

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ALTERAÇÕES  
ULTRAESTRUTURAIS PROMOVIDAS POR COMPOSTOS DE  
COORDENAÇÃO EM *Staphylococcus aureus* E *Pseudomonas*  
*aeruginosa*

**ESTÉFANY BRAZ TOLEDO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO/2017



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ALTERAÇÕES  
ULTRAESTRUTURAIS PROMOVIDAS POR COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO  
EM *Staphylococcus aureus* E *Pseudomonas aeruginosa*

**ESTÉFANY BRAZ TOLEDO**

“Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como requisito parcial das exigências para a  
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia  
e Biotecnologia.”

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO/2017

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ALTERAÇÕES  
ULTRAESTRUTURAIS PROMOVIDAS POR COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO  
EM *Staphylococcus aureus* E *Pseudomonas aeruginosa*

**ESTÉFANY BRAZ TOLEDO**

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Biotecnologia.”

Aprovada em 31 de março de 2017.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Alessandro Coutinho Ramos (Dr. em Produção Vegetal) - UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré (Dr<sup>a</sup>. em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - UFRJ

---

Prof. Olney Vieira da Motta (Dr. em Biociências e Biotecnologia) - UENF

---

Prof. João Carlos de Aquino Almeida (Dr. em Biociências e Biotecnologia) - UENF  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter chegado até aqui, pelas conquistas e obstáculos, sorrisos e lágrimas. Estes me moldaram e fizeram de mim o que sou hoje;

Aos meus pais, Edna e Carlos, e a minha irmã, Gabrielle, que me apoiaram e me incentivaram a sempre continuar em frente;

Ao David William, meu noivo e companheiro de jornada. Gratidão pelo incentivo, pelo apoio e pela paciência. Por aguentar meus períodos de estresse e choro e, principalmente, por fazer parte das minhas conquistas;

À amiga e irmã Valquíria Oliveira, pelos conselhos, boas risadas e incentivo;

Ao prof. João Almeida, meu orientador, pela amizade, pela orientação, pelos conselhos, pela paciência e todos os ensinamentos desde meu ensino médio;

À prof<sup>a</sup>. Christiane Fernandes, ao prof. Olney Vieira, à Solange e à Luciana pela colaboração, atenção e conselhos;

Ao prof. Flavio Costa Miguens, Amanda e Marta, por toda dedicação, ajuda, conselhos e paciência;

Às colegas Paula, Noemi, Laura, Luana e Evellinne pelas boas risadas e força nos momentos difíceis. O apoio de vocês tornou esse período mais leve e feliz;

Ao prof. André pela atenção e disponibilidade para revisar este trabalho;

Aos demais membros do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, Laboratório de Sanidade Animal e Laboratório de Biologia Celular e Tecidual pelo convívio agradável e troca de experiências;

À UENF e ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, pela estrutura, pela concessão da bolsa e pela oportunidade de realizar esse curso;

Ao CNPq, CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	viii
Lista de Figuras e Tabelas.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Resistência Bacteriana.....	1
1.1.1 <i>Biofilme bacteriano</i> .....	3
1.1.2 <i>Parede celular e membrana celular bacteriana</i> .....	6
1.1.3 <i>Alterações intracelulares</i> .....	9
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	10
1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	13
1.4. Compostos de Coordenação.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Materiais Biológicos.....	19
3.2. Compostos Sintéticos.....	19
3.3. Cultura de Microrganismos.....	20
3.4. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC).....	20
3.5. Viabilidade Bacteriana após Ensaio de MIC.....	21
3.6. Ensaio de Inibição da Produção de Biofilme.....	22
3.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	23
3.8. Ensaio de Toxicidade dos Compostos sobre Nematóide de Vida Livre <i>Panagrellus redivivus</i> .....	23
3.9. Análise Estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Concentração Mínima Inibitória.....	25
4.2. Viabilidade Celular Bacteriana.....	30
4.3. Inibição da Produção de Biofilme.....	32

4.4. Alterações Ultraestruturais .....	34
4.5. Análise da Toxicidade dos Compostos de Coordenação .....	38
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45
8. ANEXOS.....	53

## RESUMO

A resistência aos fármacos tradicionais que vem sendo apresentada por diversos microrganismos é um crescente problema de saúde pública. Para atacar esta ameaça em curto prazo, estratégias vêm sendo focadas na busca de novos agentes antibacterianos com amplo espectro de atuação, baixa toxicidade e com atividade sobre microrganismos multirresistentes. Entre as espécies de microrganismos de maior interesse médico encontram-se o *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa*, frequentemente relacionados com diversas infecções tanto em seres humanos quanto em animais. Ambas apresentam cepas altamente resistentes aos fármacos tradicionais. Novos compostos de coordenação têm sido sintetizados visando à obtenção de novos fármacos com atividade antibacteriana, como uma alternativa eficiente e de baixo custo. O presente estudo teve como objetivo a avaliação da inibição do crescimento, produção de biofilme e alterações ultraestruturais das bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* tratadas com compostos de coordenação de zinco e ferro. Adicionalmente, ensaios com o nematoide de vida livre *Panagrellus redivivus* foram realizados para avaliação da toxicidade destes compostos. A partir dos experimentos realizados foi possível observar que dos seis compostos testados apenas dois, ZnO<sub>2</sub> e FeO<sub>2</sub>, possuíam atividade antibacteriana significativa. Estes foram capazes de diminuir a produção de biofilme bacteriano e provocaram alterações na parede celular, divisão celular e provável condensação na cromatina. Além disso, o composto ZnO<sub>2</sub> não demonstrou toxicidade significativa para o nematoide *P. redivivus*, já o composto FeO<sub>2</sub> foi tóxico a partir de 24 h de incubação. Este estudo mostrou que os compostos de coordenação possuem potencial terapêutico, podendo ser futuramente utilizados como antibacterianos alternativos, contribuindo na área da saúde pública.

**Palavras-Chave:** Bactérias, Biofilme, Metalofármacos, Morfologia, Microscopia.

## ABSTRACT

The resistance to traditional drugs that has been presented by several microorganisms is a growing problem of public health. To attack this threat in the short time, strategies have been focused on the search for new antibacterial agents with broad spectrum of performance, low toxicity and activity against multiresistant microorganisms. Among the species of microorganisms of major medical interest are *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, often related to various infections in both humans and animals. Both have highly resistant strains of traditional drugs. New coordination compounds have been synthesized in order to obtain new drugs with antibacterial activity, as an efficient and low cost alternative. The present study aimed to evaluate the growth inhibition, biofilm production and ultrastructural alterations of the *S. aureus* and *P. aeruginosa* bacteria treated with zinc and iron coordination compounds. In addition, assays with the free-living nematode *Panagrellus redivivus* were conducted to assess the toxicity of these compounds. From the experiments performed it was possible to observe that from the six compounds tested only two, ZnO<sub>2</sub> and FeO<sub>2</sub>, had significant antibacterial activity. These were able to decrease the bacterial biofilm production and cause changes in the cell wall, cell division and likely chromatin condensation. Furthermore, the compound ZnO<sub>2</sub> showed no significant toxicity to the nematode *P. redivivus*, since FeO<sub>2</sub> compound was toxic after 24 h of incubation. This study showed that the coordination compounds have therapeutic potential, and may be used as alternative antibacterials in the future, contributing in the area of public health.

