofilmes é um dos principais fatores de virulência associados à RAM, e desempenha um papel importante na sobrevivência, colonização de ambientes e estabelecimento de infecções microbianas (FLEMMING *et al.*, 2023). Estima-se que os biofilmes bacterianos desempenhem um papel importante em mais de 80% das infecções bacterianas, e que 65% das infecções hospitalares, podem ser atribuídas à formação de biofilmes em dispositivos médicos implantáveis (JAMAL *et al.*, 2018), sendo que os biofilmes também têm sido implicados em muitas doenças crônicas e refratárias como endocardite, fibrose cística, pneumonia, periodontite, rinosinusite crônica, otite média entre outras (KOLPEN *et al.*, 2022; STAAT *et al.* 2021; OLIVA *et al.*, 2028; SHRESTHA; BARAL; KHANAL, 2018; KARIGOUDAR *et al.*, 2019).

Neste contexto, novas substâncias antimicrobianas, algumas das quais apresentam boa penetração em biofilmes, têm sido propostas como alternativas aos antibióticos tradicionais (YING *et al.*, 2023). Dentre estas estratégias de combate a RAM, os peptídeos antimicrobianos, os inibidores de *quorum sensing*, os anticorpos monoclonais, além de compostos de origem natural como os óleos essenciais e os metabólicos secundários, e de origem sintética como os metalocompostos, tem se destacado como os mais promissores candidatos a novos medicamentos com efeito antimicrobiano (URUÉN *et al.*, 2021).

Dentre as alternativas mencionadas acima, os metalocompostos e em especial os complexos de rutênio, têm sido investigados como agentes antimicrobianos promissores ou como alternativas adjuvantes aos antibióticos mais tradicionais (SOUSA *et al.*, 2018; ANDRADE *et al.*, 2020; SOUSA *et al.*, 2020a; SOUSA *et al.*, 2020b). De modo geral, o mecanismo destes complexos está baseada em: (i) seu papel funcional e estrutural, onde o centro do metal Ru pode se ligar ao alvo biológico; (ii) o centro metálico pode atuar como transportador de ligantes ativos para aumentar suas atividades farmacêuticas; (iii) um complexo metálico que se comporta como um catalisador para a oxidação da glutatona e induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e (iv) pode atuar como um fotossensibilizador para gerar oxigênio singlete (LI, COLLINS; KEENE, 2015; SOUTHAM *et al.*, 2017).

Por outro lado, entre essas novas estratégias, a terapia fotodinâmica (TFD), que é menos suscetível aos mecanismos de resistência antimicrobiana de bactérias devido às suas propriedades de geração de radicais livres (HAMBLIN, 2016), é de particular interesse, e tem si mostrado promissora, auxiliando no controle do crescimento microbiano quando combinada a compostos que exibem propriedades biológicas de interesse quando irradiados por luz como os complexos de rutênio (GHOSH *et al.*, 2021). Deste modo, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade antimicrobiana, o efeito combinado com antibióticos, a interação com DNA e a atividade citotóxica do nitro complexo $[\text{RuCl}(\text{NO}_2)(\text{dppb})(4,4\text{-Mebipy})]$ na presença e na ausência de irradiação com luz azul.

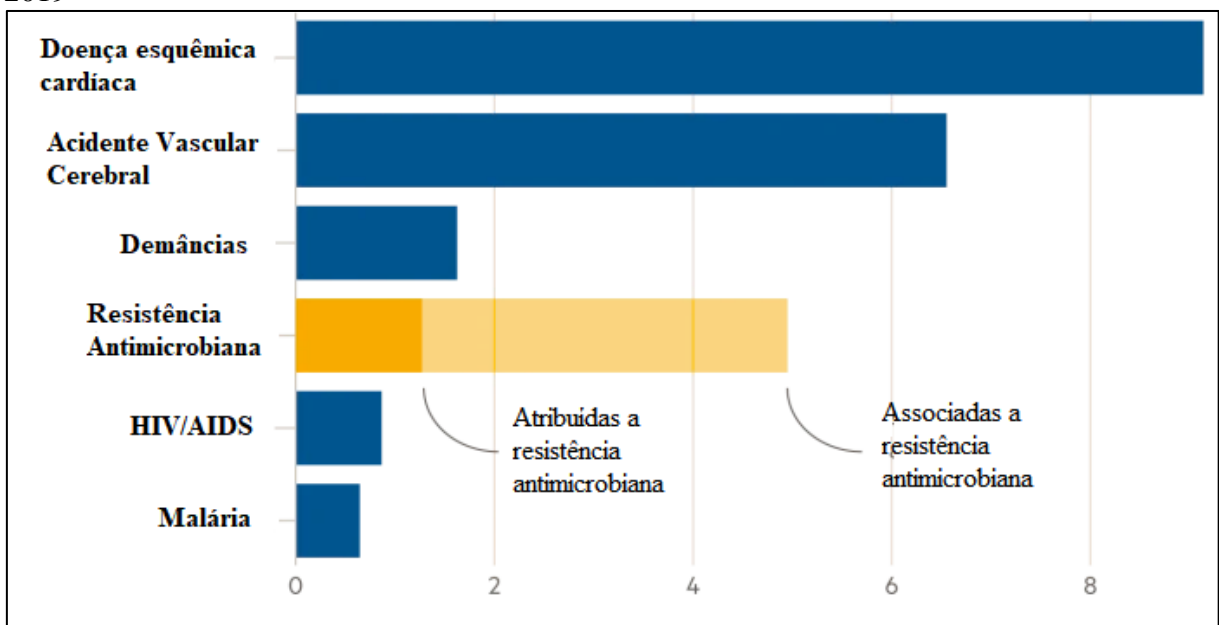
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resistência Antimicrobiana (RAM)

Declarada pela OMS como uma das 10 principais ameaças globais à saúde que a humanidade enfrenta, a RAM é um fenômeno que ocorre quando microrganismos (bactérias, fungos e vírus) desenvolvem a capacidade de resistir a ação de medicamentos que seriam letais ou impediriam seu crescimento (WHO, 2021; MURRAY *et al.*, 2022). O surgimento da RAM é um processo evolutivo normal das bactérias, no entanto, este processo é amplificado através da pressão seletiva exercida pelo uso generalizado e indevido de agentes antibacterianos na saúde humana e animal (WHO, 2022).

Estima-se que 1,27 milhão de mortes foram resultado direto de infecções bacterianas resistentes a antibióticos em 2019, e esta é a primeira vez que os dados sobre a carga global estão disponíveis (Figura 1), apresentando um quadro completo da disseminação da resistência aos antibióticos e seu impacto geral na saúde (MURRAY *et al.*, 2022).

Figura 1 – Mortes em milhões atribuídas à RAM comparada com outras causas de mortes em 2019



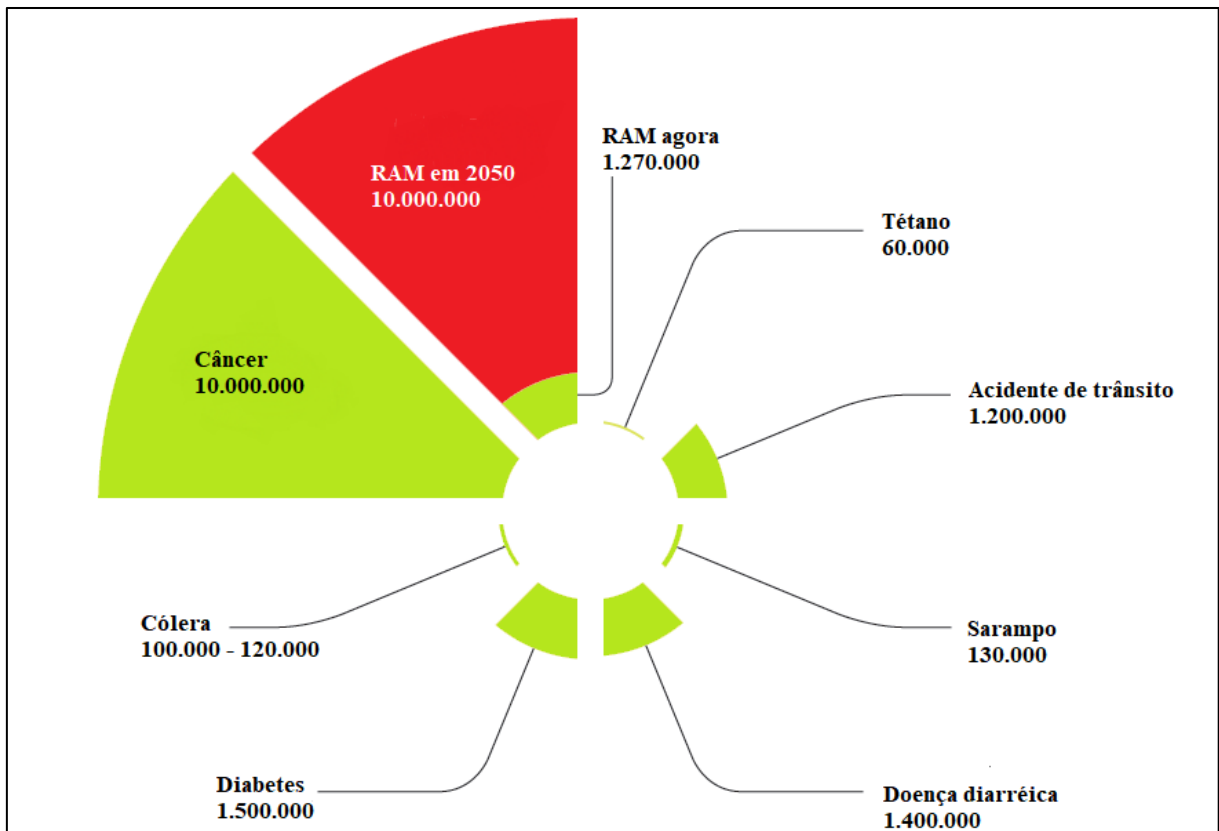
Fonte: Adaptado de Global Burden of Disease Collaborative Network (2022).

Dentre as milhões de mortes apresentadas na figura 1, Murray *et al.*, (2022) estimaram pelo menos 12 doenças infecciosas associadas ou atribuíveis à RAM que foram responsáveis por estas, as quais incluem: infecções respiratórias inferiores e todas as infecções

relacionadas no tórax; infecções da corrente sanguínea; infecções peritoneais e intra-abdominais; meningite e outras infecções bacterianas do SNC; febre tifóide, paratifóide e *Salmonella* spp não tifoide invasiva; infecções do trato urinário e pielonefrite; diarreia; tuberculose [não incluindo tuberculose associada ao HIV]; infecções bacterianas da pele e sistemas subcutâneos; endocardite e outras infecções cardíacas; infecções de ossos, articulações e órgãos relacionados; gonorréia e clamídia.

Neste contexto, a situação da RAM se mostra cada mais crítica, ainda mais quando consideramos os alertas emitidos através de um relatório encomendado pelo governo britânico liderado pelo economista Jim O'Neill há quase 10 anos. 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 patamar de 10 milhões de pessoas mortas por ano, conforme demonstrado na figura 2. Além disso os custos que a resistência aos antibióticos chegariam a US\$ 100 trilhões na metade do século, caso não for resolvida (O'NEILL, 2014).

Figura 2 – Mortalidade prevista para RAM em 2050 comparada com causas comuns de mortes atuais

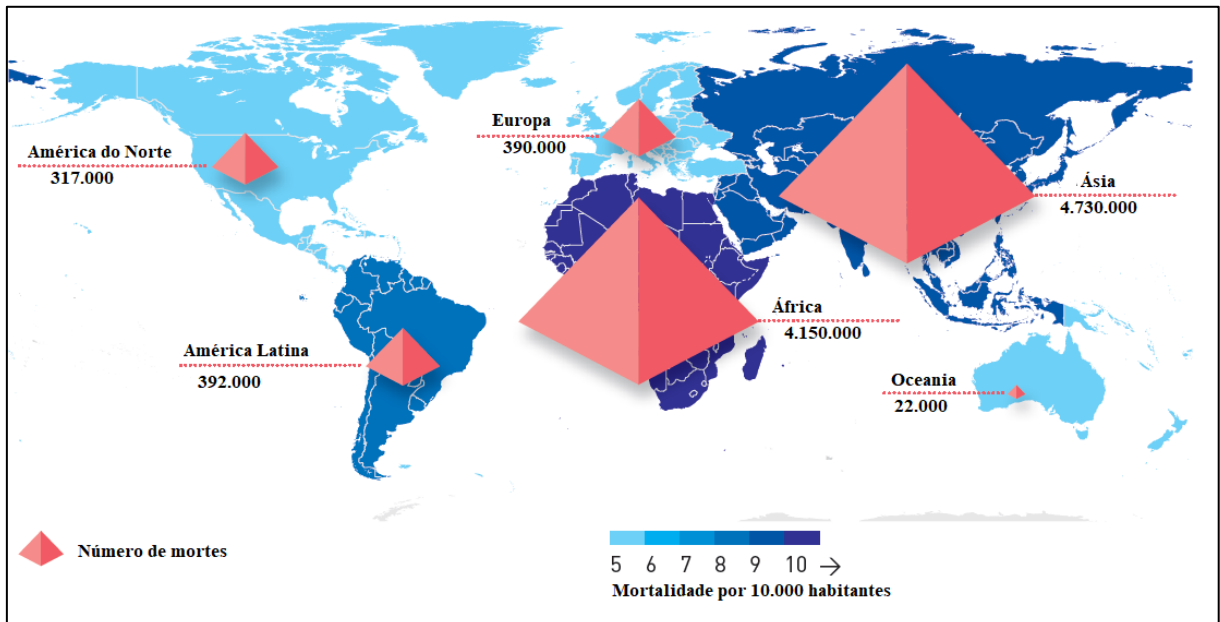


Fonte: Adaptado de O'Neill (2016) e Murray *et al.* (2022).

Como observa-se, a RAM além de ter um aumento expressivo no número de mortes anuais, ao causar morbidade traz complicações para o tratamento de doenças infecciosas, resultando em internações e tratamentos mais prolongados, o que vem aumentando os custos com os cuidados da saúde, incapacidades e morte (NAYLOR *et al.*, 2018) gerando um impacto econômico global de US\$ 3,4 bilhões de dólares no Produto Interno Bruto (PIB) (MOREL *et al.*, 2020).

Embora os riscos da RAM para a saúde humana, animal e vegetal e para o meio ambiente sejam compartilhados por todos, os países de baixa renda (PBR) e os países de renda média-baixa (PRMB), apresentam uma quantidade significativa de doenças infecciosas e serão afetados de forma mais grave pela RAM. Conforme mostrado na figura 3, tanto os países da África subsaariana quanto os que estão localizados no sul da Ásia, enfrentarão e exibirão os maiores índices de morbidade e mortalidade relacionados a RAM, um fato que pode estar relacionado ao acesso inadequado a antibióticos e altos níveis de infecção, como também devido à alta resistência, mesmo com bom acesso a antibióticos de primeira linha, incluindo fluoroquinolonas e β -lactâmicos (O'NEILL, 2014; MURRAY *et al.* 2022; LAXMINARAYAN, 2022).

Figura 3 – Predição global de mortes por RAM em 2050 projetada por continentes



Fonte: Adaptado de O'Neill (2014).

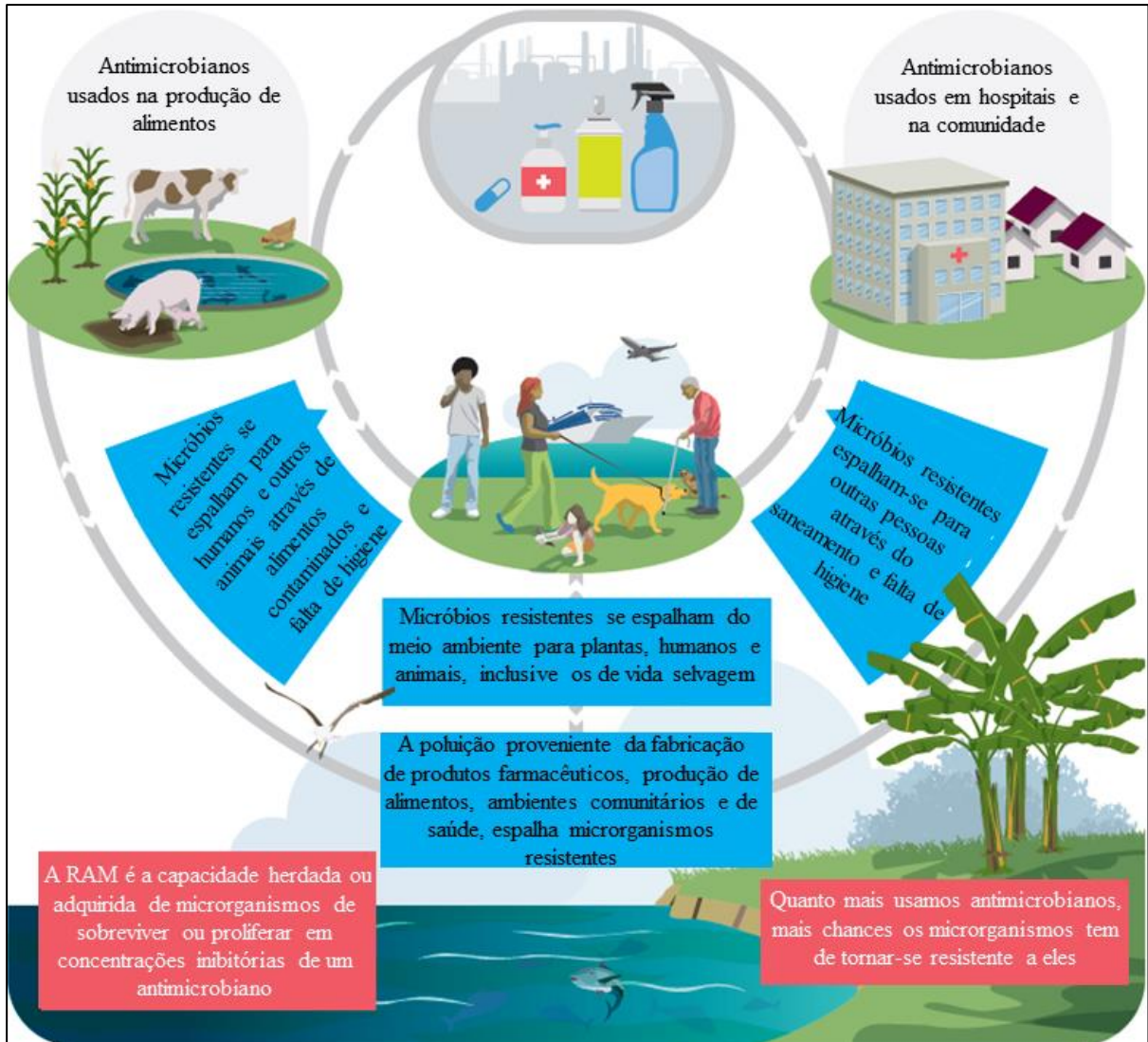
2.2. A RAM e sua relação com ambiente

Os microrganismos (particularmente as bactérias) na água, no solo e no ar, podem adquirir resistência após o contato com outros microrganismos resistentes presentes no ambiente, que podem ter-se originado ao longo do tempo evolutivo, ou terem sido introduzidos através do fluxo de resíduos humanos e/ou animais (CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN 2012; PERRY; WAGLECHNER; WRIGHT, 2016). Nesses casos, a resistência pode desenvolver-se devido a pressões seletivas de antibióticos, fungicidas, compostos antivirais, parasiticidas, certos produtos químicos desinfectantes (compostos de amónio quaternário, triclosan e cloro) e outros compostos co-selecionados (biocidas e metais como zinco e cobre), que são liberados no meio ambiente pela atividade humana, saneamento deficiente ou pelo solo e água contaminados (GRAHAM *et al.*, 2019; LARSSON; FLACH, 2022).

Quando os antimicrobianos são liberados no meio ambiente, eles podem selecionar ou induzir o desenvolvimento de microrganismos resistentes. Isso pode acontecer por mutação espontânea, aquisição e transmissão por elementos genéticos móveis (EGM), ou por transferência horizontal de genes (THG) entre bactérias ambientais e as associadas a plantas, animais ou humanos (KUMAR; PAL, 2018; LARSSON; FLACH, 2022). A transmissão da resistência pode ocorrer quando a concentração do antimicrobiano (ou de outros agentes químicos) é 10 a 1.000 vezes menor que as concentrações utilizadas na medicina humana e animal durante um tratamento clínico (BENGTSSON-PALME; LARSSON, 2016). A infraestrutura do tratamento de águas residuais pode reduzir significativamente os antimicrobianos e outros produtos químicos co-selecionados nos efluentes (MURRAY *et al.*, 2020) e é fundamental para a gestão da poluição ambiental.

Fontes identificadas de microrganismos resistentes, genes e antimicrobianos, iniciam a sua propagação a partir de pontos específicos ou relativamente locais. Como esquematizado na figura 4, o caminho real da propagação da RAM, inclui locais no ambiente que abrigam temporariamente microrganismos resistentes, que pode então ser transmitidos a seres humanos ou animais. Esses locais são fontes transitórias ou condicionais de RAM e são frequentemente influenciados por eventos hidrológicos e antropogênicos no ambiente. A exposição humana à RAM também pode ocorrer após o consumo de alimentos que tenham sido contaminados com microrganismos resistentes no ambiente de produção, nos microbiomas dos animais destinados à alimentação ou dos ambientes de processamento, ou na ingestão de água contaminada com material fecal (HÖLZEL; TETENS; SCHWAIGER, 2018; LEONARD *et al.*, 2018; FAO; OMS, 2019; KOUTSOUMANIS *et al.*, 2021).

Figura 4 – Formas de espalhamento da RAM na interface humano-animal-alimentar e ambiental



Fonte: Adaptado de Australia, Department of Health and Aged Care (2017).

Os desafios da RAM não podem ser compreendidos ou abordados separadamente da tripla crise planetária que inclui alterações climáticas, perda da biodiversidade e poluição e dos resíduos, todos impulsionados por padrões insustentáveis de consumo e produção (CAVICCHIOLI *et al.*, 2019; UN, 2022). Impulsionados pelo crescimento populacional, pela urbanização e pela crescente procura de alimentos e cuidados de saúde, podemos esperar um aumento na utilização de antimicrobianos e nas liberações de poluentes no ambiente.

Os padrões de consumo e produção insustentáveis são particularmente preocupantes para os sistemas agroalimentares, mas também para outros setores, como o químico, incluindo os antimicrobianos, que agora estão em risco de perder a sua eficácia (UNEP, 2023).

2.2.1 Mudanças climáticas, perda da biodiversidade e poluição

A crise climática tem numerosos impactos nos ecossistemas, na saúde humana, na saúde animal e na produção de alimentos, que também afetam a RAM (GLG, 2021). Temperaturas mais altas podem estar associadas ao aumento da frequência de transferência horizontal de genes, especialmente aqueles associados à conjugação (LERMAN; TOLMACH 1957; KIM; KIM; KATHARIOU, 2008; VEGGE *et al.*, 2012), bem como a um aumento de infecções resistentes a antimicrobianos (MACFADDEN *et al.*, 2018; MCGOUGH *et al.*, 2020; PEPI; FOCARDI, 2021). A crise climática também contribui para o surgimento e propagação da RAM no ambiente devido à perturbação contínua do ambiente ocasionado por padrões climáticos extremos (BURNHAM, 2021).

Além disso, a frequência, composição e quantidade de poluição contendo agentes bióticos e abióticos podem estar aumentando devido à crise climática. A temperatura, as concentrações de oxigênio e dióxido de carbono no ambiente, também podem influenciar a sobrevivência e proliferação de bactérias e a taxa com que adquirem resistência (LIAO; CHEN; HUANG, 2019; GUPTA, LASKAR; KADOURI 2016; JONG *et al.*, 2020). Os impactos antimicrobianos na biodiversidade microbiana podem, por sua vez, afetar os ciclos biogeoquímicos, como os ciclos do carbono e do metano, que estão diretamente envolvidos na regulação do clima da Terra (BOLLINGER *et al.*, 2021).

A atividade humana e as alterações climáticas alteraram a diversidade microbiana do solo nas últimas décadas, o que também pode promover a circulação de genes de resistência a antibióticos no ambiente (ZHU; PENUELAS, 2020). As comunidades microbianas naturais fornecem importantes funções ecossistêmicas, e os efeitos ecotoxicológicos dos antimicrobianos nos microbiomas ambientais, também podem impactar serviços ecossistêmicos mais amplos, como aqueles relacionados aos ciclos biogeoquímicos e à saúde das plantas (BRANDT *et al.*, 2015).

A biodiversidade e os ecossistemas totalmente funcionais são essenciais para a saúde planetária, e os antimicrobianos ameaçam potencialmente a saúde dos ecossistemas (GRENNI; ANCONA; BARRA CARACCILO, 2018; BANERJI *et al.*, 2019). A elevada diversidade microbiana pode atuar como uma barreira biológica para resistir à propagação da RAM (CHEN, Q. *et al.*, 2019); por outro lado, o uso de antimicrobianos pode ameaçar diminuir a diversidade microbiana e a preservação da biodiversidade microbiológica é essencial para manter um reservatório molecular diversificado para futuras descobertas farmacêuticas (CHEN, J. *et al.*, 2019).

Os microrganismos que habitam ambientes naturais têm sido, e continuarão a ser, fontes de descoberta farmacêutica para o bem-estar, prevenção de doenças e utilização em cuidados de saúde (NEERGHEEN-BHUNJUN *et al.*, 2017). Visto que a biota do solo é um componente essencial da saúde planetária (ZHU *et al.*, 2019; ZHU; PENUELAS, 2020), manter a diversidade microbiana do solo e identificar as forças que moldam a diversidade microbiana deste, é crucial para preservar este legado transmitido pelo solo (NEERGHEEN-BHUNJUN *et al.*, 2017; ZHU; PENUELAS, 2020). Mudanças na diversidade microbiana em habitats naturais são um bioindicador de mudanças nas funções dos ecossistemas (GRENNI; ANCONA; BARRA CARACCILO, 2018; JØRGENSEN *et al.*, 2018; BANERJI *et al.*, 2019).

As atividades humanas como a geração de águas residuais, elevam os genes de resistência antimicrobiana (GRAM) nos ambientes afetados, mas poucos estudos examinaram como os microrganismos que transportam esses GRAM persistem e interagem com outras espécies microbianas nos seus arredores (RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2015; BENGTSSON-PALME, KRISTIANSOON; LARSSON, 2018; SMALLA *et al.*, 2018; BANERJI *et al.*, 2019). Embora os impactos nos ecossistemas, a perda de biodiversidade devido à utilização de antimicrobianos e à poluição estão sendo mais bem elucidados, continuam a existir provas muito limitadas de uma ligação causal entre a RAM e os impactos na perda de biodiversidade. Por outro lado, a poluição por produtos químicos com atividade antimicrobiana (por exemplo, produtos farmacêuticos, certos metais, biocidas e outros compostos) pode aumentar a mobilização de GRAM em certos microrganismos e aumentar a RAM em microrganismos no ambiente (MURRAY *et al.*, 2021).

A água, o solo e o ar servem então como veículos para a propagação de micróbios resistentes aos antimicrobianos entre pessoas, animais e outros reservatórios ambientais (por exemplo, ambientes de produção de alimentos, incluindo a aquicultura) (EFSA, 2021). De todo modo, os GRAM são cada vez mais reconhecidos como contaminantes emergentes, com a magnitude de sua ocorrência correlacionada com insumos antropogênicos, o que gera ambientes contaminados que tornam-se fontes de RAM (PRUDEN *et al.*, 2006; SANDERSON *et al.*, 2016; UNEP, 2017).

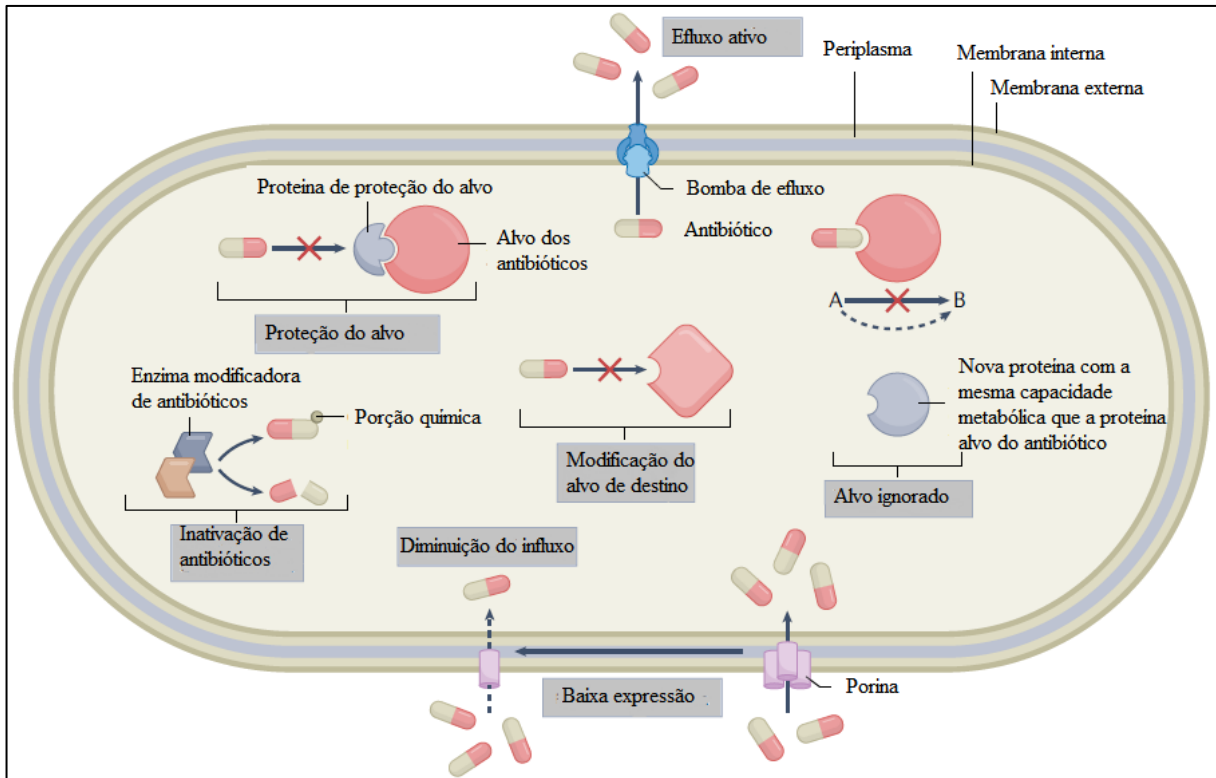
2.3 Mecanismos moleculares de RAM

De modo geral, a RAM é determinada pela expressão de genes de resistência, que individualmente ou em conjunto, determinam o funcionamento de toda maquinaria celular, através da expressão de mecanismos de resistência e de alterações em vias bioquímicas e estruturais (HERNANDO-AMADO *et al.*, 2019). Como já bem descrito na literatura, alguns microrganismos podem expressar resistência intrínseca ou inerente, que consistem em mecanismos de resistência naturais de um gênero ou espécie bacteriana, ou podem expressar resistência adquirida, que é originada a partir de mutações nos próprios genes ou pela aquisição dos genes de resistência de outras bactérias pelos processos de conjugação bacteriana e obtenção de plasmídeo e transposon, via bacteriófago (transdução) ou via ambiente (transformação) (GRAHAM *et al.*, 2019; LARSSON; FLACH 2022; SMITH *et al.*, 2023; DARBY *et al.*, 2023; UNEP, 2023).

Na figura 5 estão mostrados os principais mecanismos de resistência conhecidos atualmente que didaticamente são divididos de acordo com o mecanismo de inativação do antibiótico em: I) redução da permeabilidade (controle da expressão de porinas); II) bomba de efluxo (transporte ativo de antibióticos); III) produção de enzimas que inativam ou modificam antibióticos; IV) alteração de sítio alvo (ligação) do antibiótico e V) bloqueio ou proteção do sítio alvo do antibiótico.

Para atingir o alvo e agir no meio intracelular, os antibióticos devem ultrapassar a membrana externa ou toda a parede celular. Antibióticos hidrofílicos (geralmente moléculas pequenas) devem atravessar a membrana externa por difusão passiva através de proteínas de membrana externa denominadas porinas ou Omp (*Outer membrane proteins*) (MISHRA *et al.*, 2012). A redução da permeabilidade da membrana externa pode ocorrer por alterações na estrutura das porinas ou mesmo pela perda da porina (Figura 5), resultando em permeabilidade mais seletiva ou até mesmo impermeabilidade às drogas, um mecanismo que pode afetar a entrada de antibióticos beta-lactâmicos e fluoroquinolonas (WHITTLE *et al.*, 2021).

Figura 5 – Visão geral dos mecanismos moleculares de resistência aos agentes antimicrobianos



Fonte: Adaptado de Darby *et al.*, (2023).

Além de impedir que os medicamentos entrem na célula, as bactérias podem exportá-los ativamente em um processo conhecido como efluxo (DARBY *et al.*, 2023). Conforme mostrado na figura 5, as bombas de efluxo são proteínas transmembranares que podem transportar uma ampla variedade de compostos tóxicos, incluindo antibióticos, através das membranas bacterianas de maneira dependente de energia, constituindo um mecanismo particularmente importantes da RAM em bactérias Gram-negativas (NAZAROV, 2022).

De modo geral, nas bactérias Gram-negativas que apresentam membrana externa, o sistema de efluxo é geralmente composto por uma proteína transmembrana interna, uma proteína transmembrana externa (uma porina) e uma proteína que faz a ligação dessas duas proteínas transmembrana, compondo assim o sistema de efluxo chamado sistema tripartido ou multicomponente (DU *et al.*, 2018; EBBENSGAARD; LØBNER-OLESEN; FRIMODT-MØLLER, 2020). Por sua vez, em bactérias Gram-positivas, que não têm a membrana externa, o sistema de efluxo é a própria bomba de efluxo, formando assim um sistema de componente simples (SALEHI *et al.*, 2021).

Um mecanismo generalizado de resistência em muitas bactérias patogênicas é a modificação ou inativação do agente antimicrobiano (FORSBERG *et al.*, 2015), que

comumente é dividida em dois mecanismos: (I) inativação do antibiótico por degradação ou (II) modificação pela transferência de um grupo químico, no entanto, ambos os mecanismos são comuns entre as bactérias devido à mobilidade dos genes codificadores (DARBY *et al.*, 2023).

Exemplos da inativação de antibióticos incluem a hidrólise de antibióticos β -lactâmicos por β -lactamases e a ligação de hidroxilases de tetraciclina para inativar tetraciclinas (TOOKE *et al.*, 2019). As β -lactamases evoluíram na natureza em resposta à produção de antibióticos β -lactâmicos por microrganismos e têm sido estudadas desde a década de 1940 (NAAS *et al.*, 2017). Como mostrado no quadro 1, existem quatro classes de β -lactamases (A–D); as classes A, C e D são serino- β -lactamases e os membros da classe B são metalo- β -lactamases dependentes de zinco de acordo com a classificação de Ambler (TOOKE *et al.*, 2019).

Quadro 1 - Classificação das enzimas β -lactamases

Classificação de Ambler	Sítio ativo	Tipo de enzima	Microrganismo hospedeiro	Substrato
A	Serina	β -lactamases de amplo espectro (TEM, SHV), ESBL (TEM, SHV, CTX-M) Carbapenemases (KPC, GES, SME)	Enterobacteriaceae e não fermentadores	Ampicilina, cefalotina Penicilinas, cefalosporinas de 3ª geração Todos os β -lactâmicos
B	Grupo tiol de ligação ao zinco	Carbapenemases (VIM, IMP, NDM-1)	Enterobacteriaceae e não fermentadores	Todos os β -lactâmicos
C	Serina	Cefamicinases AmpC (AmpC) Cefamicinases AmpC (CMY, DHA, MOX FOX, ACC)	<i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> Enterobacteriaceae	Cefamicinas, cefalosporinas de 3ª geração Cefamicinas, cefalosporinas de 3ª geração
D	Serina	β -lactamases de amplo espectro (OXA) ESBL (OXA) Carbapenemases (OXA)	Enterobacteriaceae e não fermentadores	Oxacilina, ampicilina, cefalotina Penicilinas, cefalosporinas de 3ª geração Todos os β -lactâmicos

Fonte: Adaptado de Saini e Bansal (2012).

Em relação ao mecanismo de alteração de sítio, muitos antibióticos se ligam a um alvo primário com alta afinidade, o que geralmente inibe uma função celular essencial e leva à inibição do crescimento ou à morte microbiana (BAQUERO, LEVIN, 2021). Se a estrutura do alvo primário for alterada ou protegida por grupos funcionais químicos, a ligação do antibiótico pode se tornar ineficiente, conferindo resistência ao antibiótico. Um dos principais exemplos são as mutações cromossômicas em regiões determinantes de resistência às quinolonas. Mutações nos genes *gyrA* e/ou *parC* (mais comuns) alteram as enzimas topoisomerase IV e/ou DNA gyrase que atuam na duplicação do DNA bacteriano e são os alvos das quinolonas. Com estas alterações as bactérias escapam da ação das quinolonas, já que a duplicação do DNA ocorre normalmente (BUSH *et al.*, 2020). Outro exemplo é a alteração nas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs, do inglês *Penicillin-Binding Proteins*), enzimas bacterianas que atuam no processo de biossíntese da parede celular bacteriana. Essas alterações podem ter origem em mutações em genes cromossômicos em *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. mitis* e *N. gonorrhoeae* e conferem resistência variada aos antibióticos beta-lactâmicos (PERIASAMY *et al.*, 2020).

Por fim, um outro mecanismo de RAM bastante difundido globalmente é a proteção ou bloqueio que impede a ligação do antibiótico ao sítio alvo. Um exemplo de proteção é a produção de enzimas denominadas Qnr, mediada por genes adquiridos *pmqr* (*Plasmid-Mediated Quinolone Resistance*) que se ligam e protegem a DNA topoisomerase tipo II contra a ação das quinolonas, o que diminui a sensibilidade destas bactérias aos antibióticos dessa classe (RUIZ, 2019). Um exemplo de bloqueio às drogas é o espessamento da parede celular em *S. aureus*, mediado pela expressão de um conjunto de genes cromossômicos, que funciona como uma barreira e bloqueia o acesso de antibióticos como vacomicina e teicoplanina ao sítio alvo, conferindo resistência intermediária para os fenótipos VISA ou GISA, ou mesmo resistência total nos fenótipos designados de VRSA ou GRSA (DARBY *et al.*, 2023).

2.4 Bactérias de interesse clínico

Dentre a grande diversidade de microrganismos de interesse clínico para saúde humana, em 2017 a OMS publicou sua primeira lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos, e trata-se de um catálogo de 12 espécies de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde humana. A lista, conforme mostrada no quadro 2, foi elaborada numa tentativa de orientar e promover a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos antibióticos, como parte dos esforços da OMS para enfrentar a crescente resistência global aos medicamentos antimicrobianos (WHO, 2017).

Essa lista é dividida em três categorias de acordo com a urgência em que se necessitam novos antibióticos: prioridade crítica, alta ou média. O grupo mais crítico de todos inclui bactérias multirresistentes, que são particularmente perigosas em hospitais, casas de repouso e entre os pacientes cujos cuidados exigem dispositivos como ventiladores e cateteres intravenosos (ASOKAN *et al.*, 2019).

Quadro 2 – Lista de agentes patogênicos prioritários da OMS para a P&D de novos antibióticos

Prioridade	Microrganismos	Característica
1 CRÍTICA	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Resistente aos carbapenêmicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente aos carbapenêmicos
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Resistente aos carbapenêmicos produtoras de ESBL
2 ALTA	<i>Enterococcus faecium</i>	Resistente à vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente à meticilina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Resistente à claritromicina
	<i>Campylobacter spp</i>	Resistente às fluoroquinolonas
	<i>Salmonellae</i>	Resistentes às fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Resistente a cefalosporina, resistente às fluoroquinolonas
3 MÉDIA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Resistente à penicilina
	<i>Haemophilus influenza</i>	Resistente à ampicilina
	<i>Shigella spp.</i>	Resistente às fluoroquinolonas

Fonte: Adaptado de: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>

Ressalta-se que os critérios para a seleção dos agentes patogênicos mencionados na lista foram os seguintes: o nível de letalidade das infecções que provocam; se o seu tratamento requer longas internações hospitalares; com que frequência apresentam resistência aos antibióticos existentes quando infectam as pessoas em comunidades; a facilidade para se espalhar entre animais, dos animais aos seres humanos e, entre os humanos; se as infecções que provocam podem ser prevenidas (por exemplo, por meio de uma boa higiene e vacinação); quantas opções de tratamento permanecem; e se novos antibióticos para tratar as infecções que causam já estão sendo pesquisados e desenvolvidos (WHO, 2017).

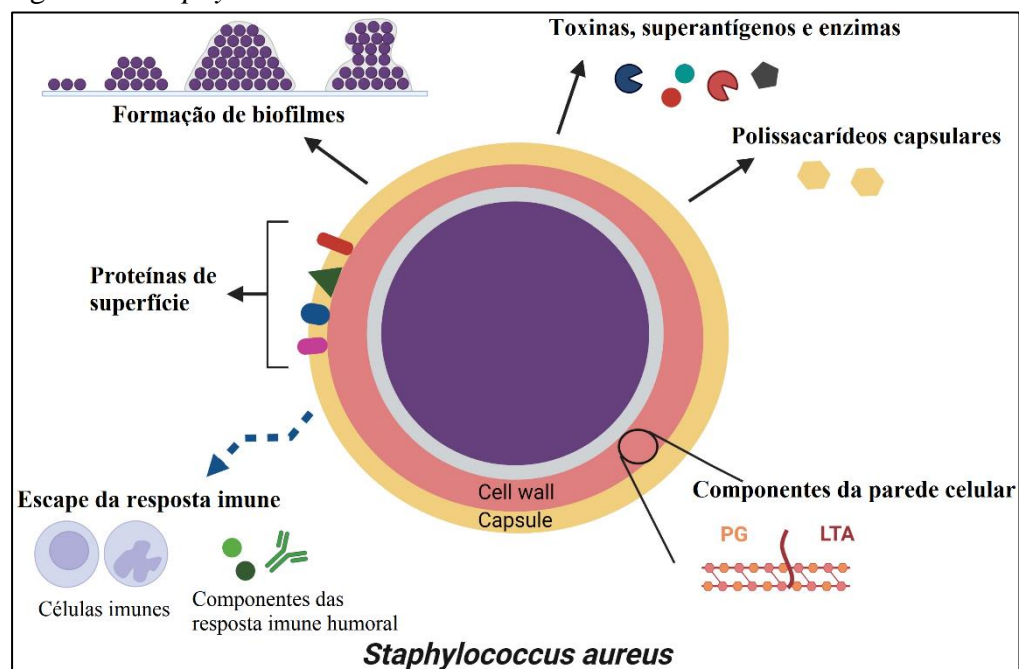
2.4.1 Bactérias Gram-positivas: *S. aureus* e *S. epidermidis*

O gênero *Staphylococcus* compreende patógenos do homem e outros animais. São

cocos gram-positivos, não esporulados, com diâmetro aproximado de 0,5 a 1,5 μm e se dividem em diferentes planos, formando massas irregulares, resistentes ao dessecamento e tolerantes a altas concentrações de sal (até 10% NaCl) quando crescem em meios de cultura (MADIGAN *et al.*, 2016). Este grupo de bactérias é facilmente disseminada pelas partículas de poeira presentes no ar e nas superfícies e, pelo menos duas espécies apresentam importância para o homem: *S. aureus*, uma espécie que exibe pigmentação amarela e *S. epidermidis*, uma espécie não pigmentada, sendo as duas geralmente encontradas na microbiota do trato respiratório superior e da pele, o que torna muitas pessoas potenciais carreadores (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2018). Ambas as espécies são potencialmente patogênicas, porém *S. aureus* é mais frequentemente associado às doenças humanas. Os estafilococos provocam uma variedade de doenças, incluindo acne, furúnculos, pústulas, impetigo, pneumonia, osteomielite, endocardites, meningite e artrite (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021).

Algumas linhagens de *S. aureus* também produzem outras proteínas associadas à virulência (Figura 6), incluindo hialuronidase, fibrinolisinase, lipase, ribonuclease (RNase) e desoxirribonuclease (DNase) (AHMAD-MANSOUR *et al.*, 2021). Certas linhagens foram implicadas como os agentes responsáveis pela síndrome do choque tóxico (TSS, *toxic shock syndrome*), um grave quadro decorrente de uma infecção estafilocócica, caracterizado por febre alta, erupções, vômitos, diarreia e, ocasionalmente, morte (TAYEB-FLIGELMAN *et al.*, 2017).

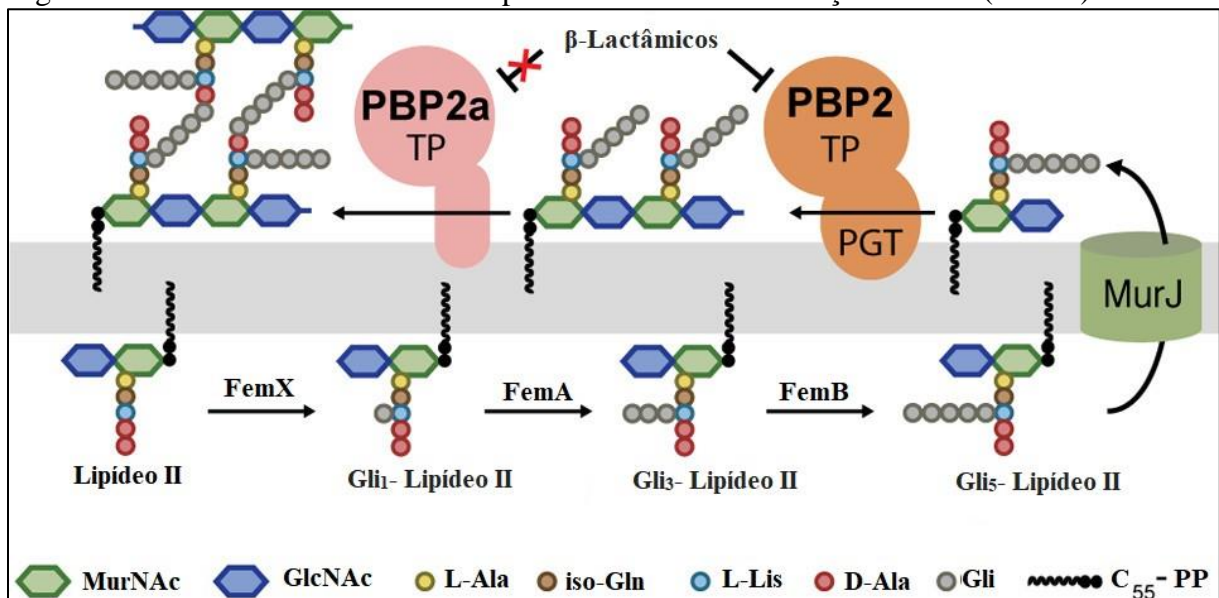
Figura 6 – *Staphylococcus aureus* e fatores de virulência associados



Fonte: Guo *et al.*, (2020).

De acordo com o perfil de sensibilidade a antibióticos, *S. aureus* pode ser dividido em *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA) e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Shore *et al.* (2011), verificaram que a resistência à meticilina ocorre pela alteração da proteína de ligação à penicilina PBP2 em PBP2a (conforme Figura 7), codificada pelo gene *mecA*, presente em um elemento genético móvel chamado *staphylococcal cassette chromosome* (SCCmec). A resistência à meticilina indica a resistência a todos os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, com exceção de cefalosporinas de quinta geração, assim a perda da eficácia a essa classe é relevante, uma vez que os β -lactâmicos possuem um excelente perfil de segurança (SRISUKNIMIT *et al.*, 2017).

Figura 7 – Resistência antimicrobiana pelo mecanismo de alteração de alvo (PBP2a)



Fonte: Srisuknimit *et al.*, (2017).

S. epidermidis é um representante dos estafilococos coagulase-negativos (CoNS) e um colonizador ubíquo da pele humana (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018), considerado como um dos principais causadores de infecções associadas a implantes, endocardite de válvula protética e infecções de marca-passo cardíaco (OLIVEIRA *et al.*, 2018; SCHILCHER; HORSWILL, 2020). As infecções de implantes são graves para o paciente, onerosas para o sistema de saúde e muitas vezes resolvidas apenas com a remoção do dispositivo (OLIVEIRA *et al.*, 2018). *S. epidermidis* além de frequente, é o principal responsável por cerca de 30 a 40% das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) de corrente sanguínea, que geralmente são o resultado de uma infecção prévia de cateter associada a biofilme que se disseminou na corrente sanguínea (SCHILCHER; HORSWILL, 2020). As infecções da

corrente sanguínea são difíceis de tratar e podem levar a complicações graves, incluindo sepse, choque séptico e endocardite infecciosa (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Este tipo de infecção também é uma causa predominante de sepse de início tardio na população neonatal pré-termo, com complicações a longo prazo, incluindo comprometimento do desenvolvimento neurológico e paralisia cerebral (JOUBERT *et al.*, 2022). Coletivamente, *S. epidermidis* continua sendo um patógeno oportunista grave, particularmente para pacientes imunocomprometidos.

O arsenal de fatores de virulência canônicos do *S. epidermidis* é pequeno em comparação com o *S. aureus* e composto por fatores que podem ter um duplo papel no comensalismo e na infecção, incluindo proteases, lipases entre outros (OTTO, 2009). As cepas de *S. epidermidis* geralmente não codificam muitas toxinas ou exoenzimas, embora genes enterotoxigênicos tenham sido identificados em nove cepas de *S. epidermidis* em 2019 (BANASZKIEWICZ *et al.*, 2019), e o sequenciamento de todo o genoma desta bactéria comensal revelou um repertório de genes de virulência maior (ou seja, genes para formação de biofilme, adesinas, hemolisinas e exoenzimas) do que anteriormente estimado, o que é mais provável devido à flexibilidade genética deste organismo (ARGEMI *et al.*, 2019).

Em relação à resistência de *S. epidermidis* à meticilina (designado de MRSE), alguns estudos já tem encontrado cepas resistentes a essa classe de antibióticos e, tem demonstrado que a pele normal de adultos e neonatos, tem sido relacionada como reservatórios naturais de MRSE (MÉRIC *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2018; SALGUEIRO *et al.*, 2019), além disso, a identificação de resistência à meticilina, estar correlacionada com a resistência a outras classes de antibióticos, o que tem contribuído para o compartilhamento de altos níveis de resistência a antibióticos entre MRSA e MRSE (MÅNSSON *et al.*, 2021; DATTA *et al.*, 2021).