**Keywords:** Bacteria, Biofilm, Metal-Drugs, Morphology, Microscopy.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Agr - *Accessory gene regulator*;

ATCC - *American Type Culture Collection*;

BHI - Infusão Cérebro e Coração (do inglês *Brain Heart Infusion*);

CCTA – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias;

CCT – Centro de Ciência e Tecnologia;

CFU – Unidade formadora de colônia (do inglês *Colony Forming Unit*);

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

DO - Densidade óptica;

EPS – Exopolissacarídeo;

LCQUI – Laboratório de Ciências Químicas;

LSA – Laboratório de Sanidade Animal;

MDR - Resistentes a múltiplas drogas (do inglês *multidrug resistance*);

MDRP - Bombas de resistência a múltiplos fármacos (do inglês *multidrug resistance pumps*);

MH - Meio de cultura Mueller Hinton;

MIC - Concentração inibitória mínima (do inglês *minimal inhibitory concentration*);

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*);

MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (do inglês *methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*);

NORa – Bomba de efluxo de norfloxacino;

OMS - Organização Mundial da Saúde;

PBS - Tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffered saline*);

QS - Auto indução (do inglês *quorum sensing*);

ROS - Espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*);

UTI - Unidade de Tratamento Intensivo.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1:** Representação esquemática do desenvolvimento do biofilme retratado em um processo de cinco estágios. Estagio 1: Fixação inicial de bactérias a uma superfície inerte; Estagio 2: Produção de matriz extracelular de EPS; Estagio 3: Proliferação e acumulação de agregados de células em multicamadas. Estagio 4: Formação final da comunidade bacteriana em uma matriz polimérica; Estagio 5: Dispersão das células bacterianas para formação de biofilme (MONROE, 2007). .....4
- Figura 2:** Estrutura da cis-platina (A) e seu análogo, a carboplatina (B) (ALMEIDA *et al.*, 2005). ..... 16
- Tabela 1:** Interpretação da produção de biofilme ..... 23
- Figura 3:** Visualização gráfica do ensaio de microdiluição de onde foi tirada a concentração mínima inibitória dos compostos Fe01 (A), Fe02 (B), Fe03 (C), Zn01 (D), Zn02 (E) e Zn03 (F) sobre *S. aureus* ATCC 25923. \*p < 0,05 .....26
- Figura 4:** Visualização gráfica do ensaio de microdiluição de onde foi tirada a concentração mínima inibitória dos compostos Fe01 (A), Fe02 (B), Fe03 (C), Zn01 (D), Zn02 (E) e Zn03 (F) sobre *S. aureus* MRSA 33591. \*p < 0,05.....27
- Figura 5:** Visualização gráfica do ensaio de microdiluição de onde foi tirada a concentração mínima inibitória dos compostos Fe01 (A), Fe02 (B), Fe03 (C), Zn01 (D), Zn02 (E) e Zn03 (F) sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027. \*p < 0,05.....28
- Figura 6:** Visualização gráfica do ensaio de microdiluição de onde foi tirada a concentração mínima inibitória dos compostos Fe01 (A), Fe02 (B), Fe03 (C), Zn01 (D), Zn02 (E) e Zn03 (F) sobre *P. aeruginosa* ATCC 15442. \*p < 0,05.....29
- Figura 7:** Imagem de placas de Petri contendo colônias de *S. aureus* ATCC 25923 tratada com o composto Fe02 (B), após 20 h de incubação. Abaixo da imagem é mostrado o número de colônias, (-) indica um número excessivo de colônias que impedem a contagem e o asterisco indica significância p < 0,05. ....30
- Figura 8:** Imagem de placas de Petri contendo colônias de *S. aureus* MRSA 33591 tratada com o composto Fe02 (B) e Zn02 (C), após 20 h de incubação. Abaixo da

imagem é mostrado o número de colônias, (-) indica um número excessivo de colônias que impedem a contagem e o asterisco indica significância  $p < 0,05$ . .....30

**Figura 9:** Imagem de placas de Petri contendo colônias de *P. aeruginosa* ATCC 9027 tratada com o composto FeO<sub>2</sub> (B) e ZnO<sub>2</sub> (C), após 20 h de incubação. Abaixo da imagem é mostrado o número de colônias, (-) indica um número excessivo de colônias que impedem a contagem e o asterisco indica significância  $p < 0,05$ . .....31

**Figura 10:** Imagem de placas de Petri contendo colônias de *P. aeruginosa* ATCC 15442 tratada com o composto FeO<sub>2</sub> (B) e ZnO<sub>2</sub> (C), após 20 h de incubação. Abaixo da imagem é mostrado o número de colônias, (-) indica um número excessivo de colônias que impedem a contagem e o asterisco indica significância  $p < 0,05$ . .....31

**Quadro 1:** Densidades ópticas de *S. aureus* ATCC 25923 crescidos na ausência e presença dos compostos de coordenação e determinação da produção de biofilme segundo Stepanovic *et al.* (2007). O asterisco indica significância  $p < 0,05$ . ..... 32

**Quadro 2:** Densidades ópticas de *S. aureus* MRSA 33591 crescidos na ausência e presença dos compostos de coordenação e determinação da produção de biofilme segundo Stepanovic *et al.* (2007). O asterisco indica significância  $p < 0,05$ . ..... 32

**Quadro 3:** Densidades ópticas de *P. aeruginosa* ATCC 9027 crescidos na ausência e presença dos compostos de coordenação e determinação da produção de biofilme segundo Stepanovic *et al.* (2007)..... 33

**Quadro 4:** Densidades ópticas de *P. aeruginosa* ATCC 15442 crescidos na ausência e presença dos compostos de coordenação e determinação da produção de biofilme segundo Stepanovic *et al.* (2007). O asterisco indica significância  $p < 0,05$ . ..... 33

**Figura 11:** Imagens de *S.aureus* ATCC 25923 na ausência (controle) e presença dos compostos de coordenação após 6 h de incubação. Controle, as células apresentaram aspecto regular. A parede (seta vermelha) e a divisão celular (seta branca) também estão normais. FeO<sub>2</sub>, células apresentaram divisão irregular (seta branca) e grânulos eletrondensos no citoplasma (seta amarela), indicando provável

condensação de cromatina. ZnO<sub>2</sub>, células apresentaram alterações na morfologia, parede (seta vermelha) e divisão celular (seta branca).....35

**Figura 12:** Imagens de *P. aeruginosa* ATCC 9027 na ausência (controle) e presença dos compostos de coordenação, após 6 h de incubação. Controle, as células apresentaram morfologia regular, parede celular uniforme (seta vermelha), cromatina com distribuição normal (seta amarela) e divisão celular (seta branca) também normal. FeO<sub>2</sub>, células apresentaram alterações na parede celular (seta vermelha), divisão celular irregular (seta branca) e provável condensação de cromatina (seta amarela). ZnO<sub>2</sub>, as células apresentaram degradação da parede celular (seta vermelha), alteração na divisão celular (seta branca), condensação de cromatina (seta amarela) e esvaziamento pontual do conteúdo citoplasmático (seta azul).....38

**Figura 13:** Visualização gráfica do ensaio de toxicidade para o nematoide de vida livre *P. redivivus*. \*p < 0,05.....37

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Resistência Bacteriana

Considerada um problema de relevância mundial, a resistência bacteriana a certas substâncias antimicrobianas é uma ameaça para o controle de doenças infecciosas em todo o mundo.

O grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu em 1929 com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming. Dez anos mais tarde, esta foi introduzida como agente terapêutico, mostrando-se eficaz para combater as infecções bacterianas (TAVARES, 2001). No entanto, o uso extensivo e sem controle levou ao aparecimento das primeiras cepas bacterianas resistentes a antibióticos penicilínicos. Da mesma forma, os antibióticos lançados no mercado nos anos seguintes, como a meticilina, cefalosporina, estreptomicina, tetraciclina, eritromicina, vancomicina e outros, aos poucos foram se tornando limitados devido ao aparecimento de microrganismos resistentes a múltiplas drogas (MDR, do inglês *multidrug resistance*) (GOODMAN & GILMAN, 2010). Entre estes microrganismos MDR existentes atualmente, os mais resistentes ao tratamento são *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA, do inglês *methicillin-resistant S. aureus*), *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis*. Estas estirpes geralmente contêm determinantes de MDR que conferem um fenótipo de resistência complexo aos antimicrobianos disponíveis comercialmente, representando um grande desafio para as indústrias farmacêuticas e um incentivo para o desenvolvimento de novos fármacos (GOOTZ, 2010; KHAN & KHAN, 2016).

A resistência bacteriana é a capacidade que certas bactérias possuem de resistir ao efeito de um ou mais agentes antimicrobianos. Esta pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é aquela que faz parte da herança genética do microrganismo e é transmitida verticalmente à prole sem a perda da característica fenotípica. O principal determinante deste tipo de resistência é a presença ou ausência do alvo para a ação do fármaco (DEL FILHO *et al.*, 2008). Por sua vez, a resistência adquirida ocorre quando há o aparecimento de resistência em uma

espécie bacteriana anteriormente sensível à droga por transferência horizontal de genes. Isso resulta de alterações estruturais e/ou bioquímicas da célula bacteriana. Estas alterações são determinadas por mutação em genes reguladores ou estruturais, aquisição de genes de resistência veiculados por elementos genéticos transmissíveis (transformação, conjugação ou transdução), ou da combinação entre eles (GOLD *et al.*, 1996; TENOVER, 2006).