2.4.2 Bactérias Gram-negativas: *E. coli* e *P. aeruginosa*

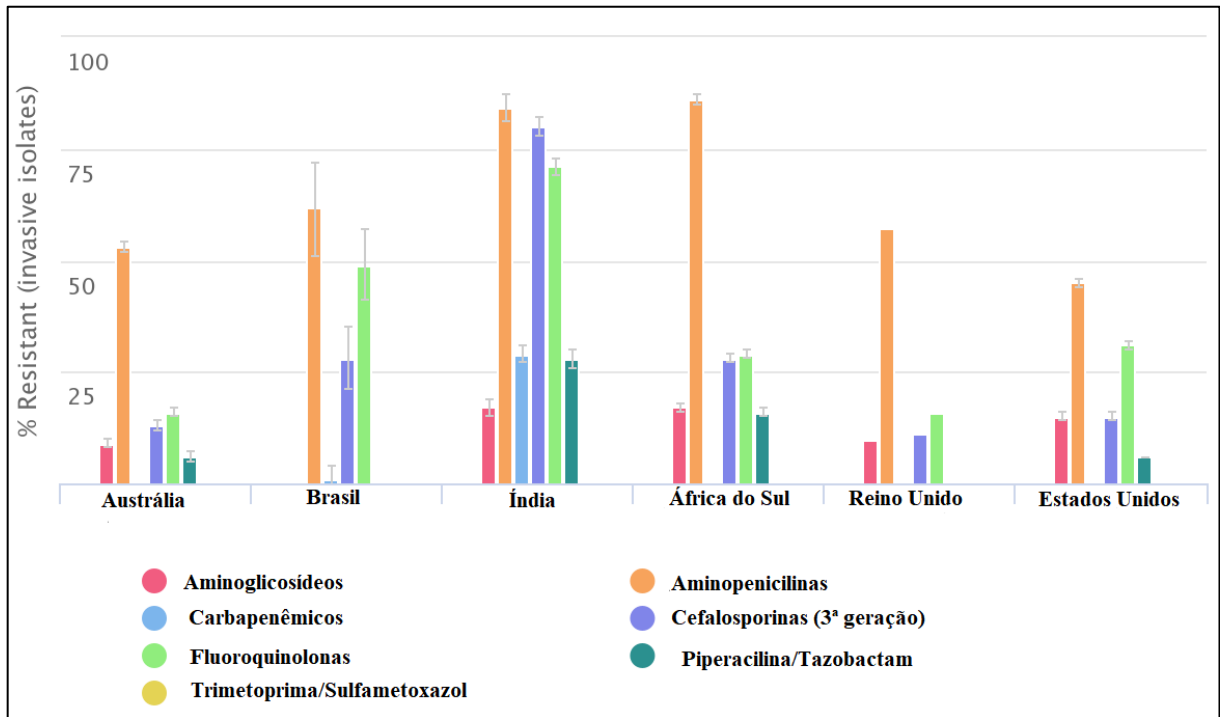
Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo conhecido por fazer parte da microbiota intestinal, mas também pode ser a causa de doenças intestinais e extraintestinais em humanos com ocorrência de centenas de cepas de *E. coli* identificadas, resultando em um espectro de doenças, desde gastroenterite leve e autolimitada até insuficiência renal e choque séptico (MUELLE; TAINTER, 2023). Esta bactéria é uma das principais causas de IRAS, incluindo infecções do trato urinário (ITU) associadas a cateteres e pneumonia associada a ventiladores (PAV), bacteremia e peritonite, entre outras (SLIGL; TAYLOR; BRINDLEY, 2006).

E. coli também pode ser encontrada no solo, em vegetais e na água, bem como em carnes mal cozidas (MADIGAN *et al.*, 2018). Cepas patogênicas causam doenças intestinais em humanos quando ingeridas, sendo que, geralmente, este tipo de doença, é causado por um dos cinco subtipos patogênicos de *E. coli* que são identificados de acordo com seus antígenos O, que é determinado por uma cadeia polissacarídica repetitiva presente na membrana externa do lipopolissacarídeo (LPS) e H que é determinado flagelo bacteriano (PROCOP *et al.*, 2018). Estes subtipos ou patótipos patogênicos de *E. coli* incluem: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), também conhecida como *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e muitas vezes referida como EHEC/STEC, *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) (LEEKITCHAROENPHON *et al.*, 2021).

Em relação a RAM, esta espécie bacteriana representa um importante reservatório de GRAM devido à sua alta capacidade de acumulá-los, principalmente por meio de transferência horizontal de genes (POIREL *et al.*, 2018). Além disso, descobriu-se que *E. coli* desempenha papéis importantes na disseminação de GRAM e mediam a resistência a antibióticos de último recurso (carbapenêmicos, colistina e tigeciclina) em bactérias Gram-negativas, o que pode levar à indisponibilidade de antimicrobianos tanto na medicina humana quanto na veterinária (HE *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2016; KUMARASAMY *et al.*, 2010). De acordo com relatórios da OMS (WHO, 2014) e do CDC (CDC, 2019), *E. coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) também é um grande problema de saúde global, por isso essa bactéria tem sido comumente utilizada como biomarcador para monitorar a RAM em ambientes hospitalares e até mesmo em fazendas de gado, para controle na saúde animal e ambiental.

De acordo com a figura 8, *E. coli* multirresistente tem sido observado em vários países nas últimas décadas. O mecanismo predominante de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em *E. coli* é a produção de ESBL transmitidas por plasmídeos (WU *et al.*, 2021). Desde o primeiro relato no início dos anos 1980, os organismos produtores de ESBL se espalharam por todo o mundo (FRANICZEK *et al.*, 2012). Os genes ESBL são frequentemente codificados em plasmídeos transferíveis que codificam genes de resistência, e a aquisição desses genes resistentes por isolados comensais ou fecais leva, por sua vez, a patógenos multidrogas resistentes (MDR) (SHERCHAN *et al.*, 2015).

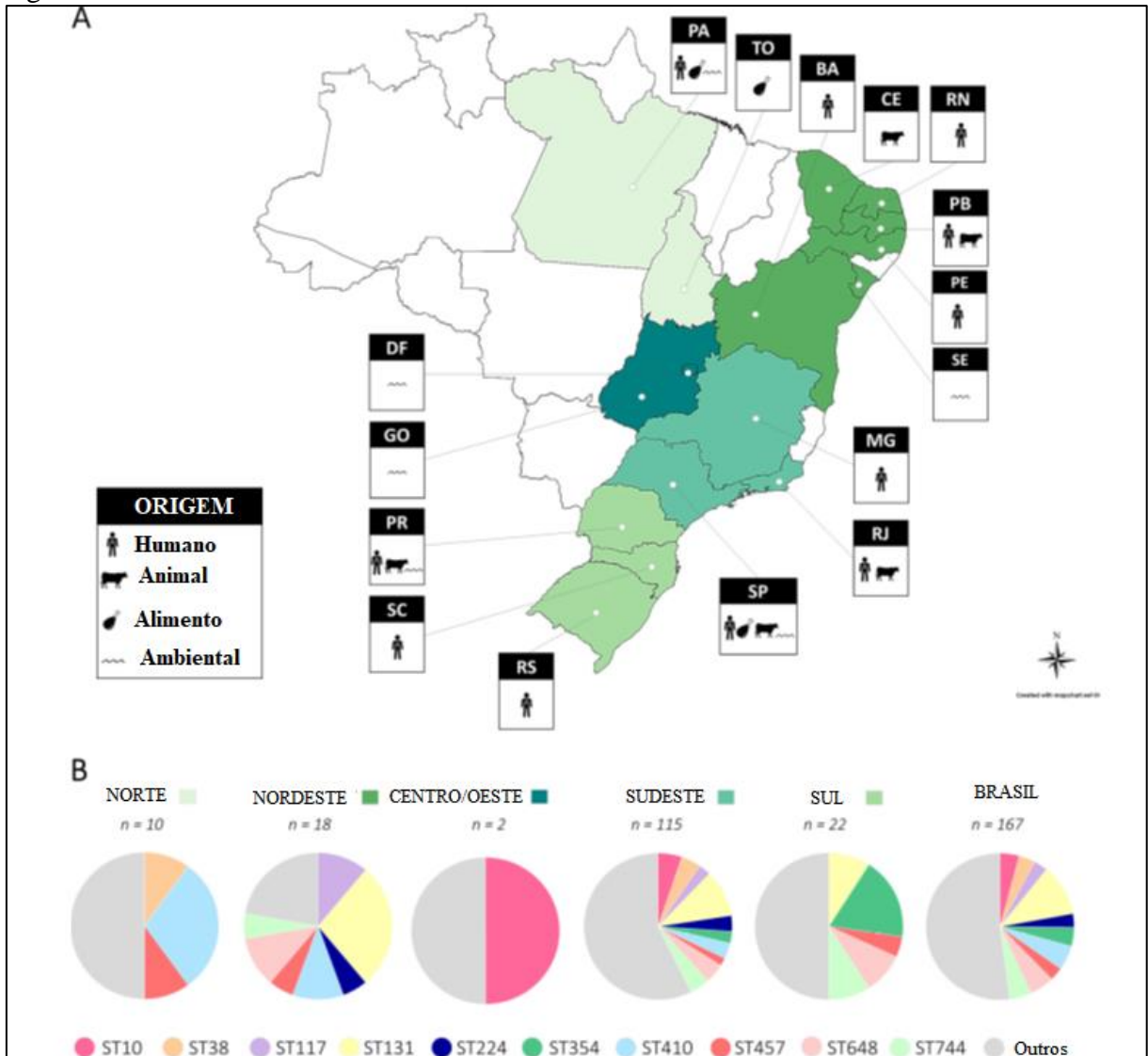
Figura 8 – Resistência de *E. coli* as principais classes de antibióticos em alguns países pelo mundo



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

Dados epidemiológicos mostram que a rápida disseminação de patógenos de prioridade crítica no Brasil como é o caso de *E. coli*, é notavelmente preocupante, considerando sua dimensão continental, a diversidade do comércio internacional, a produção pecuária, e viagens humanas. Estudo recente realizado por Fuga *et al.* (2022), mostraram que de 167 cepas analisadas de *E. coli*, 54 apresentaram resistência a fluoroquinolonas, aminopenicilinas, colistina, cefalosporinas de amplo espectro e/ou carbapenêmicos clinicamente relevantes, além disso, 42 amostras foram classificadas como cepas multirresistentes. Como mostrado na figura 9, a disseminação dos clones internacionais ST10, ST38, ST117, ST131, ST224, ST354, ST410, ST457, ST648 e ST744 que estão relacionadas a multirresistência, foram confirmados em todas as regiões do Brasil, em pelo menos 16 estados sendo que a circulação estava presente tanto em humanos quanto em animais, no ambiente e em alimentos.

Figura 9 – A) Distribuição geográfica de cepas de *E. coli* (n = 167) circulantes na interface homem-animal-ambiente-alimento em todas as regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Sudeste); (B) Representação dos principais clones internacionais circulando nas regiões brasileiras



Fonte: Adaptado de Fuga *et al.*, (2022).

P. aeruginosa também é uma bactéria Gram-negativa aeróbia em forma de bastão que pode ser isolada da maioria dos ambientes, incluindo solo, plantas e tecidos de mamíferos (TUON *et al.*, 2022). Esta bactéria pode sobreviver na água, diferentes superfícies e dispositivos médicos usando seus fatores de ligação como flagelos, pili e a formação de biofilmes, sendo, portanto, abundante em ambientes naturais e artificiais, incluindo hospitais, lagos e ralos de pias domésticas (SHARIATI *et al.*, 2018).

P. aeruginosa é um patógeno oportunista MDR que causa infecção aguda ou crônica que incluem a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), fibrose cística, sepse e pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) (ROSSI *et al.*, 2021; JURADO-MARTIN;

SAINZ-MEJIAS; MCCLEAN, 2021; CENDRA, TORRENTS, 2021). Além disso, também é um dos principais patógenos que causam infecções hospitalares, que são amplamente encontrados em dispositivos médicos (ventilação) porque tendem a colonizar este tipo de superfície (JANGRA; SHARMA; CHHILLAR, 2022). Recentemente, *P. aeruginosa* foi listada como um dos patógenos de nível crítico para descoberta de novos antibióticos, além de integrar o grupo denominado de ESKAPE, que inclui *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* (DAIKOS *et al.*, 2021).

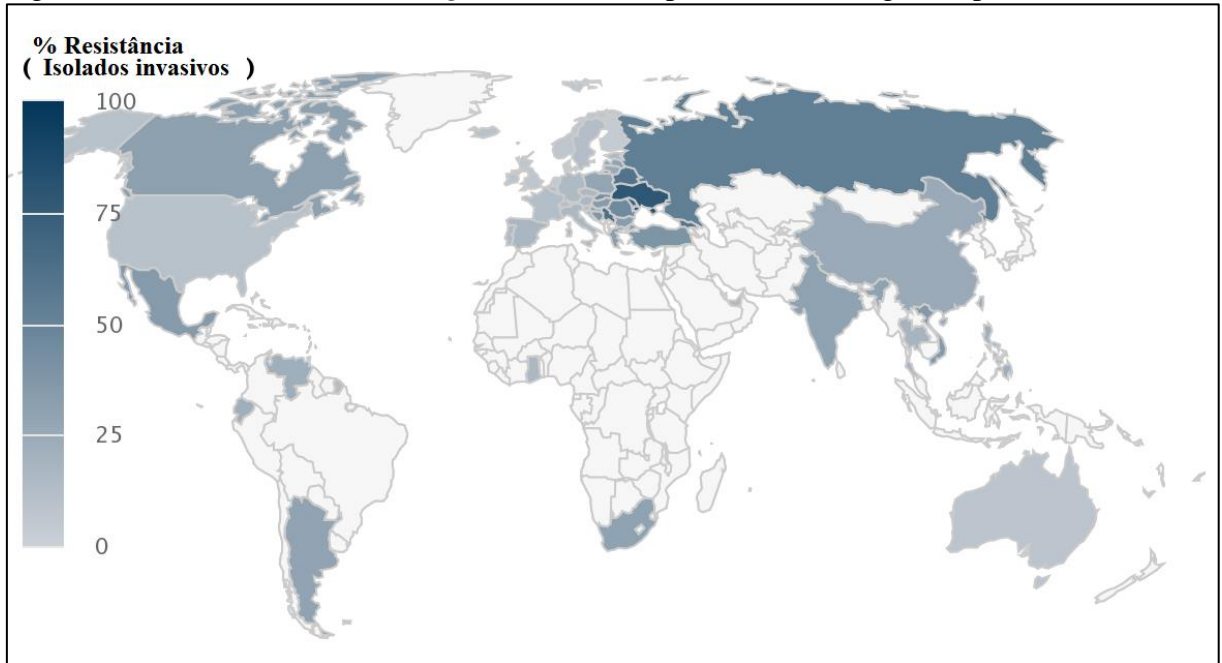
P. aeruginosa é capaz de se adaptar ao ambiente adverso dos hospedeiros por meio da secreção de uma variedade de fatores de virulência, que contribuem para o sucesso da infecção e para o surgimento da doença (VIDAILLAC; CHOTIRMALL, 2021). Em primeiro lugar, o lipopolissacarídeo (LPS) é um componente estrutural de superfície importante para proteger a membrana externa sendo que a endotoxicidade do lipídeo A, um componente do LPS, permite danos nos tecidos, fixação e reconhecimento pelos receptores do hospedeiro (PARK *et al.*, 2022), sendo que este mesmo LPS pode também estar relacionado à tolerância a antibióticos e à formação de biofilme (CHAMBERS; CHERNY; SAUER, 2017). Em segundo lugar, as proteínas de membrana externa (OMP) contribuem para a troca de nutrientes, adesão e resistência a antibióticos (SABNIS *et al.*, 2021). Além disso, a resistência a medicamentos causada pela formação de biofilmes está associada ao flagelo, pili e outras adesinas (OZER *et al.*, 2021).

Em terceiro lugar, existem seis tipos de sistemas de secreção, incluindo flagelos (associados a T6SS), pili (T4SS) e sistema de secreção tipo 3 de componentes multitoxinas (T3SS), que funcionam na colonização do hospedeiro, adesão e sinalização quimiotática de resposta. Finalmente, exopolissacarídeos, como alginato, Psl e Pel, podem ajudar a facilitar a formação de biofilmes, ao mesmo tempo em que interferem na resposta imune (OZER, *et al.*, 2021).

A capacidade de resistência de *P. aeruginosa* ao efeito dos antibióticos comumente usados tem aumentado exponencialmente ao longo dos anos (KUNZ-COYNE *et al.*, 2022). O desenvolvimento de resistência pode ocorrer através de mutações genéticas específicas ou pela aquisição de genes resistentes a antibióticos. Mecanismos de competência, como a THG por meio de elementos móveis, auxiliam no processo de multirresistência (MDR) em bactérias, que pode evoluir ainda mais para resistência extrema a medicamentos (XDR) (TENOVER *et al.*, 2022). A prevalência de *P. aeruginosa* MDR está aumentando globalmente, com uma variação de 15% a 30% em todo o mundo, com destaque para as cepas circulantes resistentes aos

carbapenêmicos que chega a ultrapassar os 75% na Ucrânia (Figura 10) (DOU *et al.*, 2017; HORCAJADA *et al.*, 2019; AL HAMDAN *et al.*, 2022; MOHAMED *et al.*, 2022).

Figura 10 – Resistência de *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos em algumas partes do mundo



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

Apesar de não aparecer no mapa da resistência da figura 10, a redução da suscetibilidade a antimicrobianos em *P. aeruginosa* tem sido observada no Brasil e em outros países há anos (MATOS *et al.*, 2016; SORLI *et al.*, 2017), destacando a diminuição da sensibilidade aos antibióticos de escolha, como carbapenêmicos e cefalosporinas anti-*Pseudomonas* (FIGUEIREDO *et al.*, 2007; KHODARE *et al.*, 2020). Seguindo uma tendência mundial, isolados de *P. aeruginosa* produtoras de Metallo- β -lactamases começaram a ser descritos no Brasil no início dos anos 2000 e são responsáveis pelo aumento dos níveis de resistência aos carbapenêmicos. Eles são semelhantes aos observados em outros locais, e cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos são frequentemente detectadas abrigando variantes *bla*IMP, *bla*VIM e *bla*NDM em amostras de várias fontes, em contraste, o gene variante *bla*SPM-1, que destaca-se pelo seu caráter endêmico (NEVES *et al.*, 2019; GARCÍAS-BETANCUR *et al.*, 2021; de OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2022).

2.5 Biofilmes bacterianos

Na natureza, as bactérias existem em dois estilos de vida distintos: bactérias planctônicas unicelulares ou agregados microbianos (biofilmes) (FLEMMING *et al.*, 2023). De modo geral, os biofilmes são compreendidos como comunidades microbianas sésseis que podem se fixar na superfície de objetos ou serem incorporadas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) autoproduzidas na forma de agregados (WANG; BIAN; WANG, 2022). Estudos demonstraram que a substância polimérica extracelular (SPE) do biofilme é composta principalmente por uma mistura complexa de biomoléculas como polissacarídeos, DNA extracelular (eDNA), proteínas e lipídios (SHARMA *et al.*, 2019; ARNAOUTELI *et al.*, 2021).

Os biofilmes são onipresentes e desempenham papéis críticos em ambientes naturais e antropogênicos. As comunidades de biofilmes são importantes para o funcionamento do ecossistema, impulsionando processos biogeoquímicos, ciclagem de nutrientes e biorremediação (YADAV, 2017; FLEMMING; WUERTZ, 2019). Microrganismos benéficos formam biofilmes associados a hospedeiros humanos, animais e vegetais como parte essencial do holobionte (de VOS, 2015; CARTHEY *et al.*, 2020). Por outro lado, os biofilmes também são responsáveis por cerca de 80% das infecções bacterianas (JAMAL *et al.*, 2018), que são muitas vezes extremamente difíceis de tratar devido aos mecanismos de proteção específicos fornecidos pelo biofilme (PENESYAN; GILLINGS; PAULSEN, 2015). Da mesma forma, a formação de biofilme tem consequências negativas em muitos ambientes industriais (SCHULTZ *et al.*, 2011; GALIÉ *et al.*, 2018; CHAN *et al.*, 2019).

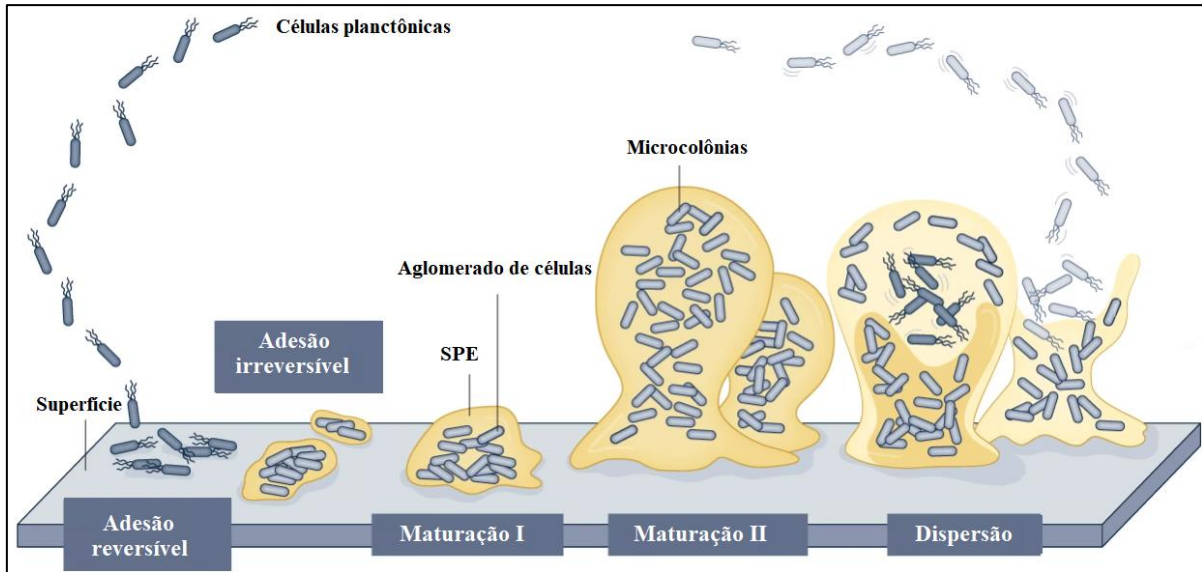
Como as bactérias que vivem em biofilmes apresentam um comportamento marcadamente diferente de seus exemplares planctônicos que são normalmente usadas nos testes de agentes antimicrobianos tradicionais, muitos antimicrobianos apresentam eficácia reduzida contra biofilmes em dosagens convencionais (CHOI *et al.*, 2023). Especificamente, a terapia antimicrobiana tradicional é muitas vezes ineficaz contra infecções crônicas e localizadas, com infecções relacionadas a biofilmes conferindo até 1.000 vezes mais resistência do que infecções causadas por organismos planctônicos (MAH; O'TOOLE, 2001). O tratamento de infecções crônicas tem se concentrado em quimioterapia antimicrobiana precoce e agressiva de altas doses e/ou de longo prazo, apesar das evidências clínicas limitadas para a erradicação do biofilme (HØIBY *et al.*, 2015). Portanto, há uma necessidade urgente de estratégias inovadoras de terapia antibiofilme para enfrentar este desafio crítico e melhorar os resultados clínicos.

2.5.1 Processo de formação do biofilme

Nos últimos 40 anos, os microbiologistas categorizaram as bactérias como apresentando duas formas de vida na natureza. Em um deles, as bactérias aparecem como células únicas, independentes e flutuantes (planctônicas); no outro, as bactérias estão organizadas em biofilmes. Além disso, o termo “biofilme” referia-se originalmente a biomaterial numa superfície; no entanto, mais recentemente, bactérias agregadas não ligadas à superfície também foram reconhecidas como biofilmes (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1987; MCCOY *et al.*, 1981; FLEMMING *et al.*, 2021). Da mesma forma, agregados não associados à superfície são agora reconhecidos em ambientes clínicos, e as infecções crônicas por biofilme são ainda divididas em infecções associadas à superfície ou não associadas à superfície. Infecções associadas à superfície são comumente observadas em pacientes com implantes ou dispositivos médicos. As infecções não associadas à superfície incluem infecções do trato respiratório com depuração mucociliar do hospedeiro prejudicada (no muco viscoso das vias aéreas em indivíduos com fibrose cística) ou infecções persistentes dos tecidos moles que estão associadas a comorbidades como diabetes e vascularização prejudicada dos membros inferiores predispondo à não-superfície (LEBEAUX *et al.*, 2013).

O modelo original de formação de biofilme é baseado em publicações importantes que investigam biofilmes formados por *P. aeruginosa*. Como mostrado na figura 11, o modelo tradicional propõe que a formação de biofilmes é um processo cíclico que ocorre de maneira progressiva e específica em cinco estágios. O processo é iniciado após o contato superficial por células planctônicas individuais. Vários passos de desenvolvimento são discerníveis, incluindo fixação reversível, fixação irreversível, maturação do biofilme (maturação I e maturação II) e, finalmente, dispersão (SAUER *et al.*, 2002; PETROVA; SAUER, 2009). Durante a fixação reversível, as bactérias fixam-se ao substrato através do polo celular ou do flagelo, seguida de fixação longitudinal. A transição para a fixação irreversível coincide com uma redução nas taxas de reversão dos flagelos, uma redução na expressão do gene dos flagelos e na produção de componentes da matriz do biofilme, uma fase que é caracterizada por células aderidas que demonstram tolerância aos medicamentos (GUPTA *et al.*, 2013).

Figura 11 – Modelo tradicional de formação de biofilmes bacterianos



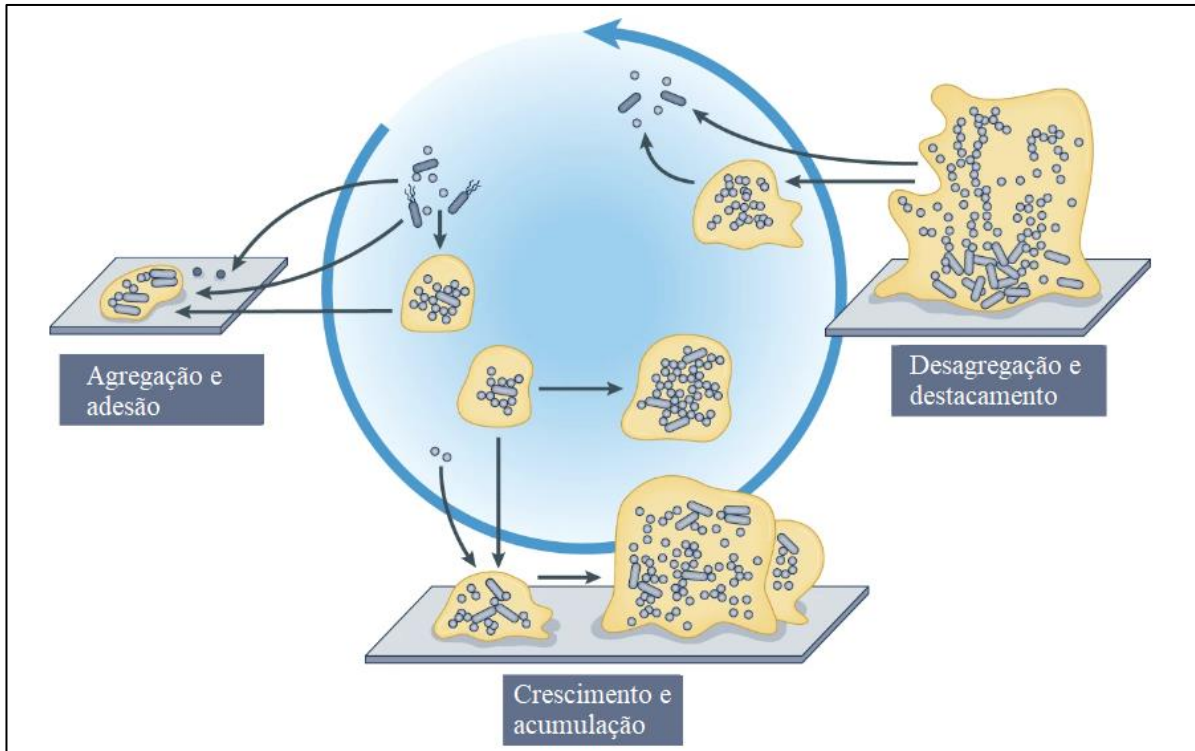
Fonte: Adaptado de Sauer *et al.*, (2022).

Os estágios de maturação do biofilme são caracterizados pelo aparecimento de aglomerados de células incorporadas na matriz do biofilme (estágio de maturação I), que subsequentemente amadurecem completamente em microcolônias (estágio de maturação II) (SAUER *et al.*, 2002; PETROVA; SAUER, 2009). Foi relatado que a dispersão coincide com a diminuição e degradação dos componentes da matriz, com células sendo dispersas e demonstrando maior suscetibilidade aos medicamentos em relação às células do biofilme (Figura 11). Uma deficiência deste modelo tradicional de formação de biofilme é o fato de não levar em conta a formação de agregados não ligados à superfície que são frequentemente observados na clínica (em pacientes colonizados) e no meio ambientais (SAUER *et al.*, 2022).

A visualização de biofilmes e agregados bacterianos em outros sistemas experimentais *in vitro*, no ambiente e em infecções, revela grandes disparidades com o modelo tradicional. À medida que a avaliação de biofilmes de diversos ambientes se tornou mais sofisticada, foram observadas grandes diferenças no microambiente do biofilme monoespécie ou multiespécies em relação a substratos, oxigênio e exposição a produtos secretados (STEWART; FRANKLIN, 2008; DAL; VLIET; ACKERMANN, 2019; KOWALSKI *et al.*, 2020; DAR *et al.*, 2021). De modo geral, as observações encontraram variações que dependiam se as bactérias estavam diretamente adjacentes ao meio de crescimento ou aprisionadas em algum tipo de material biológico (por exemplo, muco, tecido ou sítio de infecção) ou material não biológico (por exemplo, dentro de corrosão ou dispositivos médicos). Dessa forma, Sauer *et al.*, (2022) apresentaram um modelo atualizado e mais abrangente, conforme esquematizado

na figura 12, que descreve, pelo menos, três principais eventos na formação de biofilme: agregação, crescimento e desagregação.

Figura 12 – Modelo conceitual expandido de formação de biofilmes



Fonte: Adaptado de Sauer *et al.*, (2022).

De acordo com as ideias propostas por Sauer *et al.*, (2022), o esquema apresenta a proposta de modelo atualizado para formação de biofilmes, que inclui três eventos principais independente ou não de uma superfície de fixação. Em contraste com o modelo de cinco etapas, o presente modelo considera diferentes habitats, condições e microambientes, bem como o possível influxo de novas células. Além disso, o novo modelo também abrange biofilmes fixados à superfície e não fixados à superfície, com possível troca entre os dois. As bactérias podem entrar no modelo em qualquer ponto, eliminando assim, o esquema restritivo de desenvolvimento que o modelo de cinco passos representa.

As três etapas propostas por Sauer *et al.* (2022), podem ser assim resumidas: (I) agregação e fixação: durante este evento, as bactérias agregam-se umas às outras ou fixam-se a superfícies bióticas e abióticas; (II) crescimento e acumulação: durante este evento, as colônias bacterianas agregadas e aderidas expandem-se pelo crescimento e recrutamento das células circundantes e (III) desagregação e desprendimento: durante esta etapa, as bactérias podem deixar o biofilme como agregados e como células únicas, dependendo do mecanismo. Esses

três eventos caracterizam e representam a maioria, senão todos, os cenários de biofilme, independentemente do tempo e da maturidade e, permitem uma visão mais dinâmica que pode ser usada para explicar a maioria dos cenários da formação de biofilmes em ambientes clínicos, habitats ambientais e industriais.

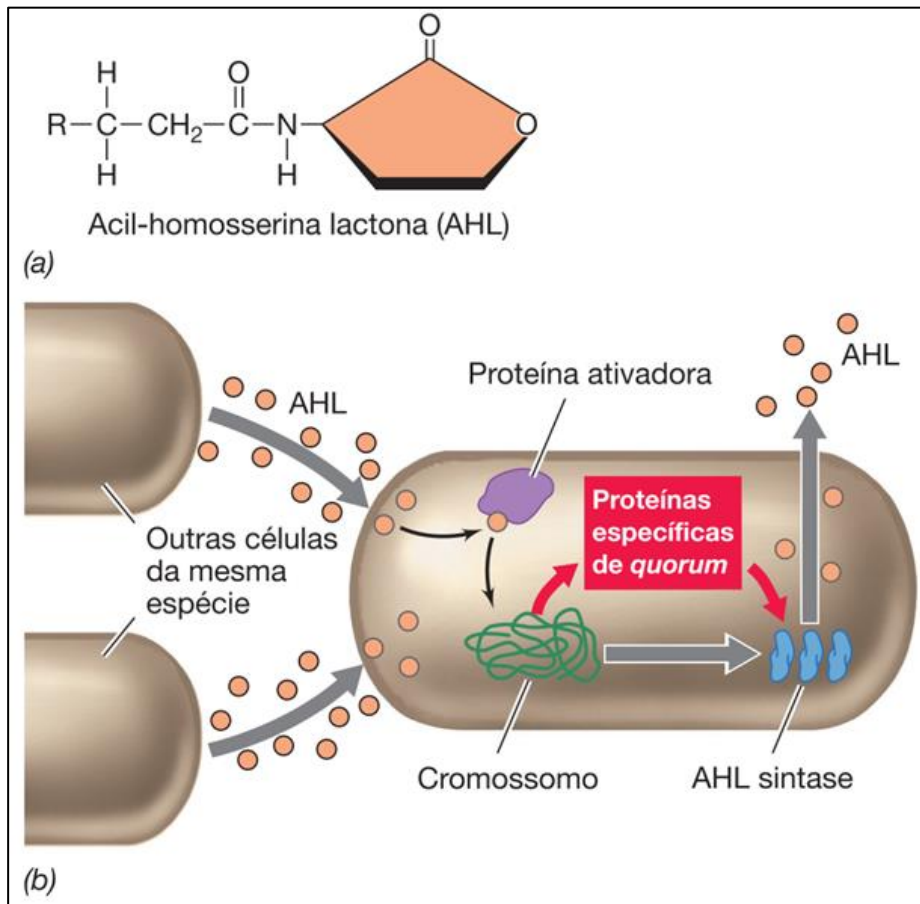
2.5.2 Comunicação celular (Quorum sensing) em biofilmes

Quorum sensing (QS) é um processo de comunicação química bacteriana entre células que depende da produção, detecção e resposta a moléculas de sinalização extracelular denominadas de autoindutores (AI) (MUKHERJEE; BASSLER, 2019). A detecção de QS permite que grupos de bactérias alterem o comportamento de forma síncrona em resposta a mudanças na densidade populacional e na composição de espécies da comunidade vicinal, sendo que, este tipo de comunicação mediado por detecção de *quorum*, constitui um padrão de comunicação do mundo microbiano (BAUER *et al.*, 2017).

Existem diferentes classes de autoindutores. A primeira classe identificada consistiu nas *acyl-homoserinas lactonas* (AHL) (Figura 13a), moléculas distintas, com grupamentos acil de diversos tamanhos, que são encontradas em diferentes espécies de bactérias Gram-negativas. Além disso, muitas bactérias Gram-negativas sintetizam o AI-2 (autoindutor 2; um derivado cíclico de furano) e, ao que parece, ele é utilizado como um autoindutor comum a muitas espécies bacterianas (MADIGAN *et al.*, 2018).

As moléculas de sinalização mais extensivamente estudadas nos últimos anos incluem AHL produzida por bactérias Gram-negativas, boratos de furanose produzidos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (AI-2), peptídeo autoindutor (AIP) produzida por bactérias Gram-positivas e outras moléculas de sinalização. envolvido na detecção de densidade bacteriana, como indol e fator de sinal difusível (DSF) (WATERS; BASSLER 2005; BANDARA *et al.*, 2012; ZARKAN *et al.*, 2020). Quando as moléculas sinalizadoras extracelulares atingem um determinado limiar, elas são reconhecidas por proteínas receptoras bacterianas (figura 13b) para regular a expressão de genes específicos e, uma vez no interior da célula, o autoindutor se liga a uma cinase sensorial, desencadeando o processo de transcrição (ABISADO *et al.*, 2018).

Figura 13 – *Quorum sensing*. a) estrutura de uma acil-homosserina lactona e b) uma célula que expressa a acil-homosserina lactona sintase

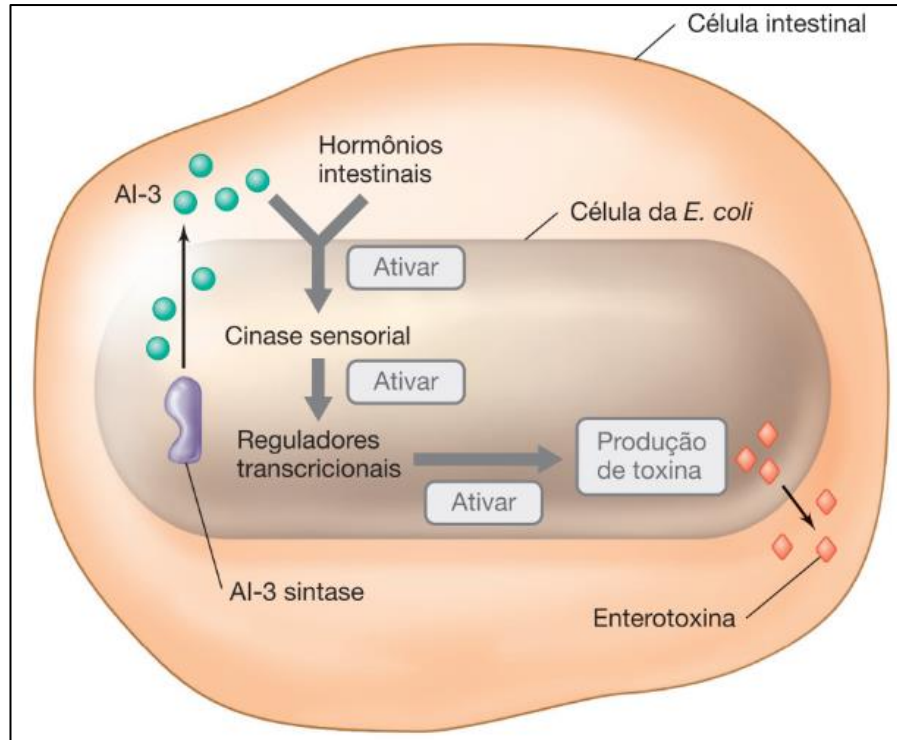


Fonte: Adaptado de Madigan *et al.*, (2018).

Uma variedade de genes é controlada por sistemas de QS incluindo genes de algumas bactérias patogênicas, como por exemplo, a produção da toxina Shiga por *E. coli*, bem como o agente patogênico de origem alimentar, *E. coli* O157:H7 que produz uma AHL, denominada AI-3, que induz genes de virulência, assim, à medida que a população de *E. coli* aumenta no intestino, as bactérias produzem AI-3 enquanto as células intestinais do hospedeiro produzem os hormônios do estresse: adrenalina e noradrenalina (DENAMUR *et al.*, 2021).

Como mostrado na figura 14, todas as três moléculas sinalizadoras se ligam a duas cinases sensoriais diferentes na membrana citoplasmática da *E. coli*, resultando na fosforilação e na ativação de duas proteínas ativadoras da transcrição. Essas proteínas ativam a transcrição de genes que codificam funções motoras e secreção de enterotoxinas, bem como genes que codificam proteínas formadoras de lesões na mucosa intestinal do hospedeiro. Esse é um raro exemplo de um sistema que consegue perceber tanto os sinais químicos bacterianos quanto os eucarióticos para regular a expressão gênica (MADIGAN *et al.*, 2018).

Figura 14 – Produção de fator virulência em *E. coli* produtoras de toxina Shiga



Fonte: Adaptado de Madigan *et al.*, (2018).

É bem conhecido que a formação de biofilme envolve comportamento de grupo e depende de regulação complexa de detecção de QS e um sistema intracelular de segundo mensageiro. Uma série de compostos de moléculas pequenas, como indol, AI-2, AHL, AIP e DSF, estão amplamente disponíveis intra ou interespecíficos com funções reguladoras em uma ampla gama de atividades fisiológicas de bactérias, incluindo a formação de biofilme (WANG; BIAN; WANG, 2022).

Diversos sinais, incluindo a comunicação célula a célula, levam as bactérias a deixarem de viver livremente em suspensão no meio líquido (crescimento planctônico) para se multiplicarem em uma matriz semissólida em biofilmes, dessa forma a sinalização intracelular também desempenha um papel importante na formação do biofilme bacterianos (RINALDO *et al.*, 2018).

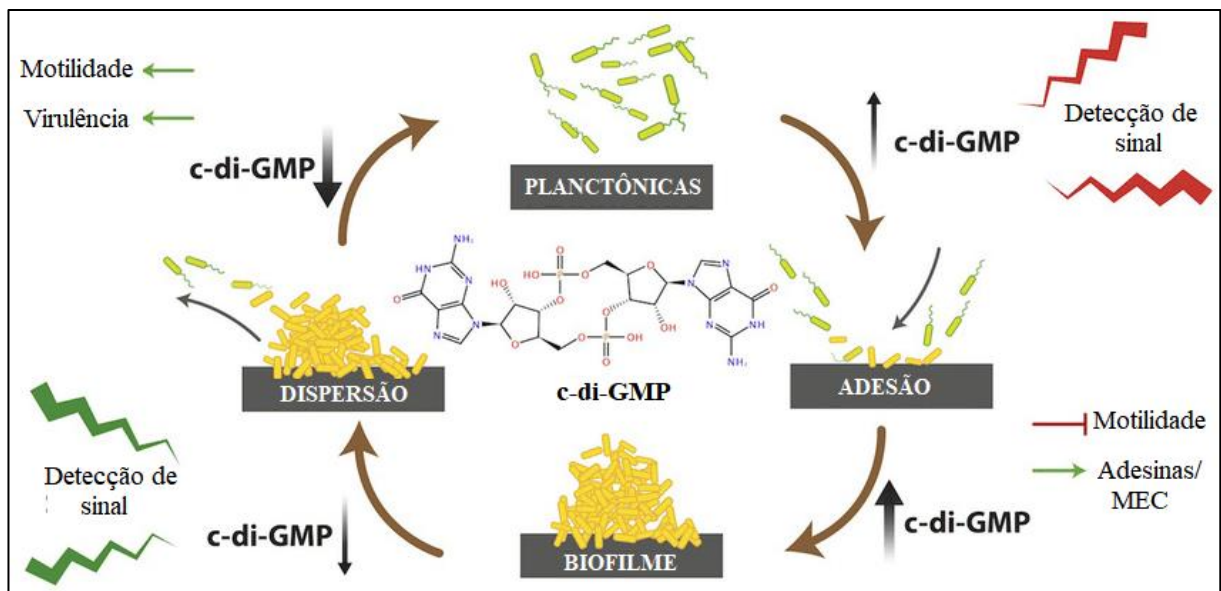
Dentre as moléculas que integram a sinalização intracelular, um segundo mensageiro importante na arquitetura do biofilme é o nucleotídeo regulador *di-guanosina monofosfato cíclico* (c-di-GMP), assim, enquanto os nucleotídeos reguladores desempenham papéis importantes em todos os domínios da vida, o c-di-GMP é produzido somente pelos procaríotos (MADIGAN *et al.*, 2018), e a síntese ou degradação dessa molécula depende dos

estímulos ambientais e celulares, sendo que sua síntese causa numerosas mudanças fisiológicas e a expressão de genes de virulência (WANG *et al.*, 2017).

A figura 15 mostra um esquema da formação do biofilme de *P. aeruginosa*, uma notória bactéria produtora de biofilme, que é assistida pela síntese de um exopolissacarídeo, chamado de Pel, produzido pela proteína receptora de c-di-GMP, PelD, e funciona tanto como suporte primário para a comunidade microbiana quanto como um mecanismo de resistência a antibióticos (VALENTINI; FILLOUX, 2016). Da mesma forma, a expressão dos genes da biossíntese do flagelo em *P. aeruginosa* está sob o controle positivo da proteína que se liga ao c-di-GMP, FleQ (MADIGAN *et al.*, 2018).

Com algumas exceções, altos níveis de c-di-GMP estão associados à formação de biofilme, enquanto a diminuição da concentração intracelular de c-di-GMP desencadeia a dispersão do biofilme (Figura 15) (ROMLING; GALPERIN; GOMELSKY, 2013). Uma vez que as moléculas e vias biossintéticas envolvidas na sinalização de c-di-GMP e QS são encontradas apenas em bactérias, elas representam alvos atraentes para o desenvolvimento de medicamentos que desregulam o ciclo de formação do biofilme (RINALDO *et al.*, 2018).

Figura 15 – Representação esquemática dos efeitos mais comuns dos níveis de c-di-GMP na dinâmica do biofilme. MEC: matriz extracelular



Fonte: Adaptado de Rinaldo *et al.*, (2018).

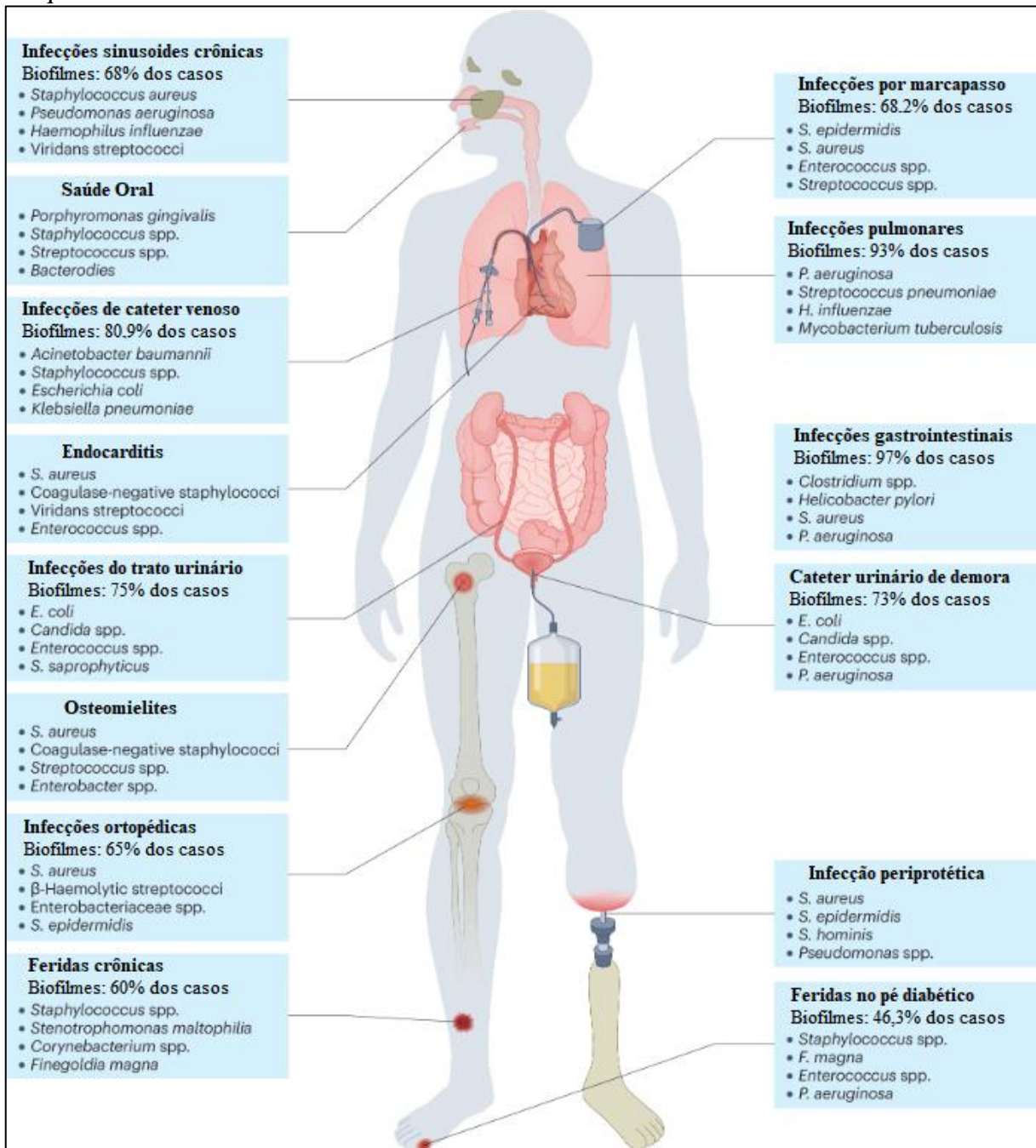
2.5.3 Doenças associadas a biofilmes

Biofilmes microbianos monoespécies e multiespécies, localizados em tecidos ou em corpos estranhos, podem causar infecções persistentes em praticamente todos os órgãos do

corpo (Figura 16) (LEBEAUX *et al.*, 2014). Estas infecções são difíceis de tratar com antimicrobianos, apesar da susceptibilidade bacteriana, e contribuem para a propagação da infecção. Uma das infecções mais comuns causadas por biofilmes microbianos são as infecções intravasculares por cateteres, que muitas vezes levam a infecções da corrente sanguínea, uma causa substancial de mortalidade e de custos associados aos cuidados de saúde (RUPP; KARNATAK, 2018). Outro exemplo são as infecções articulares protéticas e, embora apenas uma baixa percentagem de implantes (especialmente implantes de joelho e quadril) sejam infectados (0,5-1%), as infecções articulares protéticas representam um grande problema de saúde pública devido ao grande e crescente número de cirurgias de implantes (KURTZ *et al.*, 2007). Feridas crônicas, incluindo úlceras de pé diabético, úlceras de pressão e úlceras venosas de perna, também representam um grave problema mundial e os biofilmes são a principal causa do comprometimento da cicatrização (MOSER *et al.*, 2017).

Outros exemplos são as infecções relacionadas a corpos estranhos em dispositivos de oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO) e dispositivos de assistência ventricular esquerda (LVAD), o que podem ter consequências graves quando o LVAD representa terapia em estágio final e não é elegível para substituição (TATTEVIN *et al.*, 2019). De modo geral, e como mostrado na figura 16, quando o corpo estranho conecta partes estéreis do corpo com a microbiota comensal, biofilmes multiespécies podem se formar sobre ou dentro do corpo estranho, de onde podem causar infecções em partes estéreis do corpo (HØIBY *et al.*, 2015).

Figura 16 – Locais de infecções clínicas comuns associadas ao biofilme e os patógenos mais frequentes



Fonte: Adaptado de Choi *et al.*, (2023).

Para infecções de biofilme localizadas em tecidos e em secreções, os fatores predisponentes incluem, por exemplo, uma mutação no gene que codifica a proteína reguladora transmembrana da fibrose cística em pacientes com fibrose cística que leva a secreções viscosas nos pulmões e à remoção mucociliar prejudicada de bactérias aspiradas, defeitos endoteliais de válvulas cardíacas que predispõem o paciente à endocardite infecciosa, condições de pele que permitem o estabelecimento de biofilmes e desenvolvimento de feridas que não cicatrizam, ou

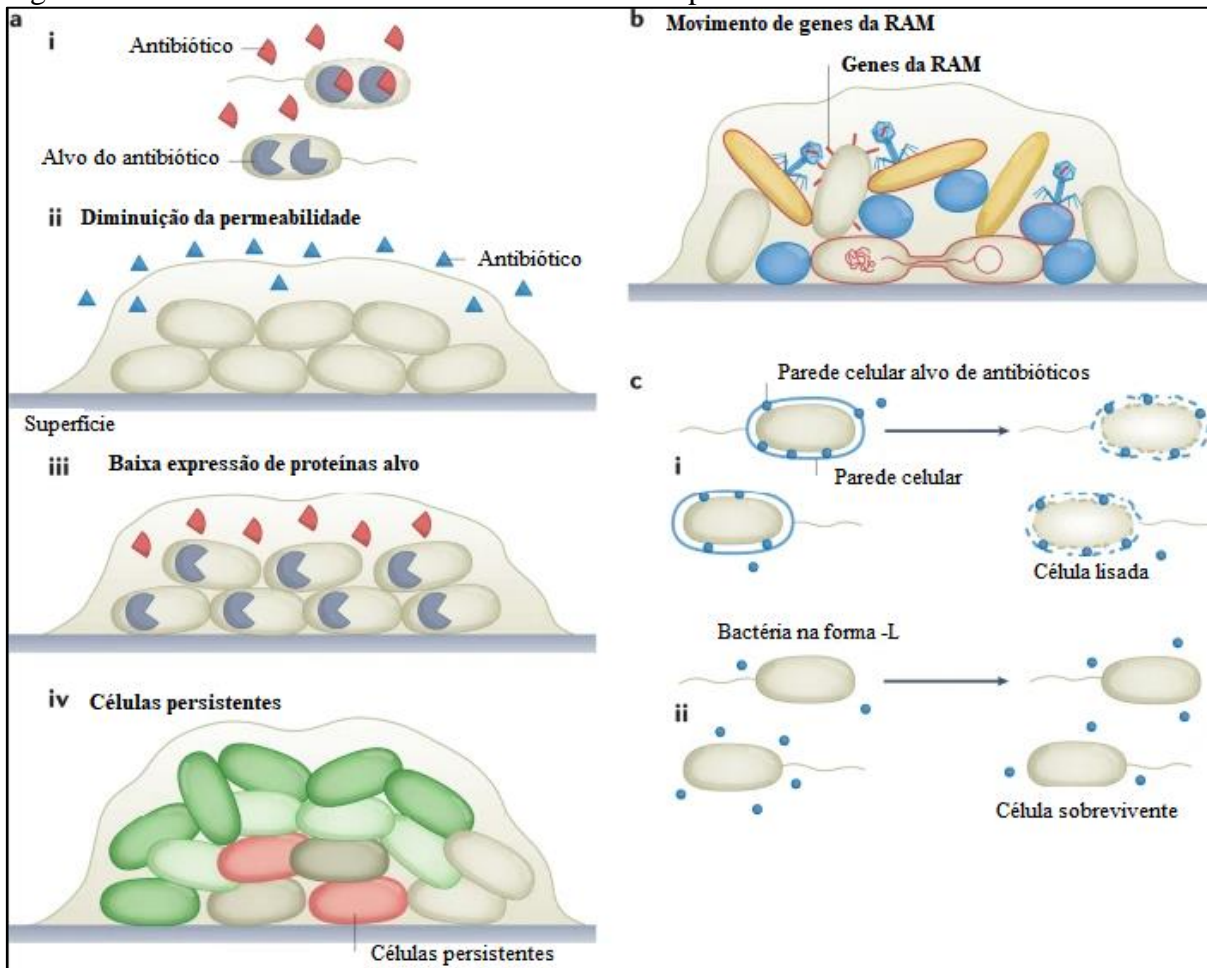
formação de sequestro ósseo após trauma ósseo, gerando um nicho para infecção bacteriana (HØIBY *et al.*, 2015). Tais infecções levam à inflamação contínua e à destruição do tecido infectado (por exemplo, tecido pulmonar na fibrose cística, válvula cardíaca na endocardite e infecções de feridas que não cicatrizam e se espalham para os ossos do pé) (CHOI *et al.*, 2023).