O surgimento de cepas bacterianas resistentes é um fenômeno natural regido pelo princípio evolutivo da seleção de adaptações genéticas a mudanças no meio ambiente onde o organismo vive. Dessa forma, se uma população bacteriana infecciosa contendo alguns mutantes resistentes a determinado antibiótico for exposta a este, as bactérias genotipicamente alteradas terão maior vantagem seletiva (WALSH, 2000). O abuso, mau uso e a distribuição dos antibióticos a níveis inferiores ao que é recomendado em manuais terapêuticos, bem como as más condições de higiene, o fluxo contínuo de viajantes, o aumento de pacientes imunocomprometidos e a demora no diagnóstico das infecções bacterianas favorece o aumento da resistência tanto nos hospitais, como na comunidade como um todo (WHO, 2014). Estima-se que a cada ano nos Estados Unidos, pelo menos 2 milhões de pessoas são infectadas com bactérias que são resistentes a antibióticos e pelo menos 23.000 pessoas morrem por ano como resultado direto dessas infecções (CDC, 2015).

Na União Europeia a situação também é alarmante. Estudos mostram que, em apenas três anos, houve uma duplicação da resistência em determinadas bactérias, entre elas a *K. pneumoniae*, na qual a resistência a carbapenêmicos aumentou de 4,6% em 2010 para 8,3% em 2013. As infecções causadas por *K. pneumoniae* resistente passaram a ser tratadas com colistina, atualmente a última linha de defesa contra a mesma. No entanto, em 2013 surgiram os primeiros casos de resistência a colistina, representando uma ameaça grave e um risco maior à segurança do paciente (ECDC, 2014).

Já no Brasil, aproximadamente 25% dos casos de pacientes adultos internados em unidades de tratamento intensivo (UTI), com infecções por *K. pneumoniae*, eram resistentes aos antimicrobianos carbapenêmicos. A resistência, a esta mesma classe de antimicrobianos, sobe para 35,6% para os casos de infecções

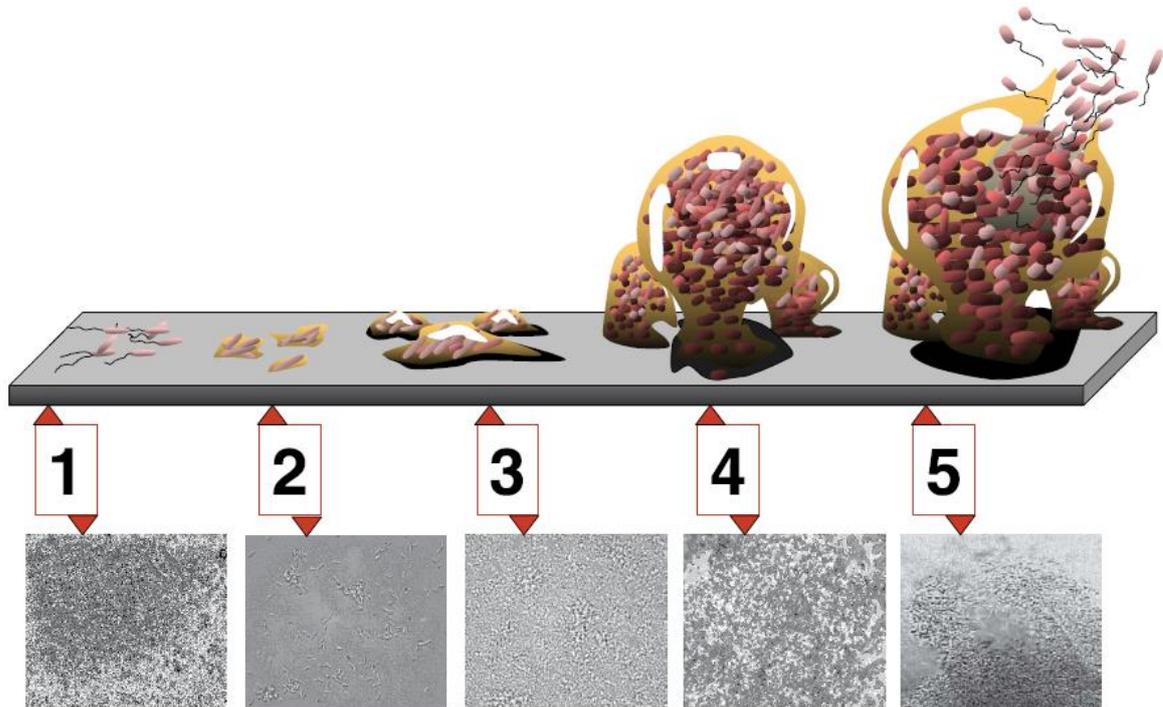
por *P. aeruginosa*, e 77,1% para as infecções por *Acinetobacter spp.* (ANVISA, 2015).

Com frequência as bactérias utilizam uma ou mais estratégias para evitar a ação de antimicrobianos, acentuando a resistência aos mesmos. Entre os principais mecanismos de resistência estão: produção de biofilme, alteração da permeabilidade da membrana celular externa das bactérias Gram-negativas; reprogramação e modificação da estrutura alvo; efluxo contínuo do antibiótico e degradação do antimicrobiano por enzimas (SILVEIRA *et al.*, 2006; ANVISA, 2007).

Em geral, estes mecanismos de resistência bacteriana podem ser agrupados em três linhas de defesa de acordo com os locais de ação de resistência: a primeira linha de defesa é o biofilme bacteriano; a segunda linha de defesa é a parede celular, a membrana celular e as bombas de efluxo; e as respostas bioquímicas e genéticas intracelulares são consideradas a terceira linha de defesa bacteriana (ZHOU *et al.*, 2015).

### 1.1.1 Biofilme bacteriano

Os biofilmes são comunidades de microrganismos que crescem embebidos em uma matriz extracelular constituída basicamente de exopolissacarídeos (EPS) e aderidos a uma superfície inerte, um tecido vivo ou aderidas umas às outras (Fig. 1). Este sistema é altamente resistente tanto à resposta imune do hospedeiro como à terapia sistêmica com antibióticos, conferindo proteção aos microrganismos e causando infecções persistentes difíceis de erradicar (ARCHER *et al.*, 2011).



**Figura 1:** Representação esquemática do desenvolvimento do biofilme retratado em um processo de cinco estágios. Estágio 1: Fixação inicial de bactérias a uma superfície inerte; Estágio 2: Produção de matriz extracelular de EPS; Estágio 3: Proliferação e acumulação de agregados de células em multicamadas. Estágio 4: Formação final da comunidade bacteriana em uma matriz polimérica; Estágio 5: Dispersão das células bacterianas para formação de biofilme (MONROE, 2007).

O biofilme é constituído por um agregado de microrganismos que formam uma estrutura tridimensional com micro canais, úteis na distribuição de nutrientes, água e escoamento de metabólitos. Nesse agregado polimicrobiano os microrganismos são responsáveis por menos de 10% da massa seca, enquanto que a matriz pode ser responsável por mais de 90%. A matriz é o material extracelular, produzido pelos próprios organismos, em que as células do biofilme estão incorporadas. Esta é composta por um conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros que representam o alicerce para a arquitetura tridimensional do biofilme e é responsável pela adesão às superfícies, coesão estrutural, proteção contra agentes físicos, químicos e defesas imunológicas do hospedeiro. Essa característica facilita a comunicação célula a célula e obtenção de nutrientes, além de atuar como um centro de reciclagem, mantendo todos os excretas e restos

celulares disponíveis, incluindo o DNA, o que pode representar um reservatório de genes para a transferência horizontal (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

A formação de sua estrutura tridimensional é um processo dinâmico que envolve uma série de eventos moleculares coordenados, representando um ambiente propício para a comunicação célula a célula (*quorum sensing*) (COSTERTON *et al.*, 1995). *Quorum sensing* (QS) ou autoindução é um processo de comunicação célula a célula nos quais genes bacterianos são expressos de acordo com a densidade populacional, após uma concentração crítica de moléculas auto indutoras terem sido atingidas (FUQUA *et al.*, 1994). Nesse processo, uma enzima catalisa a síntese de uma molécula sinal que, ao ser secretada, se liga a um receptor nas células alvo e induz a reprogramação da expressão de vários genes, incluindo aqueles que codificam a enzima que produz o sinal, criando um ciclo de *feedback* positivo. Em agentes patogênicos bacterianos, a maioria dos genes controlados por QS codificam vários fatores de virulência diferentes, tais como proteases, toxinas e adesinas, que atuam na formação de esporos ou corpos de frutificação, auxiliam na colonização do hospedeiro, na evasão da resposta imune, formação de biofilmes e adaptação a mudanças ambientais (LI & TIAN, 2012; HOLM & VIKSTRÖM, 2014).

O sistema QS permite que as bactérias mudem suas atividades coletivamente comportando-se como uma comunidade para realizar tarefas que seriam impossíveis individualmente, tais como diminuição da competição por recursos e nutrientes e entrar em estado latente em condições inóspitas (OLIVER, 2010). No contexto de infecções bacterianas, a expressão regulada de fatores de virulência coordena o ataque contra o hospedeiro e maximiza a probabilidade de estabelecimento de infecções e interações sociais em biofilmes. Vários agentes patogênicos importantes utilizam sistemas de QS para controlar a expressão de múltiplos fatores de virulência durante a infecção e comportamentos associados com a formação de biofilme. Entre os mais relevantes para a saúde humana estão a *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter* spp, *Burkholderia cepacea*, *Escherichia* spp, *Salmonella typhimurium* e *Candida albicans* (LI & TIAN, 2012; HOLM & VIKSTRÖM, 2014; CASTILLO-JUÁREZ *et al.*, 2015).

Etapas importantes para a formação e desenvolvimento do biofilme são as adesões iniciais, passando os microrganismos de seu estilo de vida planctônico ao sésil, a formação de micro colônias, a maturação do biofilme e o destacamento de bactérias, retornando ao seu estilo de vida planctônico. Durante a infecção as bactérias sésseis liberam antígenos e estimulam a liberação de anticorpos pelo hospedeiro, mas os anticorpos não são eficazes para matar as bactérias dentro dos biofilmes e podem causar danos aos tecidos circundantes. Após o seu estabelecimento, as bactérias individuais se dispersam a partir do biofilme original e atingem novas áreas, mediando infecções agudas e desempenhando um papel importante na progressão das doenças crônicas (COSTERTON *et al.*, 1995; 1999).

Biofilmes bacterianos têm sido reconhecidos por muitas décadas como a causa mais frequente de infecções associadas a dispositivos médicos implantáveis tais como cateteres, válvulas cardíacas, marca-passos, lentes de contato, próteses articulares e linhas intravenosas. Esta comunidade bacteriana aumenta substancialmente a morbidade e mortalidade de pacientes, pois se tornam difíceis de tratar devido a características da matriz do biofilme e fenotípicas das bactérias que atuam como uma barreira que impede a ação de drogas antimicrobianas e resposta imune do hospedeiro. Além disso, pesquisas relataram que algumas linhagens que são capazes de produzir biofilme possuem alta capacidade de colonização e são mais virulentas quando comparadas a linhagens que não são produtoras de biofilme. Este mecanismo é, portanto, extremamente importante no estabelecimento de infecções (GARA & HUMPHREYS, 2001; OTTO, 2009; MCCARTHY *et al.*, 2015).

### 1.1.2 Parede celular e membrana celular bacteriana

A parede celular bacteriana e a membrana plasmática são estruturas cruciais para a manutenção da forma da célula e troca de nutrientes ou moléculas de sinalização. Estas duas estruturas podem agir como barreiras físicas, restringindo a entrada de substâncias na célula, incluindo agentes antimicrobianos, atuando, dessa forma, na resistência bacteriana. Além disso, as bombas de efluxo, presentes na membrana celular, removem eficientemente os agentes antimicrobianos do meio

intracelular para o extracelular e contribuem para o aumento da resistência dos biofilmes, mostrando-se extremamente importantes na resistência bacteriana. (ZHOU *et al.*, 2015).

Em ambas as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, a parede celular é construída de peptidoglicano, uma rede tridimensional e elástica de polímeros de açúcares, com ligação cruzada peptídica, que circunda a célula no lado externo de sua membrana plasmática. Essa estrutura bacteriana mantém a pressão osmótica e confere resistência à tensão, protegendo a bactéria da lise celular, o que torna essa estrutura um alvo atraente para a terapia antibacteriana como no caso dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e da vancomicina (HUANG *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2006).

A principal diferença entre o peptidoglicano da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é a espessura das camadas que circundam a membrana plasmática. Enquanto o peptidoglicano de Gram-negativas tem apenas alguns nanômetros de espessura, representando uma a algumas camadas, o peptidoglicano de Gram-positivas tem uma espessura de 30-100 nm e contém várias camadas. Nas bactérias Gram-negativas esta parede fina é circundada por uma membrana externa de lipopolissacarídeo, ausente nas Gram-positivas, que é responsável por uma estabilização adicional da célula, pela proteção contra moléculas tóxicas e pelo choque endotóxico associado à septicemia. Devido a estas características, as bactérias Gram-negativas são geralmente mais resistentes que as Gram-positivas (SILHAVE *et al.*, 2010).

As membranas bacterianas constituem uma barreira de permeabilidade seletiva que oferece uma proteção eficaz contra compostos nocivos presentes no meio extracelular, além de proporcionar a entrada de nutrientes necessários para a célula. No entanto, alguns compostos conseguem atravessar essa barreira e atingir as estruturas intracelulares. Para evitar a acumulação intracelular de compostos tóxicos, as bactérias têm desenvolvido sistemas dependentes de energia para bombear tais moléculas para fora da célula, num processo que não envolve a alteração ou a degradação dos fármacos (FERNÁNDEZ & HANCOCK, 2012).

As bombas de efluxo bacteriano transportam ativamente muitos antibióticos para fora da célula e estão entre as principais contribuições para a resistência intrínseca de bactérias. Quando superexpressas, as bombas de efluxo também podem conferir elevados níveis de resistência a antibióticos anteriormente eficazes. Algumas bombas de efluxo tem especificidade restrita ao substrato, podendo ser específica para uma determinada droga, mas muitas transportam uma ampla gama de substratos estruturalmente diferentes e são conhecidas como bombas de resistência a múltiplos fármacos (MDRP, do inglês *multidrug resistance pumps*). Apesar de todas as bactérias possuírem vários genes que codificam bombas de efluxo MDRP em seus cromossomos, alguns têm sido mobilizados para plasmídeos que podem ser transferidos entre bactérias. Este é um fato preocupante, pois mostra que este mecanismo de resistência é transmissível e pode ser rapidamente disseminado para outros agentes patogênicos clinicamente relevantes (BLAIR *et al.*, 2011).

Naturalmente, as bombas de efluxo desempenham um papel importante na defesa contra diferentes compostos tóxicos que as bactérias podem encontrar em seu ambiente natural. Por exemplo, o habitat da *E. coli* é o trato gastrintestinal, no qual há uma presença significativa de sais biliares. Portanto, não é surpreendente que a bomba de efluxo AcrAB da *E. coli* exiba uma elevada afinidade para com os sais biliares, o que indica que este é o seu substrato natural, facilitando a colonização do trato entérico, e adicionalmente já foi mostrado que é esta bomba que confere resistência a antibióticos. Da mesma forma, a bomba de efluxo NORa de *S. aureus* é sensível à limitação de ferro, que é uma característica comum do ambiente do hospedeiro e alternativamente produz resistência à fluoroquinolonas. Estes exemplos sugerem que é possível que os transportadores de drogas inicialmente realizassem um papel na secreção de substratos fisiologicamente relevantes, e que mais tarde este mecanismo mostrou-se útil para expelir compostos antibióticos e metabólitos secundários tóxicos (NIKAIDO, 2009; BLAIR *et al.*, 2011; FERNÁNDEZ & HANCOCK, 2012).

### 1.1.3 Alterações intracelulares

Apesar das defesas bacterianas descritas acima, vários agentes antimicrobianos penetram nas células e exercem sua atividade. Estes podem agir inibindo o crescimento ou matando as bactérias ao destruir os sistemas metabólicos e impedindo a expressão de genes reguladores. Em resposta a esta pressão de seleção, as células bacterianas tendem a desenvolver mecanismos para alterar a estrutura alvo de ação do composto, produzir agentes antagônicos e regular a expressão gênica.

A maioria dos antimicrobianos se liga com alta afinidade aos seus alvos e impedem que os mesmos realizem sua função normal. A bactéria, por sua vez, poderá alterar o alvo de ação do antimicrobiano e impedir a ligação deste. Por outro lado, as bactérias podem modificar ou até mesmo destruir os antimicrobianos, resistindo assim à sua ação. Isso ocorre devido à produção de enzimas específicas que podem inativar os antibióticos por hidrólise ou alterá-los quimicamente (BLAIR *et al.*, 2011).