2.5.4 Mecanismos de tolerância em biofilmes

Os biofilmes são inerentemente tolerantes à ação dos antibióticos e alguns apresentam resistência devido a múltiplos fatores (CIOFU *et al.*, 2022). Durante o estilo de vida planctônico, as bactérias são inibidas pelo tratamento com antibióticos (Figura 17, parte **ai**). No entanto, as células dentro de um biofilme exibem um grande grau de heterogeneidade de estados metabólicos e expressão gênica, o que resulta em células individuais sendo resistentes dentro de um biofilme devido à permeabilidade reduzida (parte **aii**), baixa atividade metabólica resultando em expressão do alvo reduzido (parte **aiii**) e produção de um grande número de células persistentes (parte **aiv**) (CIOFU *et al.*, 2022). Os biofilmes também podem sofrer altas taxas de troca genética, permitindo a movimentação de genes de RAM (Figura 17, parte **b**) (STEWART *et al.*, 2019).

Um exemplo notável de como uma mudança no estilo de vida pode resultar em resistência é observado nas bactérias em “forma de L”, que são células que perdem a sua parede celular após exposição ao stress (CLAESSEN; ERRINGTON, 2019). As bactérias na forma L são, conseqüentemente, resistentes aos agentes de direcionamento da parede celular (por exemplo, β -lactâmicos) e a exposição a esses medicamentos seleciona rapidamente bactérias deficientes na parede celular (Figura 17, parte **c**) (MONAHAN *et al.*, 2014).

Figura 17 – Tolerância e resistência no estilo de vida planctônico e em biofilme



Fonte: Adaptado de Darby *et al.*, (2023)

Uma outra mudança que pode ser observada no estilo de vida bacteriano que pode ser induzida pelas condições ambientais, é a formação de células persistentes, que são células dormentes, que muitas vezes têm o seu crescimento interrompido, mas a viabilidade é mantida. As células persistentes são altamente resistentes à ação letal dos antibióticos bactericidas, mas recuperam a sensibilidade normalmente quando a replicação é retomada (BALABAN *et al.*, 2019). Vários mecanismos para a formação de células persistentes foram sugeridos incluindo sistemas de toxina-antitoxina e produção de guanosina-pentafosfato ((p)ppGpp), embora ainda haja muito debate sobre a importância de cada um (PACIOS *et al.*, 2020). Dados recentes demonstraram que as células com baixos níveis de ATP têm maior probabilidade de se tornarem persistentes (MANUSE *et al.*, 2021; SHAN *et al.*, 2017).

A tolerância aos antimicrobianos descreve a capacidade de uma população bacteriana de sobreviver transitoriamente a concentrações letais de antibióticos, o que pode ser devido ao fato das bactérias retardarem processos metabólicos essenciais (BRAUNER *et al.*, 2016) conforme está mostrado na figura 17. Ao adotar um estilo de vida de biofilme, uma

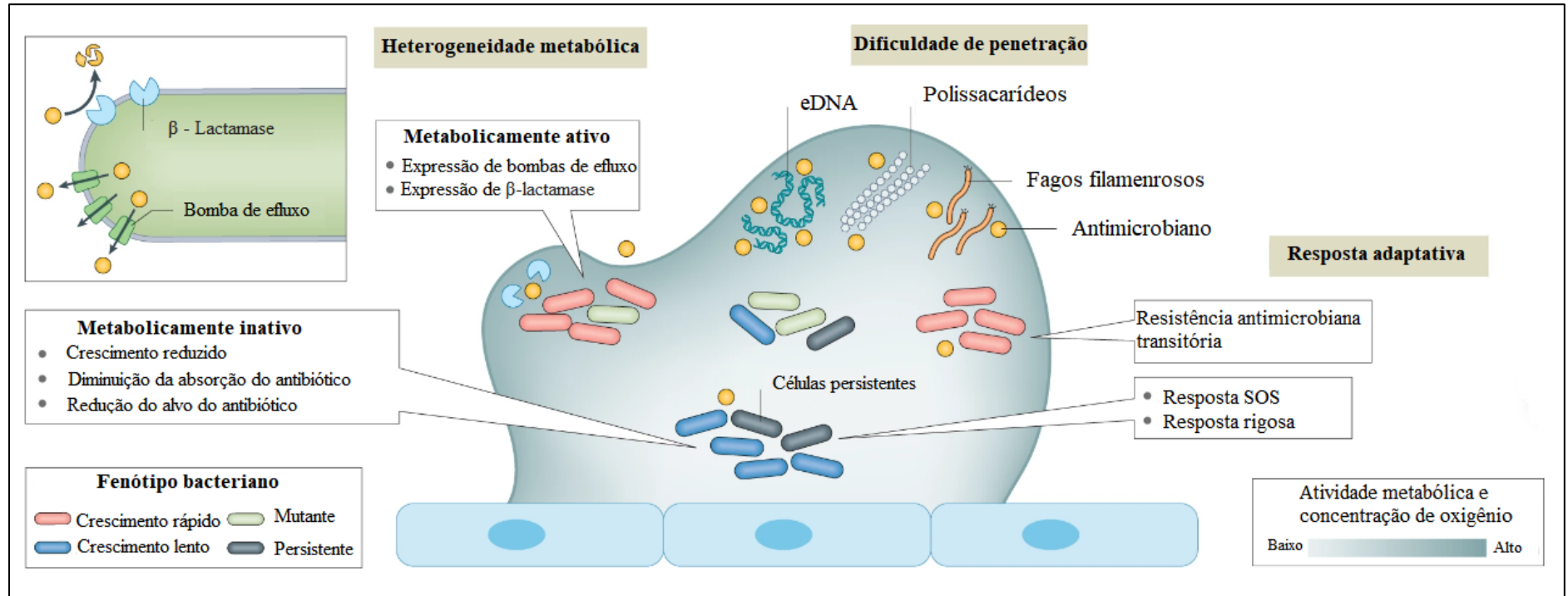
grande parte da população bacteriana cresce lentamente ou não cresce, o que foi proposto para promover a tolerância. Como resultado, o tratamento de biofilmes requer concentrações mais elevadas de antibióticos administrados durante um período mais longo do que a dose e a duração necessárias para o tratamento de células cultivadas planctônicamente (HØIBY *et al.*, 2015).

Em geral, a atividade antibacteriana dos antibióticos depende de sua capacidade de atingir os seus alvos nas células bacterianas em concentrações suficientes. A dosagem de concentrações suficientes de antibióticos contra as bactérias alvo é dificultada nos biofilmes pela presença da matriz, que pode atrasar a penetração das moléculas de antibiótico nas células bacterianas, e pela fraca disponibilidade de alvos bacterianos devido ao crescimento lento das células bacterianas do biofilme. Em geral, quanto mais antigo for o biofilme, mais tolerante ele será aos antimicrobianos (ANWAR *et al.*, 1989; HENGZHUANG *et al.*, 2011; HØIBY *et al.*, 2019).

A suscetibilidade de um biofilme aos antibióticos pode ser expressa pela determinação *in vitro* da concentração de antibiótico necessária para inibir o crescimento do biofilme, ou seja, a concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB), ou para prevenir o novo crescimento após a exposição ao antibiótico, representando a concentração de erradicação mínima do biofilme (CEMB) (CIOFU *et al.*, 2022). Os parâmetros correspondentes para populações planctônicas são a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). As concentrações de antibióticos que representam CIMB e CEMB são mais altas do que aquelas que representam CIM e CBM, com intervalos de 4 a 1.000, dependendo dos patógenos específicos, do antibiótico testado e das condições de teste (meio de crescimento e sistema de teste de suscetibilidade de biofilme *in vitro*) (CRUZ; SHAH; TAMMELA, 2018; MOTTOLA *et al.*, 2016; MACIA; ROJO-MOLINERO; OLIVER, 2014). A consequência da dosagem do tratamento do biofilme com a CIM planctônico é que, apesar da redução no tamanho da população incorporada no biofilme, a infecção persiste e as bactérias retomam o crescimento após a interrupção do tratamento (FERNÁNDEZ-BARAT *et al.*, 2017).

De todo modo, os principais mecanismos de tolerância de biofilmes bacterianos ao tratamento com antimicrobianos que estão descritos na figura 18, também incluem a dificuldade de penetração dos antibióticos em virtude da barreira formada pela matriz de SPE do biofilme; as mudanças no metabolismo celular responsáveis pela origem de variantes de colônias pequenas (SCV) e células persistentes e pelas respostas adaptativas ao estresse conhecidas como resposta oxidativa ao estresse (SOS) e resposta vigorosa.

Figura 18 – Mecanismos de tolerância antimicrobiana do biofilme



Fonte: Adaptado de Ciofu *et al.*, (2022). Os biofilmes são compostos por subpopulações bacterianas caracterizadas por diferentes atividades metabólicas, com populações metabolicamente ativas localizadas na superfície oxigenada em um biofilme e subpopulações não crescentes residindo nas zonas anóxicas centrais. O esquema apresenta três mecanismos conhecidos de tolerância antimicrobiana: heterogeneidade metabólica, penetração prejudicada de moléculas de antibióticos e ativação de respostas adaptativas ao estresse e aos antibióticos. Subpopulações metabolicamente ativas na superfície do biofilme exibem expressão aumentada de bombas de efluxo ou β -lactamases. A subpopulação metabolicamente inativa com baixas taxas de crescimento apresenta expressão reduzida ou insignificante do alvo antibiótico e redução da captação ativa de antibióticos. Componentes da matriz, como polissacarídeos com carga negativa, DNA extracelular (eDNA) e fagos filamentosos, ligam-se a antibióticos com carga positiva, como aminoglicosídeos e polimixinas, retardando sua penetração no biofilme. A ativação de respostas rigorosas e de estresse SOS em populações metabolicamente inativas e a resistência adaptativa a antimicrobianos em populações metabolicamente ativas contribuem para a tolerância dos biofilmes aos antibióticos. Uma resistência transitória ocorre devido à regulação positiva de genes de resistência, tais como genes envolvidos na regulação positiva da produção de β -lactamase ou modificações de lipopolissacarídeos, que prejudicam a penetração da colistina. A ativação de respostas adaptativas ao estresse prejudica a eficácia dos antimicrobianos, contribuindo para a tolerância dos biofilmes aos antibióticos.

2.6 Metalocompostos

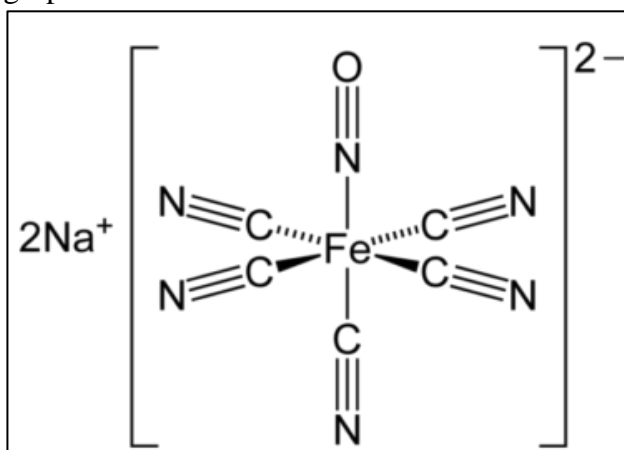
Os metais têm sido usados por suas propriedades antimicrobianas há milhares de anos. A prevalência de vasos de cobre (Cu) e prata (Ag) e seu uso para desinfecção de água e preservação de alimentos é bem conhecida desde a época do Império Persa (ALEXANDER, 2009). No contexto histórico do uso de metais para uso na saúde humana, há registros de Paracelso, um médico suíço, usando prata internamente e nitrato de prata externamente para tratamento de feridas na década de 1520, o que é seguido até hoje através do uso do nitrato de prata (AgNO_3) para prevenir a oftalmia neonatal e folhas de prata para prevenir infecções de feridas cirúrgicas (SHARMA *et al.*, 2022). Além disso, compostos como óxidos de telúrio (Te), magnésio (Mg), arsênico (As), sais de Cu e mercúrio (Hg) foram usados para tratar doenças como lepra, tuberculose, gonorreia e sífilis, no entanto, este uso extensivo de compostos à base de metais continuou até a descoberta da penicilina na década de 1920 (HODGES, 1889; KEYES, 1920; FRAZER; EDIN, 1930).

Em contraste com íons metálicos livremente solvatados ou nanopartículas metálicas, um metalocomposto ou complexo metálico é um arranjo bem definido de ligantes (orgânicos e/ou inorgânicos) em torno de um ou mais centros metálicos, que permitem que suas propriedades possam ser manipuladas de forma semelhante às utilizadas no desenvolvimento de medicamentos convencionais (FREI *et al.*, 2020a). Existe uma grande diversidade de propriedades entre os metais e possibilidades quase infinitas de combinações de ligantes, sendo que o número de ligantes (isto é, o número de coordenação) pode variar de 1 a 28 (LI *et al.*, 2018). Esta gama de números de coordenação leva a uma variedade rica e tridimensionalmente diversa de estruturas de complexos metálicos (MORRISON *et al.*, 2020).

De modo geral, além de rica diversidade estrutural em comparação com compostos orgânicos, os complexos metálicos também exibem diferentes mecanismos de ação que incluem: reações redox; geração de ERO ou de outras espécies ativas; troca de ligantes ou liberação desencadeada de ligantes e inibição competitiva ou covalente de enzimas ou proteínas (BOROS; DYSON; GLASSER, 2020). Um outro ponto a destacar, é que os metais, por serem menos eletronegativos, tendem a formar íons carregados positivamente, e essa propriedade lhes confere maior solubilidade nos fluidos biológicos, dessa forma, os íons formados têm maior afinidade por biomoléculas ricas em elétrons, como DNA e proteínas, e desempenham um papel importante na estabilização/influência de suas estruturas terciárias ou quaternárias (SHARMA *et al.*, 2022).

Dentre a grande diversidade de complexos metálicos conhecidos, o nitroprussiato de sódio (SNP), foi um dos primeiros compostos a ser utilizado no tratamento de crises hipertensivas, mesmo antes de se conhecer o seu mecanismo de ação (estrutura mostrada na Figura 19) (TFOUNI *et al.*, 2010; OSTROWSKI; FORD, 2009). Descobertos em 1850, os efeitos anti-hipertensivo desse metalocomposto foi observado pela primeira vez em 1929, levando-o a ser utilizado como fármaco desde 1950, não sendo, porém, o único composto inorgânicos de nitrosila conhecido (HOTTINGER *et al.*, 2014), no entanto, até hoje, continua sendo o único a ser validado e utilizado como fármaco e, por conta de sua relevância e importância terapêutica do NO, estudos para síntese de compostos doadores de NO vem sendo desenvolvidos (SILVA FILHO *et al.*, 2023).

Figura 19 – Molécula de nitroprussiato de sódio que consiste em um sal de sódio contendo Fe complexado com cinco ânions cianeto e um grupo NO



Fonte: Hottinger *et al.*, (2014).

Atualmente, existem muitos medicamentos à base de platina, ferro, zinco e bismuto, entre outros elementos químicos em uso clínico como mostrado na figura 20, enquanto muitos outros estão alcançando resultados em ensaios clínicos (BARRY; SADLER, 2013). Nas últimas décadas, novas estratégias interessantes surgiram apoiando a visão de que a química inorgânica medicinal amadureceu (FARRELL, 2002; THOMPSON; ORVIG, 2003; BARRY; SADLER, 2013). Uma dessas estratégias explorou o uso de um complexo metálico como uma estrutura inerte para criar estruturas 3D com mais diversidade em torno de uma molécula orgânica ativa, que resultou em novos inibidores para quinases, acetilcolinesterase, trombina, transcriptase reversa do HIV-1 e agentes vasodilatadores (MEGGERS, 2009; SA *et al.*, 2015). Outros casos incluem um composto centralizado no Fe que foi projetado para superar a resistência à

isoniazida no tratamento da tuberculose usando uma estratégia mediada por processos redox, que mostrou resultados bem-sucedidos (SOUSA *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2012; RODRIGUES-JUNIOR *et al.*, 2017).

Figura 20 – Tabela periódica destacando os elementos classificados como metais (marcados em laranja) que são considerados de interesse clínico para desenvolvimento de metalocompostos

1 H 1.0079																	2 He 4.0026
3 Li 6.941	4 Be 9.0122											5 B 10.81	6 C 12.011	7 N 14.007	8 O 15.999	9 F 18.998	10 Ne 20.179
11 Na 22.99	12 Mg 24.305											13 Al 26.982	14 Si 28.086	15 P 30.974	16 S 32.06	17 Cl 35.453	18 Ar 39.948
19 K 39.098	20 Ca 40.08	21 Sc 44.956	22 Ti 47.9	23 V 50.941	24 Cr 51.996	25 Mn 54.938	26 Fe 55.847	27 Co 58.933	28 Ni 58.71	29 Cu 63.546	30 Zn 65.38	31 Ga 69.72	32 Ge 72.59	33 As 74.922	34 Se 78.96	35 Br 79.904	36 Kr 83.8
37 Rb 85.468	38 Sr 87.62	39 Y 88.906	40 Zr 91.22	41 Nb 92.906	42 Mo 95.94	43 Tc (98)	44 Ru 101.07	45 Rh 102.91	46 Pd 106.4	47 Ag 107.87	48 Cd 112.41	49 In 114.82	50 Sn 118.69	51 Sb 121.75	52 Te 127.6	53 I 126.9	54 Xe 131.3
55 Cs 132.91	56 Ba 137.33	*La 138.91	72 Hf 178.49	73 Ta 180.95	74 W 183.85	75 Re 186.21	76 Os 190.2	77 Ir 192.22	78 Pt 195.09	79 Au 196.87	80 Hg 200.59	81 Tl 204.37	82 Pb 207.2	83 Bi 208.98	84 Po (209)	85 At (210)	86 Rn (222)
87 Fr (223)	88 Ra (226)	†Ac (227)	104 Rf (261)	105 Db (268)	106 Sg (271)	107 Bh (272)	108 Hs (270)	109 Mt (278)	110 Ds (281)	111 Rg (288)	112 Cn (288)	113 Nh (284)	114 Fl (289)	115 Mc (288)	116 Lv (293)	117 Ts (294)	118 Og (294)
* Lanthanides		58 Ce 140.12	59 Pr 140.91	60 Nd 144.24	61 Pm (145)	62 Sm 150.4	63 Eu 151.96	64 Gd 157.25	65 Tb 158.93	66 Dy 162.5	67 Ho 164.93	68 Er 167.26	69 Tm 168.93	70 Yb 173.04	71 Lu 174.97		
† Actinides		90 Th 232.04	91 Pa 231.04	92 U 238.03	93 Np (237)	94 Pu (244)	95 Am (243)	96 Cm (247)	97 Bk (247)	98 Cf (251)	99 Es (252)	100 Fm (257)	101 Md (258)	102 No (259)	103 Lr (262)		

Fonte: Adaptado de Frei *et al.*, (2020a).

2.6.1 Atividade antimicrobiana de metalocompostos

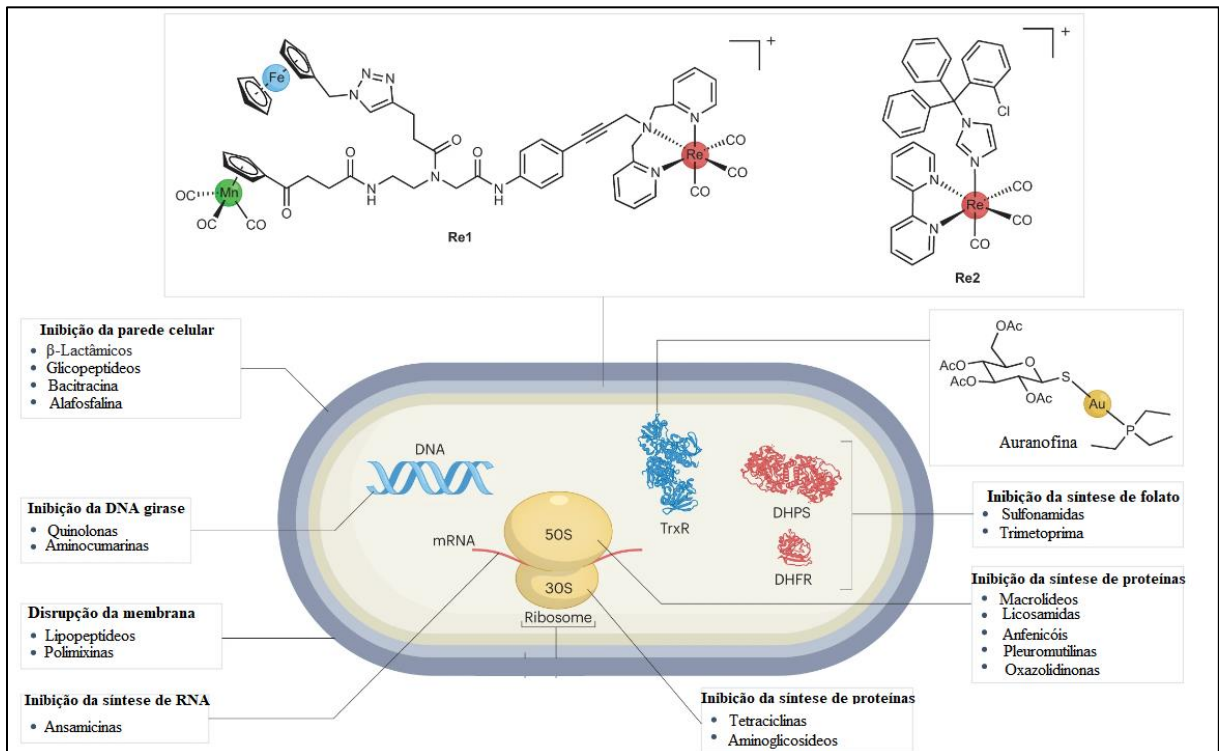
As propriedades antibacterianas dos complexos metálicos foram observadas no início da história da moderna química medicinal inorgânica. Por exemplo, as propriedades antibacterianas de complexos simples de rutênio foram relatadas em 1952 (DWYER *et al.*, 1952). As propriedades antiproliferativas dos complexos de platina que levaram ao desenvolvimento e aprovação do medicamento anticâncer cisplatina, foram observadas pela primeira vez no controle e inibição do crescimento de *E. coli* por Rosenberg em 1965 (ROSENBERG; van CAMP; KRIGAS, 1965). Desde essas publicações, tem havido um fluxo lento, mas constante de estudos sobre as propriedades antibacterianas de complexos metálicos, com um aumento acentuado na última década.

Neste cenário, vários metalocompostos têm sido utilizados no tratamento de algumas doenças como os compostos à base de ouro miocrisina e auranofina, que são usados

para o tratamento da artrite reumatóide, e a prata e seus complexos que também demonstraram efeitos citotóxicos contra fungos e bactérias Gram-positivas/Gram-negativas (SHARMA *et al.*, 2022). Outros exemplos incluem os metalocompostos de cobre e zinco cujas investigações mostraram que o mecanismo de ação responsável pela atividade antimicrobiana pode estar relacionado a produção de ERO que danificam o DNA, desestabilização da membrana plasmática com aumento de sua permeabilidade, ou a desativação de enzimas respiratórias (BORTHAGARAY, 2016; NANDANWAR; KIM, 2019).

Uma das primeiras investigações detalhadas do mecanismo de ação dos metalocompostos foi realizada por Wenzel *et al.*, (2013) e Patra *et al.*, (2015). Neste estudo os autores descreveram a preparação de um complexo trimetálico designado de **Re1** como mostrado na figura 21, contendo rênio, ferro e manganês com uma estrutura de ácido nucleico peptídico. De modo geral, o composto mostrou atividade contra uma bactérias Gram-positivas incluindo *S. aureus* (MRSA), *S. aureus* intermediário à vancomicina (VISA) e *Bacillus subtilis*. As conclusões do estudo apontaram que complexo pode até causar reduções significativos nos níveis de ATP citosólico, no entanto, seu provável mecanismo de ação estaria relacionado a danos causados na membrana plasmática bacteriana.

Figura 21 – Visão geral dos mecanismos de ação de antibióticos e dos metalocompostos Re1 e Re2



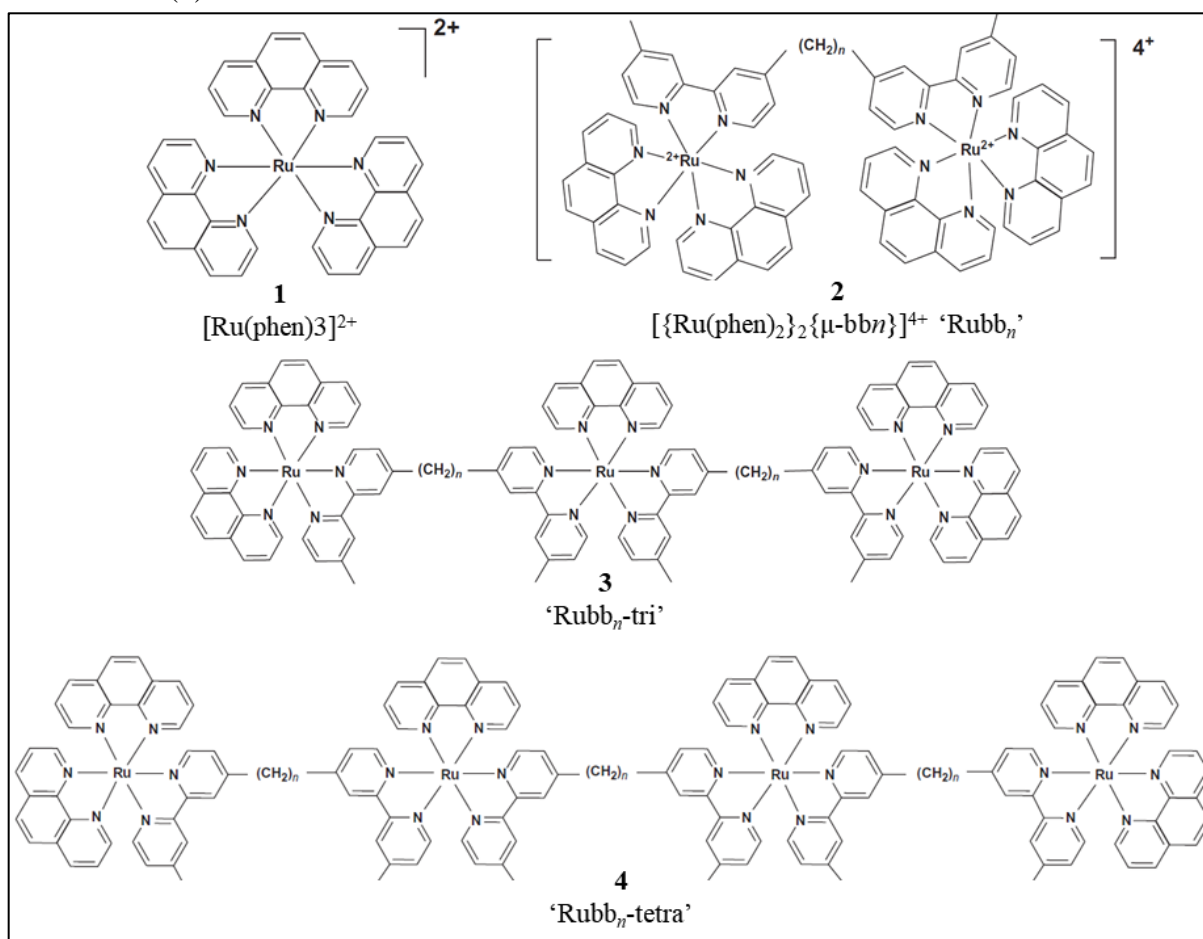
Fonte: Adaptado de Frei *et al.*, (2023).

Em um estudo recente realizado por Mendes *et al.* (2022), o metalocomposto designado de **Re2** (também mostrado na Figura 21) exibiu interação com a membrana plasmática e potencialmente interferiu na síntese de peptidoglicanos, algo que foi percebido através dos altos níveis citoplasmáticos de UDP-*N*-acetilmurâmico-pentapeptídeo, um precursor solúvel associado a biossíntese do peptidoglicano.

2.6.2 Complexos de rutênio

Devido ao sucesso da atividade anticâncer do complexo de platina (Pt) descoberto na década de 1960, tem havido um interesse considerável no desenvolvimento de agentes terapêuticos baseados em outros metais de transição e, em particular, em complexos metálicos que tem o elemento rutênio (Ru) como átomo central (ABREU *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2018). Como mostrado na figura 22 (1), um complexo de rutênio consiste em um metalocomposto que possui um átomo de rutênio (Ru) em uma região central designada de centro metálico, em um dos seus estados de oxidação (II, III, IV) em coordenação com diferentes ligantes que exibem alguma atividade biológica (LI; COLLINS; KEENE, 2015). De modo geral, os complexos de rutênio podem apresentar de um até quatro centros metálicos (Figura 22). Complexos que apresentam um centro são designados de mononucleares, os que apresentam de dois a quatro são designados de di (Figura 22-2), tri (Figura 22-3), e tetranucleares (Figura 22-4) (SOUTHAM *et al.*, 2017).

Figura 22 – Exemplos da estrutura química de complexos de rutênio mono (1), di (2), tri (3) e tetranuclear (4)



Fonte: adaptado de Southam *et al.*, (2017).

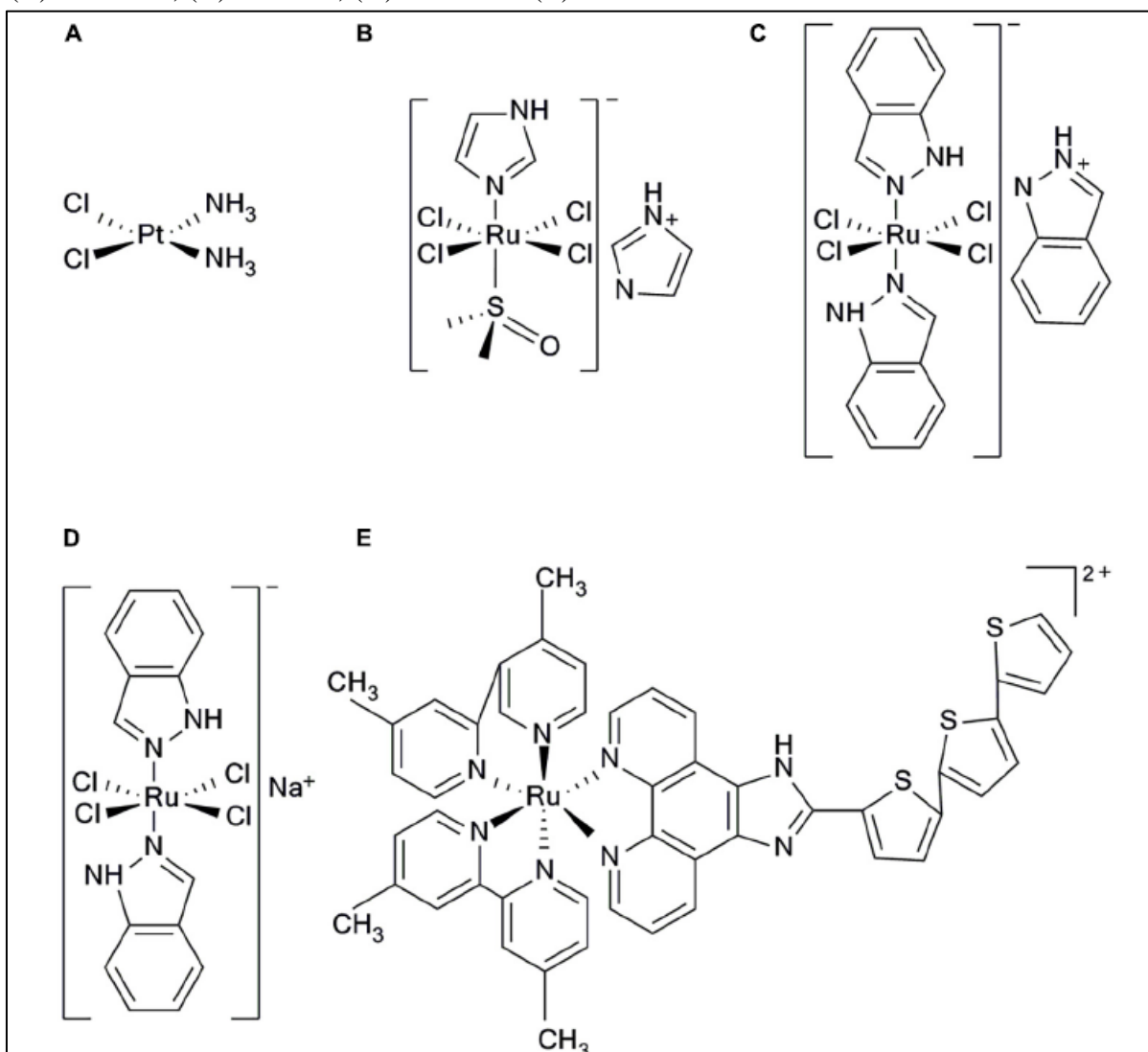
Alguns dos fatores que fazem com que os complexos de rutênio se destaquem na busca por novos fármacos são: (1) sua configuração tridimensional que permite a coordenação e funcionalização de ligantes visando alvos moleculares definidos e; (2) a estabilidade química de seus compostos, tornando possível a coordenação de diferentes tipos de ligantes, desde o mais simples íon cloreto às moléculas orgânicas complexas (SIJA *et al.* 2014; SWAVEY *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018). De acordo com Fischer *et al.*, (2014), um outro fator de interesse na produção de complexos de rutênio é a capacidade de sintetizar estes compostos em estados de oxidação acessíveis em condições fisiológicas, sendo os estados de oxidação Ru(II) e Ru(III) similares aos compostos de platina(II), possibilitando um melhor efeito por mecanismos redox, o que pode possibilitar sua atuação de forma semelhante ao dos complexos de Pt.

Dentre as atividades biológicas demonstradas, os complexos de rutênio mostraram notável atividade antitumoral entre os numerosos compostos metálicos estudados. Várias vantagens sobre os medicamentos de platina (Figura 23A) foram observadas para os complexos de rutênio como: maior eficácia, baixa toxicidade, menor índice de resistência aos

medicamentos, um fato que somado a sua boa estabilidade termodinâmica e cinética, capacidade de reagir em ambientes de hipóxia, pH ácido e alto nível de glutathione, pode torná-los uma nova geração de medicamentos antitumorais clínicos (ABID *et al.*, 2016; THOTA, 2016; SOUTHAM *et al.*, 2017).

Todos os seguintes complexos de rutênio que progrediram para estudos clínicos, NAMI-A {ImH[trans-RuCl₄(dmsO) (imidazol)]} (Figura 23B), KP1019 {indazólio trans-[tetraclorobis(1H-indazol)rutenato(III)]} (Figura 23C), e KP1339 [Na(trans-RuCl₄ (Ind)₂)] (Figura 23D), são complexos de Ru(III) (WEBB *et al.*, 2013). O complexo NAMI-A mostrou potente eficácia inibitória na metástase tumoral, no entanto, os estudos clínicos de fase II revelaram que causou efeitos secundários graves nos pacientes e, portanto, não foram realizadas investigações adicionais (BERGAMO *et al.*, 2003; ALESSIO *et al.*, 2004). KP1019 também não foi investigado devido à sua baixa solubilidade em água, efeitos colaterais graves e eficácia insatisfatória para estudo clínico (HARTINGER *et al.*, 2006, 2008). Para melhorar a baixa solubilidade em água do KP1019, os pesquisadores desenvolveram um complexo de sal de sódio mais solúvel designado de KP1339 (Figura 23D), que também passou para estudos clínicos (HEFFETER *et al.*, 2010). Usando as potentes propriedades fotofísicas e químicas do complexo Ru(II), os pesquisadores sintetizaram o fotossensibilizador TLD 1443 (Figura 23E), (ZENG *et al.*, 2017), um composto que apresentou propriedades fotoquímicas melhoradas e mostrou eficácia terapêutica significativa contra câncer de bexiga, e ainda em 2017 passou para ensaios clínicos de fase II (SMITHEEN *et al.*, 2017).

Figura 23 – Estrutura de cinco complexos metálicos com atividade antitumoral. (A) cisplatina; (B) NAMI-A; (C) KP1019; (D) KP1339 e (E) TLD1443



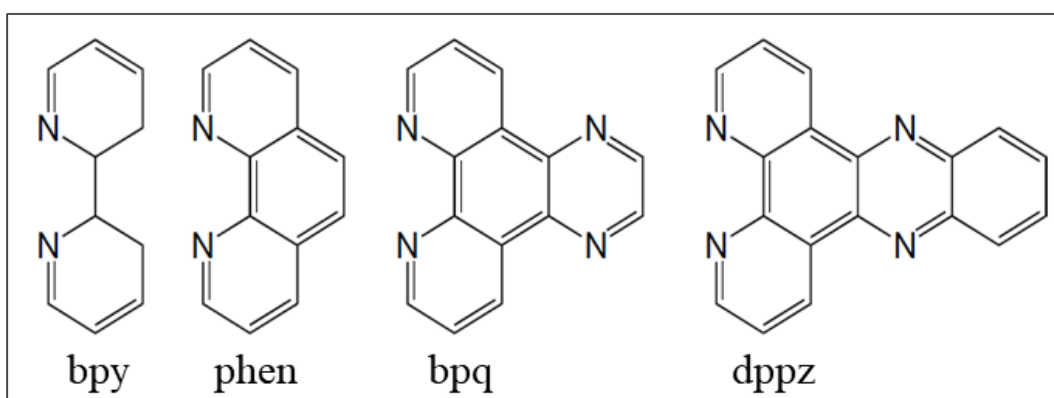
Fonte: Adaptado de Lin *et al.*, (2018).

2.6.3 Ligantes polipiridínicos, fosfínicos e óxido nítrico (NO)

A maioria dos complexos à base de rutênio com um notável desempenho terapêutico, são compostos de coordenação, nos quais as atividades biológicas, dentre elas a antimicrobiana, está associada à sua natureza lipofílica e aos efeitos relacionados à carga, algo diretamente relacionado à natureza de seus ligantes (GHOSH *et al.*, 2021). Uma classe de ligantes que tem ganhado notável atenção são os polipiridínicos, os quais vem sendo utilizados em coordenação com metais de interesse para clínica (CLARK, 2002; WAGENKNECHT; STEMP; BARTON, 2000). Os principais ligantes polipiridínicos utilizados são: bipyridinas (bpy), fenantrolinas (phen), dipiridoquinoxilina (dpq) e dipiridofenazina (dppz =dipirido[2,3-

a:2'3'-c]fenazina) apresentados na figura 24. Como mencionado acima, o DNA é um alvo biológico importante e, moléculas que interagem e danificam o DNA, têm sido demonstradas como agentes citotóxicos com atividades antibióticas e anticancerígenas (LI *et al.*, 2016). Nesse sentido, um ligante piridínico denominado de dppz tem mostrado notável afinidade de ligação ao DNA em uma série de complexos polipiridínicos de rutênio (da SILVEIRA CARVALHO *et al.*, 2017) e, outros ligantes como a bipyridina (bpy) ou fenantrolina (phen), mostraram resultados biológicos promissores, pois exibiram atividades antituberculose e anticancerígenas, quando em coordenação à complexos de rutênio(II) (PAVAN *et al.*, 2011; dos SANTOS *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015; CARNIZELLO *et al.*, 2016).

Figura 24 – Exemplos de ligantes polipiridínicos



Fonte: Adaptado de Viganor *et al.*, (2017).

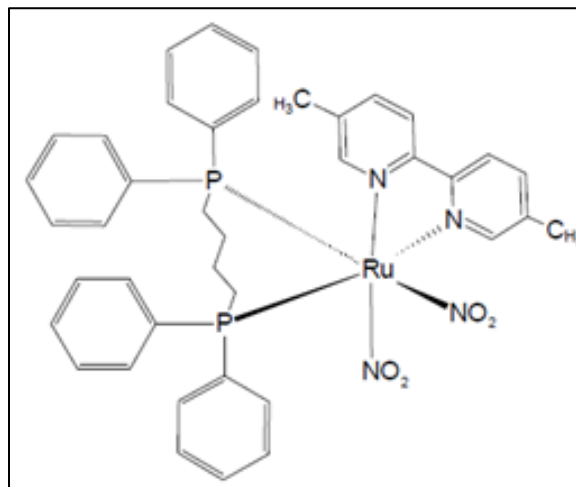
Outra classe de ligantes que vem sendo bastante estudada para a síntese de complexos metálicos com atividade anticancerígena e antimicrobiana, são os ligantes fosfínicos (Figura 24) (da SILVA MIRANDA *et al.*, 2008). Os complexos de fosfinas também possuem uma importante atuação na área medicinal, já que o estudo destes complexos aplicado à medicina foi impulsionado pela descoberta da atividade antiartrítica apresentada pelo complexo [Au(Et3P)(SGluAc4)] (Auranofina) que foi liberado para o uso clínico nos Estados Unidos em 1985 (da SILVEIRA CARVALHO *et al.*, 2017). Desde então as atividades antitumorais deste composto passaram a ser altamente exploradas pelos pesquisadores, e estes estudos resultaram no surgimento de diversos complexos fosfínicos contendo diferentes centros metálicos, que veem sendo submetidos à avaliação de suas atividades antitumoral em diversas linhagens de células, além do mais, atividade anti-malária e antiparasitária também já foram relatadas para estes ligantes (SANNELLA *et al.*, 2008; DEBNATH *et al.*, 2012).

Em relação ao ligante óxido nítrico (NO), sabe-se que esta molécula altamente reativa, participa de diversos processos fisiológicos nos mamíferos, incluindo vasodilatação,

controle de pressão sanguínea, controle de sono, controle de apetite, além de atuar como mensageiro secundário no cérebro e sistema nervoso periférico, função plaquetária dentre outros (HIRST; ROBSON, 2011; CARAMORI, *et al.*, 2015; SILVA FILHO *et al.*, 2023). A sua vasta atuação biológica aliada à facilidade de coordenação com vários centros metálicos com diferentes geometrias, números de coordenação e propriedades eletrônicas, vem estimulando pesquisadores a buscar novos sistemas de entrega (ANDRIANI, *et al.*, 2014). Formalmente, o NO pode assumir três estados de oxidação, NO⁺, NO e NO⁻, e ainda dependendo da natureza do metal (estados de oxidação) este pode se coordenar de 3 maneiras diferentes, (RAYNOR, 1972). Estudos têm demonstrado que nitrosilo e nitrocompostos, apresentam atividade antitumoral apreciável, já que a liberação citotóxica do NO pode ocorrer dentro de células tumorais e levar a morte celular da mesma (SERLI *et al.*, 2003).

Como o NO possui alta afinidade para o rutênio, complexos Ru-NO vem se destacando nas últimas décadas. Um exemplo é o complexo [RuCl₂(NO)(BPA)], onde BPA= 2-hydroxybenzyl(2-methylpyridyl)amine, que foi avaliado contra linhagens de células tumorais HeLa (carcinoma cervical humano), Tm5 (melanoma murino) e CHO (ovário de hamster chinês), apresentando resultados de IC₅₀ inferiores ao da cisplatina para as linhagens HeLa e Tm5, indicando o seu potencial antitumoral (HEINRICH *et al.*, 2011; SERLI, *et al.*, 2003). Outro estudo mostra um nitro complexo de rutênio com fórmula *cis*-[Ru(NO₂)₂(dppb)(5,5'-mepipy)], onde 5,5'-mepipy= 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina e dppb= 1,4-bis(difenilfosfina)butano (Figura 25) que demonstrou atividade antiparasitária promissora em parasitas nas formas epimastigotas e tripomastigotas, transmissores da Doença de Chagas (BASTOS *et al.*, 2014). Por fim, as potenciais aplicações terapêuticas do óxido nítrico (NO) como um agente antibacteriano, antiinflamatório e anticâncer, resultaram em um grande número pesquisas e desenvolvimento de compostos doadores de NO e nos materiais relacionados capazes de entrega-lo nos locais desejados (YANG *et al.*, 2018; ORLOWSKA *et al.*, 2018; SILVA FILHO *et al.*, 2023).

Figura 25 – Estrutura do complexo *cis*-[Ru(NO₂)₂(dppb)(5,5'-mebipy)]



Fonte: Bastos *et al.*, (2014).

2.6.4 Atividade antimicrobiana de complexos de rutênio

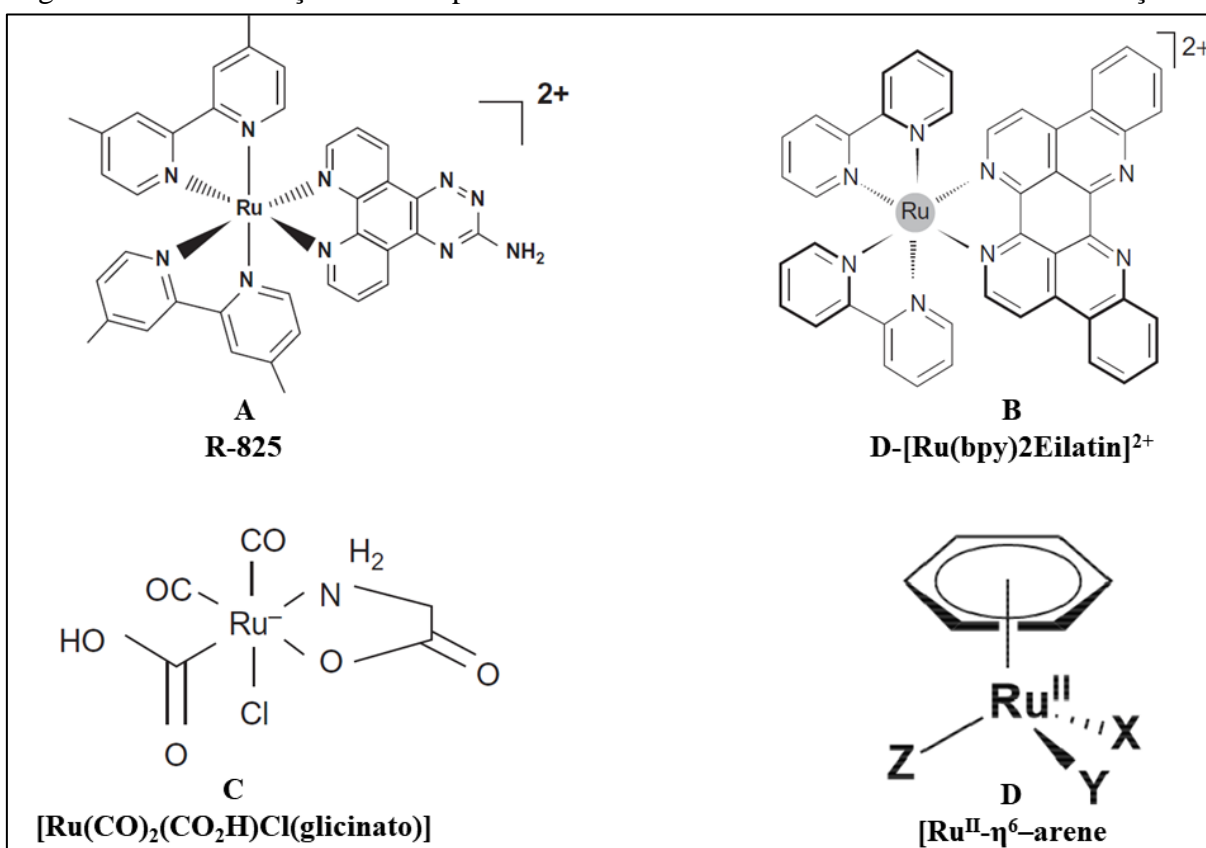
O conhecimento prévio de suas propriedades químicas e comportamento biológico, resultou em um maior foco na adaptação de complexos de rutênio como agentes antimicrobianos (LI; COLLINS; KEENE, 2015). Vários estudos realizados nas últimas décadas destacaram as propriedades antibacterianas promissoras dos complexos de rutênio colocando-os entre as classes mais promissoras de novos metaloantibióticos (SMITTEN *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2015).

De acordo com Li *et al.*, (2015) a atividade antimicrobiana dos complexos de rutênio pode ser reconhecida como uma função de sua lipofilicidade e carga, onde essas características podem ser controladas com relativa facilidade pela modificação do ligante que envolve uma esfera hexacoordenada. Além disso, a afinidade com o sítio alvo molecular, pode ser facilmente otimizada em comparação com medicamentos de base puramente orgânica. Assim, parece mais provável que um mecanismo completamente novo de atividade antimicrobiana possa ser alcançado com complexos de Ru(II), diferente daqueles de moléculas orgânicas já em uso clínico (FREI *et al.*, 2020b).

Dada a diversidade de complexos de rutênio e suas atividades antimicrobianas relatados na literatura, Southam *et al.* (2017), propuseram uma classificação baseada no papel do íon Ru que sustenta a atividade antimicrobiana do composto. Como apresentado na figura 26, os compostos antimicrobianos de rutênio foram divididos em quatro classes com base no seu mecanismo de ação, a saber: **(I) Estrutural:** O íon Ru tem um papel estrutural, ou seja, o

Ru dá forma ao composto ativo através de uma esfera de coordenação de ligantes. Estes complexos são inertes e biologicamente estáveis, onde o Ru entra em contato com o alvo através de interações não covalentes (Figura 26A); **(II) Transportador:** O íon Ru funciona simplesmente como transportador do fármaco ativo, mais frequentemente um composto orgânico (Figura 26B); **(III) Funcional:** O íon Ru tem um papel funcional, ou seja, a atividade antimicrobiana do composto é mediada pela coordenação direta do íon Ru a alvos biológicos. Trata-se de compostos relativamente instáveis do ponto de vista biológico, são frequentemente pró-fármacos que contêm ligantes lábeis (Figura 26C), e **(IV) Fotoativado:** O composto de Ru é ativo apenas após iluminação onde pode atuar como fotossensibilizador (Figura 26D).

Figura 26 – Classificação dos complexos de rutênio de acordo com seu mecanismo de ação



Fonte: Adaptado de Southam *et al.*, (2017).

De acordo com a classificação apresentada na figura 26, o papel do íon rutênio nos compostos antimicrobianos de classe (I) deve atuar como uma “estrutura” central para a qual os ligantes bioativos são coordenados e, portanto, a composição química e as propriedades dos ligantes coordenados determinam a atividade antimicrobiana (GIANFERRARA; BRATSO; ALESSIO, 2009; GILL; THOMAS, 2012). O próprio íon rutênio pode fornecer à molécula uma carga catiônica, mas não interage diretamente com alvos intracelulares, exceto por meio de

interações não covalentes (GIANFERRARA; BRATSOS; ALESSIO, 2009). É necessário que estes complexos sejam inertes e estáveis em sistemas biológicos, uma vez que a estrutura do composto é fundamental para a atividade biológica, assim, como estes complexos permanecem inalterados *in vivo*, podem interagir reversivelmente com alvos intracelulares tais como DNA, RNA, proteínas, membranas ou outros metabolitos (GILL; THOMAS, 2012; LI *et al.*, 2015).

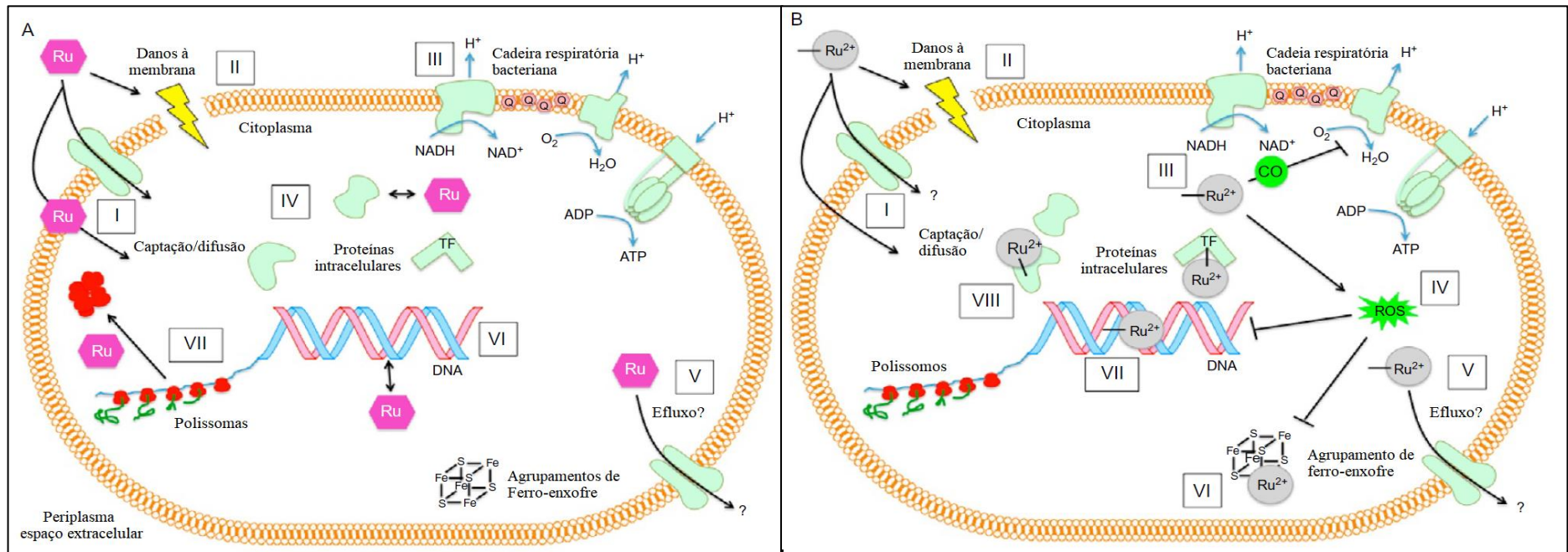
Os antimicrobianos transportadores de rutênio (classe II) são complexos organometálicos nos quais o íon rutênio é coordenado a um medicamento orgânico estabelecido com a finalidade de aumentar as atividades antimicrobianas do composto orgânico em questão (GIANFERRARA; BRATSOS; ALESSIO, 2009). Para que o íon rutênio funcione como um verdadeiro ligante 'transportador', ele não deve provocar efeitos antimicrobianos significativos por meio da coordenação com alvos biológicos sendo tal complexo considerado 'funcional' (SOUTHAM *et al.*, 2017).

Por sua vez, a atividade antimicrobiana dos complexos de rutênio de classe III depende em grande parte da coordenação covalente do íon rutênio com os alvos nas células bacterianas, sendo assim, pelo menos um ligante no rutênio deve ser suficientemente lábil para permitir que o íon metálico se coordene com seus alvos (GIANFERRARA; BRATSOS; ALESSIO, 2009). Dentro desta classe destacam-se os rutênio-carbonil (CORMs, figura 26C) que são convencionalmente classificados como compostos "transportadores", nos quais o íon rutênio atua apenas como um meio de entrega de CO *in vitro* ou *in vivo* (MANN, 2012). Southam *et al.*, (2017) consideram esses compostos de uma perspectiva alternativa e propõem que são os íons rutênio dos CORMs em si, e não as ações do CO 'liberado', que medeiam as atividades antimicrobianas desses complexos.

Para complexos de rutênio fotoativados (classe IV, figura 26D), a atividade antimicrobiana é amplamente dependente da geração de oxigênio singleto, que por sua vez provoca efeitos bactericidas. Nos últimos anos, a escassez de novos antibióticos e o longo processo necessário para trazer novos agentes antimicrobianos ao mercado levou a um interesse crescente na terapia fotoativa para tratar infecções bacterianas, sendo que os complexos de rutênio se mostraram promissores (SOUTHAM *et al.*, (2017).

Em resumo, os alvos celulares bacterianos dos complexos de rutênio estruturais (Figura 27A) e funcionais (Figura 27B) foram idealizados por Southam *et al.*, (2017) e apesar de ainda não estarem totalmente elucidados, múltiplos alvos como a membrana plasmática, proteínas intracelulares, componentes da respiração celular, DNA, RNA e formação de ERRO, são apresentados como as principais vias de atuação destes complexos.

Figura 27 – Alvos celulares bacterianos de complexos estruturais e funcionais de rutênio. (A) alvos celulares bacterianos de complexos "estruturais" de Ru; (B) alvos células bacterianos de complexos "funcionais"



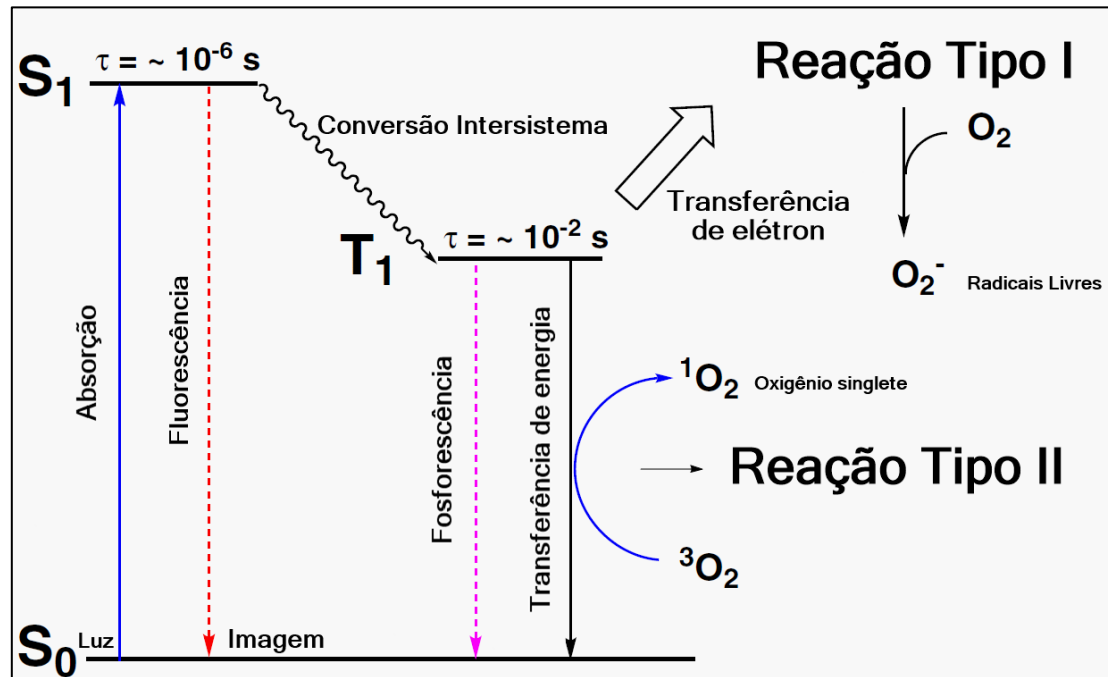
Fonte: Adaptado de Southam *et al.*, (2017). Em (A) Alvos celulares bacterianos seguem os passos: (I) Captação via difusão facilitada por um transportador de membrana e/ou difusão direta dependendo da lipofilicidade; (II) Direcionamento direto ou indireto à membrana; (III) Interrupção dos processos ligados à membrana, como a respiração aeróbica; (IV) Associação reversível com proteínas intracelulares; (V) O efluxo pode ocorrer através de bombas de efluxo bacteriano; (VI) Associações reversíveis com DNA via (1) intercalação de ligantes com bases de DNA e/ou (2) interações eletrostáticas entre o DNA carregado negativamente e os centros catiônicos de Ru; (VII) Associação reversível com RNA nos ribossomos levando à agregação de polissomas nos pólos celulares. Em (B) os passos são: (I) Captação via difusão facilitada através de um transportador de membrana e/ou difusão direta; (II) Danos diretos/indiretos ao envelope celular; (III) Inibição da respiração aeróbica através da ligação direta do íon $Ru(II)$ e/ou ligantes lábeis a componentes da cadeia respiratória; (IV) Geração de ERO direta ou indiretamente a partir do complexo "funcional", levando a danos oxidativos em: DNA e aglomerados de ferro-enxofre; (V) O efluxo pode ocorrer através de bombas de efluxo bacteriano; (VI) Coordenação do íon $Ru(II)$ aos aglomerados de ferro-enxofre, levando à disfunção proteica; (VII) Ligação covalente do íon $Ru(II)$ ao N7 das bases de guanina no DNA; (VIII) Interações covalentes com resíduos de aminoácidos expostos, levam à disfunção enzimática. Interações covalentes com resíduos expostos em fatores de transcrição (TF) também podem levar a perturbações na regulação gênica.

2.7 Fototerapia dinâmica (FTD)

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma estratégia terapêutica que utiliza uma combinação de compostos ou moléculas fotossensíveis denominadas de fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio molecular (PIKSA *et al.*, 2023). De início, a TFD foi investigada contra uma série de condições médicas, incluindo aterosclerose, psoríase e cânceres malignos (JOSEFSEN; BOYLE, 2008; LE GALL *et al.*, 2018). O princípio da técnica consiste na excitação do FS pela luz que leva a transferências intramoleculares de energia não radiativa e, no final, transferência de energia física para o oxigênio no estado fundamental ($^3\text{O}_2$) (BAPTISTA *et al.*, 2017).

Como mostrado na figura 28, após a absorção da luz, o fotossensibilizador excitado no estado triplete, pode formar espécies reativas de oxigênio, induzindo à citotoxicidade por meio de dois mecanismos principais denominados de reações do tipo I e reações do tipo II, nas quais, ambos são dependentes de moléculas de oxigênio presente nas células (LI, 2009). De modo geral, as reações do tipo I envolvem a produção de ERO resultantes do FS ativado. Como esquematizado na figura 28, ocorre a captação de hidrogênio ou a transferência de elétrons entre o FS no estado triplete T1 ($^3\text{FS}^*$) e uma molécula adjacente (substrato), formando radicais iônicos. Estes que, por sua vez, interagem com as moléculas de oxigênio que estão no seu estado fundamental ($^3\text{O}_2$), levando a produção de ERO como superóxidos (O_2^-), radicais hidroxilas (OH^-) e peróxidos de hidrogênio (H_2O_2). Essas espécies reativas de oxigênio, induzem reações de oxidação em biomoléculas, causando um estado de estresse oxidativo nas células, e resultando em morte celular (LI, 2009; KWIATKOWSKI *et al.*, 2018).

Figura 28 – Mecanismo das reações tipo I e II da terapia fotodinâmica (TFD)



Fonte: Adaptado de Yoon; Jang, (2013).

Por outro lado, as reações do tipo II envolvem a geração de oxigênio singlete (1O_2) através da transferência direta de energia do FS excitado no estado tripleto para o oxigênio também no estado tripleto (LI, 2009). Como a energia necessária para a transição do oxigênio do estado fundamental tripleto para o estado singlete é de aproximadamente $22,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$, uma energia relativamente pequena é necessária para produzir 1O_2 e essas reações são caracterizadas pela dependência da concentração de oxigênio (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001). Ambas as vias acima requerem oxigênio molecular e levam à oxidação de biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios e bases nitrogenadas de nucleotídeos, resultando no efeito de eliminação de patógenos e células indesejadas (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

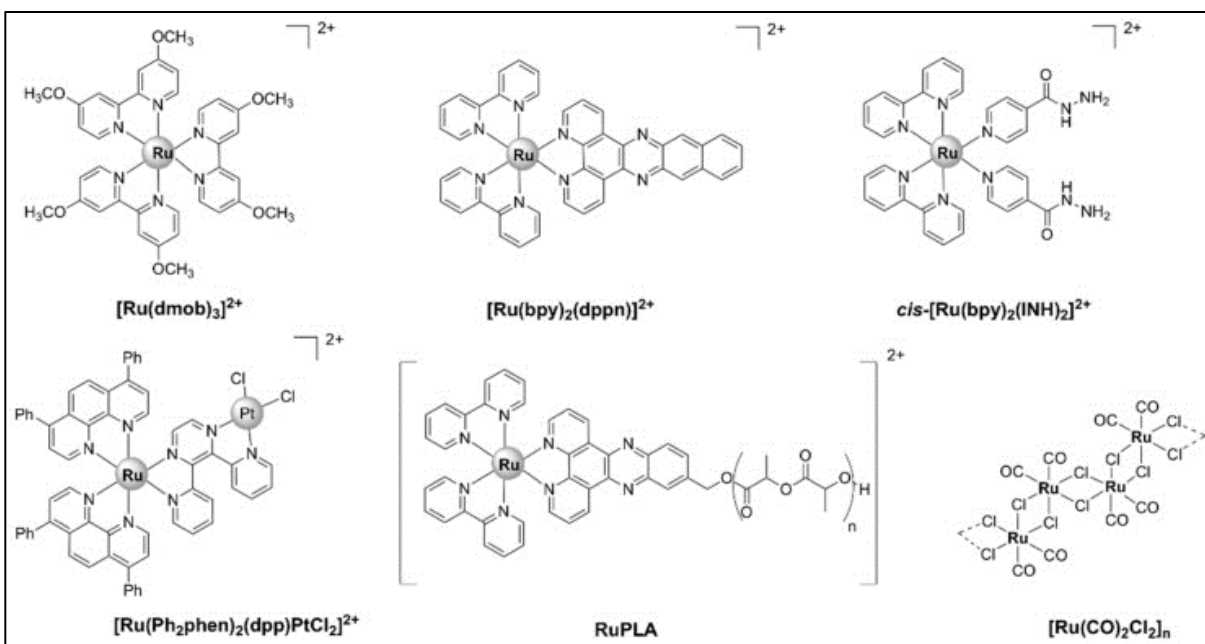
De acordo com o conhecimento atual, o mecanismo da TFD não parece depender muito do tipo de célula (procariótica/eucariótica). Em contraste com o tecido humano normal, as células anormais são caracterizadas por maior sensibilidade ao estresse oxidativo causado pela TFD, e considera-se que o tratamento em si não apresenta efeitos colaterais a longo prazo (TRIESSCHEIJN *et al.*, 2006). A ação fotodinâmica pode ser eficaz contra uma ampla gama de patógenos, notadamente vírus, bactérias, fungos e parasitas, iniciando um novo capítulo no tratamento antimicrobiano, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) (WAINWRIGHT, 1998; HAMBLIN; HASAN, 2004; PEREIRA GONZALES; MAISCH, 2012; CIEPLIK *et al.*, 2018).

2.7.1 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa)

No contexto da resistência antimicrobiana e de opções terapêuticas, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) mostra-se muito promissora como alternativa às modalidades antimicrobianas convencionais (YOUF *et al.*, 2023). Na verdade, uma vez que a TFDa não requer interação com um alvo molecular específico e, pode ser mais resiliente que os antimicrobianos, seu uso poderia ser uma ferramenta para superar a disseminação crescente de microrganismos multirresistentes (MDR) (KWIATKOWSKI *et al.*, 2018; PEREIRA ROSA, 2014; HU *et al.*, 2018; MULANI, *et al.*, 2019). Embora muitas investigações *in vitro* tenham sido feitas para verificar a relevância potencial de tal estratégia, poucos estudos foram conduzidos até agora em modelos *in vivo* (JAKUBASZEK *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2015).

Os complexos metálicos constituem um vasto grupo potencial de novos medicamentos ativos com grande promessa para diversas aplicações biomédicas, em especial para TFDa (FREI, 2020a; FREI *et al.*, 2020b; SPESIA; DURANTINI, 2022). Estes compostos constituem FS atraentes para TFDa, principalmente porque (i) absorvem fortemente a luz visível, (ii) exibem propriedades fotofísicas ajustáveis, (iii) podem produzir eficientemente ERO após irradiação de luz e (iv) geralmente não são citotóxicos no escuro (LE GALL *et al.*, 2018; LEMERCIER *et al.*, 2018; KARGES *et al.*, 2020). Alguns complexos de rutênio fotoativos são mostrados na figura 29.

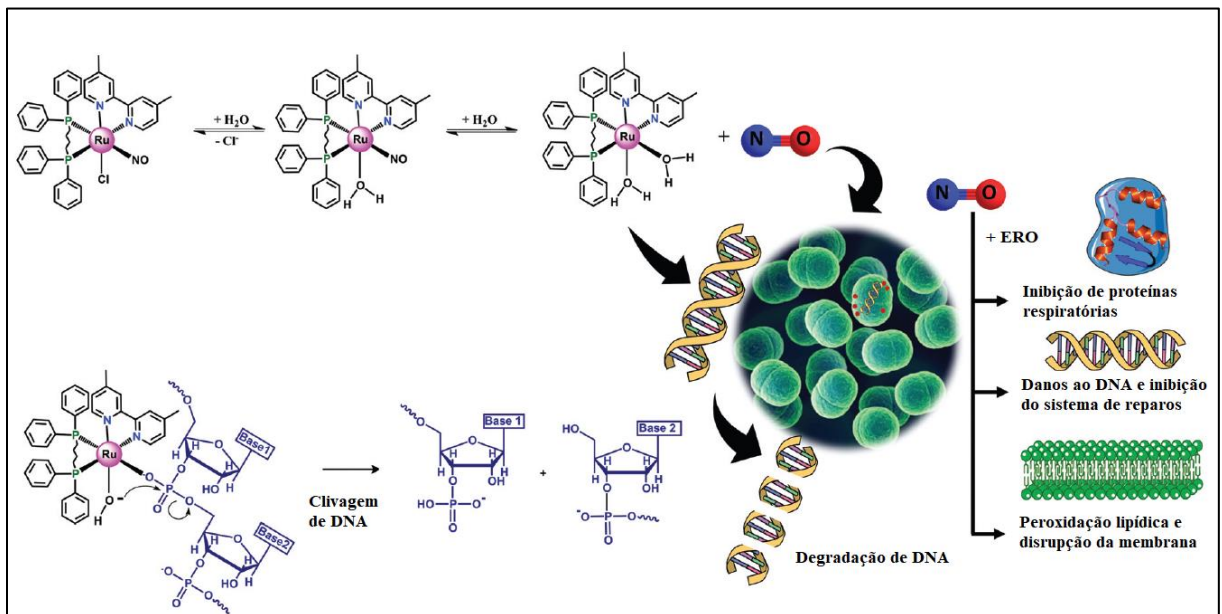
Figura 29 – Estruturas químicas de complexos de rutênio desenvolvidas para Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana



Fonte: Munteanu; Uivarosi, (2021).

Apoiando a ideia da combinação entre complexos metálicos e TFDa, um estudo publicado por Sousa *et al.*, (2020b) investigaram a atividade antimicrobiana do complexo nitrosil $\text{cis-[RuCl(NO)(dppb)(4,40-Mebipy)](PF}_6)_2$, juntamente com seu complexo precursor $\text{cis-[RuCl}_2(\text{dppb})(4,40\text{-Mebipy)]}$ irradiados por luz azul. Ambos os complexos mostraram atividade antibacteriana promissora quando associados a TFD contra *S. aureus* e *S. epidermidis*, no entanto, o complexo nitrosil apresentou maior efeito antibiótico que seu precursor, apoiando o importante papel de NO neste processo que, provavelmente induziu a produção de ERO, danos ao DNA e membrana plasmática destas bactérias (conforme mostrado na Figura 30).

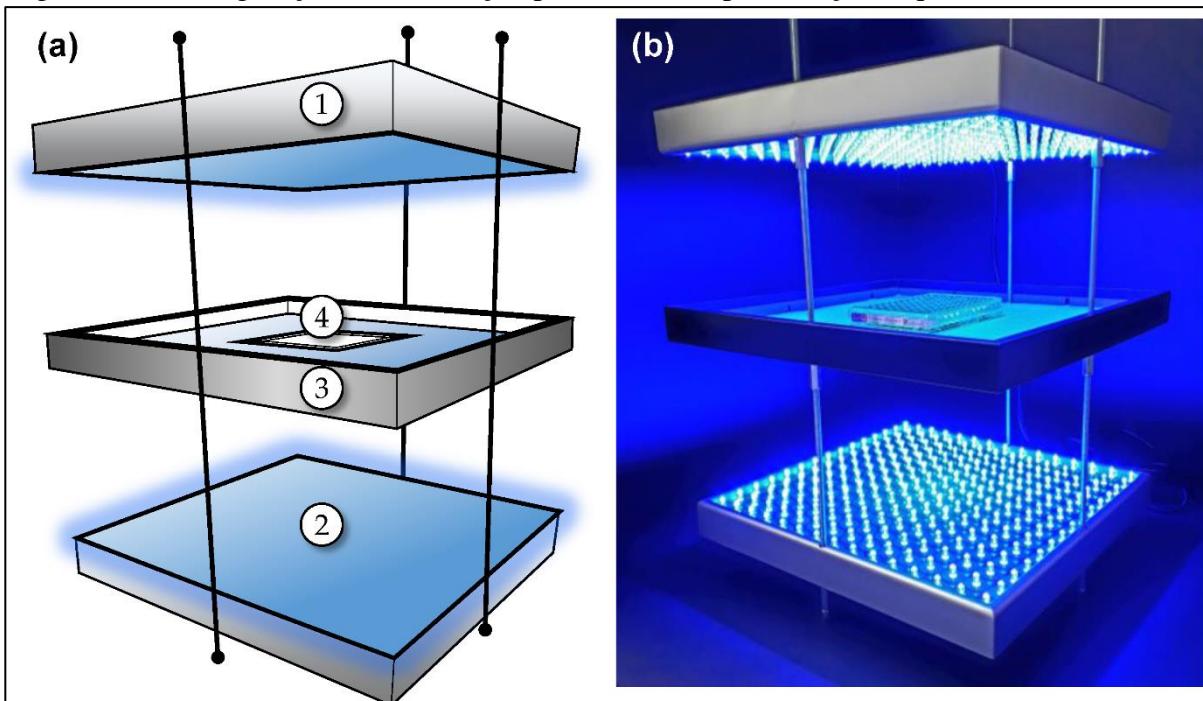
Figura 30 – Mecanismos propostos para a atividade antimicrobiana do composto nitrosil mostrando a liberação de NO e seus possíveis alvos biológicos



Fonte: Sousa *et al.*, (2020b).

Outro estudo envolvendo os efeitos da TFDa associada a complexos de rutênio, foi conduzido por Youf *et al.*, (2022) que avaliaram os complexos $[\text{Ru(II)}]1$ e $[\text{Ru(II)}]2$. Após algum tempo de exposição à luz azul conforme demonstrado no esquema da figura 31, o tratamento com os complexos foi eficiente para inibir o crescimento total de *S. aureus*, por outro lado, nenhum efeito foi observado para *P. aeruginosa*. Observou-se também que as bactérias cresceram com a mesma eficiência em todas as condições consideradas, inclusive na presença de $[\text{Ru(II)}]$, desde que a luz não fosse aplicada.

Figura 31 – Configuração de iluminação para TFDa. Representação esquemática



Fonte: Adaptado de Youf *et al.*, (2022). Em (a) são mostrados os dois painéis de LED (① e ②) colocados acima e abaixo de uma placa intermediária (③) usada para segurar materiais colocados em uma área de exposição central (④). A imagem em (b) mostra a iluminação de uma placa de 96 poços contendo amostras de [Ru (II)]. A fluorescência é claramente visível a olho nu.

De modo geral, a capacidade dos complexos de interagir eficientemente com bactérias parece ser crucial para a atividade da TFDa, considerando a curta meia-vida das ERO geradas após irradiação luminosa, assim, apenas aumentar a produção de $^1\text{O}_2$ não é suficiente para produzir agentes TFDa mais eficientes. Parâmetros que afetam as interações com bactérias, como lipofilicidade e capacidade de formar agregados, também devem ser considerados no desenvolvimento de futuros compostos otimizados para TFDa (MUNTEANU; UIVAROSI, 2021).

3 HIPÓTESES

1. O nitro complexo de rutênio [RuCl(NO₂)(dppb)(4,4'-Mebpy)] apresenta atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*;
2. O nitro complexo de rutênio [RuCl(NO₂)(dppb)(4,4'-Mebpy)] apresenta efeito sinérgico quando combinado a ampicilina e tetraciclina contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*;
3. O nitro complexo de rutênio [RuCl(NO₂)(dppb)(4,4'-Mebpy)] possui atividade antibiofilme reduzindo a biomassa e o número de células viáveis de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*;
4. O nitro complexo de rutênio [RuCl(NO₂)(dppb)(4,4'-Mebpy)] causa danos na membrana plasmática de *S. aureus* e *E. coli*;
5. O nitro complexo de rutênio [RuCl(NO₂)(dppb)(4,4'-Mebpy)] tem a capacidade de clivar DNA plasmidial quando irradiado por luz LED azul;
6. O nitro complexo de rutênio [RuCl(NO₂)(dppb)(4,4'-Mebpy)] não apresenta citotoxicidade contra fibroblastos murinos e eritrócitos humanos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar a atividade antimicrobiana, o efeito combinado com antibióticos, a interação com DNA e a atividade citotóxica do nitro complexo [RuCl(NO₂)(dppb)(4,4-Mebipy)] na presença e na ausência de irradiação com luz azul.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do complexo de rutênio sobre as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis*, e Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli*;
- Avaliar o efeito da combinação do complexo de rutênio com os antibióticos ampicilina (β -lactâmico) e tetraciclina (amplo espectro) sobre as bactérias supracitadas;
- Avaliar a atividade do complexo sobre a inibição da formação de biofilmes e sobre biofilmes pré-formados das bactérias supracitadas;
- Avaliar o efeito do complexo sobre o número de células viáveis tanto de biofilmes em formação, quanto em biofilmes pré-formados de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*;
- Avaliar modificações morfológicas e estruturais de biofilmes de *S. aureus* e *E. coli* através de microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar a interação do complexo com DNA plasmidial pBR322 antes e após irradiação com luz azul;
- Verificar a citotoxicidade do complexo de rutênio sobre eritrócitos humanos e células de fibroblastos murinos L929

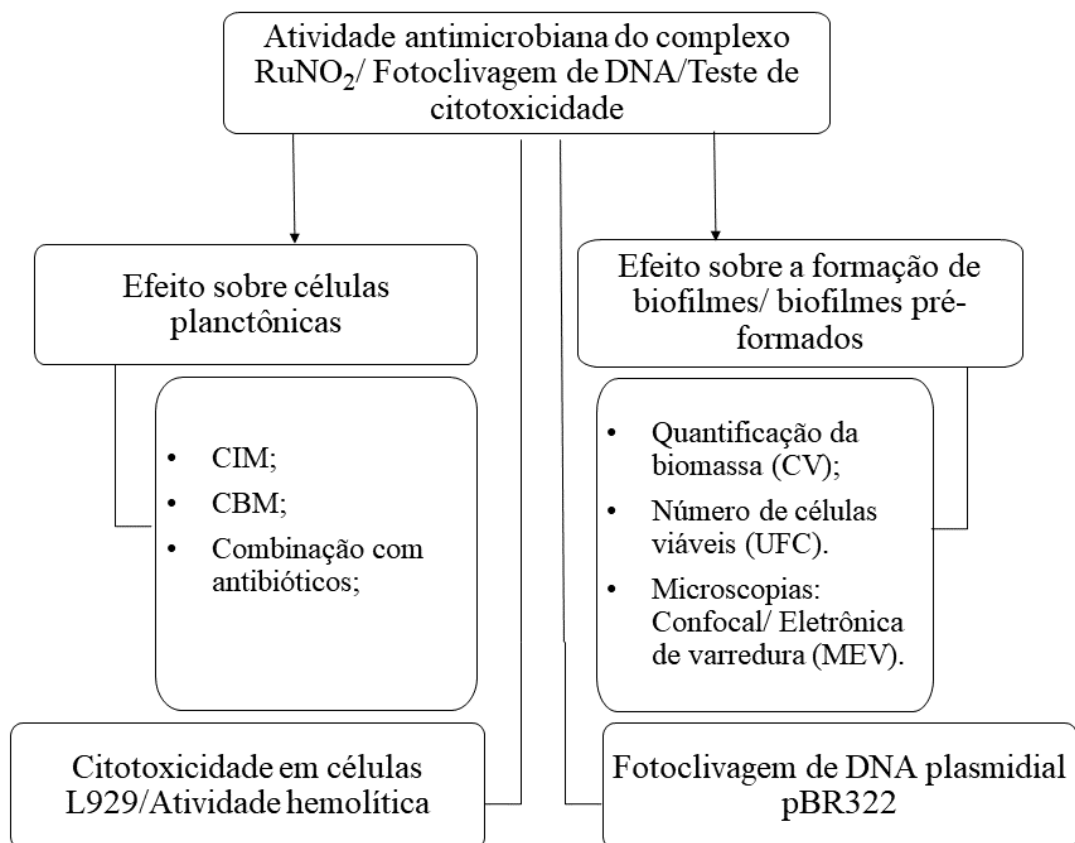
5 METODOLOGIA

5.1 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, do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM - UFC) para obtenção das imagens da microscopia Confocal e da Central Analítica da UFC na obtenção das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Os ensaios foram realizados em triplicatas e repetidos pelo menos três vezes em momentos distintos, seguindo o organograma proposto na figura 32.

Figura 32 – Organograma e estruturação deste estudo



Fonte: Próprio autor.

5.2 Microrganismos

Para o presente estudo foram utilizadas cepas padrão que integram o acervo da bacterioteca do Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS), sendo todas cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) exibidas na tabela 1. Estas cepas estão apresentadas com o nome da espécie, seguida de um código de identificação, características e/ou uso.

Tabela 1 – Lista de espécies bacterianas alvos deste estudo

CEPA	ATCC	ORIGEM	CARACTERÍSTICA/USO
<i>S. aureus</i>	25923	Seattle (USA) 1945	Sensível a meticilina/ Exame de produtos lácteos,
<i>S. aureus</i>	700698	Não documentada	Resistente a meticilina (MRSA) e susceptibilidade heterogenia à vancomicina
<i>S. epidermidis</i>	12228	Não documentada	Usado em testes de mídia e vários ensaios e utilizado no projeto de sequenciamento do genoma.
<i>S. epidermidis</i>	35984	Tennessee (USA)	Produz polissacarídeos de adesão, genoma completo
<i>E. coli</i>	11303	Não documentada	Facilmente produz mutantes coloniais. Hospedeira de bacteriófago
<i>P. aeruginosa</i>	27853	Não documentada	Pesquisa prospectiva de patógenos/Detecção de aerossóis

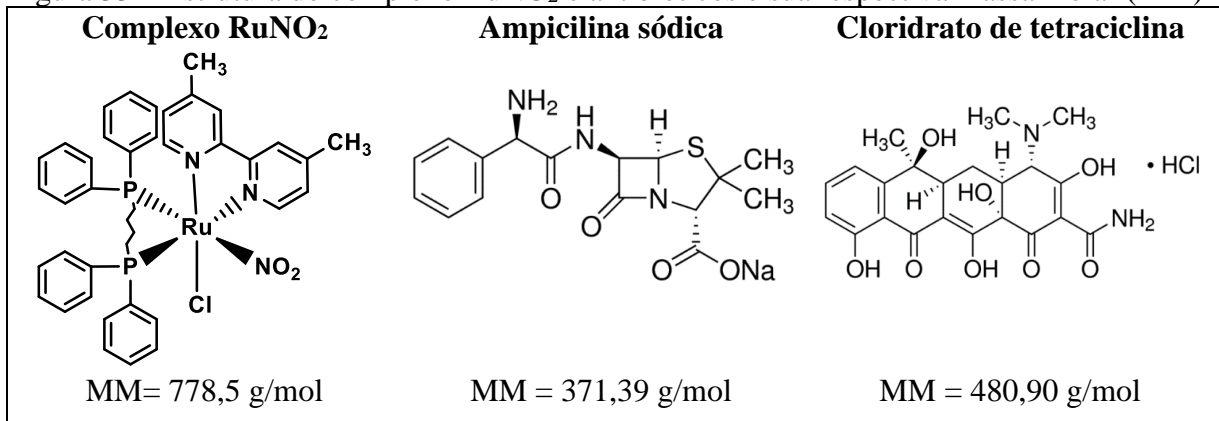
Fonte: www.atcc.org

5.3 Obtenção dos complexos de rutênio e antibióticos

O nitro complexo de rutênio [RuCl(NO₂)(dppb)(4,4'-Mebipy)] designado como RuNO₂, avaliado neste estudo, foi gentilmente cedido pela professora Dra. Alda Karine Medeiros de Holanda, do Laboratório de Bioinorgânica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC. A estrutura química contendo a massa molar (MM) deste complexo, está apresentada na figura 33.

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 β-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, que inibe a síntese proteica, e é usado tanto no tratamento de infecções de bactérias Gram-positivas quanto de Gram-negativas. Sua estrutura química e massa molar também são mostrados na figura 33.

Figura 33 – Estrutura do complexo RuNO₂ e antibióticos e sua respectiva massa molar (MM)



Fonte Complexo RuNO₂: Laboratório de Bioinorgânica – (UFC)

Fonte Antibióticos: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/87128?lang=pt®ion=BR>

5.4 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 glicerol 20% a -80 °C, os microrganismos foram estriados em placas de Petri contendo meio Soja Tríplica Ágar (TSA) e incubados por 24 h, a 37 °C.

Após o crescimento nas placas, 5 colônias isoladas foram removidas e inoculada em 5 mL de meio Mueller-Hinton Cátion Ajustado (MHBCA) 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 9.000 RPM por 5 min a 4°C, sendo ressuspensa em novo meio MHB (10 mL). Posteriormente, com o auxílio do espectrofotômetro (Amersham Biosciences), a concentração final da suspensão bacteriana foi ajustada para 5x 10⁵ Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL), através da turbidimetria (620 nm) e curvas de calibração previamente determinada para cada bactéria.

5.5 Solubilização e diluição do complexo RuNO₂ e antibióticos

A solubilização do complexo RuNO₂ e dos antibióticos também seguiram as normas de padronização propostas pelo CLSI (2015). Inicialmente, o complexo RuNO₂ foi solubilizado Dimeltisulfóxido (DMSO) 100% e em seguida em meio MHBCA para os ensaios sobre células planctônicas e TSB para biofilmes, sendo preparada uma solução estoque de 10 mg/mL. Logo depois, diluições foram realizadas em tubos *falcon* de 15 mL e obteve-se uma

concentração final de 1.024 $\mu\text{g/mL}$ de RuNO_2 para ambos os meios de cultura e 4% para o DMSO. Os antibióticos ampicilina e tetraciclina também foram solubilizados em meio MHBCA, e suas concentrações ajustadas para 1.024 e 512 $\mu\text{g/mL}$. Ressalta-se que logo após as diluições, todas as soluções foram esterilizadas por filtro 0,22 μm .

5.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)

A avaliação da atividade antibacteriana do complexo RuNO_2 e dos antibióticos, foi realizada segundo o ensaio de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 poços de fundo “U” de acordo com as normas sugeridas pelo CLSI (2015), com modificações sugeridas por Andrade *et al.*, (2020). Para a determinação da CIM, os poços da linha A (1 a 5) da placa foram preenchidos inicialmente com 200 μL de RuNO_2 sendo a concentração inicial de 512 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida, realizou-se a diluição seriada na base dois para obtenção de diferentes concentrações, que variaram entre 256 e 2 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, 100 μL da suspensão bacteriana já previamente ajustada na concentração de 5×10^5 UFC/mL, foi adicionada em cada um dos poços na placa, obtendo-se um volume final de 200 μL . Em seguida, as placas foram submetidas à irradiação com luz azul por 1 h sendo então incubadas a 37 °C por 24 h em incubadora. Placas controle foram preparadas e incubadas nas mesmas condições, mas não foram irradiadas com luz azul.

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 a menor concentração do complexo RuNO_2 capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano. Para a determinação da CBM 24 h depois da incubação, foram removidos 10 μL da solução contida nos poços que não apresentaram crescimento microbiano, seguido de inoculação em placas de Petri com meio MHA. As placas de Petri foram incubadas novamente sobre as mesmas condições já descritas e, após o período de mais 24 h avaliou-se a presença de UFC e considerou-se como CBM, a menor concentração do complexo RuNO_2 que inibiu o crescimento visível das UFC (DAS *et al.*, 2016). 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 1, propostos pelo CLSI (2015).

Tabela 2 – Pontos de corte de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos

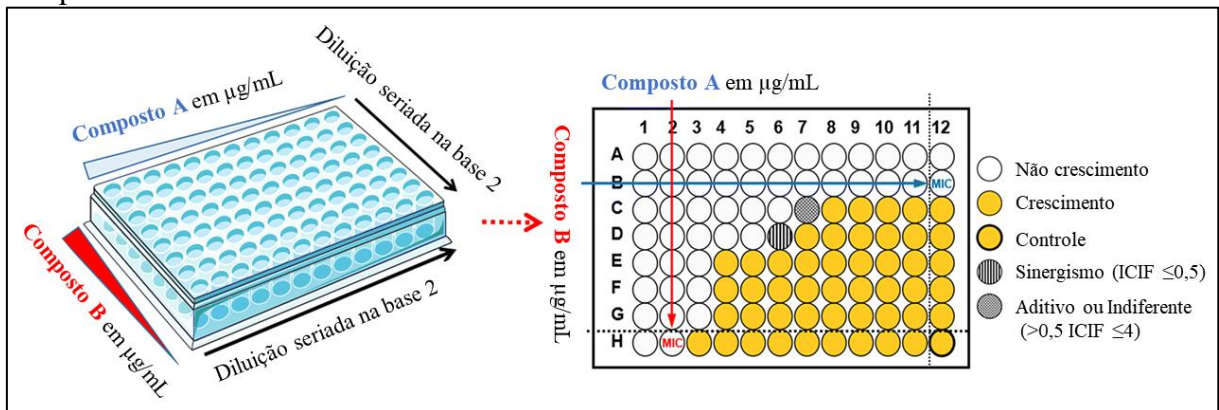
Fenótipo	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Diâmetro da zona
Sensível (S)	≤ 2	≥ 20
Intermediário (I)	8 – 16	15 -19
Resistente (R)	≥ 32	≤ 14

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

5.7 Avaliação do efeito de RuNO₂ combinado aos antibióticos ampicilina e tetraciclina

A avaliação dos efeitos resultantes da combinação entre RuNO₂ e os antibióticos, foi realizada através da técnica de *checkerboard*. Para este estudo, foram avaliadas duas combinações, a saber: RuNO₂ + Ampicilina, e RuNO₂ + Tetraciclina. Tanto o complexo quanto os antibióticos foram preparados em concentrações 4 vezes a da CIM. Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 de poliestireno de fundo “U”. Resumidamente, o complexo RuNO₂ foi diluído nas linhas A a E, (sentido vertical da placa) e os antibióticos diluídos no sentido horizontal, de A1/A5 até E1/E5 (conforme esquema mostrado na figura 34).

Figura 34 – Esquemática da técnica de *checkerboard* para o ensaio de combinação entre o complexo RuNO₂ e antibióticos



Fonte: Próprio autor.

No total, 25 poços foram utilizados, de forma que as concentrações finais para cada um dos compostos 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, e logo em seguida foram misturados em nova placa, de maneira que cada poço dessa nova placa, foi preenchido com 50 μL de RuNO₂, 50 μL do antibiótico e 100 μL do inóculo bacteriano previamente ajustado (5×10^5 UFC/mL). A linha F foi usada como controle da CIM do RuNO₂,

a coluna 6 como controle da CIM dos antibióticos e a linha G como controle de crescimento bacteriano. Em seguida, as placas foram submetidas à irradiação com luz azul por 1 h sendo então incubadas a 37 °C por 24 h em incubadora. Para determinação da nova CIM em combinação, a absorbância foi mensurada a um comprimento de onda de 620 nm em leitor de microplacas (SpectraMax i3).

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 1 abaixo:

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

CIFA= [CIM do complexo combinado/CIM do complexo individual];

CIFB= [CIM do antibiótico combinado/CIM do antibiótico individual].

A avaliar da interação entre RuNO₂ e os antibióticos foi baseada no valor do ICIF e foi assim considerado: efeito sinérgico (ICIF ≤ 0,5), efeito aditivo ou indiferente (0,5 < ICIF ≤ 4) ou efeito antagônico (ICIF > 4) (ODDS, 2003; CASTELO-BRANCO *et al.*, 2016).

5.8 Ensaio de inibição da formação de biofilmes

Biofilmes bacterianos foram formados na presença de diferentes concentrações do complexo RuNO₂ (256 a 2 µg/mL) em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços de fundo plano conforme descrito por Stepanovic *et al.* (2000), com modificações de Andrade *et al.* (2020). Após o desenvolvimento dos biofilmes, os poços foram lavados duas vezes para remover células fracamente aderidas, e os biofilmes foram avaliados pela quantificação da biomassa total, e contagem do número de células viáveis. A preparação das placas para os testes foi similar ao procedimento usado nos ensaios de CIM, no entanto o meio de cultura usado foi o TSB e a suspensão de bactérias foi ajustada para uma concentração final de 1x 10⁶ UFC/mL. As placas também foram submetidas à irradiação com luz azul por 1 h sendo então incubadas a 37 °C por 24 h.

5.8.1 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 μL de metanol a 95% por 5 minutos para fixação dos biofilmes. Adicionou-se, então, 200 μL de cristal de violeta 1% por mais 5 minutos, a 25 °C. Em seguida, o excesso de corante foi removido e as placas lavadas três vezes com água destilada. O corante remanescente foi solubilizado com ácido acético a 33% e então a biomassa foi quantificada através da medição da densidade óptica a 590 nm ($D.O_{590}$) com o auxílio de um leitor de microplacas (SpectraMax i3).

5.8.2 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 μL 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_{10} UFC/mL.

5.8.3 Ensaio sobre biofilmes pré-formados

Os ensaios de biofilmes pré-formados também foram realizados em placas de 96 poços de fundo plano. As suspensões de bactérias (200 μL ajustadas para 1×10^6 UFC/mL) foram adicionadas a cada poço e incubadas a 37° C durante 24 horas. Após a formação dos biofilmes o meio foi retirado e cada poço foi lavado com água destilada estéril para remoção das células fracamente aderidas. Logo em seguida, 200 μL de RuNO_2 nas concentrações que variaram de 256 a 2 $\mu\text{g/mL}$ foi adicionado aos poços, sendo que no controle de bactéria não tratada foi adicionado apenas 200 μL de meio de cultura. Após esta etapa as placas foram submetidas à irradiação com luz azul por 1 h sendo então incubadas a 37 °C por mais 24 h. As mesmas metodologias de cristal violeta, contagem de células viáveis utilizadas para avaliação da inibição da formação de biofilmes, também foram usadas para avaliar a ação do complexo de rutênio sobre os biofilmes pré-formados.

5.8.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a observação de alterações na morfologia de células planctônicas e na densidade celular da biomassa dos biofilmes, análises por MEV foram realizadas de acordo com Andrade *et al.* (2020), no entanto, por conta de limitações na quantidade de amostras a serem analisadas, e no agendamento das análises junto à Central Analítica da UFC, este ensaio foi realizado somente com duas cepas, a saber: *S. aureus* ATCC 700698 (MRSA) e *E. coli* ATCC 11303. De modo geral, biofilmes de *S. aureus* ATCC 700698 (MRSA) e *E. coli* ATCC 11303 foram cultivados nas mesmas condições anteriormente citadas, no entanto, foram utilizadas placas de 24 poços. As concentrações de RuNO₂ utilizadas foram de 32 µg/mL para *S. aureus* e 256 µg/mL para *E. coli* e as placas também foram submetidas à irradiação com luz azul por 1 h. Após o tempo de incubação, os biofilmes foram submetidos as seguintes etapas: 1) as células em suspensão foram removidas e os poços lavados com PBS (pH 7,4) 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 cortados e removidos. Subsequentemente, as amostras contendo os biofilmes foram metalizados (revestidos com ouro) e visualizados no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG (Central Analítica da UFC, Brasil).

5.8.5 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Os efeitos do tratamento de RuNO₂ sobre biofilmes também foram analisados utilizando Microscopia Confocal de Varredura a Laser conforme metodologia descrita por Castelo Branco *et al.* (2016). Da mesma forma que aconteceu nas análises de MEV, por conta de limitações na quantidade de amostras a serem analisadas e no calendário de agendamento das análises junto ao Centro Especializado de Micologia Médica (CEMM) da UFC, este ensaio foi realizado somente com duas cepas, a saber: *S. aureus* ATCC 700698 (MRSA) e *E. coli* ATCC 11303. Assim, para os ensaios de redução da biomassa, os biofilmes de *S. aureus* ATCC 700698 e *E. coli* foram crescidos diretamente na superfície de lamínulas redondas de vidro (Olen, K5-2020), utilizando uma placa de cultura de 24 poços e tratados com RuNO₂ nas concentrações de 32 e 256 µg/mL respectivamente, sendo posteriormente submetidas à irradiação com luz azul por 1 h e incubadas a 37 °C por 24 h. Os biofilmes pré-formados também foram formados nas mesmas condições, no entanto a concentração de tratamento

RuNO₂ para *S. aureus* ATCC 700698 foi de 64 µg/mL, para *E. coli*, a concentração permaneceu em 256 µg/mL. Após a incubação, as placas foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7,4) e, posteriormente, os biofilmes foram corados com o kit de reagentes fluorescentes LIVE/DEAD (Invitrogen, EUA). As lamínulas foram avaliadas em Microscópio Confocal Nikon C2, a 488 nm para a detecção do corante SYTO9, que identifica células viáveis (em verde), e a 561nm para a detecção do iodeto de propídio, o qual identifica células mortas ou com danos na membrana plasmática.

5.9 Fotoclivagem de DNA

O estudo de clivagem de DNA foi realizado com o intuito de verificar a capacidade do complexo RuNO₂ de interagir/clivar o DNA. Esse procedimento foi realizado utilizando eletroforese com gel de agarose (0,8% p/v em tampão TAE, pH 8,0). O DNA utilizada foi o superenovelado plasmidial pBR322 (21 µM pares de bases de nucleotídeos). Essa solução de DNA plasmidial foi combinada com o complexo RuNO₂ nas concentrações de 30, 50 e 100 µM. As amostras foram expostas à luz LED azul por 1 h, e outras, para controle mantidas no escuro por 1 h, bem como algumas amostras foram misturadas com glutationa (10 mmol L⁻¹). Além disso, uma escada linear de DNA (1 kbp) foi aplicada na primeira pista de todos os géis. Controles de DNA plasmidial também foram usados sem qualquer tratamento (escuro), irradiados com luz azul ou misturados com glutationa. O complexo [Ru(bpy)₃]²⁺ (TBP) (30 µmol L⁻¹) foi usado como controle para fotoclivagem do DNA, nas mesmas condições. Após a corrida das amostras em gel de agarose, estas foram coradas com GelRed (1 mg mL⁻¹, Biotium) por 30 min, e as imagens foram coletadas com o sistema Gel Doc XR+ (Biorad). Todas as irradiações de luz foram realizadas usando luz azul Basetech Conrand, 1,7 W (λ_{\max} = 463 nm).

5.10 Atividade hemolítica

O ensaio de atividade hemolítica foi realizado conforme descrito por Jiang *et al.* (2022) com modificações. Resumidamente, amostras de sangue humano (O⁺) recém coletadas foram misturadas com uma solução anticoagulante de heparina (concentração de 0,2 mL). Para obter uma suspensão pura de hemácias, as amostras de sangue foram lavadas seis vezes (centrifugadas a 3.500 RPM por 5 min a 25°C) com NaCl 0,15 M e uma solução de sangue a 3% foi preparada. Em tubos eppendorf, uma alíquota de 100 µL em triplicata foi adicionada juntamente com 100 µL do complexo RuNO₂ solubilizado em NaCl 0,15 M e DMSO a 4% nas

concentrações que variaram de 128 a 2 µg/mL. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 1 h sendo irradiadas por luz azul. Um controle positivo para hemólise (SDS 1%) e controles negativos de NaCl 0,15 M e DMSO 4% foram usados. Após o período de incubação os tubos foram centrifugados a 3.000 RPM por 5 min na temperatura ambiente. Do sobrenadante fluido, 150 µL foram transferidos para um microplaca de 96 poços de fundo plano, e a absorbância foi quantificada através da medição da densidade óptica a 450 nm ($D.O_{450}$) com o auxílio de um leitor de microplacas (SpectraMax i3). A porcentagem de hemólise foi calculada pela equação 2:

$$\text{Hemólise (\%)} = \left(\frac{\text{Abs450 da amostra tratada} - \text{Abs450 do NaCl 0,15 M}}{\text{Abs450 do SDS 1\%} - \text{Abs450 do NaCl 0,15 M}} \right) \times 100\%$$

5.11 Teste de viabilidade celular

Para este ensaio foi utilizada a linhagem L929 (fibroblastos murino) obtida da ATCC (*American Type Culture Collection*, EUA), através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em frascos T-75 (Kasvi®) para cultura de células contendo meio Eagle Dulbecco Modificado- DMEM (Sigma®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO® - Life Technologies), 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina (GIBCO® - Life Technologies) e mantidas a 37°C, em uma atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada três dias e ao atingirem 80% de confluência as células foram tripsinizadas (0,025% tripsina/0,1% EDTA) para subcultura e/ou ensaios de viabilidade.

5.11.1 Ensaio de viabilidade celular

Após a tripsinização, foi realizado o ajuste do número de células ($5 \times 10^4/200$ µL/poço) através da contagem em câmara de Neubauer. As células foram adicionadas em placas de poliestireno de 96 poços de fundo plano, mantidas por 24 horas em condições de cultura padrão a 37°C, em uma atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂. O complexo RuNO₂ testado foi solubilizado em DMSO resultando em uma solução na concentração de 128 µg/mL e 1% de DMSO que posteriormente foi submetida à diluição seriada gerando sete concentrações testes, 128; 64; 32; 16; 8; 4 e 2 µg/mL. Após 24 horas de adição das células, o meio foi retirado da placa de 96 poços e adicionou-se 200 µL/poço de RuNO₂ nas concentrações citadas

anteriormente. Nos poços controles foram adicionados apenas meio DMEM e DMSO. Foram montadas placas para o ensaio nos tempos de 24 e 48 horas.

Para verificação da viabilidade celular, foi aplicado o ensaio de MTT. O MTT é um método colorimétrico baseado na biorredução do composto MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Este processo é realizado por enzimas mitocondriais e a mudança de coloração do meio reflete diretamente a atividade celular, podendo ser medida em termos de absorbância. Decorrido o tempo de exposição ao RuNO₂, o meio foi retirado e substituído por 100 µL de meio DMEM não suplementado no qual adicionou-se 20 µL da solução de MTT e as absorbâncias foram mensuradas em um leitor de microplacas (SpectraMax i3) com comprimento de onda de 570 nm de acordo com especificações do fabricante. Foram realizados três ensaios independentes e em triplicata nos tempos de 24 e 48 horas. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada pela equação 3:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{\overline{Abs}_{570\ nm}(RuNO_2)}{\overline{Abs}_{570\ nm}(controle)} \times 100\%$$

5.12 Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicatas em três momentos distintos. 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 8.0 para Windows (San Diego, California, USA). Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Atividade antimicrobiana sobre células planctônicas

Os resultados da atividade antimicrobiana do complexo RuNO₂ sobre o crescimento planctônico dos microrganismos testados, tanto irradiados (Luz ON) quanto na ausência de irradiação (Luz OFF) com luz azul, foram avaliados através dos ensaios de determinação da CIM, CBM e do efeito combinado aos antibióticos ampicilina e tetraciclina. Em termos gerais, o complexo RuNO₂ apresentou efeito bacteriostático e bactericida, tanto na presença quanto na ausência de luz conforme apresentado na tabela 3.