Uma simples alteração genética pontual pode levar ao aparecimento de um exemplar muito resistente, que normalmente não perde viabilidade nem patogenicidade. No entanto, os genes de resistência quase sempre fazem parte do DNA de plasmídeos extracromossômicos, que podem ser transferidos entre microrganismos. Além disso, alguns genes de resistência fazem parte de unidades de DNA denominadas *transposons* que se movem entre cromossomos e plasmídeos transmissíveis, alterando assim a constituição gênica do organismo. Portanto, os genes de resistência podem ser transferidos entre duas bactérias de mesma espécie ou não, com subsequente recombinação, gerando multirresistência aos antimicrobianos (ZHOU *et al.*, 2015).

## 1.2. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae, apresenta forma de coco e podem ser encontrados em arranjos individuais, aos pares e em agrupamentos irregulares, semelhantes a cachos de uva, possuindo diâmetro que varia entre 0,5 e 1,5  $\mu\text{m}$ . São Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, podem ser capsulados, imóveis e capazes de produzir catalase. (BERDGOLL, 1990).

O gênero é composto por 52 espécies e 28 subespécies (EUZÉBY, 2017), e geralmente faz parte da microbiota da pele, fossas nasais e intestino. Entre as espécies do gênero, *S. aureus* se destaca como a mais virulenta e o patógeno de maior impacto econômico, causando um amplo espectro de infecções em humanos e animais. Frequentemente apresenta resistência múltipla, é produtora de toxinas e causa diversas doenças por diferentes mecanismos, representando um dos desafios mais significativos para a terapia (SPICER, 2002; DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008).

*S. aureus* pode causar diversos processos infecciosos, que variam desde infecções cutâneas crônicas relativamente benignas até infecções sistêmicas potencialmente fatais. As infecções cutâneas incluem foliculite simples, impetigo, furúnculos e carbúnculos que podem levar a sintomas sistêmicos. Em casos mais graves causa a broncopneumonia estafilocócica e pneumonia, levando ao desenvolvimento de bacteremia, que, em sítios corpóreos distantes, pode gerar endocardite, osteomielite, piodartrite e formação de abscessos metastáticos, em particular na pele, nos tecidos subcutâneos, pulmões, fígado, rins e cérebro. Este microrganismo é ainda a segunda causa mais frequente de meningite associada a derivações ventriculoperitoneais e um dos muitos agentes relacionados com peritonite em pacientes submetidos à diálise peritoneal ambulatoria contínua. As toxinas estafilocócicas também são responsáveis pela necrose epidérmica crônica, síndrome do choque tóxico e intoxicações alimentares (KONEMAN *et al.*, 2001).

*S. aureus* possui dois componentes especiais na parede celular que contribuem para sua virulência: proteína A e ácidos teicóicos. A proteína A é exclusiva de *S.*

*aureus* e está ligada ao peptidoglicano, podendo ser liberada para o meio durante o crescimento. Esta proteína se liga a região constante da imunoglobulina G, atuando como um fator de virulência, interferindo na opsonização, na ingestão dos microrganismos pelos leucócitos, inibindo a ativação do sistema complemento e estimulando reações de hipersensibilidade dos tipos imediatos e tardios. Os ácidos teicóicos são encontrados em todos os estafilococos e estão envolvidos na inibição da ativação do sistema do complemento, na adesão às superfícies das mucosas quando se ligam à fibronectina e na inibição da quimiotaxia de células inflamatórias (KONEMAN *et al.*, 2001; SPICER, 2002).

Além dos mecanismos de patogenicidade estruturais, a produção de substâncias extracelulares, como exotoxinas e enzimas, contribui significativamente para a virulência deste microrganismo. As hemolisinas, leucocidinas, toxinas exfoliatinas A e B, 23 enterotoxinas distintas (incluindo SEA, SEB, SEC, SED e SEE) e toxina da síndrome do choque tóxico (TSS-1), são exotoxinas que podem desencadear resposta imunológica e provocar lesão celular e tecidual. Além disso, a produção de enzimas como coagulase, catalase, hialuronidase, fibrinolisinase, lipases, DNAase e  $\beta$ -lactamases aumentam ainda mais a patogenicidade desta bactéria. (KONEMAN *et al.*, 2001; SCHLIEVERT & CASE, 2007).

Em *S. aureus*, o QS controla a expressão de vários destes fatores de virulência tais como hemolisinas, leucocidinas, adesinas de superfície celular, exoenzimas, além da formação de biofilmes, resistência a antibióticos e infecções crônicas. O sistema de regulação ocorre via sistema *accessory gene regulator* (Agr), um locus composto de cinco genes (hld, agrA, agrB, agrC, agrD), dois promotores (P2 e P3) e uma molécula efetora (RNAIII). O sistema Agr ocorre em cascata e é sensível a concentração celular e a quantidade de peptídeo auto indutor (LI & TIAN, 2012).

Biofilmes formados por estafilococos têm sido reconhecidos por muitas décadas como a causa mais frequente de infecções hospitalares. A matriz extracelular à base de polímero diminui a susceptibilidade a agentes antimicrobianos e às defesas imunológicas, fazendo com que essas infecções sejam difíceis de erradicar. Entre os agentes etiológicos mais comuns que formam biofilme, o *S. aureus* se destaca, sendo encontrado em vários dispositivos médicos implantados,

como válvulas cardíacas, próteses, linhas intravasculares, lentes de contato e até mesmo no próprio tecido do hospedeiro. (LISTER & HORSWILL, 2014; MCCARTHY *et al.*, 2015).

Durante a infecção, a dispersão das células do biofilme pode resultar em sítios secundários de colonização e agravamento da infecção. Cerca de 65% das pessoas com infecções por *S. aureus* são colonizados com a mesma cepa, ao passo que o percentual salta para 80% nas infecções nosocomiais. As infecções que resultam são bastante diversificadas, e podem incluir infecções agudas, tais como a bacteremia e abscessos nos tecidos, que são geralmente causadas por células planctônicas e produção de toxinas segregadas e exoenzimas. Em contraste, as infecções crônicas, tais como endocardite e osteomielite, não são causadas por células de vida livre, mas sim por biofilmes, em que o *S. aureus* se adere no hospedeiro causando infecções persistentes (LI & TIAN, 2012; LISTER & HORSWILL, 2014).

A emergência de casos de MRSA tem ganhado a atenção de centros de controle de patógenos e de pesquisadores em todo o mundo. Além disso, estas estirpes estão adquirindo também um alto nível de resistência à vancomicina, representando um risco ainda maior para a saúde pública, uma vez que esta droga antimicrobiana continua a ser a primeira linha e a terapia mais barata para o tratamento de infecções causadas por MRSA. Geralmente, esta multirresistência está relacionada à plasmídeos que codificam transportadores de efluxo, responsáveis pela resistência a várias classes de antimicrobianos (KOREEN *et al.*, 2004; NIKAIDO, 2009; ROSSI *et al.*, 2014).

Em 2002, foi descrito no Brasil um caso de MRSA suscetível a vancomicina que adquiriu um agrupamento de genes (*vanA*) durante a terapia antibiótica e tornou-se resistente à vancomicina. A partir deste ano, outros isolados foram relatados ao redor do mundo. Recentemente, foi relatado a aquisição de *vanA in vivo* e consequente resistência à vancomicina em *S. aureus* sensíveis a meticilina (MSSA, do inglês *methicillin-sensitive S. aureus*). A aquisição desse gene por um plasmídeo levou à bacteremia no paciente (ROSSI *et al.*, 2014; PANESSO *et al.*, 2015).

Estirpes que são prevalentes em hospitais estão sob pressão seletiva contínua e estão expostos a um arsenal de antibióticos cada vez maior. Estas são muito bem adaptadas para sobreviver e evoluir neste ambiente e cepas resistentes tem se disseminado rapidamente em vários países, sendo a causa mais frequente de infecções hospitalares. No tratamento destas infecções em pacientes ambulatoriais a vancomicina tem sido a principal droga de escolha. Antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos, como as fluoroquinolonas, também são utilizados como opções terapêuticas para o tratamento de infecções. Contudo, um aumento na resistência a estes antibióticos têm sido observado nos últimos anos. (EVANGELISTA & DE OLIVEIRA; PANESSO *et al.*; CARREL *et al.*, 2015).

### 1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* pertence à família Pseudomonadaceae e atualmente possui 230 espécies e 18 subespécies (EUZÉBY, 2017). Os membros desta família são bacilos Gram-negativos retos ou ligeiramente curvos, aeróbicos estritos, não fermentadores, oxidase-positivos e a maioria das cepas apresenta motilidade por meio de um ou mais flagelos polares. (SPICER, 2002).