Observou-se que, na presença de luz (Luz ON) o complexo RuNO₂ apresentou valores de CIM entre 4 e 8 µg/mL para as cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*, e CBM entre 4 e 16 µg/mL. Interessante destacar que este complexo também apresentou efeito bacteriostático contra *E. coli* e *P. aeruginosa* com valor da CIM de 256 µg/mL para ambas as bactérias. Na ausência de luz (Luz OFF) o complexo RuNO₂ apresentou o dobro dos valores da CIM e da CBM (entre 8 e 32 µg/mL) para as bactérias Gram-positivas, no entanto, contra *E. coli* e *P. aeruginosa* os valores da CIM permaneceram os mesmos.

Ainda conforme a tabela a tabela 3, pelo menos três cepas demonstraram perfil de resistência contra os antibióticos ampicilina (Amp) e tetraciclina (Tetra) de acordo com recomendações e pontos de cortes (Tabela 2) do CLSI (2015). As cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, mostraram ser menos sensíveis a ambos os antibióticos testados. Em adição, a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 apresentou resistência ao tratamento com Amp, exibindo CIM no valor de 1.024 µg/mL.

Tabela 3 – Sensibilidade antimicrobiana de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ao complexo RuNO₂ e antibióticos

Bacteria	CIM (µg/mL)											
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>S. aureus</i> (ATCC 700698)		<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)		<i>S. epidermidis</i> (ATCC 35984)		<i>E. coli</i> (ATCC 11303)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
RuNO ₂ (Luz ON)	4	4	8	16	4	4	4	8	256	ND	256	ND
RuNO ₂ (Luz OFF)	8	16	16	32	8	8	16	32	256	ND	256	ND
Ampicilina	0,25 ^S	0,5	64 ^R	64	2 ^S	2	1.024 ^R	1.024	1 ^S	2	128 ^R	ND
Tetraciclina	0,25 ^S	4	128 ^R	128	0,25 ^S	4	1 ^S	4	1 ^S	4	64 ^R	128

Fonte: Próprio autor: (^S): bactérias sensíveis; (^R): bactérias resistentes; (ND): não determinado.

6.2 Atividade combinada a antibióticos

Como o complexo apresentou valores da CIM mais baixos quando irradiado com luz azul, todos os demais ensaios foram realizados na presença de luz (Luz ON), assim, de posse valores da CIM obtidos nestas condições, o complexo RuNO₂ foi avaliado em combinação com os antibióticos Amp e Tera, no intuito de potencializar o efeito bacteriostático de ambos.

Conforme a tabela 4, o complexo RuNO₂ combinado a Amp apresentou efeito sinérgico sobre todas as cepas de *Staphylococcus*. Os valores do ICIF variaram de 0,125 a 0,375. Foi observado efeito indiferente contra *E. coli* ATCC 11303 (ICIF = 1,06) e efeito antagônico contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 (ICIF >4,0).

Observando a CIM individual da Amp, percebemos sua considerável redução quando combinada com o complexo RuNO₂, especialmente em relação as cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984 (ambas resistentes a meticilina) que exibiram perfil de resistência. Conforme mostrado na tabela 4, observou-se redução de cerca de 1/4 da CIM da Amp contra *S. aureus* e 1/16 contra *S. epidermidis* quando este antibiótico foi combinado com RuNO₂.

Interessante destacar que RuNO₂ em combinação com tetraciclina, apresentou efeito sinérgico somente contra *E. coli* e *P. aeruginosa*. Destaque para o resultado observado entre as combinações, cujo efeito sinérgico foi responsável pela redução de 1/16 nos valores de CIM do complexo e de 1/4 nos valores de CIM do antibiótico. Por outro lado, observamos efeito indiferente contra *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Tabela 4 – Efeito do complexo RuNO₂ combinado aos antibióticos Amp e Tetra contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*

BACTÉRIAS	COMPLEXO DE RUTÊNIO			ANTIBIÓTICO				EFEITO
	RuNO ₂ (Luz ON)			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	4	0,25	0,0625	0,25	0,0625	0,25	0,312	Sinergismo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	8	1	0,125	64	16	0,25	0,375	Sinergismo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	4	0,25	0,0625	2	0,5	0,25	0,312	Sinergismo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	4	0,25	0,0625	1.024	64	0,0625	0,125	Sinergismo
<i>E. coli</i> ATCC 11303	256	256	1,0	1	0,0625	0,0625	1,062	Indiferente
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	256	>256	>2,0	128	>128	>2,0	>4,0	Antagonismo
	RuNO ₂ (Luz ON)			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	4	2	0,5	0,25	0,0312	0,125	0,625	Indiferente
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	8	0,5	0,0625	128	64	0,5	0,562	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	4	2	0,5	0,25	0,0312	0,125	0,625	Indiferente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	4	4	1,0	1	0,0312	0,0312	1,031	Indiferente
<i>E. coli</i> ATCC 11303	256	16	0,0625	1	0,25	0,25	0,312	Sinergismo
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	256	16	0,0625	64	16	0,25	0,312	Sinergismo

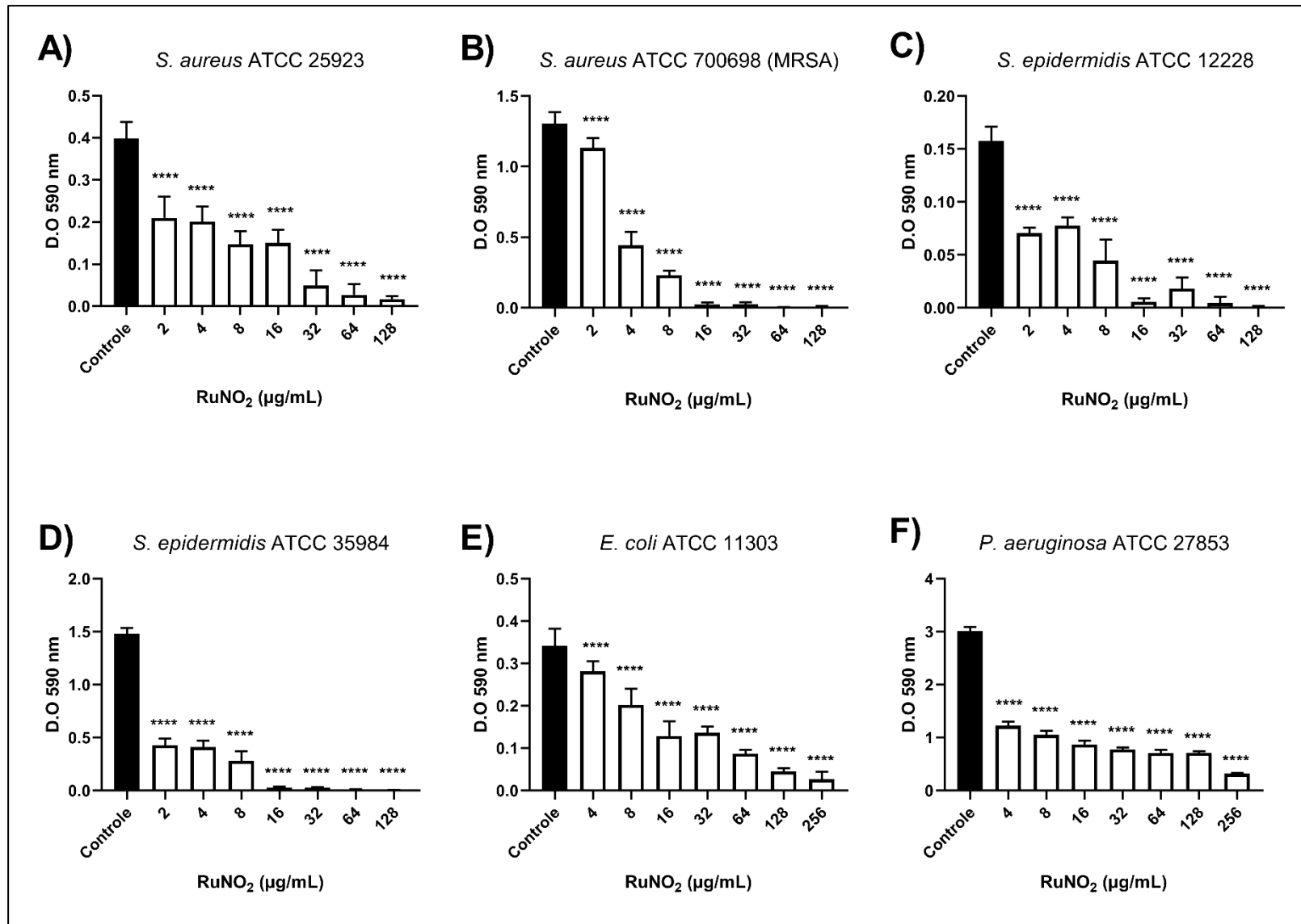
Fonte: Próprio autor. Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (CIM), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM), Concentração Inibitória Fracionada (CIF) e do Índice da Combinação Inibitória Fracionada (ICIF). ICIF ≤ 0,5 efeito sinérgico, ICIF > 0,5 ≤ 4,0 efeito indiferente, ICIF > 4,0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

6.3 Atividade antibiofilme: inibição da formação de biofilmes e contagem de célula viáveis

Nas figuras 35, 36, 37 e 38 encontram-se os resultados da atividade antibiofilme do complexo RuNO₂ (Luz ON) contra as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. O efeito antibiofilme foi avaliado pelo método colorimétrico cristal violeta (CV) e pela contagem do número de células viáveis no biofilme. As figuras 35 e 36 apresentam os resultados dos ensaios de inibição da formação de biofilmes. Já as figuras 37 e 38, demonstraram os efeitos antibiofilme do complexo RuNO₂ contra biofilmes pré-formados das espécies bacterianas.

Conforme mostrado na figura 35, o complexo RuNO₂ reduziu a biomassa total dos biofilmes de todas as espécies bacterianas com percentuais que variaram de 13 a 99,9% (Figura 35A-F). As cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984 mesmo sendo resistentes a ampicilina e outros β-lactâmicos, se mostraram sensíveis a este complexo, apresentando redução em mais de 65% de sua biomassa na concentração de 4 µg/mL (concentração da CIM) e de 99,8% em sua maior concentração de (128 µg/mL) (Figura 35B e D). Para as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa* observamos percentuais de redução da biomassa em cerca de 90% na concentração da CIM (256 µg/mL) e em mais de 40% em concentrações subinibitórias (cerca de 1/16 da CIM) conforme pode se verificar na figura 35E-F.

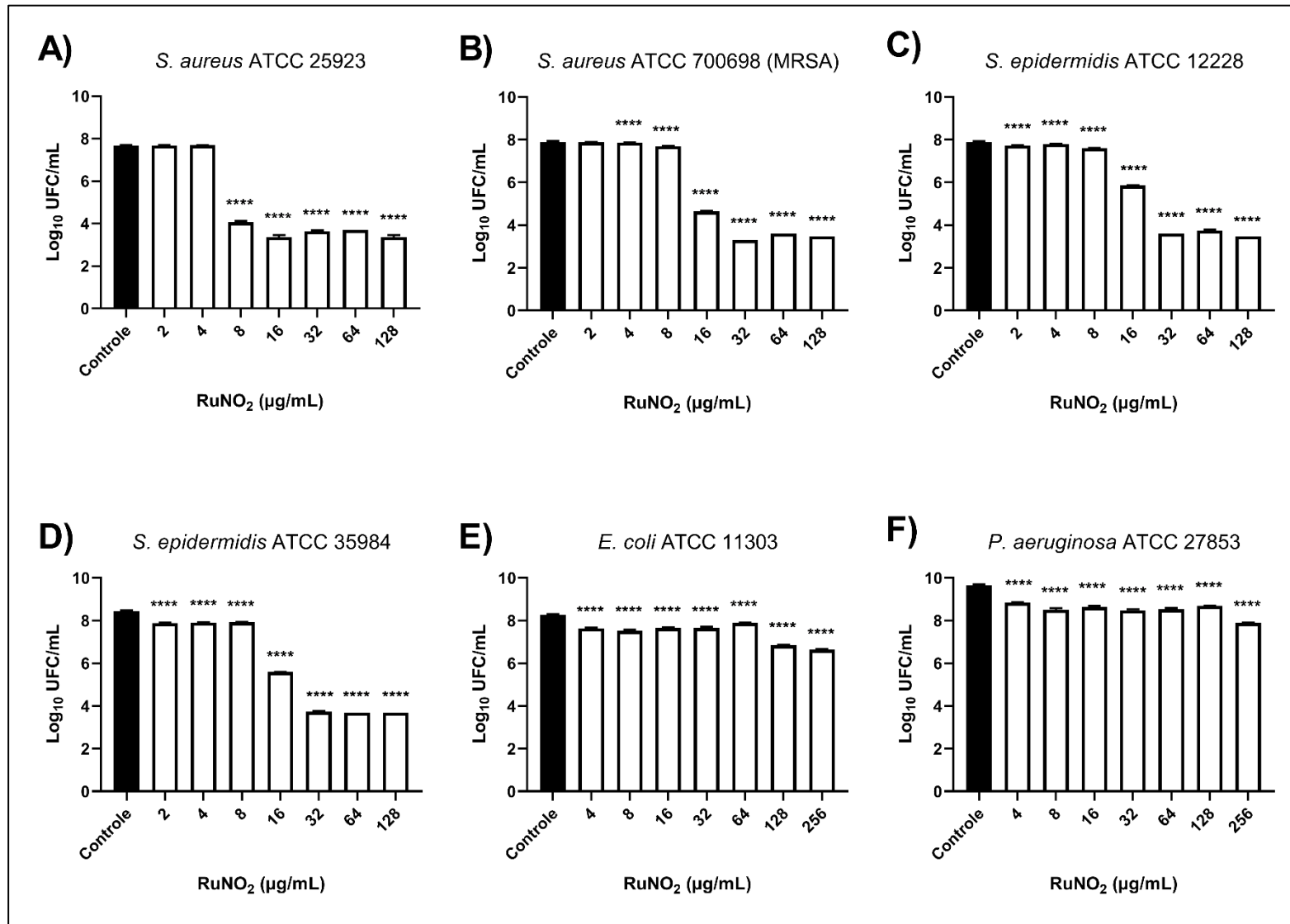
Figura 35 – Efeito do complexo RuNO₂ sobre a formação de biofilmes de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*



Fonte: Próprio autor. Quantificação da biomassa (A – F) através da coloração por cristal violeta (CV). Colunas brancas representam bactérias tratadas com diferentes concentrações de RuNO₂, colunas pretas representam o controle de bactérias não tratadas. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 e ****p < 0,0001 representam diferença estatística em relação ao controle.

No ensaio de contagem de células viáveis presentes nos biofilmes, todas as cepas testadas mostraram-se suscetíveis, com redução no número de UFC que variaram de 1 a 4 ordens de grandeza na escala logarítmica (Figura 36A-F). Dentre as cepas usadas neste ensaio, mais uma vez *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984, já relatados na literatura como resistente a meticilina e designados de MRSA e MRSE, mostraram-se sensíveis ao tratamento com RuNO₂, pois observou-se redução em mais de 4 ordens na escala logarítmica no número de células viáveis na concentração de 32 µg/mL (Figura 36B-D), o que representa uma redução de 10.000 vezes, no número destas células presentes no biofilme. *E. coli* e *P. aeruginosa* apresentaram reduções de cerca de 1 ordem de grandeza em relação ao controle quando tratadas com RuNO₂ na concentração de 256 µg/mL (Figura 36E-F).

Figura 36 – Efeito do complexo RuNO₂ sobre o número de células viáveis presentes em biofilmes de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*



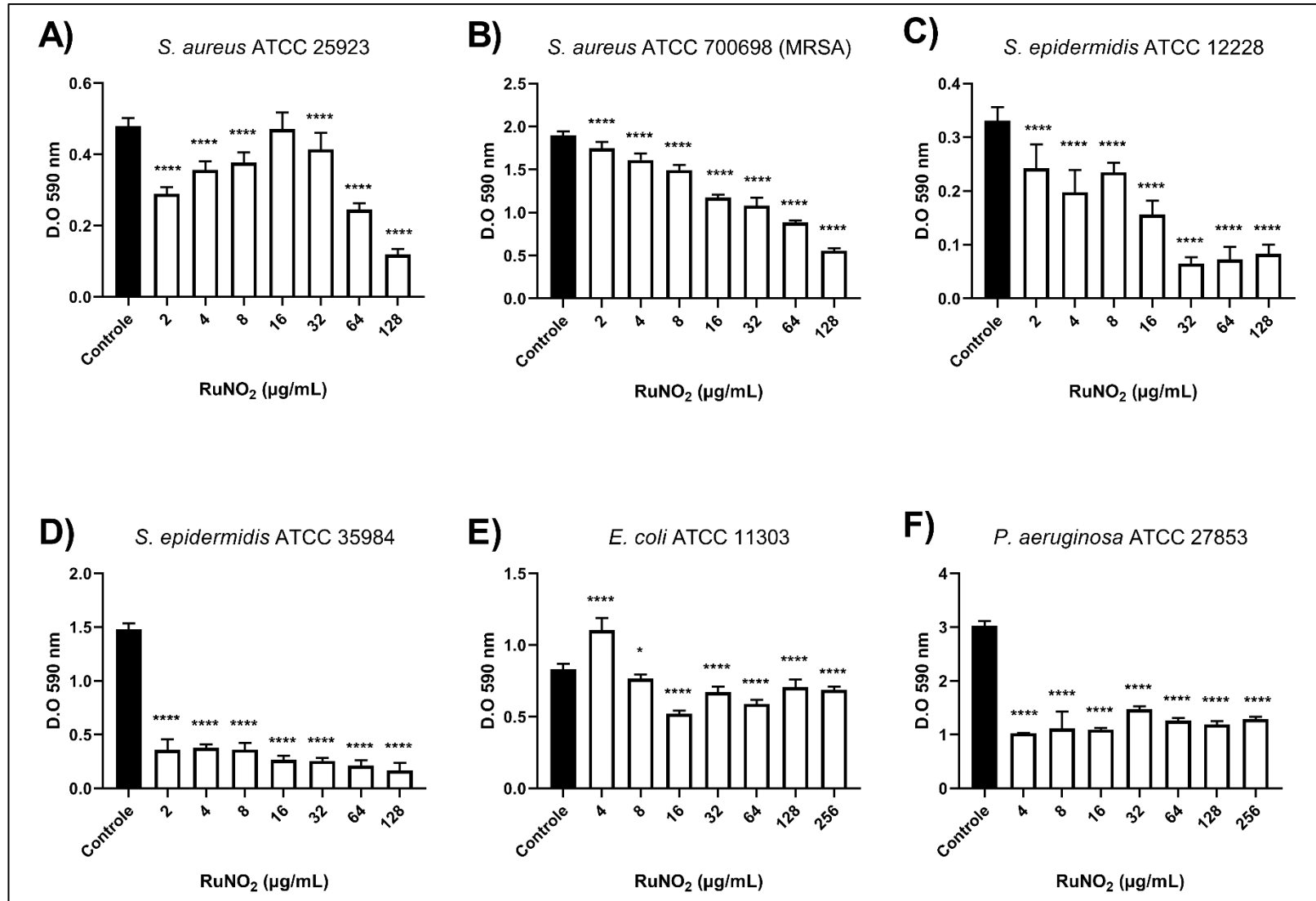
Fonte: Próprio autor. Contagem do número de células viáveis (A – F). Colunas brancas representam bactérias tratadas com diferentes concentrações de RuNO₂, colunas pretas representam o controle de bactérias não tratadas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ representam diferença estatística em relação ao controle.

6.4 Atividade sobre biofilmes pré-formados: quantificação da biomassa e enumeração de células viáveis

Além dos ensaios de avaliação sobre a inibição da formação de biofilmes na presença do complexo RuNO₂, também foi verificado a capacidade do complexo de reduzir a biomassa e o número de células viáveis de biofilmes pré-formados (com 24 h de formação), no intuito de investigar seu potencial para tratar biofilmes já estabelecidos.

De modo geral, o complexo RuNO₂ (Figura 37A-F), foi capaz de induzir a redução da biomassa total das cepas avaliadas neste estudo. Observou-se que os biofilmes de *S. epidermidis* ATCC 35984 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 se mostraram mais sensíveis ao tratamento com RuNO₂ com redução da biomassa em mais de 65% nas menores concentrações (2 µg/mL para *S. epidermidis* e 4 µg/mL para *P. aeruginosa*) para ambas as bactérias (Figura 37D e F). Os biofilmes das demais cepas mostraram-se mais resistentes, no entanto, *S. aureus* ATCC 700698 apresentou comportamento de dose dependência.

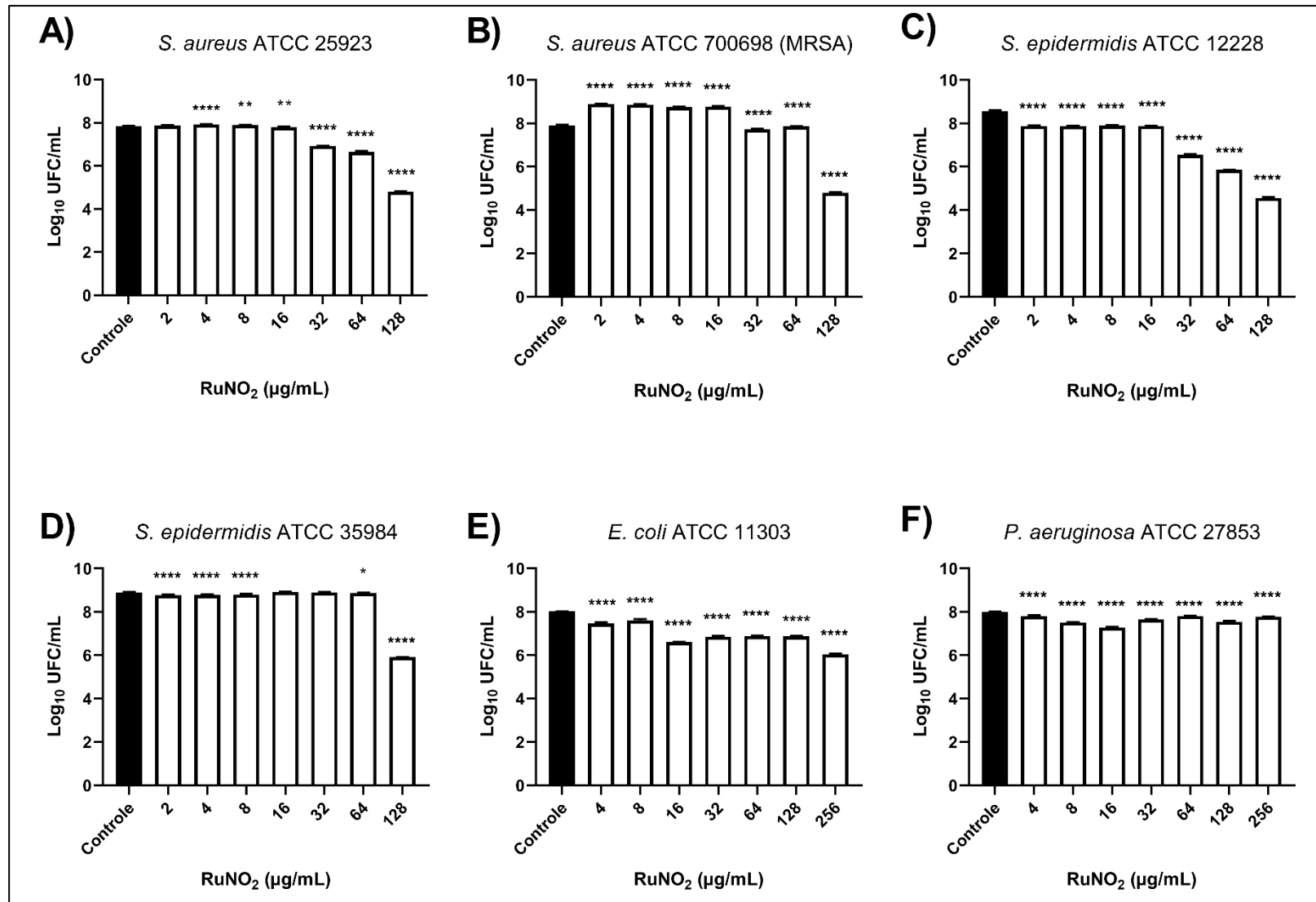
Figura 37 – Efeito do complexo RuNO₂ sobre a biomassa de biofilmes pré-formados de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*



Fonte: Próprio autor. Quantificação da biomassa (A – F) através da coloração por cristal violeta (CV). Colunas brancas representam bactérias tratadas com diferentes concentrações de RuNO₂, colunas pretas representam o controle de bactérias não tratadas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ representam diferença estatística em relação ao controle.

Em relação ao número de células viáveis nos biofilmes pré-formados (Figura 38A-F), RuNO₂ reduziu o número de UFC em pelo menos 2 ordens de grandezas na escala logarítmica nas concentrações mais altas (128 µg/mL para Gram-positivas e 256 µg/mL para Gram-negativas) com exceção do biofilme de *P. aeruginosa*. Os biofilmes das cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentaram os maiores níveis de redução de UFC, já que exibiram diminuição de 3 e 4 ordens de grandezas respectivamente (Figura 38B-C) em relação ao controle. Observou-se que *S. aureus* ATCC 700698 mostrou diferença significativa nas menores (entre 16 e 2 µg/mL), no entanto, houve aumento no número de UFC, o que implica aumento na densidade celular. De modo geral, os biofilmes de *E. coli* e *P. aeruginosa* exibiram diferença significativa ($p < 0,0001$) após tratamento com diferentes concentrações de RuNO₂ em relação ao controle de bactérias não tratadas.

Figura 38 – Efeito do complexo RuNO₂ no número de células viáveis em biofilmes pré-formados de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*



Fonte: Próprio autor. Contagem do número de células viáveis (A – F). Colunas brancas representam bactérias tratadas com diferentes concentrações de RuNO₂, colunas pretas representam o controle de bactérias não tratadas. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001 e *****p* < 0,0001 representam diferença estatística em relação ao controle.

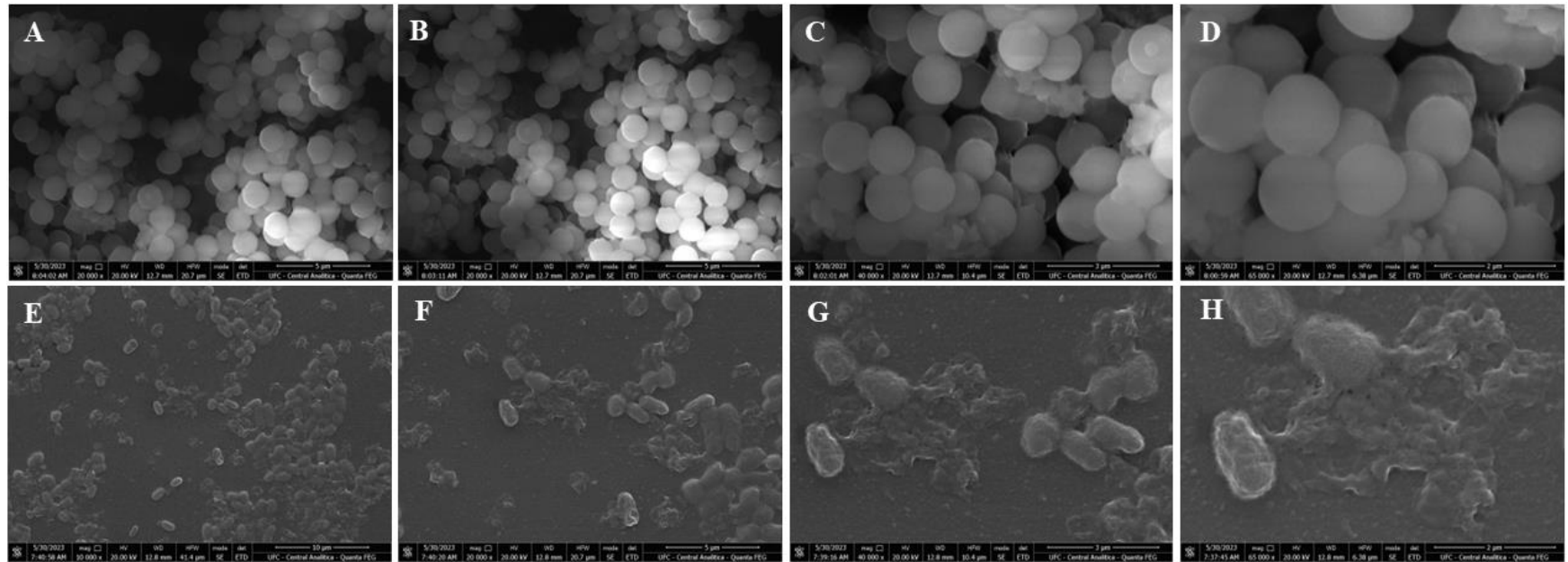
6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com a finalidade de analisar alterações na morfologia de células planctônicas e na densidade celular da biomassa de biofilmes em formação de *S. aureus* e *E. coli* dos efeitos do complexo RuNO₂, eletromicrografias dos biofilmes tratados e não tratados foram obtidas por MEV. As imagens obtidas são mostradas nas figuras 39 e 40.

Conforme mostrado na figura 39A-D, as células bacterianas de *S. aureus* que formam o controle de bactérias não tratadas, apresentam uma morfologia normal, em forma de coco e, visivelmente observa-se a integridade da parede e membrana celular. As eletromicrografias desse controle de bactérias, também mostraram alta densidade celular embebidas na matriz polimérica do biofilme que, estava aparentemente estava crescendo na forma tulipa ou aglomerados celulares. Por outro lado, percebe-se também a imensa alteração morfológica nas células de *S. aureus* quando tratadas com RuNO₂ irradiado com luz azul na concentração de 32 µg/mL (Figura 39E-H), um indicativo que este complexo pode agir no eixo parede/membrana celular e, a superfície das células também se apresentam com maior rugosidade. É notavelmente visível as células de *S. aureus* pós-tratamento apresentam-se quase como em forma de bacilo, já que as células mostram um algum tipo de alongamento na morfologia celular. Observa-se também danos na membrana plasmática, pois também é verificado rompimentos na integridade celular como está mostrado na figura 39F. Verificou-se também baixa densidade celular e células dispensas sobre a superfície onde o biofilme foi formado (Figura 39D-E).

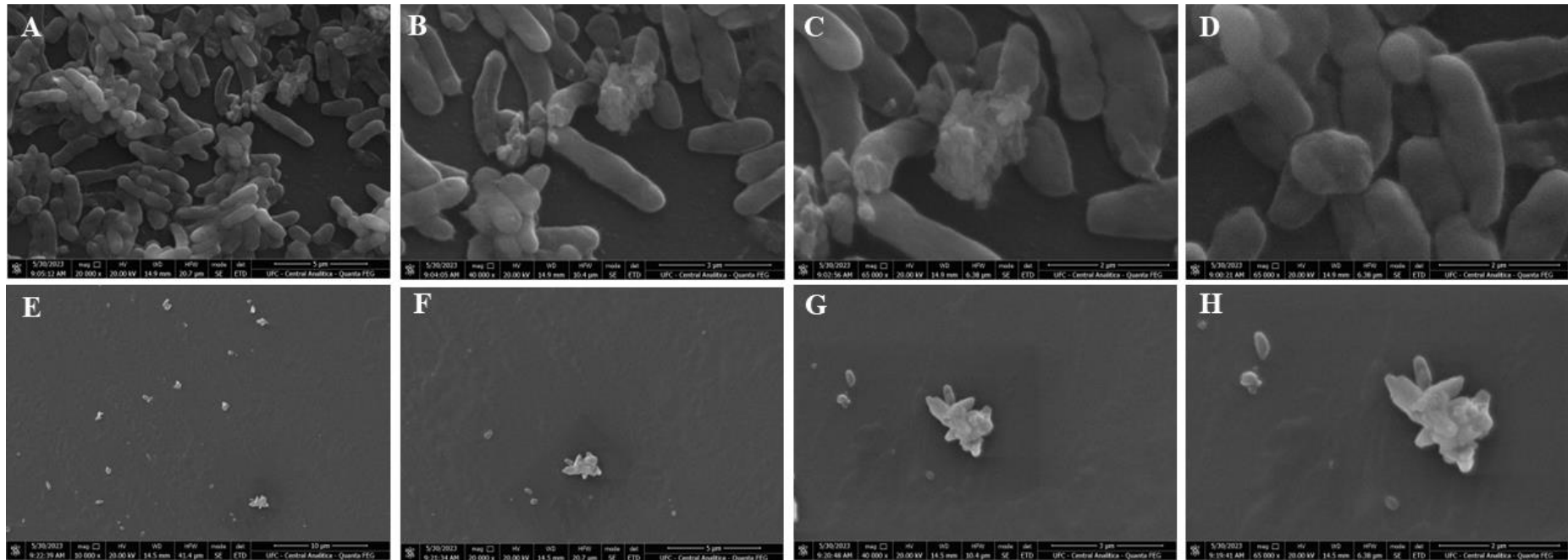
As mesmas observações também são feitas para *E. coli*. No controle de bactérias não tratadas (Figura 40A-D), mas também irradiadas com luz azul, percebe-se uma alta densidade celular constituindo o biofilme e células com integridade preservadas, já que é perceptível a presença de bacilos, a morfologia celular característica da bactéria Gram-negativa *E. coli*. No grupo tratado com RuNO₂ na concentração de 256 µg/mL (Figura 40E-H), praticamente não se observou formação de biofilme, indicando uma baixa densidade celular. Ademais as células estão com sua morfologia totalmente alteradas. Percebe-se também comprometimento da parede celular e da membrana plasmática.

Figura 39 – Eletromicrografias mostrando o efeito do complexo RuNO_2 sobre células planctônicas e biofilmes de *S. aureus* ATCC 700698 após 24 h de tratamento



Fonte: Próprio autor. Eletromicrografias (A – D) mostram biofilmes não tratados de *S. aureus* nas magnificações de 20.000x, 40.000x, 60.000x e 65.000x respectivamente. Eletromicrografias (E – H) mostram biofilmes de *S. aureus* tratados com RuNO_2 na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ nas magnificações de 20.000x, 40.000x, 60.000x e 65.000x respectivamente.

Figura 40 – Eletromicrografias mostrando o efeito do complexo RuNO₂ sobre células planctônicas e biofilmes de *E. coli* ATCC 11303 após 24 h de tratamento



Fonte: Próprio autor. Eletromicrografias (A – D) mostram biofilmes não tratados de *E. coli* nas magnificações de 20.000x, 40.000x, 60.000x e 65.000x respectivamente. Eletromicrografias (E – H) mostram biofilmes de *E. coli* tratados com RuNO₂ na concentração de 256 µg/mL nas magnificações de 20.000x, 40.000x, 60.000x e 65.000x respectivamente.

6.6 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

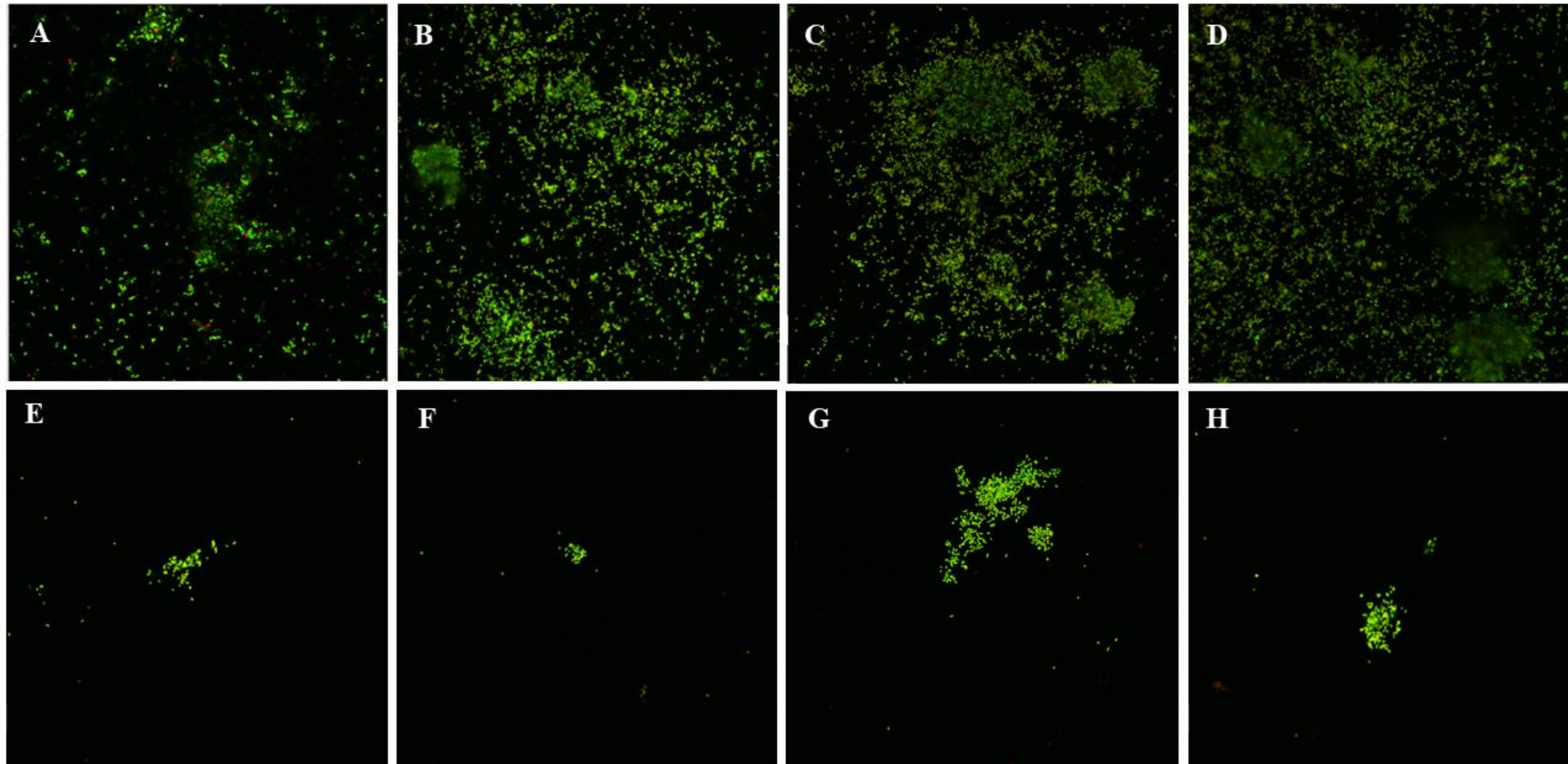
No intuito de investigar os efeitos de RuNO₂ sobre a viabilidade das células de biofilmes em formação e pré-formados, foram realizadas análises em microscopia confocal de varredura a laser. Nas análises, as células vivas (coradas com SYTO9) apareceram com fluorescência verde, e as células mortas (coradas com iodeto de propídio) apareceram com fluorescência vermelha. As figuras 41 e 42 apresentam os efeitos de RuNO₂ sobre a viabilidade das células de biofilmes em formação de *S. aureus* ATCC 700698 (MRSA) e *E. coli* ATCC 11303 nas concentrações de 32 e 256 µg/mL respectivamente.

Como observado em ambas as figuras, no grupo tratado com RuNO₂ nas concentrações mencionadas, percebeu-se baixa densidade celular, evidenciada pela fina camada de células bacterianas, e pouca matriz polimérica compondo a estrutura dos biofilmes de *S. aureus* e *E. coli* (Figuras 41E-H e 42E-H). Essa baixa densidade celular no biofilme de *S. aureus* evidenciada na concentração teste (32 µg/mL), confirma os resultados encontrados na contagem de UFC (Figura 36B), já que após contagem de células viáveis observou-se uma diminuição de 4 ordens de grandezas no número de células em relação ao controle não tratado, algo estimado em uma redução de 10.000x. Por outro lado, os biofilmes de *S. aureus* no grupo controle (Figura 41A-D) mostraram células viáveis marcadas em verde e aglomerados de celulares indicando uma alta densidade de celular compondo e estruturando o biofilme.

Para biofilmes de *E. coli* observamos a redução global no número de células viáveis (Figura 42E-H) quando comparados com o controle de crescimento não tratado (Figura 42A-D) que apresenta muitos aglomerados celulares e um biofilme crescendo tanto na forma de tapete quanto de tulipa. O tratamento com RuNO₂ na concentração de 256 µg/mL (concentração da CIM) também proporcionou efeito antibiofilme, um fato que foi observado pela baixa densidade celular e ausência quase completa da biomassa total do biofilme.

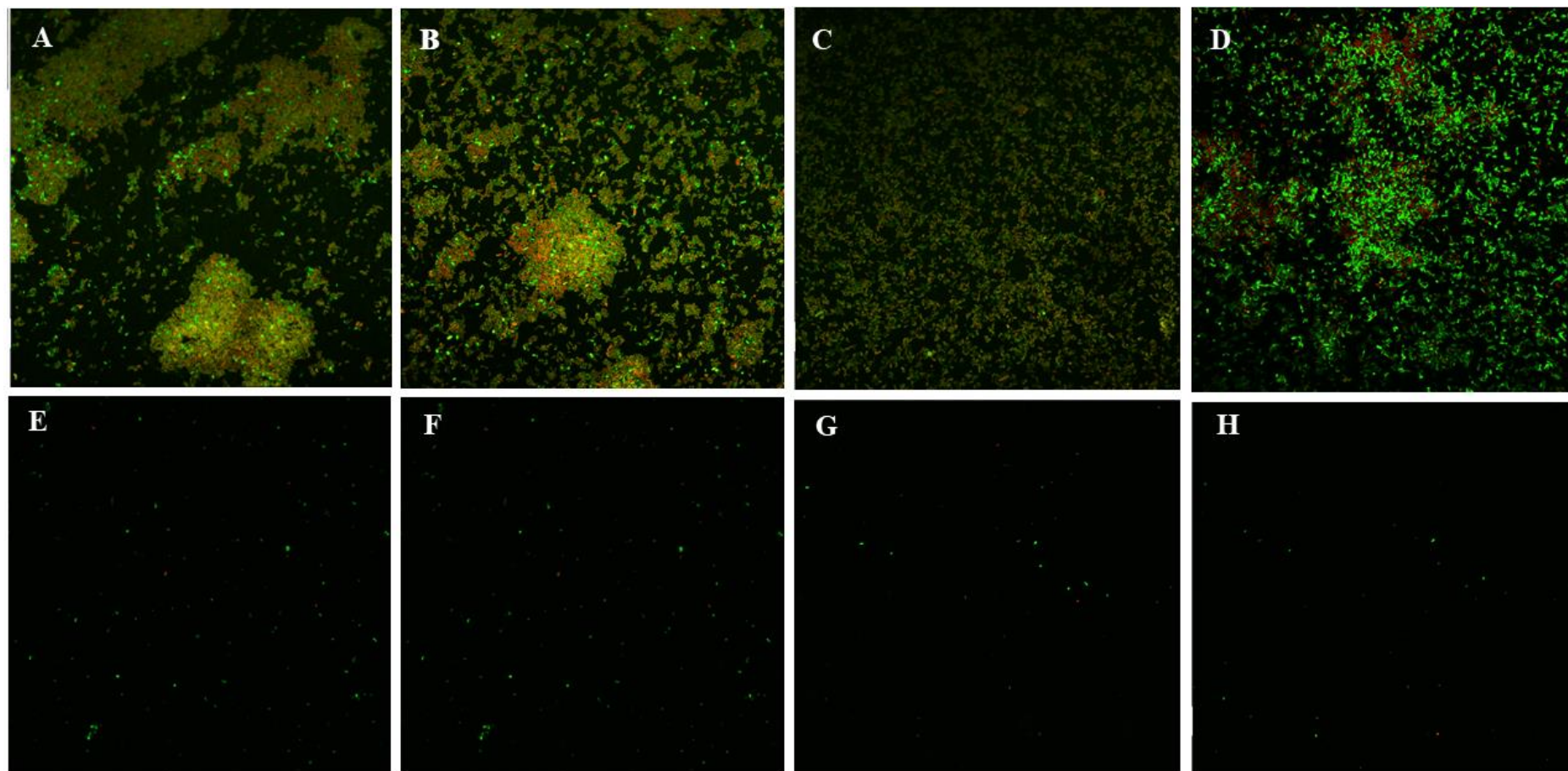
Em biofilmes pré-formados de *S. aureus*, observamos alta densidade de células mortas coradas em vermelho (Figura 43E-H) após tratamento com RuNO₂ na concentração de 64 µg/mL, um indicativo da internalização de iodeto de propídio e sua ligação ao DNA citoplasmático, algo ocasionado por danos na integridade da membrana celular. Nos biofilmes sem tratamento (Figura 43A-D) é visível a alta densidade de célula viáveis com acentuada fluorescência verde, assim como a manutenção de um biofilme bem robusto.

Figura 41 – Micrografias da avaliação do efeito do complexo RuNO₂ sobre a formação de biofilmes de *S. aureus* ATCC 700698 tratados por 24 horas



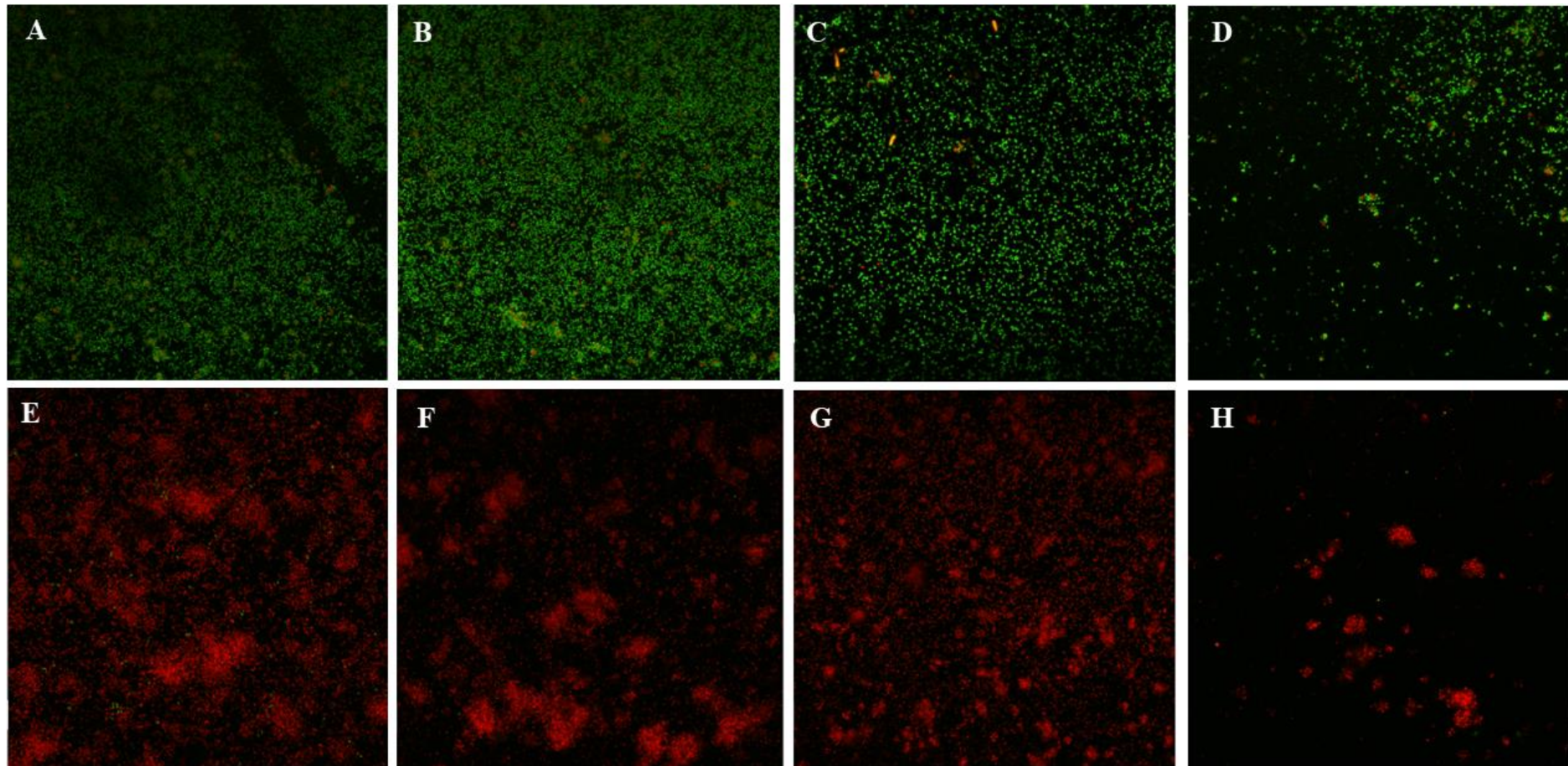
Fonte: Próprio autor. Microscopia confocal de varredura a laser: (A - D) controle de biofilmes de *S. aureus* ATCC 700698 (MRSA). (E - H) biofilmes de *S. aureus* ATCC 700698 (MRSA) tratados com RuNO₂ na concentração de 32 µg/mL. Magnitude: 600× (A - H). Lasers: 488 nm para detecção de SYTO9 e 561 nm para detecção de iodeto de propídio.

Figura 42 – Micrografias da avaliação do efeito do complexo RuNO₂ sobre a formação de biofilmes de *E. coli* ATCC 11303 tratados por 24 horas



Fonte: Próprio autor. Microscopia confocal de varredura a laser: (A - D) controle de biofilmes de *E. coli* ATCC 11303. (E - H) biofilmes de *E. coli* ATCC 11303 tratados com RuNO₂ na concentração de 256 µg/mL. Magnitude: 600× (A - H). Lasers: 488 nm para detecção de SYTO9 e 561 nm para detecção de iodeto de propídio.

Figura 43 – Micrografias da avaliação do efeito do complexo RuNO₂ sobre biofilmes pré-formados de *S. aureus* ATCC 700698 tratados após 24 horas de crescimento

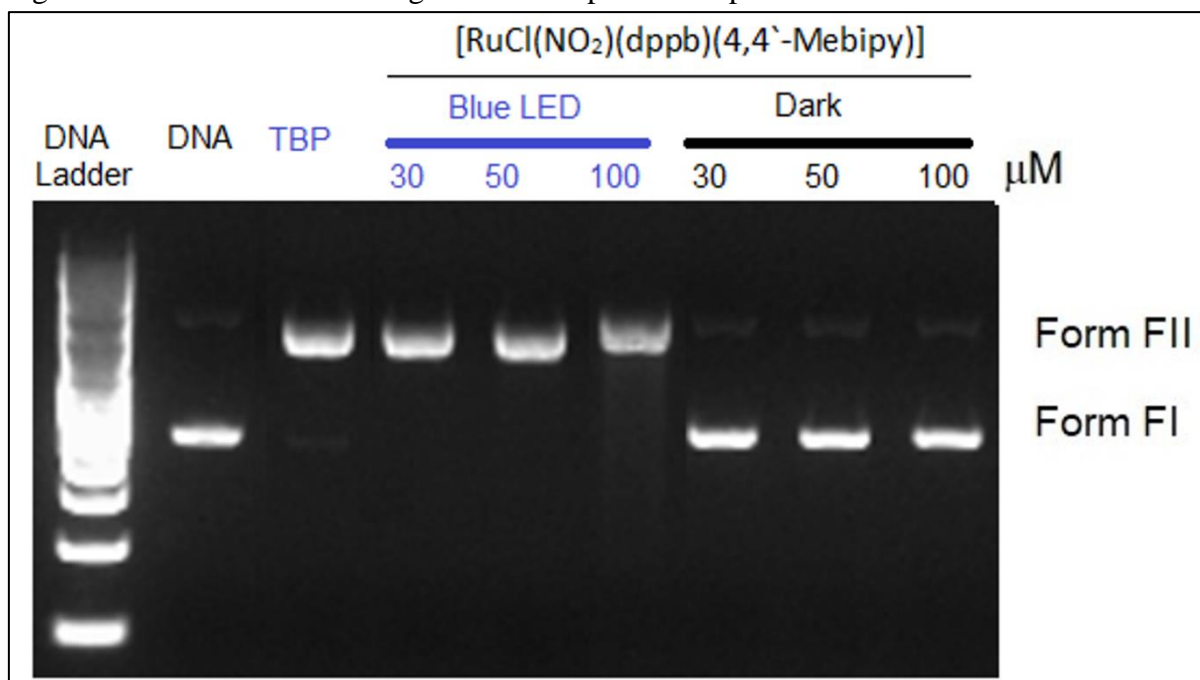


Fonte: Próprio autor. Microscopia confocal de varredura a laser: (A - D) controle de biofilmes pré-formados de *S. aureus* ATCC 700698 (MRSA). (E - H) biofilmes pré-formados de *S. aureus* ATCC 700698 (MRSA) tratados com RuNO₂ na concentração de 64 µg/mL. Magnitude: 600× (A - H). Lasers: 488 nm para detecção de SYTO9 e 561 nm para detecção de iodeto de propídio.