*P. aeruginosa* é uma bactéria extremamente versátil, encontrada em diversos ambientes, principalmente solo e água, ou ainda associada a plantas e animais, onde pode causar infecções oportunistas. Entre os pseudomonídeos é o mais frequente isolado de amostras clínicas, comumente encontrado em infecções hospitalares, especialmente prevalente entre pacientes vítimas de queimaduras, fibrose cística, leucemia aguda, transplante de órgãos e com traqueostomias. Devido à sua capacidade de se aderir a diversos materiais, ela está presente em catéteres, ventiladores, próteses, lentes de contato e feridas cutâneas exsudativas. Esta bactéria produz, ainda, queratite, infecção de úlcera córnea, endofitalmite, infecções no trato urinário e no trato respiratório inferior, sendo esta mais grave em indivíduos imunocomprometidos. Em casos mais isolados, há relatos de endocardite, meningite, abscessos cerebrais e infecções ósseas por disseminação hemática (KONEMAN *et al.*, 2001).

Por causa da alta resistência a antibióticos e do grande arsenal de fatores de virulência, tais como, alginato, lipopolissacarídeos, exotoxina A, enterotoxinas, leucocidina, aumento da viscosidade extracelular, proteases, fosfolipases e várias outras enzimas, esta bactéria causa infecções de difícil controle. Além disso, a capacidade de produção de biofilme torna as infecções causadas por *P. aeruginosa* difíceis de erradicar, sendo esta habilidade controlada por QS, assim como 10% de todo o seu complexo genoma (WILLIAMS & CÂMARA, 2009; KONEMAN *et al.*, 2001).

A frequência de infecções por *P. aeruginosa* multirresistentes é uma consequência do aumento do número de pacientes imunocomprometidos e hospitalizações de longo prazo. Esta bactéria apresenta numerosos mecanismos de resistência intrínseca e adquirida devido a múltiplas mutações e presença de plasmídeos, tornando limitado o número de antimicrobianos disponíveis. Atualmente, a defesa mais eficiente que existe contra as infecções por *P. aeruginosa* é a utilização de carbapenêmicos. No entanto, a resistência que tem sido desenvolvida é extremamente complexa e heterogênea. Entre os mecanismos mais comuns, esta bactéria remodela a membrana exterior impedindo a entrada do antibiótico, superexpressa bombas de efluxo, impedindo seu acúmulo no interior da célula, altera a estrutura alvo de ação antibiótica e, principalmente, produz enzimas  $\beta$ -lactamases e carbapenemases específicas para degradação do antibiótico (PRAGASAM *et al.*, 2016).

A hiperexpressão de bombas de efluxo multidrogas, cromossomicamente codificadas, é frequentemente detectada em isolados clínicos e contribui para a criação de fenótipos multirresistentes. A baixa permeabilidade da membrana externa de *P. aeruginosa*, combinada com tais bombas de efluxo, resulta em uma proteção eficaz contra uma ampla variedade de substâncias, incluindo antibióticos como fluoroquinolonas, tetraciclina, macrolídeos, sulfonamidas, cefalosporinas, entre outros. Este é um mecanismo de proteção versátil contra o estresse celular (DREIER & RUGGERONE, 2015).

Pacientes com fibrose cística frequentemente são vítimas de *P. aeruginosa*, que se estabelecem nos pulmões, formam biofilme e causam infecções extremamente difíceis de erradicar. O agravamento e a degradação progressiva do tecido pulmonar

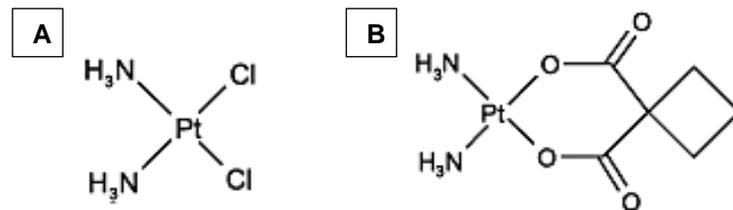
eventualmente levam à morte do paciente. Nessas condições, os aminoácidos, um dos principais constituintes das secreções, suportam o crescimento bacteriano. Além disso, os ácidos graxos, lipídeos e outros substratos hidrofóbicos do hospedeiro facilitam a colonização e estabelecimento de biofilme, que é facilitado pela liberação de alginato, polissacarídeo capsular que permite à bactéria se aderir ao tecido pulmonar e formar biofilmes (KONEMAN *et al.*, 2001; STARKEY *et al.*, 2009).

#### 1.4. Compostos de Coordenação

Muitos metais têm papel importante nos sistemas vivos, uma vez que se ligam e interagem com moléculas biológicas (SINGH *et al.*, 2011). Ainda que a elucidação dos mecanismos de ação dos mesmos no organismo seja recente, a química inorgânica medicinal já tem sido utilizada a cerca de 5000 anos por egípcios, árabes e chineses, mais pela natureza preciosa do metal do que pelas propriedades medicinais (BERALDO, 2005). Já no século XVI o médico suíço Theophrastus Paracelsus desenvolvia e usava medicamentos a base de mercúrio, com sangrias e purgas drásticas (base da “medicina heroica”), que constavam dos tratamentos usuais dos primórdios da alopatia. No entanto, somente nos últimos 100 anos as propriedades medicinais de compostos inorgânicos começaram a ser investigadas de forma racional (CROW, 2004).

Nesse contexto, a química inorgânica medicinal busca explorar as propriedades únicas de íons metálicos para a concepção de novos fármacos. A vasta gama de números de coordenação e geometrias, estados de oxidação acessíveis, características termodinâmicas e cinéticas do metal oferecem à química medicinal um largo espectro de reações que podem ser exploradas. Tem-se como exemplo a aplicação clínica de agentes quimioterápicos no tratamento do câncer à base de platina (BRUIJNINCX & SADLER, 2008). O primeiro composto de coordenação contendo platina, conhecida como cis-platina, foi sintetizada pela primeira vez em 1844 e recebeu o nome de cloreto de Peyrone, porém só em 1970 foi estabelecida a sua eficácia no tratamento do câncer em humanos (DESOIZE & MADOULET, 2002; DESOIZE, 2007). Este composto de coordenação é conhecido comercialmente por Platinil® ou Platinol® e seu análogo carboplatina por Paraplatin® (Fig. 2). O

mecanismo de ação está relacionado com a inibição seletiva da síntese do DNA devido à sua habilidade de formar ligações cruzadas do tipo interfilamentares como também intrafilamentares (OLIVEIRA & ALVES, 2002). Além da cis-platina, outras terapias dependentes de íons metálicos estão presentes em vários graus de sucesso clínico, incluindo compostos que contêm ouro (antiartríticos), lítio (antidepressivos) e ferro (anticancerígenos) (COHEN, 2007).



**Figura 2:** Estrutura da cis-platina (A) e seu análogo, a carboplatina (B) (ALMEIDA *et al.*, 2005).

No desenvolvimento de compostos de coordenação, o íon metálico central está coordenado a ligantes através de átomos que contêm um par de elétrons disponíveis para formar uma ligação. Os ligantes podem ser íons, moléculas simples ou até biomoléculas como aminoácidos ou proteínas. Estes apresentam um papel importante na atividade dos compostos, uma vez que podem limitar os efeitos tóxicos dos metais, conferindo proteção aos tecidos, e potencializar suas propriedades terapêuticas através do direcionamento do fármaco ao tecido ou a uma enzima em particular, ou aumentando a absorção do mesmo. Isso tem estimulado os químicos a empregar diferentes estratégias no desenvolvimento de novos compostos à base de metal com diferentes mecanismos de ação (TOMPSON & ORVIG, 2006; STORR *et al.*, 2006).

Atualmente, vários compostos de coordenação têm sido sintetizados visando à obtenção de novos compostos que apresentem atividade frente à microrganismos resistentes. Creaven e colaboradores (2007) relataram que compostos de prata contendo cumarinas como ligantes apresentaram atividade antimicrobiana sobre MRSA, sendo que na ausência do metal, as cumarinas não apresentaram atividade. Kalinowska e colaboradores (2016) investigaram a atividade antibacteriana de seis

compostos de prata contendo derivados de piridina e benzimidazol sobre bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli* e *Proteus hauseri*) e observaram que aqueles que continham benzimidazol possuíam propriedades antibacterianas significativas. Rodrigues-Arguelles e colaboradores (2009) publicaram as atividades antibacteriana e antifúngica de compostos de cobalto, níquel, cobre e zinco, obtidos com ligantes derivados da tiosemicarbazona. O composto de cobre foi o mais ativo, especialmente frente à *Haemophilus influenzae*, uma bactéria altamente nociva aos humanos. Agarwala e colaboradores (2014) observaram que nanopartículas de óxido de cobre e ferro possuíam atividade antibacterina e antibiofilme sobre MRSA e *E. coli*. Recentemente, Fernandes e colaboradores (2014; 2015), do nosso grupo de trabalho, publicaram resultados referentes à ação de compostos de coordenação contendo complexos mononucleares de zinco que demonstraram alta atividade antibacteriana e antitumoral e complexos de cobre e ferro que induziram apoptose em células tumorais.

Isso revela que as substâncias químicas inorgânicas sintéticas possuem um campo fértil para a aplicação de seus compostos e podem contribuir significativamente na área da saúde pública.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a inibição do crescimento, da produção de biofilme e de alterações da ultraestrutura das bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* tratadas com compostos de coordenação.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer a concentração inibitória mínima (MIC, do inglês *minima inhibitory concentration*) dos compostos de coordenação para as cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*;
- Verificar o efeito dos compostos de coordenação na produção de biofilme pelas células bacterianas, empregando-se o método de aderência em placa;
- Verificar o efeito dos compostos de coordenação sobre a morfologia bacteriana empregando-se microscopia eletrônica de transmissão;
- Observar a toxicidade dos compostos de coordenação em nematoides de vida livre *Panagrellus redivivus*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais Biológicos

Neste trabalho foram utilizadas duas espécies bacterianas, sendo duas cepas de *S. aureus* e duas de *P. aeruginosa*: *S. aureus* American Type Culture Collection (ATCC) 25923, um isolado clínico, utilizada como estirpe padrão de controle de teste em laboratório, produtora de biofilme, sensível a vários antibióticos, incluindo a meticilina (TREANGEN *et al.*, 2014); *S. aureus* ATCC MRSA 33591, isolado clínico, produtora de biofilme, resistente a meticilina e utilizada como estirpe padrão de controle de teste em laboratório (SCHAEFLER, 1979); *P. aeruginosa* ATCC 9027, isolado de infecção de orelha externa humana, frequentemente utilizada como estirpe de controle de qualidade em ensaios de esterilidade e contaminação. Além disso, é um importante produtor de biossurfactante ramnolipídeo e utilizada para testes de resistência de biofilme bacteriano (MAI-PROCHNOW *et al.*, 2015); *P. aeruginosa* ATCC 15442, isolado da água de bebedouro animal, não citotóxica e produtora de biofilme e proteases capazes de degradar mucina e utilizada como estirpe de referência em testes de desinfetante (WANG *et al.*, 2014).

As cepas bacterianas foram mantidas a 4 °C, e repicadas trimensalmente e os nematoides mantidos a temperatura ambiente e repicado a cada 20 dias. Estes foram cedidos pelo Professor Olney Vieira da Motta do Laboratório de Sanidade Animal (LSA/CCTA – UENF).

#### 3.2. Compostos Sintéticos

Os compostos de coordenação foram sintetizados no Laboratório de Ciências Químicas pelos nossos colaboradores do Grupo de Pesquisa em Química de Coordenação e Bioinorgânica da UENF, sob orientação da Professora Christiane Fernandes Horn (LCQUI/CCT – UENF). Neste trabalho foram testados seis compostos de coordenação, três de zinco (Zn01, Zn02, Zn03), três de ferro (Fe01, Fe02, Fe03). Os compostos de coordenação de zinco estão sob sigilo de patente, já

os compostos de ferro possuem estrutura e função publicadas (MORCELI *et al.*, 2016).

Os compostos de coordenação foram cedidos sob a forma de pó. Estes foram pesados e diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) para obtenção das concentrações desejadas e utilização nos ensaios.

### **3.3. Cultura de Microrganismos**

Os microrganismos foram cultivados em meio de cultura Mueller Hinton (MH) (Merck). Este foi preparado de acordo com as instruções do fabricante, distribuído em placas de Petri em volume de 20 mL aproximadamente por placa, deixados 24 h à temperatura ambiente para teste de esterilidade e armazenados a 4 °C.

A partir de uma cultura inicial em placa de Petri, foi transferida uma alçada com colônias para um tubo de ensaio contendo caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI, do inglês *Brain Heart Infusion*) (Acumedia) e levado à estufa (Visomes Plus) a 35 °C para incubação. Após um período de aproximadamente seis horas, uma alíquota de 50 µL foi retirada com uma micropipeta e espalhada sobre uma placa de Petri contendo ágar MH com o auxílio de uma alça de platina e incubadas a 35 °C. Após 24 h, a placa foi retirada da estufa e a partir desse cultivo foi preparado um esfregaço que foi corado pelo método de Gram e observado no microscópio óptico (Nikon) em objetiva de imersão de 100x, certificando-se assim de que o cultivo microbiano estará puro para ser utilizado nos ensaios.

### **3.4. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)**

Para a avaliação da atividade antibacteriana dos compostos de coordenação foi empregado o método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo descrito no manual *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (2005).

Os testes de susceptibilidade foram realizados em triplicata, sendo uma coluna da microplaca utilizada para o controle (caldo MH + inóculo) e nas demais colunas

foram depositados simultaneamente 80  $\mu\text{L}$  de caldo MH, 10  $\mu\text{L}$  das diluições dos compostos propostos, e 10  $\mu\text{L}$  da solução de inóculo. As concentrações finais testadas nos poços foram 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$  para os compostos de coordenação. A solução de inóculo foi preparada a partir de colônias jovens (item 3.3) que foram transferidas para tubos contendo caldo MH, homogeneizadas em agitador e ajustadas à densidade óptica (DO) de 0,5 na escala McFarland (equivalente a  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL), segundo a leitura realizada pelo densitômetro Densimat (bioMérieux) no comprimento de onda de 550 nm, diluídas na proporção 1:20, homogeneizadas e diluídas na proporção de 1:10, obtendo-se uma concentração final de microrganismos de  $5 \times 10^5$  CFU/mL.

As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 20 h. Logo após foi realizada a leitura no leitor de placa (Multiskan FC, Thermo Scientific), no comprimento de onda de 570nm, para determinar a MIC. Esta foi obtida por comparação da DO do crescimento bacteriano na presença de diferentes concentrações dos compostos com o crescimento no controle. A MIC de cada composto foi definida como a menor concentração da substância capaz de inibir mais de 95% do crescimento bacteriano em relação ao controle negativo. Os ensaios de MIC foram feitos em triplicatas e repetidos duas vezes.

Neste ensaio também foram testados os sais de zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ) e ferro ( $\text{FeCl}_3$ ), DMSO e os ligantes (moléculas orgânicas) dos compostos de coordenação.

### **3.5. Viabilidade Bacteriana após Ensaio de MIC**

Para identificar se a MIC dos compostos de coordenação utilizados possuem ação bactericida ou bacteriostática, foi feito o plaqueamento para contagem das unidades formadoras de colônias (CFUs, do inglês *colony forming unit*). Dos poços onde não houve crescimento bacteriano foram retirados 10  $\mu\text{L}$ , diluídos em 90  $\mu\text{L}$  de solução salina (1:10), plaqueados com *swab* estéril em placas de Petri contendo ágar MH e incubados por 20 h a 36 h a 35 °C.

As placas com um número maior de 300 CFUs foram consideradas 100% viáveis. Os ensaios foram feitos em triplicatas e repetidos duas vezes.

### 3.6. Ensaio de Inibição da Produção de Biofilme

Para o ensaio de inibição da produção de biofilme foi utilizado o método de aderência em placa de poliestireno de fundo plano descrito por Christensen *et al.* (1985). Este método apresenta bases espectrofotométricas, baseando-se na DO do material aderente produzido pela bactéria. Em cada poço da placa foram adicionados 180  $\mu\text{L}$  de caldo BHI contendo 1% de sacarose e uma suspensão do inóculo com aproximadamente  $2 \times 10^7$  CFU/mL (como descrito no item 3.3). As placas foram incubadas por 16 h a 37 °C para a formação do biofilme. Após esse período foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  dos compostos de coordenação na concentração de 5  $\mu\text{M}$  e aguardados intervalos de 2, 4 e 6 h. Após estes intervalos de tempo, o conteúdo de cada poço foi aspirado cuidadosamente e gentilmente lavado quatro vezes com 200  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*), pH 7.4 para remoção de bactérias planctônicas. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de metanol a 99%, incubados durante 15 min para fixação e secas por uma hora em temperatura ambiente. Logo após, os poços foram corados com 150  $\mu\text{L}$  de cristal violeta 2% por 5 min e aspirado o excesso por meio da lavagem das placas com água destilada. Novamente as placas foram secas a temperatura ambiente por mais uma hora e, então, adicionado 150  $\mu\text{L}$  de etanol a 95% por 30 min. Finalmente, foi realizada a leitura de densidade óptica no leitor de placa (Multiskan FC, Thermo Scientific) no comprimento de onda de 570 nm.