6.7 Fotoclivagem de DNA

Com o objetivo de compreender a relação entre sua estrutura química e o efeito antimicrobiano do complexo RuNO_2 , investigamos a interação *in vitro* desse complexo com DNA plasmidial pBR322 através da técnica de eletroforese em gel de agarose, tanto sob irradiação com luz azul ($\lambda_{\text{irr}} = 463 \text{ nm}$) ou incubado no escuro (Figura 44). As pistas de controle de DNA com ou sem o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ mostraram que o plasmídeo pBR322 não apresentou degradação (forma I; Figura 44). O complexo RuNO_2 na ausência de irradiação, não apresentou qualquer evidência de clivagem de DNA mesmo em concentrações de até $100 \mu\text{M}$ (Figura 44). Por outro lado, RuNO_2 sob irradiação de luz azul, promoveu uma clara clivagem do DNA, levando à formação de DNA fragmentado (forma II), algo que pode estar relacionado a liberação de NO e sua capacidade de reagir com O_2 e degradar DNA.

Figura 44 – Ensaio de fotoclivagem de DNA plasmidial pBR322

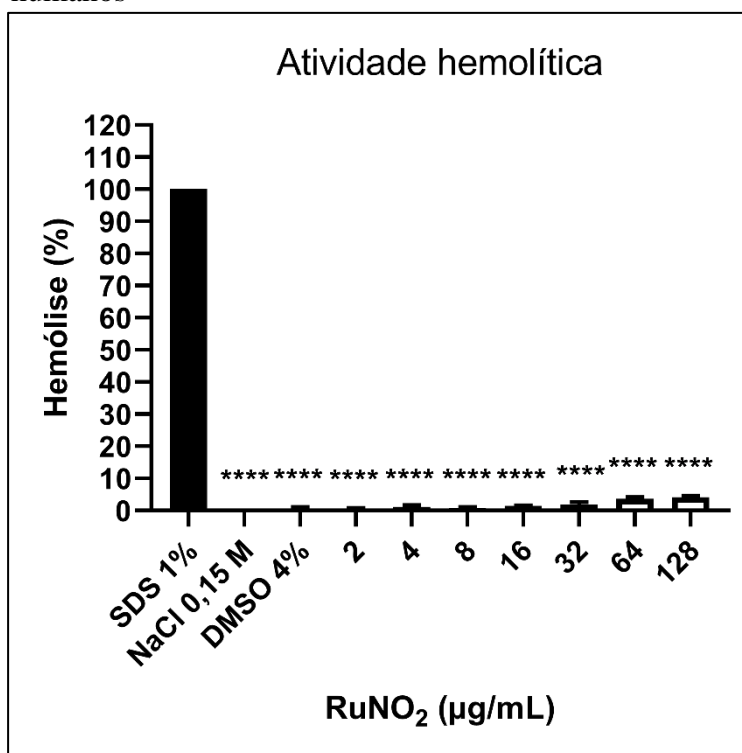


Fonte: Laboratório de Bioinorgânica- UFC. A pista 2 mostra apenas DNA de pBR322. O DNA plasmídico foi incubado com RuNO_2 nas concentrações de 100, 50, 30 μM tanto irradiado por luz azul por 1 h, quanto na ausência de irradiação. O complexo TBP = $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ foi utilizado como controle positivo para DNA fotoclivado.

6.8 Atividade hemolítica

Em relação a atividade hemolítica, observamos que o complexo RuNO₂ apresentou baixo percentual de hemólise (entre 2 a 4%) apenas para as concentrações de 64 e 128 µg/mL (Figura 45). Não foi observada hemólise nas concentrações que variaram de 2 a 32 µg/mL, algo dentro da faixa de concentrações da CIM e CBM; além disso, não foi observada hemólise quando foram utilizados NaCl 0,15 M ou DMSO 4% (controles negativos). O controle positivo (SDS 1%) apresentou 100% de hemólise.

Figura 45 – Atividade hemolítica do RuNO₂ em eritrócitos humanos

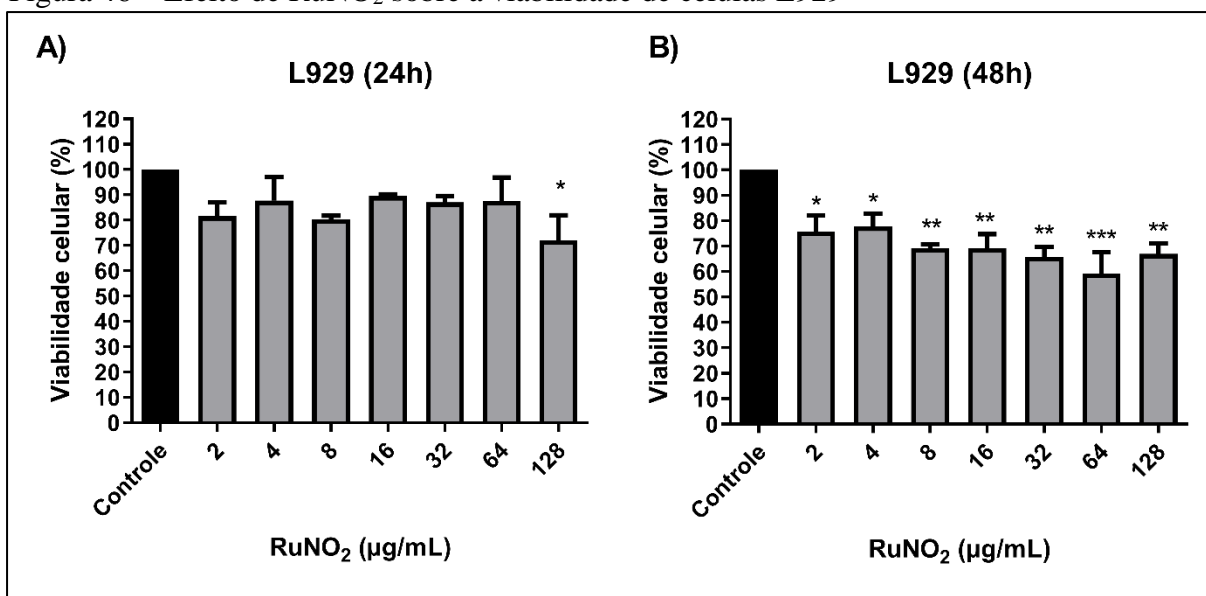


Fonte: Próprio autor. ***p* <0,01; ****p* <0,001 e *****p* <0,0001 representam diferença estatística em relação ao controle de hemólise total (SDS 1%).

6.9 Avaliação do efeito citotóxico sobre fibroblastos murinos

Conforme mostrado na figura 46, os resultados indicam que não houve diferença estatística entre o controle e os grupos tratados com diferentes concentrações de RuNO₂ nas primeiras 24 h (Figura 46A). Após 48 h (Figura 46B), foi observado efeito citotóxico em praticamente todas as concentrações, no entanto, como não houve redução da viabilidade celular em mais de 50%, o que indica que o complexo não apresenta toxicidade. Ademias, a avaliação morfológica das células através de microscopia não mostrou alterações morfológicas após tratamento com RuNO₂ (dados não mostrados).

Figura 46 – Efeito de RuNO₂ sobre a viabilidade de células L929



Fonte: Próprio autor. As células foram tratadas com diferentes concentrações (128 - 2 µg/mL) de RuNO₂. A viabilidade celular (%) foi medida por ensaio MTT. A) Efeito de RuNO₂ sobre a viabilidade celular por 24 horas. B) Efeito de RuNO₂ sobre a viabilidade celular por 48 horas. (n = 6, média ± SD). (*; **, *** $p < 0,05$ quando comparado ao controle (DMSO 1%).

7 DISCUSSÃO

Por muitas décadas, os antimicrobianos têm sido eficazes no tratamento ou prevenção de uma ampla gama de doenças infecciosas, no entanto, sua eficiência está sendo colocada em risco, devido ao surgimento progressivo de microrganismos mais resistentes aos antibióticos tradicionais (HERNANDO-AMADO *et al.*, 2019). Patógenos como *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis* resistentes a metilina, estão no topo das preocupações globais, para pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, o que representa um passo importante no combate a RAM (BURNHAM *et al.*, 2017; GHOSH *et al.*, 2021; MURRAY *et al.*, 2022).

Nas últimas décadas, pesquisas consideráveis sobre a concepção e desenvolvimento de novos antimicrobianos foram desenvolvidas e, apesar de um grande número de novas moléculas ou compostos, tanto de origem natural quanto sintética, terem sido investigadas visando combater microrganismos multirresistentes, poucas demonstram um efeito antimicrobiano efetivo ou conseguem progredir para ensaios clínicos (GHOSH *et al.*, 2018; KAVIYARASU *et al.*, 2017; AMARIEI *et al.*, 2018; MAGDALANE *et al.*, 2018).

Nesse cenário, onde de um lado se tem a crescente ameaça da resistência antimicrobiana e do outro, a preocupação global da iminência de uma período pós-antibiótico, onde lesões e infecções comuns podem voltar a ser letais (WHO, 2021), compostos à base de metais tem demonstrado excelentes atividades terapêuticas, com destaque para os complexos de rutênio que tem exibido significativas atividades antiparasitária (SILVA *et al.*, 2010), anticancerígena (SOUSA *et al.*, 2016) e antimicrobiana (ABREU *et al.*, 2017; da SILVEIRA CARVALHO *et al.*, 2017; ANDRADE *et al.*, 2020), que somado à TFDa, representa uma alternativa promissora para combate e controle da RAM (MULANI, *et al.*, 2019; PIETROWSKA *et al.*, 2022; YOUNG *et al.*, 2022).

Neste estudo, foram avaliadas as atividades antimicrobiana, o efeito combinado a antibióticos e a citotoxicidade do complexo RuNO₂ irradiado por luz azul (Luz ON) contra bactérias de interesse clínico. Os ensaios para verificação do efeito do complexo sobre o controle do crescimento microbiano mostraram que RuNO₂ (Luz ON) exibiu efeito bacteriostático e bactericida sobre as cepas bacterianas avaliadas com valores de CIM e CBM variando de 4 a 16 µg/mL para *S. aureus* e *S. epidermidis* e apenas CIM de 256 µg/mL para *E. coli* e *P. aeruginosa* (Tabela 4), algo que pode estar relacionado a capacidade deste complexo de liberar NO. Observamos também que o complexo apresentou CIM e CBM na ausência de luz (Luz OFF), com valores de CIM e CBM dobrados (entre 8 e 32 µg/mL).

Resultados similares aos deste estudo também foram relatados por Sousa *et al.* (2020b), que ao avaliarem o efeito antimicrobiano de um complexo nitrosil (doador de NO) perceberam um maior efeito inibitório deste, do que seu precursor (sem NO em sua composição), indicando que a liberado de NO está provavelmente relacionado à capacidade microbicida mais eficaz de compostos quando este está em sua estrutura.

A literatura demonstra que o NO possui atividade citotóxica, que é empregado até mesmo pelas nossas próprias células de defesa (por exemplo, macrófagos) contra patógenos, visando muitas biomoléculas (por exemplo, lipídios da membrana celular, proteínas e até mesmo DNA) (SILVA *et al.*, 2018). Outras características de interesse indicam que o NO como radical livre reativo, também inibe a fixação bacteriana, destruindo as proteínas de adesão e inibindo as principais metaloproteínas responsáveis pela respiração celular bacteriana (YANG *et al.*, 2017). Além disso, há relatos que sustentam que o NO pode causar alteração química do DNA e inibição de enzimas de reparo bem conhecidas desta macromolécula (FANG, 1997; SCHAIRER *et al.*, 2012).

Trabalho similar realizado por Abreu *et al.* (2017), investigaram complexos de rutênio com ligantes polipiridina e fosfina e verificaram o efeito antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas quando estes eram irradiados com LED azul. Por sua vez, e da Silveira Carvalho *et al.* (2017), que também avaliaram a atividade antimicrobiana do complexo cis-[RuCl(CO)(dppb)(dppz)]⁺ que com irradiação de luz LED azul, mostrou resultados de inibição de crescimento contra *S. aureus* e *S. epidermidis*, apresentando CIM bem próximos as da amicacina, um agente antimicrobiano de referência, e uma excelente atividade de inibição contra *Candida albicans*, algo que não foi observado contra bactérias Gram-negativas. De todo modo, ambos os trabalhos concluíram que o mecanismo de ação destes complexos poderia envolver sua forte ligação ao DNA e a geração de ¹O₂.

Segundo Macgowan e Macnaughton (2017), as espécies bacterianas Gram-negativas apresentam uma maior resistência a ação de agentes antimicrobianos (o que inclui o complexo RuNO₂ avaliado neste estudo), algo que pode estar relacionado a estas bactérias possuírem resistência intrínseca, que envolve sua morfologia e fisiologia, ou adquirida, por meio de THG. Em nosso estudo e outros (ABREU *et al.*, 2017; da SILVEIRA CARVALHO *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2020b; ANDRADE *et al.*, 2020) bactérias como *E. coli* e *P. aeruginosa* mostraram níveis elevados de resistência, mostrando altos valores de CIM para os complexos, ou a ausência de uma concentração inibitória nas concentrações avaliadas. Livermore (2012), atribui a resistência a bactérias Gram-negativas, pelo fato de possuírem mecanismos moleculares de resistência contra os antimicrobianos, sendo que, os mais comuns, envolvem

alterações nas proteínas ligadoras de penicilina (PBP), produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e bombas de efluxo.

Corroborando com essa hipótese, Li *et al.* (2015), ao reexaminarem o complexo $[\text{Ru}(\text{Me}_4\text{phen})_3]^{2+}$, observaram que este apresentava alta atividade bactericida em relação a bactérias Gram-positivas, e atividade moderada contra bactérias Gram-negativas, levando-os a propor que o complexo foi acumulado pelas bactérias, e que, a extensão da acumulação, está mais ou menos correlacionada com a sua atividade bactericida (*S. aureus* > MRSA > *E. coli* > *P. aeruginosa*). Como $[\text{Ru}(\text{Me}_4\text{phen})_3]^{2+}$ mostrou-se ser mais facilmente acumulado por espécies bacterianas Gram-positivas e, concluíram que a extensão dos efeitos antimicrobianos seja dependente da acumulação intracelular do complexo e sua consequente ligação irreversível a alvos moleculares (LI *et al.*, 2015).

Atualmente, uma grande variedade de formulações de complexos de rutênio estão sendo estudadas como potenciais agentes antimicrobianos para combater a ameaça iminente da RAM. No entanto, na literatura ainda são escassos os estudos de avaliação da combinação o entre complexos de rutênio e antibióticos, dessa forma, neste estudo avaliamos a interação entre diferentes concentrações do complexo RuNO_2 combinado com os antibióticos ampicilina e tetraciclina. Conforme mostrado na tabela 4, a combinação entre o RuNO_2 e ampicilina, resultou em um efeito sinérgico quando avaliado contra *S. aureus* e *S. epidermidis*, algo interessante que nos leva a ampliar a compreensão dos possíveis mecanismos de ação do complexo. Curiosamente, nenhuma interação e até mesmo efeito antagônico foi observado quando RuNO_2 combinado a ampicilina foi avaliado contra *E. coli* e *P. aeruginosa*, algo que pode estar relacionado à presença da membrana externa neste grupo de bactérias, ou mesmo a outros mecanismos de resistência como bomba de fluxo (LIVERMORE, 2012; ABREU *et al.* 2017).

Os ensaios da combinação entre RuNO_2 e tetraciclina mostraram dois resultados distintos: 1) nenhuma interação contra bactérias Gram-positivas; 2) efeito sinérgico contra bactérias Gram-negativas. Estes resultados podem reforçar a ideia de que o complexo RuNO_2 é absorvido e acumulado no citoplasma bacteriano e interage reversivelmente com alvos intracelulares, como DNA, RNA, proteínas, membranas ou outros metabólitos, causando danos e conseqüentemente morte celular, conforme demonstrado por Sousa *et al.* (2018). No nosso caso, suspeitamos que a combinação com tetraciclina permitiria uma melhor absorção do RuNO_2 , facilitando a liberação de NO intracelular e a interação com as biomoléculas e estruturas já citadas, ou ainda alteração da permeabilidade da membrana externa após interação com RuNO_2 , o que poderia facilitar a entrada da tetraciclina.

Em publicação recente, Andrade *et al.* (2020), avaliaram o efeito combinado aos antibióticos ampicilina e tetraciclina de um complexo denominado de RuNN com ligantes fosfina e quinona e verificaram efeito sinérgico, aditivo e antagônico contra *S. aureus* e *S. epidermidis*. Ainda segundo os autores, o complexo RuNN exibiu efeito sinérgico em combinação com a ampicilina que reduziu significativamente os valores da CIM deste antibiótico contra *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984, cepas resistentes aos antibióticos β -lactâmicos. Outros trabalhos que envolveram a síntese e a atividade antimicrobiana de um quelato Ru (III)–trimetoprima (TMP), e de um complexo Ru(II)-areno, combinados com o antibiótico ciprofloxacina e um derivado de ciprofloxacina (CipA), também apresentaram efeito sinérgico ou aditivo (DEMIREZEN *et al.*, 2012; UDE *et al.*, 2016).

Dentro do espectro de ação antimicrobiana do complexo RuNO₂ avaliados neste estudo, encontra-se a atividade antibiofilme. Os biofilmes são responsáveis por até 80% de todas as causas de infecções bacterianas crônicas e recorrentes em humanos (SHARMA; MISBA; KHAN, 2019), sendo que a presença de biofilmes foi confirmada em mais de 90% das superfícies secas em unidades de terapia intensiva (PARVIN *et al.*, 2019). Atualmente, a presença de bactérias resistentes a antibióticos e as infecções por elas causadas constituem uma enorme ameaça à saúde pública (FOTINOS *et al.*, 2008), um problema que é agravado pela presença de bactérias em biofilmes, um mecanismo de sobrevivência microbiano que as torna até 1.000 vezes mais resistentes à desidratação, fagocitose, toxicidade de metais, exposição a ácidos e antibióticos do que em sua forma planctônica (OTTER *et al.*, 2015).

Em relação atividade antibiofilme de RuNO₂ (Figuras 35, 36, 37 e 38), observou-se que houve redução significativa da biomassa total dos biofilmes em formação e pré-formados. Em sua maior concentração (128 μ g/mL para Gram-positivas e 256 μ g/mL para Gram-negativas), o complexo reduziu em pelo menos 90% a biomassa dos biofilmes das bactérias avaliadas. As cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984 mesmo sendo resistentes a ampicilina e outros β -lactâmicos, se mostraram sensível a este complexo, apresentado redução em mais de 65% de sua biomassa na concentração de 4 μ g/mL (concentração da CIM) e de 99,8% em sua maior concentração de (128 μ g/mL) (Figura 35B e D). Mesmo em concentrações subinibitórias, observou-se mais 40% de redução da biomassa total dos biofilmes de *E. coli* e *P. aeruginosa* (Figura 35E-F). Como foi observado atividade bacteriostática e bactericida deste complexo, a redução da biomassa pode estar relacionada com a diminuição de células planctônicas, resultado de danos ocasionados na parede celular e/ou membrana plasmática após tratamento por RuNO₂. Segundo Sharma *et al.* (2012), danos em estruturas bacterianas como paredes e membranas, interferem na capacidade das bactérias de se

ligarem a células hospedeiras, e bloqueiam sua capacidade de se ligar umas às outras para iniciarem a formação de biofilmes.

Com relação ao efeito do tratamento de RuNO₂ sobre as células viáveis nos biofilmes de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, este estudo mostrou redução significativa no número de UFC com diferenças estatísticas ($p < 0,0001$) em relação ao controle sem tratamento. Em alguns casos, a redução no número de células viáveis chegou a 4 ordens de grandeza na escala logarítmica em relação ao controle (Figura 36B-D), o que representou uma diminuição de 10.000 vezes no número de células. Em estudo reportado na literatura, Murray *et al.* (2012), fizeram a relação entre a contagem de células viáveis no biofilme, para determinar se a morte celular bacteriana poderia contribuir para mudanças na produção e estabilidade da matriz de SPE do biofilme, em comparação, os resultados encontrados em neste estudo sugerem que a diminuição no número de células viáveis ocasionados pelo efeito bacteriostático ou bactericida de RuNO₂, provavelmente interferiu na densidade celular e consequentemente na produção da matriz de SPE do biofilme, um fato que pôde ser comprovado pela microscopia confocal e eletrônica de varredura.

Em relação aos biofilmes pré-formados, o complexo também exibiu atividade antibiofilme com reduções estatisticamente significativas ($p < 0,0001$) na biomassa total e no número de células viáveis, em relação ao controle de bactérias sem tratamento. Até mesmo cepas bacterianas com perfil de resistência (*S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984) e requerem concentrações até 1.000 vezes mais elevadas de antibióticos, se mostraram sensíveis ao tratamento com RuNO₂ que induziu a redução da biomassa total em mais de 75% na concentração de 128 µg/mL. Do mesmo modo, 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 do complexo RuNO₂ com diminuição do número de células viáveis entre 2 a 4 ordens na escala logarítmica, nas maiores concentrações (62 e 128 µg/mL).

Trabalho similar realizado por Jiang *et al.* (2022) ao avaliarem o efeito antibiofilme de três complexos polipiridina de rutênio ligados a trifetilamina designados de Ru-1, Ru-2 e Ru-3, observaram que este último provou ser o complexo mais eficaz e de acordo com os resultados, a formação de biofilme na presença de Ru-3 foi significativamente reduzido em 27% e 41% na concentração de 1 µg/mL e 2 µg/mL, respectivamente, um resultado que segundo os autores indicaram que o Ru-3 pode obviamente inibir a formação de biofilme na concentração subinibitória. Em seguida, os autores também realizaram um ensaio de ataque ao biofilme bacteriano para explorar ainda mais se o Ru-3 poderia reduzir o número de células

viáveis no biofilme. De modo geral, os autores observaram que Ru-3 apresentou um efeito significativo na morte de *S. aureus* no biofilme, e com o aumento da concentração de Ru-3, o número de bactérias vivas no biofilme diminuiu drasticamente, sendo que o número de *S. aureus* sobreviventes no biofilme diminuiu inicialmente 8,6 log₁₀ para 0 log₁₀ UFC/mL, quando a concentração de Ru-3 foi de 32 µg/mL, exatamente igual ao seu valor de MBC, dados que indicaram que Ru-3 pode inibir não apenas a formação de biofilmes, mas também os biofilmes bacterianos já formados, sugerindo que o comportamento antimicrobiano do Ru-3 provavelmente não é propenso à resistência aos medicamentos.

A fraca permeabilidade dos antibióticos tradicionais é uma das principais razões para a diminuição da sua capacidade terapêutica e o aumento de bactérias multirresistentes (SUN *et al.*, 2021; YAN; BASSLER, 2019; GAFUR *et al.*, 2020). Portanto, a excelente capacidade de danificar a membrana deve ser uma característica importante dos agentes antibacterianos recentemente desenvolvidos (WANG *et al.*, 2019). Nesse sentido, para verificar se RuNO₂ pode causar danos a integridade da membrana bacteriana ou de sua parede celular, foram realizados ensaios de MEV e microscopia confocal.

As eletromicrografias obtidas por MEV (Figuras 39 e 40) e as micrografias obtidas por microscopia confocal (Figuras 41, 42 e 43), mostraram a ação de RuNO₂ na parede celular e membrana plasmática de *S. aureus* e *E. coli*. Como apresentado na seção dos resultados, é perceptível a imensa alteração morfológica nas células de *S. aureus* quando tratadas com RuNO₂ na concentração de 32 µg/mL (Figura 39H), um indicativo que este complexo causou danos na parede celular, pois as células de *S. aureus* pós-tratamento apresentam-se na forma de bacilo. Além disso, como uma das funções da parede celular é manter a morfologia das células bacterianas, qualquer interferência ou mesmo a ausência desta estrutura, causa alterações na forma das bactérias. Verificou-se também baixa densidade celular e células dispersas sobre a superfície onde o biofilme foi formado (Figura 39E-H), confirmando-se assim a redução da matriz de SPE, um componente que corresponde a mais de 80% da matéria orgânica da massa seca do biofilme (RHOADS; WOLCOTT; PERCIVAL, 2008), e resultando na redução da quantificação da biomassa, e no número de células viáveis também avaliados neste estudo.

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 de biofilmes de *E. coli* (Figura 40E-H) mostraram modificações na morfologia da parede celular bacteriana, exibindo 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 deste sobre bactérias Gram-positivas, concluíram que o complexo pôde inibir o crescimento de espécies bacterianas como *S. aureus* e *M. tetragenus*, sendo que, observações de MEV de ambas as bactérias tratadas com RuBP, mostraram danos na parede celular e na integridade da membrana, o que deve ter induzido a inibição do crescimento e a morte celular.

A microscopia confocal de biofilmes pré-formados de *S. aureus*, evidenciou que que o tratamento com RuNO₂ foi capaz de se difundir pelas estruturas tridimensionais complexas do biofilme bacteriano que é constituída de componentes como água (até 97%), polissacarídeos, proteínas e enzimas, DNA e RNA, e atingiu a alta densidade de células bacterianas (cerca de 2–5% do biofilme), causando ruptura das membranas bacterianas, um fato observado pela alta fluorescência vermelha (Figura 43E-H) através da internalização do iodeto de propídio, um fluoróforo que se liga ao DNA de bactérias que apresentam lesões na integridade da membrana plasmática (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2016), o que também é consistente com os dados obtidos através da MEV (Figura 39G-H).

A observação morfológica de amostras bacterianas de *S. aureus* tratadas com complexos de rutênio também foram avaliadas por MEV por Jiang *et al.* (2022). Neste estudo, os autores também observaram que as bactérias do grupo controle apresentavam uma superfície celular completa e lisa, sem ruptura, no entanto, no grupo tratado com Ru-3 na concentração de 4 µg/mL por 2 h, a maioria das estruturas bacterianas foram deformadas, colapsadas e muitas ondulações foram observadas, revelando que o tratamento com Ru-3 levaria à destruição física de membrana celular.

Nesse mesmo estudo, Jiang *et al.* (2022), observaram também diferenças entre o grupo tratado com Ru-3 e o grupo controle de crescimento bacteriano quando expostos aos fluoróforos 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) e iodeto de propídio iodeto (PI). O DAPI pode entrar em células vivas e mortas e produzir fluorescência azul, enquanto o PI só pode entrar em células com membrana danificada e combinar-se com ácido nucleico para produzir fluorescência vermelha (Sun *et al.*, 2021), dessa forma, os autores observaram fluorescência azul apenas no grupo controle, sugerindo membranas celulares intactas de *S. aureus*, em contraste, foi observada fluorescência azul e vermelha para os grupos Ru-3, indicando que Ru-3 pode efetivamente desintegrar a membrana de *S. aureus* na concentração de 4 µg/mL.

Em relação ao bioensaio de fotoclivagem de DNA com o complexo, observamos que RuNO₂ não apresentou qualquer evidência de clivagem de DNA na ausência de irradiação de luz azul, mesmo na maior concentração (100 µM) (Figura 44). Por outro lado, sob irradiação de luz, o complexo promoveu a clivagem eficiente do DNA, levando à formação de DNA

fragmentado (Figura 44 - forma II). Em estudo recente, foi mostrado que um complexo nitrosila designado de $ct\text{-[RuCl(NO)(dppb)(4,4-Mebipy)]}^{2+}$ promoveu a clivagem eficiente do DNA mesmo sem luz, no entanto, também verificou-se que essa degradação é potencializada pela luz azul (SOUSA *et al.*, 2020b). De modo geral, isto pode ser explicado pelo fato do NO ligado a este composto ser liberado espontaneamente em poucas horas, mas, ter seu processo de liberação acelerado quando irradiado por luz azul. De todo modo, o complexo diaqua $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{dppb})(4,4\text{-Mebipy})]^{2+}$ formado após a liberação de NO é capaz de degradar rapidamente o DNA e pode ser parcialmente responsável por este resultado (SOUSA *et al.*, 2020b). Além disso, o NO pode, direta ou indiretamente através de uma reação com O_2 ou O_2 , danificar o DNA, inibir muitas funções enzimáticas e induzir a peroxidação lipídica causando danos à membrana, sendo responsável pela maioria das propriedades antimicrobianas (BOGDAN; ILINGHOFF; DIEFENBACH, 2000; de LIMA *et al.*, 2005; KOTTUR; NAIR, 2016).

Fazendo um comparativo entre o possível mecanismo de ação antimicrobiana do complexo nitrosila $[\text{RuCl(NO)(dppb)(4,4-Mebipy)]}^{2+}$ e do complexo RuNO_2 , observamos que esses complexos exibem efeito antimicrobiano através de diferentes mecanismos quando mantidas na ausência de luz. Entretanto, após irradiação com luz azul, suspeitamos que tanto o complexo nitrosila quanto RuNO_2 possuem mecanismo de ação semelhante, e provavelmente estão relacionados à fotoliberação de NO.

Nesse estudo também avaliamos a citotoxicidade de RuNO_2 através da mensuração da atividade hemolítica e da viabilidade em cultura de células L929. A toxicidade de qualquer composto que tenha finalidade de aplicações farmacológicas, incluindo parâmetros hemolíticos, é muito importante fornecer informações sobre as interações entre moléculas e entidades biológicas a nível celular, sendo considerado um indicador de citotoxicidade geral para células normais (GHOSH *et al.*, 2018). De modo geral, a porcentagem de atividade hemolítica do complexo RuNO_2 foi inferior a 5% em todas as concentrações testadas (Figura 45). A ausência deste efeito colateral favorece a realização de mais estudos sobre metalocompostos com potencial administração endovenosa de acordo com sua concentração. Vários medicamentos utilizados na terapêutica que foram relatados como promotores de hemólise em uma taxa de até 5%, foram considerados clinicamente seguros (JIN *et al.*, 2018). Nesse caso, o ensaio de hemólise realizado neste estudo mostrou segurança para possíveis usos de RuNO_2 em terapias futuras, de acordo com o interesse em suas atividades em sistemas biológicos.

Em relação a atividade citotóxica sobre células de fibroblastos murinos (L929) RuNO_2 apresentou resultados que demonstram margem de segurança quanto a citotoxicidade

(Figura 46). Considerando que em nenhuma das concentrações avaliadas o complexo foi capaz de reduzir a viabilidade celular em mais de 50% quando tratadas no período de 24 a 48 h, percebeu-se uma citotoxicidade muito baixa em linhagens de células saudáveis, o que pode indicar que este composto pode apresentar algum tipo de seletividade, no entanto esta hipótese precisa ser avaliada.

Estudos realizados Nunes et al. (2019), avaliaram a viabilidade de células normais de fibroblastos murinos (L929) e adenocarcinoma humano (pulmão A549, próstata LNCAP e mama MCF-7), quando tratadas com isoniazida (INH) e com o complexo biperidílico Ru-INH, sendo os ensaios conduzidos com e sem irradiação de luz azul. Com a irradiação de luz azul, os autores notaram um aumento na citotoxicidade do Ru-INH para as linhagens celulares L929 e A549, mas foi menos eficaz para células MCF-7 e LNCAP. Os resultados mostraram ainda que a INH sozinha teve um efeito citotóxico contra ambas as células normais e tumorais. Por outro lado, quando o INH foi conjugado ao metal rutênio (II) complexo, seu efeito antitumoral tornou-se mais seletivo, principalmente no adenocarcinoma da próstata (LNCAP), notando ainda que Ru-INH não apresentou efeitos tóxicos contra células normais (L929) quando comparado às células cancerígenas e concluíram que esses resultados são animadores e apoiam um bom índice de seletividade para o uso potencial de Ru-INH também como agente antitumoral.

Outro estudo realizado por Oliveira *et al.* (2020), investigou o efeito citotóxico e antitumoral dos complexos biperidílicos Ru-biot e Ru-anth fotoativados contra quatro tipos de células de mamíferos (HaCaT, LS174T, A549 e MCF-7) pelo ensaio MTS. Os resultados encontrados pelos autores mostraram que o complexo metálico não biotinilado (Ru-anth) não apresentou nenhuma atividade de citotoxicidade promissora sem ou com irradiação luminosa. Por outro lado, o complexo biotinilado (Ru-biot) induziu uma redução dramática na viabilidade das células cancerígenas, particularmente contra células A549 e MCF-7. Notavelmente, o Ru-biot sem irradiação de luz não causou qualquer redução na viabilidade celular. No entanto, a irradiação de luz azul promoveu um efeito citotóxico significativo.

Notadamente, percebe-se que além do efeito antimicrobiano dos complexos de rutênio citados ao longo deste estudo, há um certo grau de seletividade de citotoxicidade destes complexos sobre células cancerígenas em relação as células normais, no entanto, os mecanismos de ação que envolvem a citotoxicidade precisa de maiores investigações.

8 CONCLUSÕES

- O complexo de rutênio RuNO₂ irradiado com luz azul, apresentou atividade antibacteriana e antibiofilme contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- Os resultados da combinação com os antibióticos ampicilina e tetraciclina, exibiram efeito sinérgico, e/ou antagônico, sendo que cepas resistentes a estes antibióticos, se mostraram sensíveis quando tratadas em combinados com o complexo RuNO₂;
- O efeito antibiofilme foi observado através da inibição da formação e da redução do número de células viáveis para biofilmes em formação e por meio da redução da biomassa e do número de células viáveis para biofilmes pré-formados;
- A MEV e confocal, evidenciaram a ação do complexo RuNO₂ sobre a parede celular e a membrana plasmática tanto de *S. aureus* quanto de *E. coli*, apontando assim para seu possível mecanismo de ação envolver tanto o complexo em si, ou a liberação de NO;
- O ensaio envolvendo a degradação de DNA *in vitro*, mostrou a capacidade do complexo de causar fotoclivagem, possivelmente também através da liberação de NO;
- Os resultados da citotoxicidade sobre eritrócitos humanos e células murinas L929, demonstraram um perfil de segurança para aplicações futuras do complexo RuNO₂ em sistemas biológicos;
- Estudos envolvendo a citotoxicidade *in vivo* em modelos de peixe *zebrafish* adulto ou camundongos, verificação da atividade antitumoral contra as células tumorais de pulmão A549, próstata LNCAP e mama MCF-7 e a detecção da indução da produção de ERO, são perspectivas futuras deste estudo.

REFERÊNCIAS

- ABID, M.; SHAMSI, F.; AZAM, A. Ruthenium complexes: an emerging ground to the development of metallopharmaceuticals for cancer therapy. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 16, p. 772–786, 2016.
- ABISADO, R. G.; BENOMAR, S.; KLAUS, J. R.; DANDEKAR, A. A.; CHANDLER, J. R. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. **mBio**, v. 9, p.e02331-17, 2018.
- ABREU, F. D.; DIÓGENES, I. C. N.; LOPES, L. G. F.; SOUSA, E. H. S.; CARVALHO, I. M. M. Ruthenium(II) Bipyridine Complexes with Pendant Anthracenyl and Naphthyl Moieties: A Strategy for a ROS Generator with DNA binding Selectivity. **Inorg. Chim. Acta.**, v. 439, p. 92-99, 2016.
- ABREU, F.D.; PAULO, T. F.; GEHLEN, M. H.; ANDO, R. A.; LOPES, L. G. F.; GONDIM, A. C. S.; VASCONCELOS, M. A.; TEIXEIRA, E. H.; SOUSA, E. H. S.; CARVALHO, I. M. M. Aryl-Substituted Ruthenium(II) Complexes: A Strategy for Enhanced Photocleavage and Efficient DNA Binding. **Inorg Chem.**, v. 56, p. 9084-9096, 2017.
- AHMAD-MANSOUR, N.; LOUBET, P.; POUGET, C.; DUNYACH-REMY, C.; SOTTO, A.; LAVIGNE, J. P.; MOLLE, V. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. **Toxins (Basel)**, v. 13, p. 677, 2021.
- AL HAMDAN, A. S.; ALGHAMDI, A. A.; ALYOUSIF, G. F.; HAMZA, F. A.; SHAFEY, M. M.; ALAMRI, A. M.; SUNKI, A. A. Evaluating the prevalence and the risk factors of gram-negative multi-drug resistant bacteria in Eastern Saudi Arabia. **Infect. Drug Resist.** v. 15, p. 475–490, 2022.
- ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; BERGAMO, A.; SAVA, G. Ruthenium antimetastatic agents. **Curr. Top. Med. Chem.** v. 4, p. 1525–1535, 2004.
- ALEXANDER, J. W. “History of the medical use of silver,” **Surgical Infections**, v. 10, n. 3, p. 289–292, 2009.
- AMARIEI, G.; KOKOL, V.; BOLTES, K.; LETÓN, P.; ROSAL, R. Incorporation of antimicrobial peptides on electrospun nanofibres for biomedical applications. **RSC Adv.**, v. 8, p. 28013–28023, 2018.
- ANDRADE, A. L.; DE VASCONCELOS, M. A.; ARRUDA, F. V. S.; DO NASCIMENTO NETO, L. G.; CARVALHO, J. M. S.; GONDIM, A. C. S.; LOPES, L. G. F.; SOUSA, E. H. S.; TEIXEIRA, E. H. Antimicrobial activity and antibiotic synergy of a biphosphinic ruthenium complex against clinically relevant bacteria. **Biofouling**, v. 36, n. 4, p. 442-454, 2020.
- ANDRIANI, K. F.; CARAMORI, G. F.; DORO, F. G.; PARREIRA, R. L. T. Ru–NO and Ru–NO₂ bonding linkage isomerism in *cis*-[Ru(NO)(NO)(bpy)₂]^{2+/+} complexes – a theoretical insight. **Dalton Trans.**, v. 43, n. 23 p. 8792 – 8804, 2014.

- ANWAR, H.; van, B. T.; DASGUPTA, M.; LAM, K.; COSTERTON, J. W.; ANWAR, H.; van BIESEN, T.; DASGUPTA, M.; LAM, K.; COSTERTON, J. W. Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel in vitro chemostat system. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 33, p. 1824–1826, 1989.
- ARGEMI, X.; HANSMANN, Y.; PROLA, K.; PRÉVOST, G. Coagulase-negative staphylococci pathogenomics. **Int. J. Mol. Sci.** v. 20, p. 1215, 2019.
- ARGUDÍN, M. A.; DEPLANO, A.; MEGHRAOUI, A.; DODÉMONT, M.; HEINRICHS, A.; DENIS, O.; NONHOFF, C.; ROISIN, S. Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. **Antibiotics (Basel)**. v. 6, n. 2, p. 12, 2017.
- ARNAOUTELI, S.; BAMFORD, N. C.; STANLEY-WALL, N. R.; KOVÁCS, Á. T. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. **Nat. Ver. Microbiol.** v. 19, p. 600-614, 2021.
- ASOKAN, G.V.; RAMADHAN, T.; AHMED, E.; SANAD, H. WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medline-PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. **Oman. Med. J.** v. 34, n. 3, p. 184-193, 2019.
- AUSTRALIA, DEPARTMENT OF HEALTH AND AGED CARE (2017). **Infographic - how antibiotic resistance can spread**, 2017.
- BALABAN, N. Q.; HELAINE, S.; LEWIS, K.; ACKERMANN, M.; ALDRIDGE, B.; ANDERSSON, D. I.; BRYNILDSEN, M. P.; BUMANN, D.; CAMILLI, A.; COLLINS, J. J. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 17, p. 441–448, 2019.
- BANASZKIEWICZ, S.; CALLAND, J. K.; MOURKAS, E.; SHEPPARD, S. K.; PASCOE, B.; BANIA, J. Genetic Diversity of Composite Enterotoxigenic *Staphylococcus epidermidis* Pathogenicity Islands. **Genome Biol Evol.** v. 11, p. 3498-3509, 2019.
- BANDARA, H.; LAM, O. L. T.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, L. Microbial chemical signaling: a current perspective. **Crit. Rev. Microbiol.** v. 38, p. 217–249, 2012.
- BANERJI, A.; JAHNE, M.; HERRMANN, M.; BRINKMAN, N.; KEELY, S. Bringing community ecology to bear on the issue of antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology** 10, 2019.
- BAPTISTA, M. S.; CADET, J.; DI MASCIO, P.; GHOGARE, A. A.; GREER, A.; HAMBLIN, M. R.; LORENTE, C.; NUNEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S.; THOMAS, A. H.; VIGNONI, M.; YOSHIMURA, T. M. Type I and type II photosensitized oxidation reactions: Guidelines and mechanistic pathways. **Photochem. Photobiol.** v. 93, p. 912–919, 2017.
- BAQUERO, F.; LEVIN, B. R. Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 19, p. 123–132, 2021.
- BARBIER, F.; RUPPÉ, E.; HERNANDEZ, D.; LEBEAUX, D.; FRANCOIS, P.; FELIX, B.; DESPREZ, A.; MAIGA, A.; WOERTHER, P. L.; GAILLARD, K *et al.* Methicillin-resistant

coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of *SCCmec* IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Infect Dis.** v. 202, p. 270-81, 2010.

BARRY, N. P.; SADLER, P. J. Exploration of the medical periodic table: towards new targets. **Chem. Commun. (Camb).** v. 49, p. 5106-31, 2013.

BASTOS, T. M.; BARBOSA, M. I.; DA SILVA, M. M.; DA C JÚNIOR, J. W.; MEIRA, C. S.; GUIMARAES, E. T.; ELLENA, J.; MOREIRA, D. R.; BATISTA, A. A.; SOARES, M. B. Nitro/Nitrosyl-Ruthenium Complexes Are Potent and Selective Anti-Trypanosoma cruzi Agents Causing Autophagy and Necrotic parasite Death. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 10, p. 6044-6055, 2014.

BAUER, M.; KNEBEL, J.; LECHNER, M.; PICKL, P.; FREY, E. Ecological feedback in quorum-sensing microbial populations can induce heterogeneous production of autoinducers. **eLife**, v. 6, p. e25773, 2017.

BENGTSSON-PALME, J.; MILAKOVIC, M.; ŠVECOVÁ, H.; GANJTO, M.; JONSSON, V.; GRABIC, R. *et al.* Industrial wastewater treatment plant enriches antibiotic resistance genes and alters the structure of microbial communities. **Water Res.** v. 162, p. 437-445, 2019.

BENGTSSON-PALME, J.; GUNNARSSON, L.; LARSSON, D. G. J. Can branding and price of pharmaceuticals guide informed choices towards improved pollution control during manufacturing? **J. Clean. Prod.** v. 171, p. 137-146, 2018.

BERGAMO, A.; MESSORI, L.; PICCIOLI, F.; COCCHIETTO, M.; SAVA, G. Biological role of adduct formation of the ruthenium(III) complex NAMI-A with serum albumin and sérum transferrin. **Invest. New Drugs**, v. 21, p. 401-411, 2003.

BLAIR, J.M.A. Introducing npj Antimicrobials and Resistance. **npj Antimicrob. Resist.** v. 1, p. 3, 2023.

BLOMQUIST, K. C.; NIX, D. E. A critical evaluation of newer beta-lactam antibiotics for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Ann. Pharmacother.** v. 55, p. 1010-1024, 2021.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunol. Ver.**, v. 173, p. 17-26, 2000.

BOLLINGER, E.; ZUBROD, J.P.; LAI, F.Y.; AHRENS, L.; FILKER, S.; LORKE, A.; BUNDSCHUH, M. Antibiotics as a silente driver of climate change? A case study investigating methane production in freshwater sediments. **Ecotoxicol. Env. Safety** v. 228, p. 113025, 2021.

BOROS, E.; DYSON, P. J.; GASSER, G. Classification of Metal-based Drugs According to Their Mechanisms of Action. **Chem.**, v. 6, n. 1, p. 41-60, 2020.

BORTHAGARAY, G. Essential transition metal ion complexation as a strategy to improve the antimicrobial activity of organic drugs. **J. Infect. Dis. Epidemiol.**, v. 2, n. 2, 2016.

BRANDT, K. K.; AMÉZQUITA, A.; BACKHAUS, T.; BOXALL, A.; COORS, A.; HEBERER, T. *et al.* Ecotoxicological assessment of antibiotics: A call for improved consideration of microorganisms. **Env. Int.** v. 85, p. 189–205, 2015.

BRAUNER, A.; FRIDMAN, O.; GEFEN, O.; BALABAN, N. Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 14, p. 320–330, 2016.

BREIDENSTEIN, E. B.; de LA FUENTE-NUNEZ, C.; Hancock, R. E. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends Microbiol.** v. 19, p. 419–426, 2011.

BRISOLA, M. C.; CRECENCIO, R. B.; BITNER, D. S.; FRIGO, A.; RAMPAZZO, L.; STEFANI, L. M.; FARIA, G. A. *Escherichia coli* used as a biomarker of antimicrobial resistance in pig farms of Southern Brazil. **Sci Total Environ.** v. 647, p. 362–368, 2019.

BURNHAM, C.; LEEDS, J.; NORDMANN, P.; O'GRADY, J.; PATEL, J. Diagnosing antimicrobial resistance. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 15, p. 697–703, 2017.

BURNHAM, J. P. Climate change and antibiotic resistance: a deadly combination. **Therapeutic Advances in Infectious Disease.** v. 8, 1–7, 2021.

BUSH, N. G.; DIEZ-SANTOS, I.; ABBOTT, L. R.; MAXWELL, A. Quinolones: mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance. **Molecules**, v. 25, p. 5662, 2020.

BYRD, A. L.; BELKAID, Y.; SEGRE, J. A. The human skin microbiome. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 16, p. 143–155, 2018.

CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M enzymes: origin and diffusion. **Front. Microbiol.** v. 3, p. 110, 2012.

CARAMORI, G. F.; ORTOLAN, A. O.; PARREIRA, R. L. T.; DA SILVA, E. H. Ruthenium nitrosyl complexes containing pyridine-functionalized carbenes – A theoretical insight. **J. Organo. Chem.**, v. 799, n. 15, p. 54–60, 2015.

CARNIZELLO, A. P.; BARBOSA, M. I.; MARTINS, M.; FERREIRA, N. H.; OLIVEIRA, P. F.; MAGALHÃES, G. M.; BATISTA, A. A.; TAVARES, D. C. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of a novel carbonyl ruthenium compound, the ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF₆ [dppb=1,4-bis(diphenylphosphine)butane and bipy=2,2'-bipyridine]. **J. Inorg. Biochem.** v. 164, p. 42–48, 2016.

CARTHEY, A. J. R.; BLUMSTEIN, D. T.; GALLAGHER, R. V.; TETU, S. G.; GILLINGS, M. R. Conserving the holobiont. **Funct. Ecol.** v. 34, p. 764–776, 2020.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 1, p. 279–293, 2004.

CASTELO-BRANCO, D.S.; RIELLO, G.B.; VASCONCELOS, D.C.; GUEDES, G.M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T.J.; MONTEIRO, A.J.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.;

SIDRIM, J.J.; BRILHANTE, R.S. Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. **J. Appl. Microbiol.** v. 120, n. 3, p. 600-606, 2016.

CAVICCHIOLI, R.; RIPPLE, W. J.; TIMMIS, K. N.; AZAM, F.; BAKKEN, L. R.; BAYLIS, M. *et al.* Scientists warning to humanity: microorganisms and climate change. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 17, p. 569-586, 2019.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic Resistance Threats in the United States.** Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2019.

CENDRA, M. D. M.; TORRENTS, E. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their partners in crime. **Biotechnol. Adv.** v. 49, p. 107734, 2021.

CHAMBERS, J. R.; CHERNY, K. E.; SAUER, K. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* dispersed cells to antimicrobial agents is dependent on the dispersion cue and class of the antimicrobial agent used. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 61, p. 1–18, 2017.

CHAN, S.; PULLERITS, K.; KEUCKEN, A.; KENNETH, M. P.; CATHERINE, J. P.; RÅDSTRÖM, P. Bacterial release from pipe biofilm in a full-scale drinking water distribution system. **NPJ Biofilms Microbiomes**, v. 5, n. 9, 2019.

CHEN, J.; MCILROY, S. E.; ARCHANA, A.; BAKER, D. M.; PANAGIOTOU, G. A pollution gradient contributes to the taxonomic, functional, and resistome diversity of microbial communities in marine sediments. **Microbiome**, v. 7, p. 104, 2019.

CHEN, Q. L.; AN, X. L.; ZHENG, B. X.; GILLINGS, M.; PEÑUELAS, J.; CUI, L.; SU, J. Q.; ZHU, Y. G. Loss of soil microbial diversity exacerbates spread of antibiotic resistance. **Soil Ecology Letters** v. 1, p. 3-13, 2019.

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

CHOI, V.; ROHN, J.L.; STOODLEY, P.; CARUGO, D.; STRIDE, E. Drug delivery strategies for antibiofilm therapy. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 21, p. 555–572, 2023.

CIEPLIK, F.; DENG, D.; CRIELAARD, W.; BUCHALLA, W.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A.; MAISCH, T. Antimicrobial Photodynamic Therapy—What We Know and What We Don't. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 44, p. 571–589, 2018.

CIOFU, O.; MOSER, C.; JENSEN, PØ.; HØIBY, N. Tolerance and resistance of microbial biofilms. **Nat. Ver. Microbiol.** v. 20, p. 621–635, 2022.

CLAESSEN, D.; ERRINGTON, J. Cell wall deficiency as a coping strategy for stress. **Trends Microbiol.**, v. 27, p. 1025–1033, 2019.

CLSI (2015) *Method for Dilution Antibacterial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*: Approved Standard – 10th ed., M07-A10, Pennsylvania 19087 USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

COHEN, N. R.; LOBRITZ, M. A.; COLLINS, J. J. Microbial persistence and the road to drug resistance. **Cell Host Microbe**. v. 13, p. 632–642, 2013.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. How bacteria stick. **Sci. Am.** v. 238, p. 86–95, 1987.

CRUZ, C. D.; SHAH, S.; TAMMELA, P. Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains. **BMC Microbiol.**, v. 18, p. 173, 2018.

DAIKOS, G. L.; da CUNHA, C. A.; ROSSOLINI, G. M.; STONE, G. G.; BAILLON-PLOT, N.; TAWADROUS, M.; IRANI, P. Review of Ceftazidime-Avibactam for the Treatment of Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics (Basel)**. v. 10, p. 1126, 2021.

DAL CO, A.; van VLIET, S.; ACKERMANN, M. Emergent microscale gradients give rise to metabolic cross-feeding and antibiotic tolerance in clonal bacterial populations. **Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** v. 374, n. 1786, 2019.

da SILVA MIRANDA, F.; SIGNORI, A. M.; VICENTE, J.; DE SOUZA, B.; PATRICK, P. J.; SZPOGANICZ, B.; GONÇALVES, N. S.; NEVES, A. Synthesis of substituted dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazines and a new heterocyclic dipyrido[3,2-f:2',3'-h]quinoxalino[2,3-b]quinoxalin. **Tetrahedron**, v. 64, p. 5410, 2008.

da SILVEIRA CARVALHO, J. M.; BATISTA, A. H. M.; NOGUEIRA, N. A. P.; HOLANDA, A. K. M.; SOUSA, J. R.; ZAMPIERE, D.; BEZERRA, M. J. B.; BARRETO, F. S.; MORAES, M. O.; BATISTA, A. A *et al.* A biphosphinic ruthenium complex with potent anti-bacterial and anti-cancer activity. **New J. Chem.** v. 41, p. 13085–13095, 2017.

DAR, D.; DAR, N.; CAI, L.; NEWMAN, D. K. Spatial transcriptomics of planktonic and sessile bacterial populations at single-cell resolution. **Science**, v. 13, n. 373(6556): eabi4882, 2021.

DARBY, E. M.; TRAMPARI, E.; SIASAT, P.; GAYA, M. S.; ALAV, I.; WEBBER, M. A.; BLAIR, J. M. A. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. **Nat Ver. Microbiol.** v. 21, p. 280–295, 2023.

DAS, B.; MANDAL, D.; DASH, S. K.; CHATTOPADHYAY, S.; TRIPATHY, S.; DOLAI, D. P.; DEY, S. K.; ROY, S. Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage-Associated Antibacterial Activity Against Clinically Isolated Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Infect. Dis. (Auckl)**, v.16, n. 9, p. 11-19, 2016.

DATTA, M. S.; YELIN, I.; HOCHWALD, O.; KASSIS, I.; BORENSTEIN-LEVIN, L.; KUGELMAN, A.; KISHONY, R. Rapid methicillin resistance diversification in *Staphylococcus epidermidis* colonizing human neonates. **Nat. Commun.** v. 12, p. 6062, 2021.

de LIMA, R. G.; SAUAIA, M. G.; BONAVENTURA, D.; TEDESCO, A. C.; LOPEZ, R. F. V.; BENDHACK, L. M.; da SILVA, R. S. Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: The vasodilator response produced by UV light irradiation. **Inorg. Chim. Acta**, v. 358, p. 2643–2650, 2005.

de OLIVEIRA SANTOS, J. V.; da COSTA JÚNIOR, S. D.; de FÁTIMA RAMOS dos SANTOS MEDEIROS, S. M.; CAVALCANTI, I. D. L.; de SOUZA, J. B.; CORIOLANO, D. L.; da SILVA, W. R. C.; ALVES, M. H. M. E.; CAVALCANTI, I. M. F. Panorama of Bacterial Infections Caused by Epidemic Resistant Strains. **Curr. Microbiol.** v. 79, p. 175, 2022.

de VOS, W. M. Microbial biofilms and the human intestinal microbiome. **NPJ Biofilms Microbiomes** v. 25, n. 1, 15005, 2015.

DEBNATH, A.; PARSONAGE, D.; ANDRADE, R. M.; HE, C.; COBO, E. R.; HIRATA, K.; CHEN, S.; GARCÍA-RIVERA, G.; OROZCO, E.; MARTÍNEZ, M. B *et al.* A high-throughput drug screen for *Entamoeba histolytica* identifies a new lead and target. **Nat. Med.** v. 18, p. 956, 2012.

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. **Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.**, v. 94, p. 243–255, 2012.

DENAMUR, E.; CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; GORDON, D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 19, p. 37–54, 2021.

DOS SANTOS, M. H.; DA COSTA, A. F.; DA SILVA SANTOS, G.; DOS SANTOS, A. L.; NAGAO, P. E. Effect of chelating agents on the growth, surface polypeptide synthesis and interaction of *Streptococcus agalactiae* with human epithelial cells. **Mol. Med. Rep.**, v. 2, p. 81-84, 2013.

DOU, Y.; HUAN, J.; GUO, F.; ZHOU, Z.; SHI, Y. *Pseudomonas aeruginosa* prevalence, antibiotic resistance and antimicrobial use in Chinese burn wards from 2007 to 2014. **J. Int. Med. Res.** v. 45, n. 3, p. 1124–1137, 2017.

DU, D.; WANG-KAN, X.; NEUBERGER, A.; van VEEN, H. W.; POS, K. M.; PIDDOCK, L. J. V.; LUISI, B. F. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 16, p. 523-539, 2018.

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

EBBENSGAARD, A. E.; LØBNER-OLESEN, A.; FRIMODT-MØLLER, J. The role of efflux pumps in the transition from low-level to clinical antibiotic resistance. **Antibiotics**, v. 9, p. 855, 2020.

EFSA - Panel on Biological Hazards. Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. **EFSA J.** v. 19, e06651, 2021.

FANG, F. C. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 2818–2825, 1997.

FARRELL, N. Biomedical uses of Inorganic Chemistry. An overview. **Coord. Chem. Rev.** v.232, p. 1-4, 2002.

FERNÁNDEZ-BARAT, L.; CIOFU, O.; KRAGH, K. N.; PRESSLER, T.; JOHANSEN, U.; MOTOS, A.; TORRES, A.; HØIBY, N. Phenotypic shift in *Pseudomonas aeruginosa* populations from cystic fibrosis lungs after 2-week antipseudomonal treatment. **J. Cyst. Fibros.**, v. 16, p. 222–229, 2017.

FIGUEIREDO, E. A. P.; RAMOS, H. M.; VIEIRA, M. A. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: frequency of multidrug resistance and cross-resistance among antimicrobials in Recife/PE. **Rev Bra Ter Int.** v. 9, n. 4, p. 421-7, 2007.

FIŠAROVÁ, L.; BOTKA, T.; DU, X.; MAŠLAŇOVÁ, I.; BÁRDY, P.; PANTUČEK, R.; BENEŠÍK, M.; ROUDNICKÝ, P.; WINSTEL, V.; LARSEN, J *et al.* *Staphylococcus epidermidis* Phages Transduce Antimicrobial Resistance Plasmids and Mobilize Chromosomal Islands. **mSphere.** v. 6, n. 3, p. e00223-21, 2021.

FISCHER, B.; HEFFETER, P.; KRYEZIU, K.; GILLE, L.; MEIER, S. M.; BERGER, W.; KOWOL, C. R.; KEPPLER, B. K. Poly(lactic acid) nanoparticles of the lead anticancer ruthenium compound KP1019 and its surfactant-mediated activation **Dalton Trans.** v. 43, p. 1096, 2014.

FISHER, R. A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 15, p. 453–464, 2017.

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

FLEMMING, H.-C.; WUERTZ, S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 17, p. 247–260, 2019.

FLEMMING, H. C.; BAVEYE, P.; NEU, T. R.; STOODLEY, P.; SZEWZYK, U.; WINGENDER, J.; WUERTZ, S. Who put the film in biofilm? The migration of a term from wastewater engineering to medicine and beyond. **NPJ Biofilms Microbiomes**, v. 7, n. 10, 2021.

FLEMMING, H. C.; van HULLEBUSCH, E. D.; NEU, T. R. *et al.* The biofilm matrix: multitasking in a shared space. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 21, p. 70–86, 2023.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Joint FAO/WHO Expert Meeting in Collaboration with OIE on Foodborne Antimicrobial Resistance: Role of the Environment, Crops and Biocides – Meeting Report*. Microbiological Risk Assessment Series no. 34. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019.

FORSBERG, K. J.; PATEL, S.; WENCEWICZ, T. A.; DANTAS, G. The tetracycline destructases: a novel family of tetracycline-inactivating enzymes. **Chem. Biol.** v. 22, p. 888–897, 2015.

FOTINOS, N.; CONVERT, M.; PIFFARETTI, J. C.; GURNY, R.; LANGE, N. Effects on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria Mediated by 5-Aminolevulinic Acid and 5-

Aminolevulinic Acid Derivatives. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 52, p. 1366–1373, 2008.

FRAZER, A. D.; EDIN, M. B. “Tellurium in the treatment of syphilis”. **The Lancet**, v. 216, n. 5577, p. 133-134, 1930.

FRANICZEK, R.; SOBIESZCZANSKA, B.; TURNIAK, M.; KASPRZYKOWSKA, U.; KRZYZANOWSKA, B.; JERMAKOW, K. *et al.* ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from children with acute diarrhea - antimicrobial susceptibility, adherence patterns and phylogenetic background. **Adv. Clin. Exp. Med.** v. 21, p. 187–92, 2012.

FREI, A. Metal Complexes, an Untapped Source of Antibiotic Potential? **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 90, 2020a.

FREI, A.; ZUEGG, J.; ELLIOTT, A. G.; BAKER, M.; BRAESE, S.; BROWN, C.; CHEN, F.; DOWSON, C.; DUJARDIN, G.; JUNG, N. *et al.* Metal complexes as a promising source for new antibiotics. **Chem Sci.**, v. 11, n. 10, p. 2627-2639, 2020b. *Erratum in: Chem Sci.*, v. 11, n. 17, p. 4531, 2020.

FREI, A.; VERDEROSA, A. D.; ELLIOTT, A.G.; ZUEGG, J.; BLASKOVICH, M. A. T. Metals to combat antimicrobial resistance. **Nat. Rev. Chem.** v. 7, p. 202–224, 2023.

FUGA B, SELLERA FP, CERDEIRA L, ESPOSITO F, CARDOSO B, FONTANA H, MOURA Q, CARDENAS-ARIAS A, SANO E, RIBAS *et al.* WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. **Microbiol. Spectr.** v. 10, n. 2, p. e0125621, 2022.

GAFUR, A.; SUKAMDANI, G. Y.; KRISTI, N.; MARUF, A.; XU, J.; CHEN, X *et al.* From bulk to nano-delivery of essential phytochemicals: recent progress and strategies for antibacterial resistance. **J. Mater. Chem. B.** v. 8, p. 9825–9835, 2020.

GALIÉ, S.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; MIGUÉLEZ, E. M.; VILLAR, C. J.; LOMBÓ, F. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. **Front. Microbiol.** v. 9, p. 898–898, 2018.

GARCÍA-BETANCUR, J. C.; APPEL, T. M.; ESPARZA, G.; GALES, A. C.; LEVY-HARA, G.; CORNISTEIN, W.; VEGA, S.; NUÑEZ, D.; CUELLAR, L.; BAVESTRELLO, L.; *et al.* Update on the Epidemiology of Carbapenemases in Latin America and the Caribbean. **Expert Rev. Anti-Infect. Ther.** v. 19, n. 197–213, 2021.

GHOSH, T.; BISWAS, M. K.; CHATTERJEE, S.; ROY, P. 2018. *In-vitro* study on the hemolytic activity of different extracts of Indian medicinal plant *Croton bonplandianum* with phytochemical estimation: a new era in drug development. **J. Drug Deliv. Ther.** v. 8, n. 4, p. 155–160, 2018.

GHOSH, S.; AMARIEI, G.; MOSQUERA, M. E. G.; ROSAL, R. Polymeric ruthenium precursor as a photoactivated antimicrobial agente. **J. Hazard. Mater.** v. 402, p. 123788, 2021.

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

GILL, M. R.; THOMAS, J. A. Ruthenium(II) polypyridyl complexes and DNA—from structural probes to cellular imaging and therapeutics. **Chem. Soc. Rev.** v. 41, p. 3179–3192, 2012.

GLG - GLOBAL LEADERS GROUP ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. *Antimicrobial Resistance and the Climate Crisis*. Geneva, 2021.

GRAHAM, D.W.; BERGERON, G.; BOURASSA, M.W.; DICKSON, J.; GOMES, F.; HOWE, A *et al.* Complexities in understanding antimicrobial resistance across domesticated animal, human, and environmental systems. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1441, n. 1, p. 17–30, 2019.

GRAHAM, D.W., BERGERON, G., BOURASSA, M.W., DICKSON, J., GOMES, F., HOWE, A. *et al.* Complexities in understanding antimicrobial resistance across domesticated animal, human, and environmental systems. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1441, p. 17-30, 2019

GRENNI, P.; ANCONA, V.; BARRA CARACCILO, A. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: a review. **Microchem. J.** v. 136, p. 25–39, 2018.

GUO, Y.; SONG, G.; SUN, M.; WANG, J.; WANG, Y. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. **Front. Cell Infect. Microbiol.** v. 10, p. 107, 2020.

GUPTA, K.; MARQUES, C. N. H.; PETROVA, O. E.; SAUER, K. Antimicrobial tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is activated during an early developmental stage and requires the two-component hybrid SagS. **J. Bacteriol.** v. 195, p. 4975–4987, 2013.

GUPTA, S.; LASKAR, N.; KADOURI, D. E. Evaluating the effect of oxygen concentrations on antibiotic sensitivity, growth, and biofilm formation of human pathogens. **Microbiology Insights** v. 9, MBIS40767, 2016.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 3, p. 436–450, 2004.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: A bright new technique to kill resistant microbes, **Curr. Opin. Microbiol.** v. 33, p. 67-73, 2016.

HANCOCK, R. E.; SPEERT, D. P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. **Drug Resist. Updat.** v. 3, p. 247–255, 2000.

HARTINGER, C. G.; JAKUPEC, M. A.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; GROESSL, M.; EGGER, A.; BERGER, W *et al.* KP1019, a new redox-active anticancer agent—preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. **Chem. Biodivers.**, v. 5, p. 2140–2155, 2008.

HARTINGER, C. G.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; JAKUPEC, M. A.; KYNAST, B.; ZORBAS, H.; KEPPLER, B. K. From bench to bedside—preclinical and early clinical development of the

anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1Hindazole) ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). **J. Inorg. Biochem.** v. 100, p. 891–904, 2006.

HE, T.; WANG, R.; LIU, D.; WALSH, T. R.; ZHANG, R.; LV, Y.; KE, Y.; JI, Q.; WEI, R.; LIU, Z. Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans. **Nat. Microbiol.** v. 4, p. 1450–1456, 2019.

HEFFETER, P.; BOCK, K.; ATIL, B.; REZA HODA, M. A.; KORNER, W.; BARTEL, C *et al.* (2010). Intracellular protein binding patterns of the anticancer ruthenium drugs KP1019 and KP1339. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 15, p. 737–748, 2010.

HEINRICH, T. A.; von POELHSITZ, G.; REIS, R. I.; CASTELLANO, E. E.; NEVES, A.; LANZMASTER, M.; MACHADO, S. P.; BATISTA, A. A.; COSTA-NETO, C. M. A new nitrosyl ruthenium complex: synthesis, chemical characterization, *in vitro* and *in vivo* antitumor activities and probable mechanism of action. **Eur. J. Med. Chem.** v. 46, p. 3616–22, 2011.

HENGZHUANG, W.; WU, H.; CIOFU, O.; SONG, Z.; HØIBY, N. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 55, p. 4469–4474, 2011.

HERNANDO-AMADO, S.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. **Nat Microbiol.**, v. 4, n. 9, p. 1432–42, 2019.

HIRST, D.G.; ROBSON, T. Nitric Oxide Physiology and Pathology. **Nitric Oxide**, v. 704, n. 1, p. 1–13, 2011.

KHODARE, A.; KALE, P.; PINDI, G. *et al.* Incidence, Microbiological Profile, and Impact of Preventive Measures on Central Line-associated Bloodstream Infection in Liver Care Intensive Care Unit. **Indian J. Crit. Care Med.** v. 24, n. 1, p. 17–22, 2022.

HODGES, N. D. C. “The value of mercuric chloride as a disinfectant,” **Science**, v. 13, p. 62–64, 1889.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; MOSER, C.; BASSI, G. L.; COENYE, T.; DONELLI, G.; HALL-STOODLEY, L.; HOLÁ, V.; IMBERT, C.; KIRKETERP-MØLLER, K *et al.* ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 21, S1–S25, 2015.

HØIBY, N.; HENNEBERG, K. Å.; WANG, H.; STAVNSBJERG, C.; BJARNSHOLT, T.; CIOFU, O.; JOHANSEN, U. R.; SAMS T. Formation of *Pseudomonas aeruginosa* inhibition zone during tobramycin disk diffusion is due to transition from planktonic to biofilm mode of growth. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 53, p. 564–573, 2019.

HUNG, W. C.; CHEN, H. J.; LIN, Y. T.; TSAI, J. C.; CHEN, C. W.; LU, H. H.; TSENG, S. P.; JHENG, Y. Y.; LEONG, K. H.; TENG, L. J. Skin Commensal Staphylococci May Act as Reservoir for Fusidic Acid Resistance Genes. **PLoS One**. v. 10, p. e0143106, 2015.

KOLPEN, M.; KRAGH, K. N.; ENCISO, J. B.; FAURHOLT-JEPSEN, D.; LINDEGAARD, B.; EGELUND, G. B.; JENSEN, A. V.; RAVN, P.; MATHIESEN, I. H. M.; GHEORGE, A. *et al.* Bacterial biofilms predominate in both acute and chronic human lung infections. **Tórax**. v. 77, p. 1015-1022, 2022.

HÖLZEL, C. S.; TETENS, J. L.; SCHWAIGER, K. Unraveling the role of vegetables in spreading antimicrobial-resistant bacteria: a need for quantitative risk assessment. **Foodborne Pathog. Dis.** v. 15, p. 671-688, 2018.

HORCAJADA, J. P.; MONTERO, M.; OLIVER, A.; SORLÍ, L.; LUQUE, S.; GÓMEZ-ZORRILLA, S.; BENITO, N.; GRAU, S. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 32, n. 4, p. e00031–e00019, 2019.

HOTTINGER, D. G.; BEEBE, D.S.; KOZHIMANNIL, T.; PRIELIPP, R. C.; BELANI, K. G. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. **J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.**, v. 30, n. 4, p. 462-71, 2014.

HU, X.; HUANG, Y-Y.; WANG, Y.; WANG, X.; HAMBLIN, M.R. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. **Front. Microbiol.**, v. 9, p. 1299, 2018.

JAKUBASZEK, M.; GOUD, B.; FERRARI, S.; GASSER, G. Mechanisms of Action of Ru(II) Polypyridyl Complexes in Living Cells upon Light Irradiation. **Chem. Commun.** v. 54, p. 13040–13059, 2018.

JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALIL, F.; IMRAN, M.; NAWAZ, M. A.; USSAIN, T.; ALI, M.; RAFIQ, M.; KAMIL, M. A. Bacterial biofilm and associated infections. **J. Chin. Med. Assoc.** v. 81, p. 7–11, 2018.

JANGRA, V.; SHARMA, N.; CHHILLAR, A. K. Therapeutic approaches for combating *Pseudomonas aeruginosa* Infections. **Microbes Infect.** v. 24, p. 104950, 2022.

JIN, H.; YANG, L.; AHONEN, M. J. R.; SCHOENFISCH, M. H. Nitric Oxide-Releasing Cyclodextrins. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 140, p. 14178–14184, 2018.

JIANG, L.; MA, Y.; XIONG, Y.; TAN, Y.; DUAN, X.; LIAO, X.; WANG, J. Ruthenium polypyridine complexes with triphenylamine groups as antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* with membrane-disruptive mechanism. **Front. Chem.** v. 10, p. 1035741, 2022.

JONG, M. C.; HARWOOD, C. R.; BLACKBURN, A.; SNAPE, J. R.; GRAHAM, D.W. Impact of redox conditions on antibiotic resistance conjugative gene transfer frequency and plasmid fate in wastewater ecosystems. **Env. Sci. Technol.** v. 54, p. 14984-14993, 2020.

JØRGENSEN, P. S.; AKTIPIS, A.; BROWN, Z.; CARRIÈRE, Y.; DOWNES, S.; DUNN, R. *et al.* Antibiotic and pesticide susceptibility and the anthropocene operating space. **Nat. Sustain.** v. 1, p. 632-641, 2018.

JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. **Met Based Drugs**, v. 2008, p. 276109, 2008.

JOUBERT, I. A.; OTTO, M.; STRUNK, T.; CURRIE, A. J. Look who's talking: host and pathogen drivers of *Staphylococcus epidermidis* virulence in neonatal sepsis. **Int. J. Mol. Sci.** v. 23, 860, 2022.

JURADO-MARTIN, I.; SAINZ-MEJIAS, M.; MCCLEAN, S. *Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. **Int. J. Mol. Sci.** v. 22, p. 1–35, 2021.

KARGES, J.; KUANG, S.; MASCHIETTO, F.; BLACQUE, O.; CIOFINI, I.; CHAO, H.; GASSER, G. Rationally Designed Ruthenium Complexes for 1- and 2-Photon Photodynamic Therapy. **Nat. Commun.**, v. 11, 3262, 2020.

KARIGOUDAR, R. M.; KARIGOUDAR, M. H.; WAVARE, S. M.; MANGALGI, S. S. Detection of biofilm among uropathogenic *Escherichia coli* and its correlation with antibiotic resistance pattern. **J. Lab. Physicians**, v. 11, p. 17–22, 2019.

KAVIYARASU, K.; GEETHA, N.; KANIMOZHI, K.; MAGDALANE, C. M.; SIVARANJANI, S.; AYESHAMARIAM, A.; KENNEDY, J.; MAAZA, M. *In vitro* cytotoxicity effect and antibacterial performance of human lung epithelial cells A549 activity of Zinc oxide doped TiO₂ nanocrystals: Investigation of bio-medical application by chemical method. **Mater. Sci. Eng.**, v. 74, p. 325–333, 2017.

KEYES, E. L. "The treatment of gonorrhoea of the male urethra," **J. Am. Med. Ass.**, v. 75, n. 20, p. 1325–1329, 1920.

KIM, J. S.; KIM, J.W.; KATHARIOU, S. Differential effects of temperature on natural transformation to erythromycin and nalidixic acid resistance in *Campylobacter coli*. **Appl. Env. Microbiol.** v. 74, p. 6121-6125, 2008.

KHAN, M. A.; FAIZ A. Antimicrobial resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in tertiary care hospitals of Makkah and Jeddah. **Ann. Saudi Med.** v. 36, n. 1, p. 23-28, 2016.

KOLPEN, M.; KRAGH, K. N.; ENCISO, J. B.; FAURHOLT-JEPSEN, D.; LINDEGAARD, B.; EGELUND, G. B.; JENSEN, A. V.; RAVN, P.; MATHIESEN, I. H. M.; GHEORGE, A. G *et al.* Bacterial biofilms predominate in both acute and chronic human lung infections. **Thorax**. v. 77, n. 10, p. 1015-1022, 2022.

KOTTUR, J.; NAIR, D.T. Reactive Oxygen Species Play an Important Role in the Bactericidal Activity of Quinolone Antibiotics. **Ang. Chem. Int. Ed.**, v. 55, p. 2397–2400, 2016.

KOUTSOUMANIS, K.; ALLENDE, A.; ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; BOLTON, D.; BOVER-CID, S.; CHEMALY, M. *et al.* Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. **EFSA J.** v. 19, n 6, 2021.

KOWALSKI, C. H.; MORELLI, K. A.; SCHULTZ, D.; NADELL, C. D.; CRAMER, R. A. Fungal biofilm architecture produces hypoxic microenvironments that drive antifungal

resistance. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 117, p. 22473–22483, 2020.

KREDIET, T. G, MASCINI, E. M.; van ROOIJ, E.; VLOOSWIJK, J.; PAAUW, A.; GERARDS, L. J.; FLEER, A. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. **J. Clin. Microbiol.** v. 42, p. 992-995, 2004.

KUMAR, A.; PAL, D. Antibiotic resistance and wastewater: correlation, impact and critical human health challenges. **J. Environ. Chem. Eng.** v. 6, p. 52-58, 2018.

KUMARASAMY, K. K.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R.; BAGARIA, J.; BUTT, F.; BALAKRISHNAN, R.; CHAUDHARY, U.; DOUMITH, M.; GISKE, C. G.; IRFAN, S. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infect. Dis.** 10, p. 597-602, 2010.

KUNZ-COYNE, A. J.; EL GHALI, A.; HOLGER, D.; REBOLD, N.; RYBAK, M. J. Therapeutic strategies for emerging multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect. Dis. Ther.** v. 11 v. 2, p. 661–682, 2022.

KURTZ, S.; ONG, K.; LAU, E.; MOWAT, F.; HALPERN, M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. **J. Bone Jt. Surg. Am.** v. 89, p. 780–785, 2007.

KWIATKOWSKI, S.; KNAP, B.; PRZYSTUPSKI, D.; SACZKO, J.; KĘDZIERSKA, E.; KNAP-CZOP, K.; KOTLIŃSKA, J.; MICHEL, O.; KOTOWSKI, K.; KULBACKA, J. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomed. Pharmacother.**, v. 106, p. 1098–1107, 2018.

LARSSON, D. G. J.; FLACH, C.-F. Antibiotic resistance in the environment. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 20, p. 257-269, 2022.

LAXMINARAYAN, RAMANAN. **The overlooked pandemic of antimicrobial resistance. The Lancet**, v. 99, n. 10325, p. 606 – 607, 2022.

LE GALL, T.; LEMERCIER, G.; CHEVREUX, S.; TÜCKING, K.-S.; RAVEL, J.; THÉTIOT, F.; JONAS, U.; SCHÖNHERR, H.; MONTIER, T. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers for Antibacterial Photodynamic Therapy: A Structure-Activity Study on Clinical Bacterial Strains. **Chem. Med. Chem.**, v. 13, p. 2229–2239, 2018.

LEBEAUX, D.; CHALAM, A.; RENDUELES, O.; BELOIN, C. From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. **Pathogens**, v. 2013, p. 288–356, 2013.

LEBEAUX, D.; GHIGO, J. M.; BELOIN, C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 78, p. 510–543, 2014.

LEE, J. Y. H, MONK, I. R.; GONÇALVES DA SILVA, A.; SEEMANN, T.; CHUA KYL KEARNS A.; HILL, R.; WOODFORD, N.; BARTELS, M. D.; STROMMENGER, B.; LAURENT, F *et al.* Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis*. **Nat. Microbiol.** v. 3, n. 10, p. 1175-1185, 2018.

LEEKITCHAROENPHON, P.; JOHANSSON, M. H. K.; MUNK, P.; MALORNY, B.; SKARZYNSKA, M.; WADEPOHL, K.; MOYANO, G.; HESP, A.; VELDMAN, K T.; BOSSERS, A.; EFFORT Consortium. Genomic evolution of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Sci. Rep.** v. 11, 15108, 2021.

LEMERCIER, G.; FOUR, M.; CHEVREUX, S. Two-Photon Absorption Properties of 1,10-Phenanthroline-Based Ru(II) Complexes and Related Functionalized Nanoparticles for Potential Application in Two-Photon Excitation Photodynamic Therapy and Optical Power Limiting. **Coord. Chem. Rev.** v. 368, p. 1–12, 2018.

LEONARD, A. F. C.; ZHANG, L.; BALFOUR, A. J.; GARSIDE, R.; HAWKEY, P. M.; MURRAY, A. K. *et al.* Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users: environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (beach bum survey). **Environ. Int.** v. 114, 326–333, 2018

LERMAN, L. S.; TOLMACH, L. J. Genetic transformation I. Cellular incorporation of DNA accompanying transformation in *Pneumococcus*. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 26, n. 1, p. 68–82, 1957.

LIAO, J.; CHEN, Y.; HUANG, H. Effects of CO₂ on the transformation of antibiotic resistance genes via increasing cell membrane channels. **Environmental Pollution** v. 254, p. 113045, 2019.

LI, G.; SUN, L.; JI, L.; CHAO, H. Ruthenium(ii) complexes with dppz: from molecular photoswitch to biological applications. **Dalton Trans.** v. 45, p. 13261–13276, 2016.

LI, H.-R.; LIU, H.; LU, X.-Q.; ZAN, W.-Y.; TIAN, X.-X.; LU, H.-G.; WU, Y.-B.; MU, Y.-W.; LI, S.-D. Cage-like Ta@B^{qn} complexes ($n = 23–28$, $q = -1–+3$) in 18-electron configurations with the highest coordination number of twenty-eight. **Nanoscale**, v. 10, p. 7451–7456, 2018.

LI, W.T. Nanotechnology-Based Strategies to Enhance the Efficacy of Photodynamic Therapy for Cancers. **Curr. Drug. Metab.**, v. 10, p. 851–860, 2009.

LI, X.; GORLE, A. K.; AINSWORTH, T. D.; HEIMANN, K.; WOODWARD, C. E.; COLLINS, J. G.; KEENE, F. R. RNA and DNA binding of inert oligonuclear ruthenium(II) complexes in live eukaryotic cells. **Dalton Trans.** v. 44, p. 3594–3603, 2015.

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

LIN, K.; ZHAO, Z-Z.; BO, H-B.; HAO, X-J.; WANG, J-Q. Applications of Ruthenium Complex in Tumor Diagnosis and Therapy. **Front. Pharmacol.**, v. 9, p. 1323, 2018.

LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **Lancet Infect. Dis.** v. 16, p. 161–168, 2016

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **J. Porphyr. Phthalocyanines**, v. 5, n. 2, p. 105–129, 2001.

MACFADDEN, D. R.; MCGOUGH, S. F.; FISMAN, D.; SANTILLANA, M.; BROWNSTEIN, J. S. Antibiotic resistance increases with local temperature. **Nat. Climate Change** v. 8, n. 6, p. 510–514, 2018.

MACIÀ, M. D.; ROJO-MOLINERO, E.; OLIVER, A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 20, p. 981–990, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARCK, D. P. **Microbiologia The Brock**. 14. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAGDALANE, C. M.; KAVIYARASU, K.; RAJA, A.; ARULARASU, M.V.; MOLA, G. T.; ISAEV, A. B.; ALDHABI, N. A.; ARASU, M. V.; JEYARAJ, B.; KENNEDY, J.; MAAZA, M. Photocatalytic decomposition effect of erbium doped cerium oxide nanostructures driven by visible light irradiation: Investigation of cytotoxicity, antibacterial growth inhibition using catalysts. **J. Photoch. Photobio B**. v. 185, p. 275–282, 2018.

MAH, T.-F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol**. v. 9, p. 34–39, 2001.

MANN, B. E. CO-releasing molecules: A personal view. **Organometallics**, v. 31, p. 5728–5735, 2012.

MANUSE, S.; SHAN, Y.; CANAS-DUARTE, S. J.; BAKSHI, S.; SUN, W. S.; MORI, H.; PAULSSON, J.; LEWIS, K. Bacterial persisters are a stochastically formed subpopulation of low-energy cells. **PLoS Biol**. v. 19, p. e3001194, 2021.

MÅNSSON, E.; TEVELL, S.; NILSDOTTER-AUGUSTINSSON, Å.; JOHANNESSEN T. B.; SUNDQVIST, M.; STEGGER, M.; SÖDERQUIST, B. Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Lineages in the Nasal and Skin Microbiota of Patients Planned for Arthroplasty Surgery. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 265, 2021.

MATOS, E. C. O.; MATOS, H. J.; CONCEICAO, M. L, *et al.* Clinical and microbiological features of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 49, p. 305-11, 2016.

MAURICE, N. M.; BEDI, B.; SADIKOT, R. T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**. v. 58, p. 428–439, 2018.

MCCOY, W. F.; BRYERS, J. D.; ROBBINS, J.; COSTERTON, J. W. Observations of fouling biofilm formation. **Can. J. Microbiol**. v. 27, p. 910–917, 1981.

MCGOUGH, S. F.; MACFADDEN, D. R.; HATTAB, M. W.; MØLBAK, K.; SANTILLANA, M. Rates of increase of antibiotic resistance and ambient temperature in Europe: a cross-national analysis of 28 countries between 2000 and 2016. **Eurosurveillance** v. 25, p. 1–12, 2020.

MEGGERS, E. Targeting proteins with metal complexes. **Chem. Commun.** v. 9, n. 1001–1010, 2009.

MENDES, S. S.; MARQUES, J.; MESTERHÁZY, E.; STRAETENER, J.; ARTS, M.; PISSARRO, T.; REGINOLD, J.; BERSCHIED, A.; BORNICOEL, J.; KLUJ, R. M. *et al.* Synergetic antimicrobial activity and mechanism of clotrimazole-linked CO-releasing molecules. **ACS Bio. Med. Chem. Au.**, v. 2, p. 419–436, 2022.

MÉRIC, G.; MIRAGAIA, M.; de BEEN, M.; YAHARA, K.; PASCOE, B.; MAGEIROS, L.; MIKHAIL, J.; HARRIS, L. G.; WILKINSON, T. S.; ROLO, J. Ecological Overlap and Horizontal Gene Transfer in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Genome Biol Evol.** v. 7, n. 5, p. 1313–28, 2015.

MIRAGAIA, M.; de LENCASTRE, H.; PERDREAU-REMINGTON, F.; CHAMBERS, H. F.; HIGASHI, J.; SULLAM, P. M.; LIN, J.; WONG, K. I.; KING, K. A.; OTTO, M. *et al.* Genetic diversity of arginine catabolic mobile element in *Staphylococcus epidermidis*. **PLoS One.** v. 4, p.e7722, 2009.

MISHRA, N. N.; BAYER, A. S.; TRAN, T. T.; SHAMOO, Y.; MILEYKOVSKAYA, E.; DOWHAN, W.; GUAN, Z.; ARIAS, C. A. Daptomycin resistance in enterococci is associated with distinct alterations of cell membrane phospholipid content. **PLoS One.** v. 7, p. e43958, 2012.

MOHAMED, A. H.; SHEIKH OMAR, N. M.; OSMAN, M. M.; MOHAMUD, H. A.; ERASLAN, A.; GUR, M. Antimicrobial resistance and predisposing factors associated with catheter-associated UTI caused by uropathogens exhibiting multidrug-resistant patterns: a 3-year retrospective study at a tertiary hospital in Mogadishu, Somalia. **Trop. Med. Infect. Dis.** Vv. 7, n. 3, p. 42, 2022.

MONAHAN, L. G.; TURNBULL, L.; OSVATH, S. R.; BIRCH, D.; CHARLES, I. G.; WHITCHURCH, C. B. Rapid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to a spherical cell morphotype facilitates tolerance to carbapenems and penicillins but increases susceptibility to antimicrobial peptides. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, p. 1956–1962, 2014.

MOREL, C.; ALM, R.; ARDAL, C.; BANDERA, A.; BRUNO, G.; CARRARA, E. *et al.* A one health framework to estimate costs of antimicrobial resistance. **Antimicrobial Resistance and Infection Control.** V. 9, n. 187, 2020.

MORRISON, C. N.; PROSSER, K. E.; STOKES, R. W.; CORDES, A.; METZLER-NOLTE, N.; COHEN, S. M. Expanding medicinal chemistry into 3D space: metallofragments as 3D scaffolds for fragment-based drug discovery. **Chem. Sci.** v. 11, p. 1216–1225, 2020.

MOSER, C.; PEDERSEN, H. T.; LERCHE, C. J.; KOLPEN, M.; LINE, L.; THOMSEN, K.; HØIBY, N.; JENSEN, P. Ø. Biofilms and host response-helpful or harmful. **APMIS**, v. 125, p. 320–338, 2017.

MOTTA, S. S.; CLUZEL, P.; ALDANA, M. Adaptive resistance in bacteria requires epigenetic inheritance, genetic noise, and cost of efflux pumps. **PLoS One.** v. 10, p. e0118464, 2015.

MOTTOLA, C.; MATIAS, C. S.; MENDES, J. J.; MELO-CRISTINO, J.; TAVARES, L.; CAVACO-SILVA, P.; OLIVEIRA, M. Susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* biofilms in diabetic foot infections. **BMC Microbiol.**, v. 16, n. 1, p. 119, 2016.

MUELLER, M.; TAINTER, C. R. *Escherichia coli* Infection. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

MUKHERJEE, S.; BASSLER, B.L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 17, p. 371–382, 2019.

MULANI, M. S.; KAMBLE, E. E.; KUMKAR, S. N.; TAWRE, M. S.; PARDESI, K. R. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. **Front. Microbiol.**, v. 10, p. 539, 2019.

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

MURRAY, T. S.; OKEGBE, C.; GAO, Y.; KAZMIERCZAK, B. I.; MOTTERLINI, R.; DIETRICH, L. E. P.; BRUSCIA, E. M. The carbon monoxide releasing molecule CORM-2 attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4: p.1–11, 2012.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7^a ed. Elsevier Editora, 2018.

MURRAY, A. K.; STANTON, I. C.; WRIGHT, J.; ZHANG, L.; SNAPE, J.; GAZE, W. H. The ‘SElection End points in Communities of bacTeria’ (SELECT) method: a novel experimental assay to facilitate risk assessment of selection for antimicrobial resistance in the environment. **Environ. Health Perspect.** v. 128, p. 107007, 2020.

MURRAY, A. K.; STANTON, I.; GAZE, W. H.; SNAPE, J. Dawning of a new ERA: Environmental Risk Assessment of antibiotics and their potential to select for antimicrobial resistance. **Water Res.** v. 200, p. 1-11, 2021.

MURRAY, C. J. L.; IKUTA, K. S.; SHARARA, F.; SWETSCHINSKI, L.; ROBLES AGUILAR, G.; GRAY, A *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet.**, v.399, n. 10325, p. 629–55, 2022.

NAAS, T.; OUESLATI, S.; BONNIN, R. A.; DABOS, M. L.; ZAVALA, A.; DORTET, L.; RETAILLEAU, P.; IORGA, B. I. Beta-lactamase database (BLDB) - structure and function. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.** 32, p. 917-919, 2017.

NANDANWAR, S. K.; KIM, H. J. Anticancer and antibacterial activity of transition metal complexes. **ChemistrySelect**, v. 4, n. 5, p. 1706–1721, 2019.

NAYLOR, N. R.; ATUN, R.; ZHU, N.; KULASABANATHAN, K.; SILVA, S.; CHATTERJEE, A.; KNIGHT, G. M.; ROBOTHAM, J. V. Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review. **Antimicrob. Resist. Infect. Control**, v. 7, p. 58, 2018.

NAZAROV, P. A. MDR pumps as crossroads of resistance: antibiotics and bacteriophages. **Antibiotics**, v. 11, p. 734, 2022.

NEERGHEEN-BHUJUN, V.; AWAN, A. T.; BARAN, Y.; BUNNEFELD, N.; CHAN, K.; DELA CRUZ, T. E. *et al.* Biodiversity, drug discovery, and the future of global health: introducing the biodiversity to biomedicine consortium, a call to action. **J. Glob. Health**, v. 7, p. 1-5, 2017.

NEVES, P.R.; PERDIGÃO NETO, L.V.; RUEDAS MARTINS, R.C.; RAMOS, J.F.; LEITE, G.; ROSSI, F.; SANABANI, S.S.; ROCHA, V.; BATISTA, M.V.; GUIMARAES, T.; *et al.* Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Carrying *Bla*VIM-36 Assigned to ST308: Indicated Non-Virulence in a *Galleria Mellonella* Model. **J. Glob. Antimicrob. Resist.** v. 16, p. 92–97, 2019.

NUNES, E. D.; VILLELA, A. D.; BASSO, L. A.; TEIXEIRA, E. H.; ANDRADE, A. L.; VASCONCELOS, M. A.; NASCIMENTO-NETO, L. G.; GONDIM, A. C. S.; DIOGENES, I. C. N.; ROMO, A. I. B *et al.* Light-induced disruption of an acyl hydrazone link as a novel strategy for drug release and activation: isoniazid as a proof-of-concept case **Inorg. Chem. Front.** v. 4, p. 859-870, 2020.

O'NEILL, J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. In: Review on Antimicrobial Resistance. HM Governem. 2014.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Rev. Antimicrob. Resist.** 2016.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, p. 1, 2003.

OLIVA, A.; MASCELLINO, M. T.; NGUYEN, B. L.; DE ANGELIS, M.; CIPOLLA, A.; DI BERARDINO, A.; CICCAGLIONI, A.; MASTROIANNI, C. M.; VULLO, V. Detection of biofilm-associated implant pathogens in cardiac device infections: high sensitivity of sonication fluid culture even in the presence of antimicrobials. **J. Glob. Infect. Dis.**, v. 10, p. 74–79, 2018.

OLIVEIRA, W. F.; SILVA, P. M. S.; SILVA, R. C.S.; SILVA, G.M. M.; MACHADO, G.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. **J. Hosp. Infect.** v. 98, n. 2p. 111-117, 2018.

OLIVEIRA, G. F. S.; GOUVEIA JR, F. S.; PINHEIRO, A. A.; NASCIMENTO-NETO, L. G.; VASCONCELOS, M. A.; TEIXEIRA, E. H.; GONDIM, A. C. S.; LOPES, L. G. F.; CARVALHO, I. M. M.; SOUSA, E. H. S. An anthracene-pendant ruthenium(ii) complex conjugated to a biotin anchor, an essential handle for photo-induced anti-cancer activity. **New J. Chem.** v. 44, p. 6610-6622, 2020.

ORLOWSKA, E.; BABAK, M. V.; DÖMÖTÖR, O.; ENYEDY, E. A.; RAPTA, P.; ZALIBERA, M.; BUČINSKÝ, L.; MALČEK, M.; GOVIND, C.; KARUNAKARAN, V.; FARID, Y. C. S *et al.* NO Releasing and Anticancer Properties of Octahedral Ruthenium–Nitrosyl Complexes with Equatorial 1H-Indazole Ligands. **Inorg. Chem.** v. 57, p. 10702–10717, 2018.

OSTROWSKI, A. D.; FORD, P. C. Metal complexes as photochemical nitric oxide precursors: Potential applications in the treatment of tumors. **Dalton Trans.**, v. 48, p. 10660–10669, 2009.

OTTER, J. A.; VICKERY, K.; WALKER, J. T.; DE LANCEY PULCINI, E.; STOODLEY, P.; GOLDENBERG, S. D.; SALKELD, J. A. G.; CHEWINS, J.; YEZLI, S.; EDGEWORTH, J. D. Surface-Attached Cells, Biofilms and Biocide Susceptibility: Implications for Hospital Cleaning and Disinfection. **J. Hosp. Infect.** v. 89, p. 16–27, 2015.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* - the ‘accidental’ pathogen. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 7, p. 555–567, 2009.

OZER, E.; YANIV, K.; CHETRIT, E.; BOYARSKI, A.; MEIJLER, M. M.; BERKOVICH R.; KUSHMARO, A.; ALFONTA, L. An inside look at a biofilm: *Pseudomonas aeruginosa* flagella biotracking. **Sci Adv.** v. 7, n. 24:eabg8581, 2021.

PACIOS, O.; BLASCO, L.; BLERIOT, I.; FERNANDEZ-GARCIA, L.; AMBROA, A.; LÓPEZ, M.; BOU, G.; CANTÓN, R.; GARCIA-CONTRERAS, R.; WOOD, T. K.; TOMÁS, M. (p)ppGpp and its role in bacterial persistence: new challenges. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 64, p. e01283-20, 2020.

PANG, Z.; RAUDONIS, R.; GLICK, B. R.; LIN, T. J.; CHENG, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnol. Adv.** v. 37, p. 177-192, 2019.

PARK, W. S.; LEE, J.; NA, G.; PARK, S.; SEO, S. K.; CHOI, J. S.; JUNG, W. K.; CHOI, I. W. Benzyl Isothiocyanate Attenuates Inflammation Activation in *Pseudomonas aeruginosa* LPS-Stimulated THP-1 Cells and Exerts Regulation through the MAPKs/NF- κ B Pathway. **Int. J. Mol. Sci.** v. 23, n. 3, p. 1228, 2022.

PARVIN, F.; HU, H.; WHITELEY, G. S.; GLASBEY, T.; VICKERY, K. Difficulty in Removing Biofilm from Dry Surfaces. **J. Hosp. Infect.** v. 103, p. 465–467, 2019.

PATRA, M.; WENZEL, M.; PROCHNOW, P.; PIERROZ, V.; GASSER, BANDOWAND, J. E.; METZLER-NOLTE, N. An organometallic structure–activity relationship study reveals the essential role of a Re(CO)₃ moiety in the activity against Gram-positive pathogens including MRSA. **Chem. Sci.** v. 6, p. 214–224, 2015.

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; BARBOSA, M. I. F., LEITE, LEITE, S. R. A.; BATISTA, C; ELLENA, J; SATO, L. S.; FRANZBLAU, S. G.; MORENO, V; GAMBINO, D; LEITE, C. Q. F. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 46, p. 5099-5107, 2011.

PENESYAN, A.; GILLINGS, M.; PAULSEN, I. T. Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. **Molecules**, v. 20, p. 5286–5298, 2015.

PEPI, M.; FOCARDI, S. Antibiotic-resistant bacteria in aquaculture and climate change: a challenge for health in the Mediterranean area. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 18, n. 11, p. 5723, 2021.

PEREIRA GONZALES, F.; MAISCH, T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. **Fung. Biol.** v. 116, p. 1–10, 2012.

PEREIRA ROSA, L. Antimicrobial Photodynamic Therapy: A New Therapeutic Option to Combat Infections. **J. Med. Microb. Diagn.** v. 3, n. 4, 2014.

PEREIRA, F. C.; LIMA, B. A.; DE LIMA, A. P.; PIRES, W. C.; MONTEIRO, T.; MAGALHÃES, L. F.; COSTA, W.; GRAMINHA, A. E.; BATISTA, A. A.; ELLENA, J. SIVEIRA-LACERDA, E. P. Cis-[RuCl(BzCN)(N–N)(P–P)]PF₆ complexes: Synthesis and in vitro antitumor activity: (BzCN = benzonitrile; N–N = 2,2'-bipyridine; 1,10-phenanthroline; P–P = 1,4-bis(diphenylphosphino) butane, 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane, or 1,1'-(diphenylphosphino)ferrocene). **J. Inorg. Biochem.**, v. 149, p. 91–101, 2015.

PERIASAMY, H.; JOSHI, P.; PALWE, S.; SHRIVASTAVA, R.; BHAGWAT, S.; PATEL, M. High prevalence of *Escherichia coli* clinical isolates in India harbouring four amino acid inserts in PBP3 adversely impacting activity of aztreonam/avibactam. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 75, p. 1650-1651, 2020.

PERRY, J.; WAGLECHNER, N.; WRIGHT, G. The prehistory of antibiotic resistance. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.** v. 6, p. 1-8, 2016.

PETROVA, O. E.; SAUER, K. A novel signaling network essential for regulating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **PLoS Pathog.** v. 5, e1000668, 2009.

PIKSA, M.; FORTUNA, W.; LIAN, C.; GACKA, M.; SAMUEL, IDW.; MATCZYSZYN, K.; PAWLIK, K. J. Treatment of antibiotic-resistant bacteria colonizing diabetic foot ulcers by OLED induced antimicrobial photodynamic therapy. **Sci Rep.**, v. 13, p. 14087, 2023.

POIREL, L.; MADEC, J. Y.; LUPO, A.; SCHINK, A. K.; KIEFFER, N.; NORDMANN, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. **Microbiol Spectr.** v. 6, n. 4, 2018.

PROCOP, G. W.; CHURCH, D. L.; HALL, G. L.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. **Diagnóstico Microbiológico**. 7^a ed – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

PRUDEN, A.; PEI, R.; STORTEBOOM, H.; CARLSON, K. H. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. **Environ. Sci Technol.** v. 40, p. 7445-7450, 2006.

QIN, S.; XIAO, W.; ZHOU, C.; PU, QINQIN.; DENG, X.; LAN, L.; LIANG, H.; SONG, X.; WU, M. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Sig. Transduct. Target. Ther.** v. 7, p. 199, 2022.

RAY, M. D.; BOUNDY, S.; ARCHER, G. L. Transfer of the methicillin resistance genomic island among staphylococci by conjugation. **Mol. Microbiol.** v. 100, p. 675–685 2016.

RAYNOR, J. B. On the formalism of treating the linear nitric oxide ligand as NO⁺. **Inor. Chim. Acta**, v. 6, n. 1, p. 347-348, 1972.

RHOADS, D. D.; WOLCOTT, R. D.; PERCIVAL, S. L. Biofilms in wounds: management strategies. **J. Wound Care**. v. 17, n. 11, p. 502-508, 2008.

RINALDO, S.; GIARDINA, G.; MANTONI, F.; PAONE, A.; CUTRUZZOLÀ, F. Beyond nitrogen metabolism: nitric oxide, cyclic-di-GMP and bacterial biofilms. **FEMS Microbiol Lett**. v. 365, n. 6, 2018.

RODRIGUES, V. S.; dos SANTOS, A.; SANTOS, A. J.; SCHNEIDER, C. Z.; CALIXTO, J. B.; SOUSA, E. H. S.; LOPES, L. G. D.; SOUTO, A. A.; BASSO, L. A.; SANTOS, D.S.; CAMPOS, M. M. Activity of IQG-607, a new orally active compound, in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Int. J. Antimicrobial. Agents**, v. 40, n. 2, p. 182–185, 2012.

RODRIGUES-JUNIOR, V. S.; MACHADO, P.; CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA, J. M.; ANDRADE, E. L.; BENTO, A. F.; CAMPOS, M. M.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. Preclinical safety evaluation of IQG-607 in rats: Acute and repeated dose toxicity studies. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** v. 86, p. 11–17, 2017.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; CHAMORRO, S.; MARTI, E.; HUERTA, B.; GROS, M.; SÀNCHEZ-MELSIÓ, A. *et al.* Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. **Water Res.** v. 69, 234-242, 2015.

RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di- GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 77, p. 1–52, 2013.

ROSENBERG, B.; van CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, p. 698–699, 1965.

ROSSI, E.; LA ROSA, R.; BARTELL, J. A.; MARVIG, R. L.; HAAGENSEN, J. A. J.; SOMMER, L. M.; MOLIN, S.; JOHANSEN, H. K. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 19, p. 331-342, 2021.

RUIZ, J. Transferable mechanisms of quinolone resistance from 1998 onward. **Clin. Microbiol. Rev.** 32, p. e00007-19, 2019.

RUPP, M. E.; KARNATAK, R. Intravascular catheter-related bloodstream infections. **Infect. Dis. Clin. North Am.** v. 32, p. 765–787, 2018.

SA, D. S.; FERNANDES, A. F.; SILVA, C. D. S.; COSTA, P. P. C.; FONTELES, M. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; LOPES, L. G. F.; SOUSA, E. H. S. Non-nitric oxide based metallovasodilators: synthesis, reactivity and biological studies. **Dalton Trans.**, v. 44, p. 13633–13640, 2015.

SABNIS, A.; HAGART, K. L.; KLÖCKNER, A.; BECCE, M.; EVANS, L. E.; FURNISS, R. C. D.; MAVRIDOU, D. A.; MURPHY, R.; STEVENS, M. M.; DAVIES, J. C. Colistin kills

bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. **Elife**. v. 10, p. e65836, 2021.

SALEHI, B.; GHALAVAND, Z.; YADEGAR, A.; ESLAMI, G. Characteristics and diversity of mutations in regulatory genes of resistance-nodulation-cell division efflux pumps in association with drug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Resist. Infect. Control** v. 10, p. 53, 2021.

SAINI, A.; BANSAL, R. Insights on the structural characteristics of NDM-1: The journey so far. **Adv. Biol. Chem.**, v. 2, p. 323-334, 2012.

SANDERSON, H.; FRICKER, C.; BROWN, R.S.; MAJURY, A.; LISS, S. N. Antibiotic resistance genes as an emerging environmental contaminant. **Environ. Rev.** v. 24, p. 205-218, 2016.

SANNELLA, A. R.; CASINI, A.; GABBIANI, C.; MESSORI, L.; BILIA, A. R.; VINCIERI, F. F.; MAJORI, G.; SEVERINI, C. New uses for old drugs. auranofin, a clinically established antiarthritic metalloidrug, exhibits potent antimalarial effects in vitro: mechanistic and pharmacological implications. **FEBS Letters**, v. 582, p. 844, 2008.

SANTOS, A. L. S.; SODRE, C. L.; VALLE, R. S.; SILVA, B. A.; ABI-CHACRA, E. A.; SILVA, L. V.; SOUZA-GONCALVES, A. L.; SANGENITO, L. S.; GONCALVES, D. S.; SOUZA, L. O *et al.* Antimicrobial action of chelating agents: repercussions on the microorganism development, virulence and pathogenesis. **Curr. Med. Chem.**, v. 19, p. 2703-2714, 2012.

SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRLICH, G. D.; COSTERTON, J. W.; DAVIES, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **J. Bacteriol.** v. 184, p. 1140–1154, 2002.

SAUER, K.; STOODLEY, P.; GOERES, D. M.; HALL-STOODLEY, L.; BURMØLLE, M.; STEWART, P. S.; BJARNSHOLT, T. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 20, p. 608–620, 2022.

SCHAIRER, D. O.; CHOUAKE, J. S.; NOSANCHUK, J. D.; FRIEDMAN, A. J. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. **Virulence**. v. 3, p. 271–279, 2012.

SCHILCHER, K.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 84, p. e00026-19, 2020.

SCHULTZ, M. P.; BENDICK, J. A.; HOLM, E. R.; HERTEL, W. M. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. **Biofouling**, v. 27, p. 87–98, 2011.

SERLI, B.; ZANGRANDO, E.; GIANFERRARA, T.; YELLOWLEES, L.; ALESSIO, E. Coordination and release of NO by ruthenium-dimethylsulfoxide complexes – implications for antimetastases activity. **Coord. Chem. Rev.**, v. 245, n. 1, p. 73- 83, 2003.

SHAN, Y.; BROWN, G. A.; ROWE, S. E.; DEISINGER, J. P.; CONLON, B. P.; LEWIS, K. ATP-dependent persister formation in *Escherichia coli*. **mBio**, v. 8, p. e02267-16, 2017.

SHARMA, B.; SHUKLA, S.; RATTAN, R.; FATIMA, M.; GOEL, M.; BHAT, M.; DUTTA, S.; RANJAN, R. K.; SHARMA, M. Antimicrobial Agents Based on Metal Complexes: Present Situation and Future Prospects. **Int. J. Biomater.** v. 8, n. 2022, p. 6819080. 2022.

SHARMA, D.; MISBA L.; KHAN, A. U. Antibiotics versus Biofilm: An Emerging Battleground in Microbial Communities. **Antimicrob. Resist. Infect. Control**, v. 8, n. 76, 2019.

SHARMA, A.; GUPTA, S.; SARETHY, I. P.; DANG, S.; GABRANI, R. Green tea extract: possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens. **Food Chem.** V. 135, n. 2: p. 672–675, 2012.

SHARIATI, A.; AZIMI, T.; ARDEBILI, A.; CHIRANI, A.S.; BAHRAMIAN, A.; PORMOHAMMAD, A.; SADREDINAMIN, M.; ERFANIMANESH, S.; BOSTANGHADIRI, N.; SHAMS, S.; *et al.* Insertional inactivation of oprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Tehran, Iran. **N. Microbes N. Infect.** v. 21, p. 75–80, 2018.

SHERCHAN, J. B.; HAYAKAWA, K.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; OHMAGARI, N.; KIRIKAE, T.; NAGAMATSU, M *et al.* Clinical epidemiology and molecular analysis of extended-spectrum B-lactamase-producing *Escherichia coli* in Nepal: characteristics of sequence types 131 and 648. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 59, p. 3424–32. 2015.

SHORE, A. C.; DEASY, E. C.; SLICKERS, P.; BRENNAN, G.; O'CONNELL, B.; MONECKE, S.; EHRLICH, R.; COLEMAN, D. C. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3765–3773, 2011.

SHRESTHA, P.; COOPER, B. S.; COAST, J.; OPPONG R, D. O.; THI THUY, N.; PHODHA, T.; CELHAY, O.; GUERIN, P. J.; WERTHEIM, H.; LUBELL, Y. Enumerating the economic cost of antimicrobial resistance per antibiotic consumed to inform the evaluation of interventions affecting their use. **Antimicrob. Resist. Infect. Control.** v. 7, p. 98, 2018.

SHRESTHA, L. B.; BARAL, R.; KHANAL, B. Comparative study of antimicrobial resistance and biofilm formation among Gram-positive uropathogens isolated from community acquired urinary tract infections and catheter-associated urinary tract infections. **Infect. Drug Resist.**, v. 12, p. 957–963, 2018.

SIJA, E.; HARTINGER, C. G.; KEPPLER, B. K.; KISS, T.; ENYEDY, E. A. Solution equilibrium studies of anticancer ruthenium(II)-eta(6)-p-cymene complexes of pyridinecarboxylic acids. **Polyhedron**, v. 67, p. 51, 2014.

SILVA FILHO, P. M.; PAZ, I. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; ABREU, D. S.; LOPES, L. G. F.; SOUSA, E. H. S.; LONGHINOTTI, E. Nitroprusside-Expanding the Potential Use of an Old Drug Using Nanoparticles. **Mol. Pharm.**, v. 20, n.1, p. 6-22, 2023.

SILVA, H. V. R.; DIAS, J. S. M.; FERREIRA-SILVA, G. Á.; COLINA-VEGAS, L.; IONTA, M.; CHARLANE, G. A.; CORRÊA, C.; BATISTA, A.A.; BARBOSA, M. I. F.;

DORIGUETTO, A. C. Phosphine/diimine ruthenium complexes with Cl^- , CO, NO^+ , NO_2^- , NO_3^- and pyridine ligands: Pro-apoptotic activity on triple-negative breast cancer cells and DNA/HSA interactions. **Polyhedron**, v. 144, p. 55-65, 2018.

SILVA, Z. S.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. S.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. ANIMAL Models for Photodynamic Therapy (PDT). **Biosci. Rep.**, v. 35, p. e00265, 2015.

SILVA, J. J. N.; GUEDES, P. M. M.; ZOTTIS, A.; BALLIANO, T. L.; SILVA, F. O. N.; LOPES, L. G. F.; ELLENA, J.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; FRANCO, D. W.; SILVA, J. S. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and *in vitro/in vivo* trypanocidal activity. **British J. Pharmacol.**, v. 160, p. 260–269, 2010.

SLIGL, W.; TAYLOR, G.; BRINDLEY, P. G. Five years of nosocomial Gram-negative bacteremia in a general intensive care unit: epidemiology, antimicrobial susceptibility patterns, and outcomes. **Int. J. Infect. Dis.** v. 10, p. 320-325, 2006.

SMALLA, K.; COOK, K.; DJORDJEVIC, S. P.; KLÜMPER, U.; GILLINGS, M. Environmental dimensions of antibiotic resistance: assessment of basic science gaps. **FEMS Microbiol. Ecol.** v. 94, p. 1-6, 2018.

SMITHEEN, D. A.; YIN, H.; BEH, M. H.; HETU, M.; CAMERON, T. S.; MCFARLAND, S. A *et al.* Synthesis and photobiological activity of Ru(II) dyads derived from pyrrole-2-carboxylate thionoesters. **Inorg. Chem.**, v. 56, p. 4121–4132, 2017.

SMITTEN, K. L.; THICK, E. J.; SOUTHAM, H. M.; de LA SERNA, J. B.; SIMON J. FOSTERB, S. J.; THOMAS, J. A. Mononuclear ruthenium(II) theranostic complexes that function as broad-spectrum antimicrobials in therapeutically resistant pathogens through interaction with DNA. **Chem. Sci.**, v. 11, p. 8828–8838, 2020.

SORLI, L.; LUQUE, S.; SEGURA, C.; CAMPILLO, N.; MONTERO, M.; ESTEVE, E.; HERRERA, S.; BENITO, N.; ALVAREZ-LERMA, F.; GRAU, S.; HORCAJADA, J. P. Impact of colistin plasma levels on the clinical outcome of patients with infections caused by extremely drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Infect Dis.** v. 17, n.1, p. 11, 2017.

SOUSA, E. H. S.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S.; DIOGENES, I.C.N.; LONGHINOTTI, E.; LOPES, L.G.D.; MOREIRA, I. D. Isoniazid metal complex reactivity and insights for a novel anti-tuberculosis drug design. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 17, n. 2, p. 275–283, 2012.

SOUSA, E. H. S.; VIEIRA, F. G. M.; BUTLER, J. S.; BASSO, L. A.; SANTIAGO, D. S.; DIÓGENES, I. C. N.; LOPES, L. G. F.; SADLER, P. J. $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{isoniazid})]^{3-}$: an iron isoniazid complex with redox behavior implicated in tuberculosis therapy. **J. Inorg. Biochem.**, v. 140, 236–244, 2014.

SOUSA, E. H. S.; RIDNOUR, L. A.; GOUVEIA, F. S.; SILVA, C. D.; WINK, D. A.; LOPES, L. G. F.; SADLER, P. J. Thiol-Activated HNO Release from a Ruthenium Antiangiogenesis Complex and HIF-1 α Inhibition for Cancer Therapy. **ACS Chem. Biol.** v. 11, n. 7, p. 2057-2065, 2016.

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

SOUSA, A. P.; GONDIM, A. C. S.; SOUSA, E. H. S.; LOPES, L. G. F.; MARTINS, P. H. R.; TEIXEIRA, E. H.; VASCONCELOS, M. A.; MEDEIROS, E. J. T.; BATISTA, A. A.; HOLANDA, A. K. M. Biphosphinic ruthenium complexes as the promising antimicrobial agent. **New J. Chem.**, v. 44, p. 21318-21325, 2020a.

SOUSA, A. P.; GONDIM, A. C. S.; SOUSA, E. H. S.; VASCONCELOS, M. A.; TEIXEIRA, E. H.; BEZERRA, B. P.; AYALA, A. P.; MARTINS, P. H. R.; LOPES, L. G. F.; HOLANDA, A. K. M. An unusual bidentate methionine ruthenium(II) complex: photo-uncaging and antimicrobial activity. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 25, 419–428, 2020b

SOUTHAM, H. M.; BUTLER, J. A.; CHAPMAN, J. A.; POOLE, R. K. The Microbiology of Ruthenium Complexes. **Adv Microb Physiol.**, v. 71, p. 1-96. 2017.

SPESIA, M. B.; DURANTINI, E. N. Evolution of Phthalocyanine Structures as Photodynamic Agents for Bacteria Inactivation. **Chem. Rec.**, v. 22, p. e202100292, 2022.

SRISUKNIMIT, V.; QIAO, Y.; SCHAEFER, K.; KAHNE, D.; WALKER, S. Peptidoglycan Cross-Linking Preferences of *Staphylococcus aureus* Penicillin-Binding Proteins Have Implications for Treating MRSA Infections. **J. Am. Chem. Soc.** v. 139, p. 9791-9794, 2017.

STAATS, A.; LI, D.; SULLIVAN, A. C.; STOODLEY, P. Biofilm formation in periprosthetic joint infections. **Ann. Jt.** v. 6, p. 43, 2021.

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

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 6, p. 199–210, 2008.

STEWART, P. S.; WHITE, B.; BOEGLI, L.; HAMERLY, T.; WILLIAMSON, K. S.; FRANKLIN, M. J.; BOTHNER, B.; JAMES, G. A.; FISHER, S.; VITAL-LOPEZ, F. G.; WALLQVIST, A. Conceptual model of biofilm antibiotic tolerance that integrates phenomena of diffusion, metabolism, gene expression, and physiology. **J. Bacteriol.**, v. 201, p. e00307-19, 2019.

SUN, D.; ZHANG, W.; YANG.; LI, N.; LIU, H.; WANG, W. Investigation of antibacterial activity and related mechanism of a ruthenium(II) polypyridyl complex. **Inorg. Chem. Commun.** v. 56, p. 17-21, 2015.

SUN, W. Z.; JIAN, Y.; ZHOU, M. X.; YAO, Y. S.; TIAN, N.; LI, C *et al.* Selective and efficient photoinactivation of intracellular *Staphylococcus aureus* and MRSA with little accumulation of drug resistance: Application of a Ru(II) complex with photolabile ligands. **J. Med. Chem.** v. 64, p. 7359–7370, 2021.

SWAVEY, S.; MORFORD, K.; TSAO, M.; COMFORT, K.; KILROY, M. K. Heteroleptic monometallic and trimetallic ruthenium (II) complexes incorporating a π -extended dipyrin ligand: Light-activated reactions with the A549 lung cancer cell line. **J. Inorg. Biochem.**, v. 75, p. 101-109, 2017.

TATTEVIN, P.; FLÉCHER, E.; AUFFRET, V.; LECLERCQ, C.; BOULÉ, S.; VINCENTELLI, A.; DAMBRIN, C.; DELMAS, C.; BARANDON, L.; VENIARD, V *et al.* Risk factors and prognostic impact of left ventricular assist device-associated infections. **Am. Heart J.** v. 214, p. 69–76, 2019.

TAYEB-FLIGELMAN, E.; TABACHNIKOV, O.; MOSHE, A.; GOLDSHMIDT-TRAN, O.; SAWAYA, M. R.; COQUELLE, N.; COLLETIER, J. P.; LANDAU, M. The cytotoxic *Staphylococcus aureus* PSM α 3 reveals a cross- α amyloid-like fibril. **Science.** v. 355, p. 831-833, 2017.

TENOVER, F. C.; NICOLAU, D. P.; GILL, C. M. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* -an emerging challenge. **Emerg. Microbes Infect.** v. 11, n. 1, p. 811–814, 2022.

TFOUNI, E.; DORO, F. G.; FIGUEIREDO, L. E.; PEREIRA, J. C.; METZKER, G.; FRANCO, D. W. Tailoring NO donors metallopharmaceuticals: ruthenium nitrosyl amines and aliphatic tetraazamacrocycles. **Curr. Med. Chem.**, v. 17, n. 31, p. 3643-3657, 2010.

THAKURIA, B.; LAHON, K. The β -lactam antibiotics as an empirical therapy in a developing country: an update on their current status and recommendations to counter the resistance against them. **J. Clin. Diagn. Res.** v. 7, p. 1207–1214, 2013.

THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Boon and bane of metal ions in medicine. **Science**, v. 300, p. 936-939, 2003.

THOTA S. Editorial: Anticancer Ruthenium Complexes in Drug Discovery and Medicinal Chemistry. **Mini Rev Med Chem.**, v.16, n. 10, p. 771, 2016.

TOOKE, C. L.; HINCHLIFFE, P.; BRAGGINTON, E. C.; COLENZO, C. K.; HIRVONEN, V. H. A, TAKEBAYASHI, Y.; SPENCER, J. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **J. Mol. Biol.** v. 431, p. 3472-3500, 2019.

TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLENS, J. H. M.; STEWART, F. A. Photodynamic therapy in oncology. **Oncologist**, v. 11, p. 1034–1044, 2006.

TUON, F.F.; DANTAS, L.R.; SUSS, P.H.; TASCA RIBEIRO, V.S. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. **Pathogens**, v. 11, p. 300, 2022.

UDE, Z.; ROMERO-CANELÓN, I.; TWAMLEY, B.; FITZGERALD HUGHES, D.; SADLER, P. J.; MARMION, C. J. A novel dual-functioning ruthenium(II)-arene complex of an anti-microbial ciprofloxacin derivative - Anti-proliferative and anti-microbial activity. **J Inorg. Biochem.**, v. 160, p. 210–217, 2016.

UN - United Nations. **Goal 12: ensure sustainable consumption and production patterns. Sustainable Development Goals.** 2022. Disponível em:

<https://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-consumption-production/> Acesso em: 30 nov. 2023.

UNEP- United Nations Environment Programme. **Frontiers 2017: Emerging Issues of Environmental Concern**. 2017. Disponível em: <https://www.unep.org/resources/frontiers-2017-emerging-issues-environmental-concern>. Acesso em: 30 nov. 2023.

UNEP - United Nations Environment Programme. **Bracing for Superbugs: Strengthening environmental action in the One Health response to antimicrobial resistance**. 2023, Geneva.

URUÉN, C.; CHOPO-ESCUIN, G.; TOMMASSEN, J.; MAINAR-JAIME, R.C.; ARENAS, J. Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. **Antibiotics**, v. 10, p. 3, 2021.

VALENTINI, M.; FILLoux, A. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. **J. Biol. Chem.** v. 291, p. 12547-12555, 2016.

VEGGE, C. S.; BRONDSTED, L.; LIGOWSKA-MARZETA, M.; INGMER, H. Natural transformation of *Campylobacter jejuni* occurs beyond limits of growth. **PLoS One** v. 7, p. e45467, 2012.

VIDAILLAC, C.; CHOTIRMALL, S. H. *Pseudomonas aeruginosa* in bronchiectasis: infection, inflammation, and therapies. **Expert. Rev. Respir. Med.** v. 15, p. 649–662, 2021.

VIGANOR, L.; HOWE, O.; MCCARRON, P.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M. The antibacterial activity of metal complexes containing 1,10-phenanthroline: potential as alternative therapeutics in the era of antibiotic resistance. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 17, n. 11, p. 1280-1302, 2017.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 42, p. 13–28, 1998.

WANG, Y.; BIAN, Z.; WANG, Y. Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 106, n. 19-20, p. 6365-6381, 2022.

WANG, L. L.; BATTINI, N.; BHEEMANABOINA, R. R. Y.; ANSARI, M. F.; CHEN, J. P.; XIE, Y. P *et al.* A new exploration towards aminothiazolquinolone oximes as potentially multi-targeting antibacterial agents: Design, synthesis and evaluation acting on microbes, DNA, HSA and topoisomerase IV. **Eur. J. Med. Chem.** v. 179, p. 166–181, 2019.

WANG, Z.; FAN, G.; HRYC, C. F.; BLAZA, J. N.; SERYSHEVA, I. I.; SCHMID, M. F.; CHIU, W.; LUISI, B. F.; DU, D. An allosteric transport mechanism for the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. **eLife**, v. 6, p. e24905, 2017.

WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 21, p. 319–346, 2005.

WEBB, M. I.; WU, B.; JANG, T.; CHARD, R. A.; WONG, E. W.; WONG, M. Q *et al.* Increasing the bioavailability of Ru(III) anticancer complexes through hydrophobic albumin interactions. **Chemistry**, v. 19, p. 17031–17042, 2013.

WENZEL, M.; PATRA, M.; SENEGES, C. H.; OTT, I.; STEPANEK, J. J.; PINTO, A.; PROCHNOW, P.; VUONG, C.; LANGKLOTZ, S.; METZLER-NOLTE, N.; BANDOW, J. E. Analysis of the mechanism of action of potent antibacterial hetero-tri-organometallic compounds: a structurally new class of antibiotics. **ACS Chem. Biol.**, v. 8, 1442–1450, 2013.
WHITTLE, E. E.; MCNEIL, H. E.; TRAMPARI, E.; WEBBER, M.; OVERTON, T. W.; BLAIR, J. M. A. Efflux Impacts Intracellular Accumulation Only in Actively Growing Bacterial **Cells**. **mBio**. v. 12, p. e0260821, 2021.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global action plan on antimicrobial resistance, 2014. Disponível em: www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/ Acesso em: 30 jul. 2023.

WHO -WORLD HEALTH ORGANIZATION AND UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. **Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2020: five years into the SDGs**. 2021. Disponível em: <https://data.unicef.org/resources/progress-onhousehold-drinking-water-sanitation-and-hygiene-2000-2020/> Acesso em: 30 jul. 2023.

WHO. Media Centre. News Release. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>. Acesso em: 10 ago. 2023.

WHO. Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data**. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022.

WU, D.; DING, Y.; YAO, K.; GAO, W.; WANG, Y. Antimicrobial Resistance Analysis of Clinical *Escherichia coli* Isolates in Neonatal Ward. **Front. Pediatr.** v. 9, p. 670470, 2021.

YADAV, M. K. Role of Biofilms in Environment Pollution and Control. In: PATRA, J., VISHNUPRASAD, C., DAS, G. (eds) **Microbial Biotechnology**. Springer, Singapore, 377-398, 2017.

YANG, X. C.; NIU, Y. L.; ZHAO, N. N.; MAO, C.; XU, F. J. A biocleavable pullulan-based vector via ATRP for liver cell-targeting gene delivery. **Biomaterials**, v. 35, p. 3873–3884, 2017.

Yan, J.; Bassler, B. L. Surviving as a community: antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms. **Cell Host Microbe**, v. 26, 15–21, 2019.

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, 2018.

YING, N. X.; WAI, F. K.; VOON, K. L *et al.* Ruthenium(II) polypyridyl complexes as emerging photosensitisers for antibacterial photodynamic therapy, **J. Inorg. Biochem.** 2023.

YOON, H. J.; JANG, W. D. Nanotechnology-based photodynamic therapy. **J. Porphyr. Phthalocyanines**, v. 17, n. 1–2, p. 16–26, 2013.

YOUF, R.; GHANEM, R.; NASIR, A.; LEMERCIER, G.; MONTIER, T.; LE GALL, T. Impact of mucus and biofilm on antimicrobial photodynamic therapy: Evaluation using Ruthenium(II) complexes. **Biofilm**, v. 5, p. 100113, 2023.

YOUF, R.; NASIR, A.; MÜLLER, M.; THÉTIOT, F.; HAUTE, T.; GHANEM, R.; JONAS, U.; SCHÖNHERR, H.; LEMERCIER, G.; MONTIER, T *et al.* Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes for Antimicrobial Photodynamic Therapy: Prospects for Application in Cystic Fibrosis Lung Airways. **Pharmaceutics**, v. 14, p. 1664, 2022.

ZARKAN, A.; LIU, J.; MATUSZEWSKA, M.; GAIMSTER, H.; SUMMERS, D. K. Local and universal action: the paradoxes of indole signalling in bacteria. **Trends Microbiol.** v. 28, p. 566–577, 2020.

ZENG, L.; GUPTA, P.; CHEN, Y.; WANG, E.; J. I. L.; CHAO, H. The development of anticancer ruthenium(ii) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials. **Chem. Soc. Rev.** v. 46, p. 5771–5804, 2017.

ZHANG, P.; HUANG, W.; WANG, Y.; LI, H.; LIANG, C.; HE, C.; WANG, H.; ZHANG, Q. Isomeric ruthenium(II) complexes for cancer therapy and cellular imaging. **Inorg. Chim. Acta**, v. 469, p. 593-599, 2018.

ZHU, Y. G.; PENUELAS, J. Changes in the environmental microbiome in the anthropocene. **Global Change Biology** v. 26, p. 3175-3177, 2020.

ZHU, Y. G.; ZHAO, Y.; ZHU, D.; GILLINGS, M.; PENUELAS, J.; OK, Y. S *et al.* Soil biota, antimicrobial resistance and planetary health. **Environ. Int.** v. 131, p. 1-7, 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE A – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS A2 (CBIII)



An Acad Bras Cienc (2023) 95(Suppl. 2): e20220619 DOI 10.1590/0001-3765202320220619
Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annals of the Brazilian Academy of Sciences
Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690
www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Purification, biochemical characterization of a lectin from marine sponge *Ircinia strobilina* and its effect on the inhibition of bacterial biofilms

ALEXANDRA S. DE ALMEIDA, DAYARA N.M. MENDONÇA, RÔMULO F. CARNEIRO, ULISSES PINHEIRO, ELIELTON FRANCISCO DO NASCIMENTO, ALEXANDRE L. ANDRADE, MAYRON A. DE VASCONCELOS, EDSON H. TEIXEIRA, CELSO S. NAGANO & ALEXANDRE H. SAMPAIO

Abstract: A new lectin from marine sponge *Ircinia strobilina*, denominated ISL, was isolated by combination of affinity chromatography in Guar gum matrix followed by size exclusion chromatography. ISL was able to agglutinate native and enzymatically treated rabbit erythrocytes, being inhibited by galactosides, such as α -methyl-D-galactopyranoside, β -methyl-D-galactopyranoside and α -lactose. ISL hemagglutinating activity was stable at neutral to alkaline pH, however the lectin loses its activity at 40° C. The molecular mass determined by mass spectrometry was 13.655 \pm 5 Da. Approximately 40% of the primary structure of ISL was determined by mass spectrometry, but no similarity was observed with any protein. The secondary structure of ISL consists of 28% α -helix, 26% β -sheet, and 46% random region, as determined by circular dichroism. ISL was a calcium-dependent lectin, but no significant variations were observed by circular dichroism when ISL was incubated in presence of calcium and EDTA. ISL was not toxic against *Artemia* nauplii and did not have antimicrobial activity against bacterial cells. However, the ISL was able to significantly inhibit the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*.

APÊNDICE B – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS B1 (CBIII)

Current Microbiology (2023) 80:325
<https://doi.org/10.1007/s00284-023-03445-3>



Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Synthetic Peptide [W7]KR12-KAEK Against *Enterococcus faecalis* Strains

Mayron Alves Vasconcelos^{1,2,3} · Bruno Rocha da Silva^{1,4} · Alexandre Lopes Andrade¹ · Aryane de Azevedo Pinheiro¹ · Francisco Flávio Vasconcelos Evaristo⁵ · Francisco Vassiliepe Sousa Arruda^{1,5} · Esteban Nicolás Lorenzón⁶ · Eduardo Maffud Cilli⁷ · Edson Holanda Teixeira¹

Received: 12 March 2023 / Accepted: 7 August 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

Abstract

The emergence of infections caused by microorganisms in the oral cavity and increasing concerns regarding the use of antibiotics have resulted in the development of novel antimicrobial molecules, such as antimicrobial synthetic peptides. The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activities of the native peptide KR-12 and its derivative, the synthetic peptide [W7]KR12-KAEK, against planktonic and biofilms *Enterococcus faecalis* strains. The methods used to evaluate the antimicrobial activity in planktonic cultures include minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration assays. The effects of [W7]KR12-KAEK on biofilm formation and mature biofilms were evaluated by quantifying biomass (crystal violet staining) and counting colony-forming units. Structural assessments of the biofilms and cellular morphological changes were performed using scanning electron microscopy. Peptide [W7]KR12-KAEK showed potential antimicrobial activity against planktonic cells. Interestingly, the native peptide KR-12 showed no antimicrobial activity. Moreover, it inhibited biofilm formation and disrupted the mature biofilms of *E. faecalis* strains. These results suggest that [W7]KR12-KAEK may be a potential molecule for the development of auxiliary antimicrobial therapies against oral infections.

APÊNDICE C – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS A2 (CBIII)

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Structural characterization of a galectin from the marine sponge *Aplysina lactuca* (ALL) with synergistic effects when associated with antibiotics against bacteria

Jéssica de Assis Duarte ^a, José Eduardo de Oliveira Neto ^a, Renato César Farias Torres ^a, Andressa Rocha de Oliveira Sousa ^a, **Alexandre Lopes Andrade** ^b, Renata Pinheiro Chaves ^a, Rômulo Farias Carneiro ^a, Mayron Alves de Vasconcelos ^{b, c, d}, Claudener Souza Teixeira ^e, Edson Holanda Teixeira ^b, Celso Shiniti Nagano ^a, Alexandre Holanda Sampaio ^{a, *}

^a Marine Biotechnology Laboratory – BioMar-Lab, Department of Fishing Engineering S/N, Bloco 871, 60440-970, Fortaleza-CE, Brazil

^b Integrated Biomolecules Laboratory - LIBS, Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará S/N, Monsenhor Furtado, 60430-160, Fortaleza, CE, Brazil

^c State University of Minas Gerais, Unidade de Divinópolis, 35501-170, Divinópolis, MG, Brazil

^d Faculdade de Ciências Exatas e Naturais Universidade Do Estado Do Rio Grande Do Norte, 59610-210, Mossoró, RN, Brazil

^e Center for Agricultural Sciences and Biodiversity, Federal University of Cariri, Crato, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 April 2023

Received in revised form

12 June 2023

Accepted 7 July 2023

Available online xxx

Handling editor: O.A. Dontsova

Keywords:

Galectin

Natural products

Antibacterial effect

ABSTRACT

Lectins presents the ability to interact with glycans and trigger varied responses, including the inhibition of the development of various pathogens. Structural studies of these proteins are essential to better understand their functions. In marine sponges, so far only a few lectins have their primary structures completely determined. Thus, the objective of this work was to structurally characterize and evaluate antibacterial potential, in association with different antibiotics, of the lectin isolated from the marine sponge *Aplysina lactuca* (ALL). ALL is a homotetramer of 60 kDa formed by four 15 kDa-subunits. The lectin showed affinity only for the glycoproteins fetuin, asialofetuin, mucin type III, and bovine sub-maxillary mucin type I. The complete amino acid sequences of two isoforms of ALL, named ALL-a and ALL-b, were determined by a combination of Edman degradation and overlapped peptides sequenced by tandem mass spectrometry. ALL-a and ALL-b have 144 amino acids with molecular masses of 15,736 Da and 15,985 Da, respectively. Both structures contain conserved residues typical of the galectin family. ALL is a protein with antibacterial potential, when in association with ampicillin and oxacillin the lectin

APÊNDICE D – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS A2 (CBIII)

Biochimie 214 (2023) 61–76



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi



Structural study and antimicrobial and wound healing effects of lectin from *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W.Gabrielson



Renata Pinheiro Chaves ^a, Ana Kátia Barbosa dos Santos ^a, Alexandre Lopes Andrade ^b,
 Aryane de Azevedo Pinheiro ^{b, c}, Juliana Meneses de Sena Silva ^d,
 Francisca Manuela Santos da Silva ^e, Jucilene Pereira de Sousa ^e,
 Ito Liberato Barroso Neto ^{e, f}, Eduardo Henrique Salviano Bezerra ^{e, g}, Jade Oliveira Abreu ^h,
 Fátima Cristiane Teles de Carvalho ^h, Oscarina Viana de Sousa ^h, Bruno Lopes de Sousa ^d,
 Bruno Anderson Matias da Rocha ^e, André Luis Coelho Silva ^e,
 Luiz Gonzaga do Nascimento Neto ^{b, i}, Mayron Alves de Vasconcelos ^{b, j},
 Edson Holanda Teixeira ^b, Rômulo Farias Carneiro ^a, Alexandre Holanda Sampaio ^a,
 Celso Shiniti Nagano ^{a, *}

^a Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Campus do Porangabaçu, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Curso de Medicina, Centro Universitário INTA, UNINTA, Itapipoca, CE, Brazil

^d Faculdade de Filosofia Dom Aureliano Matos, Universidade Estadual do Ceará, Limoeiro do Norte, CE, Brazil

^e Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, Brazil

^f Curso de Medicina, Centro Universitário Unichristus, Fortaleza, Ceará, Brazil

^g Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Cidade Universitária, Campinas, São Paulo, Brazil

^h Instituto de Ciências do Mar – Labomar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

ⁱ Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Acaraú, Acaraú, CE, Brazil

^j Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade de Divinópolis, Divinópolis, MG, Brazil

APÊNDICE E – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS A2 (CBIII)



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm



Antibacterial and antifungal action of CTAB-containing silica nanoparticles against human pathogens

Pedro Martins da Silva Filho^{a,b,1,*}, Pedro Higor Rocha Mariano^{a,1}, Alexandre Lopes Andrade^c,
 Jessica Barros Arrais Cruz Lopes^c, Aryane de Azevedo Pinheiro^c,
 Mayara Itala Geronimo de Azevedo^d, Suelen Carneiro de Medeiros^d,
 Mayron Alves de Vasconcelos^{c,e,f}, Said Gonçalvez da Cruz Fonseca^g,
 Thalles Barbosa Grangeiro^d, Luiz Gonzaga de França Lopes^b, Eduardo Henrique Silva Sousa^{b,*},
 Edson Holanda Teixeira^c, Elisane Longhinotti^{a,*}

^a Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará 60440-900 Fortaleza, CE, Brazil

^b Laboratório de Bioinorgânica, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, PO Box 12200, Campus do Pici s/n, 60440-900 Fortaleza, CE, Brazil

^c Laboratório Integrado de Biomoléculas, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, CEP 60430-270, Fortaleza, CE, Brazil

^d Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici s/n, 60440-900 Fortaleza, CE, Brazil

^e Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Exatas e Naturais, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, 59610-090 Mossoró, RN, Brazil

^f Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade de Divinópolis, 35501-170 Divinópolis, MG, Brazil

^g Laboratório de farmacotécnica, Rua Pastor Samuel Munguba, 1210 - Rodolfo Teófilo, 60430-372 Fortaleza, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Nanoparticles
 Silica
 Surfactant
 Cetyltrimethylammonium bromide
 Antimicrobial
 Synergistic action

ABSTRACT

New antibiotic agents are urgently needed worldwide to combat the increasing tolerance and resistance of pathogenic fungi and bacteria to current antimicrobials. Here, we looked at the antibacterial and antifungal effects of minor quantities of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), ca. 93.8 mg g⁻¹, on silica nanoparticles (MPSi-CTAB). Our results show that MPSi-CTAB exhibits antimicrobial activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain (*S. aureus* ATCC 700698) with MIC and MBC of 0.625 mg mL⁻¹ and 1.25 mg mL⁻¹, respectively. Additionally, for *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, MPSi-CTAB reduces MIC and MBC by 99.99% of viable cells on the biofilm. Furthermore, when combined with ampicillin or tetracycline, MPSi-

APÊNDICE F – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS A2 (CBIII)



An Acad Bras Cienc (2023) 95(1): e20220379 DOI 10.1590/0001-3765202320220379
 Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annals of the Brazilian Academy of Sciences
 Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690
 www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

New lectin isolated from the tropical sponge *Haliclona (Reniera) implexiformis* (Hechtel, 1965) shows antibiofilm effect

FRANCISCO R.N. ANDRADE, PEDRO A.S. TABOSA, RENATO C.F. TORRES, RÔMULO F. CARNEIRO, MAYRON A. VASCONCELOS, ALEXANDRE L. ANDRADE, ELIELTON NASCIMENTO, ULISSES PINHEIRO, EDSON H. TEIXEIRA, CELSO S. NAGANO & ALEXANDRE H. SAMPAIO

Abstract: A lectin from the marine sponge *Haliclona (Reniera) implexiformis* (HiL) was isolated by affinity chromatography on Sepharose™ matrix. HiL showed specificity for galactose and its derivatives. The glycoproteins porcine stomach mucin (PSM) and bovine stomach mucin (BSM) were potent inhibitors. Hemagglutinating activity of the lectin was maximal between pH 5.0 and 9.0. The lectin remained active until 60°C. The presence of CaCl₂ and EDTA did not affect the hemagglutinating activity. In SDS-PAGE, HiL showed a single band of 20 kDa under reduced conditions, whereas in the non-reducing conditions, it showed a band of 20 kDa and one additional band of 36 kDa. The average molecular mass determined by Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) was 35.874 ± 2 Da in native and non-reducing conditions, whereas carboxyamidomethylated-lectin showed 18,111 Da. These data indicated that HiL consists in a dimer formed by identical subunits linked by disulfide bonds. Partial amino acid sequence of HiL was determined by mass spectrometry, and revealed that it is a new type of lectin, which

APÊNDICE G – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS A4 (CBIII)

doi.org/10.1002/cbdv.202200777

RESEARCH ARTICLE



Chemical Composition Determination and Evaluation of the Antimicrobial Activity of Essential Oil from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) against Clinically Relevant Bacteria

Aluska Kelly A. Nunes,^a Ellen Araújo Malveira,^b Alexandre Lopes Andrade,^c
Wildson Max Barbosa da Silva,^d Selene Maia de Moraes,^d Hécio Silva dos Santos,^{c, e}
Cynthia Cavalcanti de Albuquerque,^a Edson Holanda Teixeira,^c
Diego Nathan do Nascimento Souza,^a and Mayron Alves de Vasconcelos^{*a, f}

^a Faculdade de Ciências Exatas e Naturais, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, RN, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^c Laboratório Integrado de Biomoléculas, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^d Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciência e Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Fortaleza, CE, Brasil

^e Universidade Estadual do Vale do Acaraú, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Sobral, CE, Brazil

^f Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade de Divinópolis, Divinópolis, MG, Brazil,
e-mail: mayronvasconcelos@gmail.com

In this study, the chemical composition of the essential oil (EO) extracted from *Croton blanchetianus* Baill leaves was identified, and antimicrobial and antibiofilm activities against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Escherichia coli* strains were determined. Moreover, the effects of EO in combination with ampicillin and tetracycline were investigated. Thirty-four components, mainly mono- and sesquiterpenes that

APÊNDICE H – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS B1 (CBII)

Current Microbiology (2023) 80:176
<https://doi.org/10.1007/s00284-023-03284-2>



Antimicrobial, Antibiofilm Activities and Synergic Effect of Triterpene 3 β ,6 β ,16 β -trihydroxyilup-20(29)-ene Isolated from *Combretum leprosum* Leaves Against *Staphylococcus* Strains

Edson Holanda Teixeira¹ · Alexandre Lopes Andrade¹ · Rafael Pereira¹ · Livia Pontes Farias¹ · Gabrieli Sobral Monteiro¹ · Marcia Machado Marinho⁴ · Emmanuel Silva Marinho⁵ · Hécio Silva Santos⁶ · Mayron Alves de Vasconcelos^{1,2,3}

Received: 13 July 2022 / Accepted: 23 March 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

Abstract

Antimicrobial resistance is a natural phenomenon and is becoming a huge global public health problem, since some microorganisms not respond to the treatment of several classes of antibiotics. The objective of the present study was to evaluate the antibacterial, antibiofilm, and synergistic effect of triterpene 3 β ,6 β ,16 β -trihydroxyilup-20(29)-ene (CLF1) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. Bacterial susceptibility to CLF1 was evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) assay. In addition, the effect combined with antibiotics (ampicillin and tetracycline) was verified by the checkerboard method. The biofilms susceptibility was assessed by enumeration of colony-forming units (CFUs) and quantification of total biomass by crystal violet staining. The compound showed bacteriostatic and bactericidal activity against all *Staphylococcal* strains tested. The synergistic effect with ampicillin was observed only for *S. epidermidis* strains. Moreover, CLF1 significantly inhibited the biofilm formation and disrupted preformed biofilm of the all strains. Scanning electron microscopy (SEM) images showed changes in the cell morphology and structure of *S. aureus* ATCC 700698 biofilms (a methicillin-resistant *S. aureus* strain). Molecular docking simulations showed that CLF1 has a more favorable interaction energy than the antibiotic ampicillin on penicillin-binding protein (PBP) 2a of MRSA, coupled in different regions of the protein. Based on the results obtained, CLF1 proved to be a promising antimicrobial compound against *Staphylococcus* biofilms.

APÊNDICE I – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS B1 (CBIII)

Current Microbiology (2023) 80:133
<https://doi.org/10.1007/s00284-023-03232-0>



Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Copper-Based Metallic Compounds Against Bacteria Related with Healthcare-Associated Infections

Anna L. Pereira¹ · Mayron A. Vasconcelos^{1,2,3} · Alexandre L. Andrade¹ · Israel M. Martins¹ · Alda K. M. Holanda⁴ · Ana C. S. Gondim⁴ · Dayana P. S. Penha⁵ · Katherine L. Bruno⁵ · Francisco O. N. Silva⁵ · Edson H. Teixeira¹

Received: 23 April 2022 / Accepted: 15 February 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

Abstract

Health care-associated infections (HAIs) contribute to a significant rate of morbidity, mortality, and financial burden on health systems. These infections are caused by multidrug-resistant bacteria that produce biofilm as the main virulence factor. This study aimed to evaluate the effect of the copper-based metallic compounds [Cu(phen)(pz)NO₂]Cl (I), [Cu(bpy)(pz)(NO₂)]Cl (II), and [Cu(phen)(INA)NO₂]Cl (III), where phen = phenanthroline, bpy = bipyridine, pz = pyrazinamide, and INA = isonicotinic acid, against planktonic cells and biofilms formation of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Escherichia coli*. The susceptibility of the microorganisms was evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bacterial concentration (MBC), and time-kill curve assay on planktonic cells. The biofilm formation was evaluated by biomass quantification through staining with crystal violet (CV), colony-forming units (CFUs) quantification, and biofilm metabolic activity determination by XTT assay. The compounds showed bacteriostatic and bactericidal activity on all microorganisms analyzed. Regarding the antibiofilm activity, all metallic compounds were able to reduce significantly the biofilm biomass, colony-forming units, and the metabolic activity of remaining cells, varying the efficient concentration according to the strain analyzed. Interestingly, compounds (I), (II) and (III) did not exhibit DNA degradation activity even with up to 100 µM of these metal complexes. On the other hand, complexes (I) and (III) showed a remarkable capacity to cleave DNA upon addition of glutathione, a reducing agent (Cu^{II}/Cu^I) that leads to reactive oxygen species (ROS) formation. The results presented in this study showed promising antimicrobial and antibiofilm effects.

APÊNDICE J – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS A1 (CBIII)



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Fish and Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi



Full length article

A fibrinogen-related Lectin from *Echinometra lucunter* represents a new FReP family in Echinodermata phylum



Philippe Lima Duarte^a, Francisco Regivânio Nascimento Andrade^a,
Andressa Rocha de Oliveira Sousa^a, Alexandre Lopes Andrade^b,
Mayron Alves de Vasconcelos^{b,c}, Edson Holanda Teixeira^b, Celso Shiniti Nagano^a,
Alexandre Holanda Sampaio^a, Rômulo Farias Carneiro^{a,*}

^a 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, Brasil

^b Laboratório Integrado de Biomoléculas - LIBS, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Monsenhor Furtado, s/n, 60430-160, Fortaleza, Ceará, Brasil

^c Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais – LABQUIMP, Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade Divinópolis, 35501-170, Divinópolis, Minas Gerais, Brasil

ARTICLE INFO

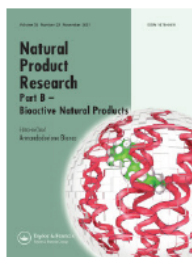
Keywords:

Lectin
Fibrinogen-related protein
Intelectin
Sea urchin
FReD
Antibacterial activity

ABSTRACT

Fibrinogen-related proteins (FREPs) have been identified in several animals. They are involved in the body's defense, acting as mediators of phagocytosis. Ficolins and intelectins are some of the most studied Fibrinogen-related Domain (FReD)-containing lectins. In this work, we have isolated a singular FReD-containing lectin, which cannot be classified as ficolin or intelectin. ELL (*Echinometra lucunter* lectin) was isolated from coelomic plasma by affinity chromatography on xanthan gum. Primary structure was determined by tandem mass spectrometry. Moreover, antimicrobial activity of ELL was evaluated against planktonic cells and biofilm of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*. ELL showed hemagglutinating activity in Ca²⁺ presence, which was inhibited by glycoprotein mucin and thyroglobulin. Complete amino acid sequence consisted of 229 residues, including a FReD in the N-terminal. Searches for similarity found that ELL was very close to putative proteins from *Strongylocentrotus purpuratus*. ELL showed moderate similarity with uncharacterized sea stars proteins and protochordate intelectins. ELL was able to inhibit the planktonic growth of the Gram-positive bacteria and significantly reduce the biofilm formation of all bacteria tested. In conclusion, we identified a new type of FReP-containing lectin with some structural and functional conservation towards intelectins.

APÊNDICE K – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS A3 (CBIII)



Natural Product Research
Formerly Natural Product Letters



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

Wound healing activity of lectin isolated from seeds of *Centrolobium microchaete* Mart. ex Benth. on cutaneous wounds in mice

Luiz Gonzaga do Nascimento Neto, Mayron Alves de Vasconcelos, Aryane de Azevedo Pinheiro, Ana Patrícia Magalhães Ramos, Renally Barbosa da Silva, Alexandre Lopes Andrade, Francisco Vassiliepe Sousa Arruda, José Ajax Nogueira Queiroz & Edson Holanda Teixeira

To cite this article: Luiz Gonzaga do Nascimento Neto, Mayron Alves de Vasconcelos, Aryane de Azevedo Pinheiro, Ana Patrícia Magalhães Ramos, Renally Barbosa da Silva, Alexandre Lopes Andrade, Francisco Vassiliepe Sousa Arruda, José Ajax Nogueira Queiroz & Edson Holanda Teixeira (2021): Wound healing activity of lectin isolated from seeds of *Centrolobium microchaete* Mart. ex Benth. on cutaneous wounds in mice, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2021.2005053](https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2005053)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2005053>

APÊNDICE L – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS A3 (CBIII)



Natural Product Research
Formerly Natural Product Letters



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

Chemical composition determination and evaluation of the antibacterial activity of essential oils from *Ruellia asperula* (Mart. Ex Ness) Lindau and *Ruellia paniculata* L. against oral streptococci

Ariana Azevedo Vasconcelos, Idia Nara de Sousa Veras, Mayron Alves de Vasconcelos, Alexandre Lopes Andrade, Hécio Silva dos Santos, Paulo Nogueira Bandeira, Elnatan Bezerra de Souza, Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque & Edson Holanda Teixeira

To cite this article: Ariana Azevedo Vasconcelos, Idia Nara de Sousa Veras, Mayron Alves de Vasconcelos, Alexandre Lopes Andrade, Hécio Silva dos Santos, Paulo Nogueira Bandeira, Elnatan Bezerra de Souza, Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque & Edson Holanda Teixeira (2021): Chemical composition determination and evaluation of the antibacterial activity of essential oils from *Ruellia asperula* (Mart. Ex Ness) Lindau and *Ruellia paniculata* L. against oral streptococci, *Natural Product Research*, DOI: [10.1080/14786419.2021.1960521](https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1960521)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1960521>

APÊNDICE M – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS A1 (CBIII)



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm



The biofilm inhibition activity of a NO donor nanosilica with enhanced antibiotics action

Pedro Martins da Silva Filho^{a,b}, Alexandre Lopes Andrade^c, Jessica Barros Arrais Cruz Lopes^c, Aryane de Azevedo Pinheiro^c, Mayron Alves de Vasconcelos^{c,d,e}, Said Gonçalves da Cruz Fonseca^f, Luiz Gonzaga de França Lopes^b, Eduardo Henrique Silva Sousa^{b,*}, Edson Holanda Teixeira^{c,*}, Elisane Longhinotti^{a,*}

^a Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE 60440-900, Brazil

^b Laboratório de Bioinorgânica, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, PO Box 12200, Campus do Pici s/n, Fortaleza, CE 60440-900, Brazil

^c Laboratório Integrado de Biomoléculas, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, CEP, Fortaleza, CE 60430-270, Brazil

^d Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Exatas e Naturais, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, RN 59610-090, Brazil

^e Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade de Divinópolis, Divinópolis, MG 35501-170, Brazil

^f Laboratório de Farmacotécnica, Rua Pastor Samuel Munguba, 1210 - Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE 60430-372, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Nitroprusside
Silica nanoparticles
Resistance
Biofilm
Antibiotics

ABSTRACT


Nitric oxide (NO) has emerged as a promising antibacterial agent, where NO donor compounds have been explored. Here, we investigated the role of a silica nanoparticle containing nitroprusside (MP*Si*-NP) as a NO donor agent against methicillin-sensitive (ATCC 25,923 and ATCC 12228) and methicillin-resistant (ATCC 700,698 and ATCC 35984) *Staphylococcus* strains. Biofilm inhibition was studied along with antibiotic activity in combination with standard antibiotics (ampicillin and tetracycline). MP*Si*-NP exhibited thermal release of 63% of NO within 24 h, while free nitroprusside released only 18% during a dialysis assay, indicating an assisted release of NO mediated by the nanoparticles. This nanomaterial showed only a moderate activity in blocking biofilm production, but exhibited a significant decrease in the number of viable bacterial cells (over 600-fold for *Staphylococcus aureus* ATCC 700,698 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984). Remarkably, even using MP*Si*-NP at concentrations below any antibacterial action, its combination with ampicillin promoted a significant decrease in MIC for resistant strains of *S. aureus* ATCC 700,698 (2-fold) and *S. epidermidis* ATCC 35,984 (4-fold). A carbopol-based gel formulation with MP*Si*-NP (0.5% w/w) was prepared and showed a zone of inhibition of 7.7 ± 0.6 mm for *S. epidermidis* ATCC 35984. Topical use of MP*Si*-NP in combination with antibiotics might be a

APÊNDICE N – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS B1 (CBIII)

Current Microbiology (2021) 78:1926–1938
<https://doi.org/10.1007/s00284-021-02449-1>



Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Potential of Essential Oil from *Croton piauhiensis* Müll. Arg.

Jean Parcelli Costa do Vale^{1,2,9} · Mayron Alves Vasconcelos^{1,3,4} · Francisco Vassiliepe Sousa Arruda^{1,5} · Nairley Cardoso Sá Firmino^{1,5} · Anna Luísa Pereira¹ · Alexandre Lopes Andrade¹ · Silvana Saker-Sampaio⁶ · Alexandre Holanda Sampaio⁷ · Emmanuel Silva Marinho¹⁰ · Alexandre Magno Rodrigues Teixeira⁸ · Márcia Machado Marinho¹¹ · Tigressa Helena Soares Rodrigues² · Edson Holanda Teixeira¹ · Hécio Silva dos Santos^{1,2,9} 

Received: 24 October 2020 / Accepted: 10 March 2021 / Published online: 29 March 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

A large number of infections are caused by Gram-positive and Gram-negative multi-resistant bacteria worldwide, adding up to a figure of around 700,000 deaths per year. The indiscriminate uses of antibiotics, as well as their misuse, resulted in the selection of bacteria resistant to known antibiotics, for which it has little or no treatment. In this way, the strategies to combat the resistance of microorganisms are extremely important and, essential oils of *Croton* species have been extensively studied for this purpose. The aim of this study was to carry the evaluation of antibacterial, antibiofilm, antioxidant activities, and spectroscopic investigation of essential oil from *Croton piauhiensis* (EOCp). The EOCp exhibited antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria with required MICs ranging from 0.15 to 5% (v/v). In addition, the MBC of the EOCp for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and ATCC 700698, were 0.15 and 1.25%, respectively. Moreover, the EOCp significantly reduced significantly the biofilm production and the number of viable cells from the biofilm of all bacterial strains tested. The antioxidant potential of the EOCp showed EC₅₀ values ranging from 171.21 to 4623.83 µg/mL. The EOCp caused hemolysis (>45%) at the higher concentrations tested (1.25 to 5%), and minor hemolysis (17.6%) at a concentration of 0.07%. In addition, docking studies indicated D-limonene as a phytochemical with potential for antimicrobial activity. This study indicated that the EOCp may be a potential agent against infections caused by bacterial biofilms, and act as a protective agent against ROS and oxidative stress.

APÊNDICE O – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS A1 (CBIII)**Biofouling**

The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research

ISSN: 0892-7014 (Print) 1029-2454 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gbif20>**Antimicrobial activity and antibiotic synergy of a biphosphinic ruthenium complex against clinically relevant bacteria**

Alexandre Lopes Andrade, Mayron Alves de Vasconcelos, Francisco Vassiliepe de Sousa Arruda, Luiz Gonzaga do Nascimento Neto, José Marcos da Silveira Carvalho, Ana Claudia Silva Gondim, Luiz Gonzaga de França Lopes, Eduardo Henrique Silva Sousa & Edson Holanda Teixeira

To cite this article: Alexandre Lopes Andrade, Mayron Alves de Vasconcelos, Francisco Vassiliepe de Sousa Arruda, Luiz Gonzaga do Nascimento Neto, José Marcos da Silveira Carvalho, Ana Claudia Silva Gondim, Luiz Gonzaga de França Lopes, Eduardo Henrique Silva Sousa & Edson Holanda Teixeira (2020): Antimicrobial activity and antibiotic synergy of a biphosphinic ruthenium complex against clinically relevant bacteria, *Biofouling*, DOI: [10.1080/08927014.2020.1771317](https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1771317)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1771317>

APÊNDICE P – PUBLICAÇÃO EM REVISTA QUALIS A1 (CBIII)

INORGANIC CHEMISTRY
FRONTIERS



RESEARCH ARTICLE

[View Article Online](#)
[View Journal](#)



Cite this: DOI: 10.1039/c9qi01172b

Light-induced disruption of an acyl hydrazone link as a novel strategy for drug release and activation: isoniazid as a proof-of-concept case†

Edinaira Deodato Nunes,^a Anne Drumond Villela,^{b,c} Luiz Augusto Basso,^{id b,c}
Edson H. Teixeira,^{id d} Alexandre L. Andrade,^d Mayron A. Vasconcelos,^{d,e}
Luiz G. do Nascimento Neto,^{d,f} Ana C. S. Gondim,^{id a} Izaura C. N. Diógenes,^{id a}
Adolfo I. B. Romo,^{id a} Otaciro R. Nascimento,^{id g} Davila Zampieri,^{id h}
Tércio Freitas Paulo,^{id a} Idalina Maria Moreira de Carvalho,^{id a}
Luiz Gonzaga de França Lopes^{id a,b} and Eduardo H. S. Sousa^{id *a,b}

Aldehydes and acyl hydrazines have been employed in a conjugation reaction that produces an acyl hydrazone bridge. A drawback to this linkage is hydrolysis, which prevents its broader use in a controllable manner. We have developed a new strategy for the cleavage of this group using a ruthenium(II) metal complex as a photogenerator of singlet oxygen. Isoniazid, an anti-tuberculosis prodrug, was chosen as a proof-of-concept compound; in this case it was coupled to an aldehyde-derivative trisbipyridine ruthenium(II) metal complex. Studies carried out using HPLC, MS, EPR, fluorescence and UV-vis showed that light could efficiently disrupt the acyl hydrazone linkage with the production of an isonicotinoyl radical. In addition, biological studies showed that bacterial strains and cancer cells became susceptible upon light irradiation. These results support a novel strategy of photoactivation based on a ruthenium metal complex conjugated to a pro-drug through an acyl hydrazone linkage, opening a broad range of applications.

Received 12th September 2019,
Accepted 15th November 2019

DOI: 10.1039/c9qi01172b

rsc.li/frontiers-inorganic