Como controle foi utilizado apenas o crescimento bacteriano, sem adição dos compostos de coordenação. O experimento foi feito em triplicata e repetido duas vezes. A interpretação dos resultados da produção de biofilme foi realizada de acordo com o critério de Stepanovic *et al.* (2007) (Tab 1).

**Tabela 1:** Interpretação da produção de biofilme.

Valor médio da DO	Produção de Biofilme
$DO \leq DOc$	Não produtor
$DOc < \sim \leq 2x DOc$	Fraco
$2x DOc < \sim \leq 4x DOc$	Moderado
$> 4x DOc$	Alto

DOc - ponto de corte da densidade óptica foi calculado da seguinte maneira:  $DOc =$  média de DO do controle + (3 x desvio padrão da DO do controle).

### 3.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As bactérias *S. aureus* MRSA 33591 e *P. aeruginosa* ATCC 9027 foram selecionadas para análise das alterações ultraestruturais. As células bacterianas, no início da fase exponencial de crescimento em meio BHI, foram incubadas com os compostos de coordenação ZnO<sub>2</sub> e FeO<sub>2</sub> durante 6 h. Em seguida, foram lavadas em PBS e fixadas por 90 min com glutaraldeído 2,5% grau II (Sigma Aldrich) e tampão cacodilato (Sigma Aldrich) 0,1 M pH 7,4. Após a fixação, as bactérias foram lavadas três vezes em solução 0,1 M de PBS. Para melhor preservação das estruturas celulares foi feita a pós-fixação em solução 1:1 de tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio (Sigma Aldrich), na ausência de luz durante 30 min. Para retirar o tetróxido de ósmio e demais substâncias foram feitas três lavagens, por 10 min cada, em PBS. Para desidratação foi utilizada imersão em série crescente de soluções de acetona (Merck) nas concentrações de 30%, 50%, 70%, 90% e 100% por 10 min em cada etapa, e depois acetona 100% super seca em duas etapas de 10 min. Para a infiltração em resina foi usada a mistura de acetona/Epon (PolyBed 812) (Sigma Aldrich) na proporção de 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 e Epon puro por 8 h cada etapa. Em seguida, o *pellet* foi colocado em formas de silicone preenchidas com Epon puro e posteriormente colocadas em estufa a 60 °C para polimerização da resina durante 48 horas. Finalmente, os blocos contendo o material foram cortados em ultramicrótomo (Reichert Ultracut, Leica) em cortes de 70 nm de espessura e coletados em grades de cobre (300 mesh). Esse material foi contrastado com acetato de uranila durante 20 min, lavado em água destilada, contrastado com citrato de chumbo por 5 min, lavado novamente e finalmente examinado no microscópio ZEISS TEM 900.

### 3.8. Ensaio de Toxicidade dos Compostos sobre Nematóide de Vida Livre *Panagrellus redivivus*

Para o ensaio de toxicidade dos compostos, os nematoides no estágio L4 de desenvolvimento foram lavados exaustivamente em água destilada e deixados por 24 h em caldo BHI adicionado 50 µg/mL de gentamicina (Sigma Aldrich) para eliminar as bactérias provenientes do intestino e da cutícula dos nematoides. Em

seguida, os nematoides foram lavados em água destilada estéril e diluídos em caldo BHI para obter-se uma concentração de 10 nematoides/mL. Então, 1900  $\mu$ L da solução com nematoides foram distribuídos em placas de 24 poços contendo 100  $\mu$ L da MIC dos compostos de coordenação, obtendo-se um volume final de 2 mL por poço. Estes foram incubados por até 48 h a 35 °C e cada 12 h os vermes mortos (imóveis) foram contados com o auxílio do microscópio óptico (Leica). Nematoides em caldo BHI sem adição dos compostos de coordenação foram utilizados como controle. Este experimento foi realizado em triplicatas e repetido duas vezes.

### **3.9. Análise Estatística**

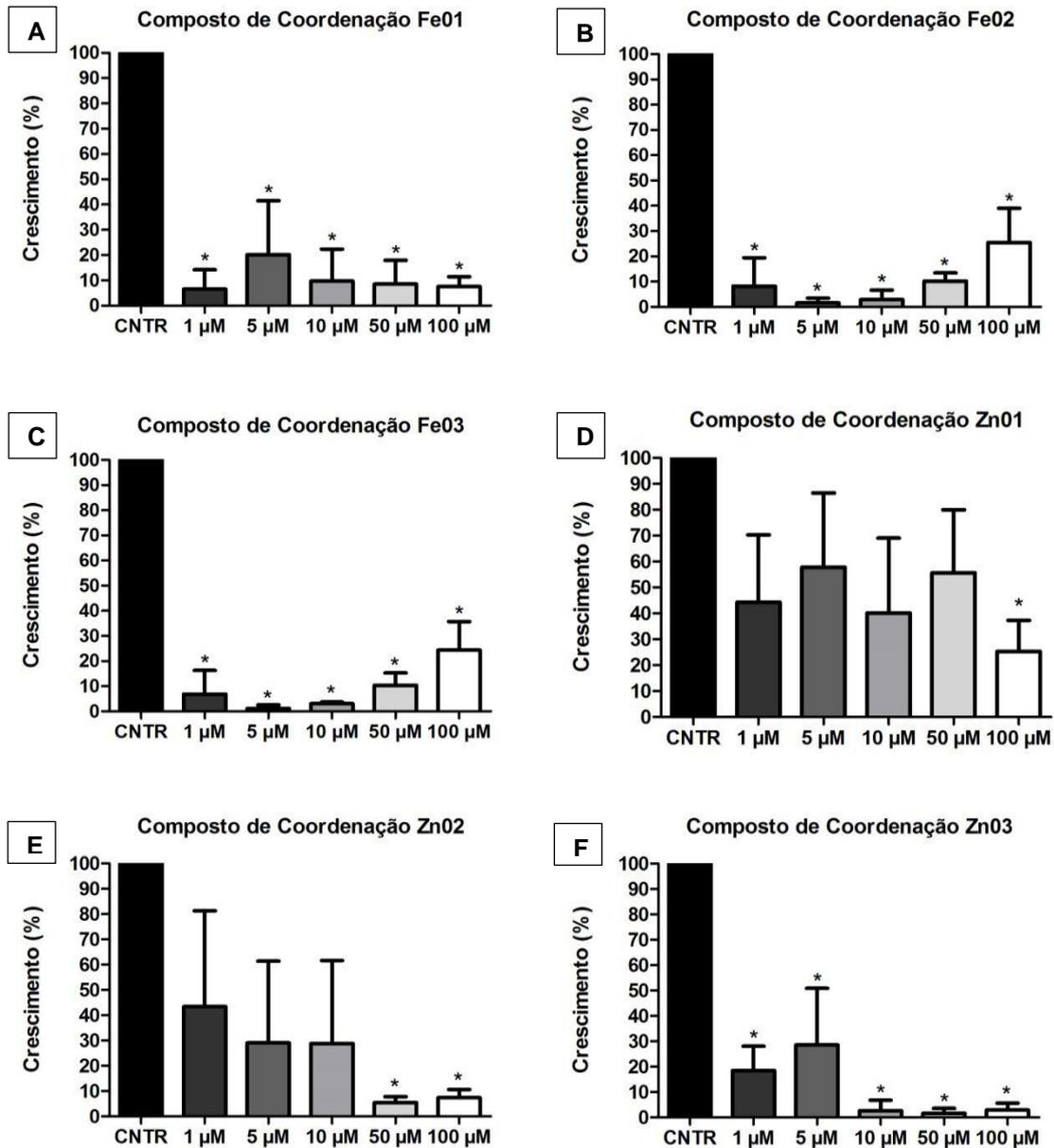
Os dados obtidos foram testados estatisticamente com o uso do programa GraphPadPrism 5 pelo teste de Anova com  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Concentração Mínima Inibitória

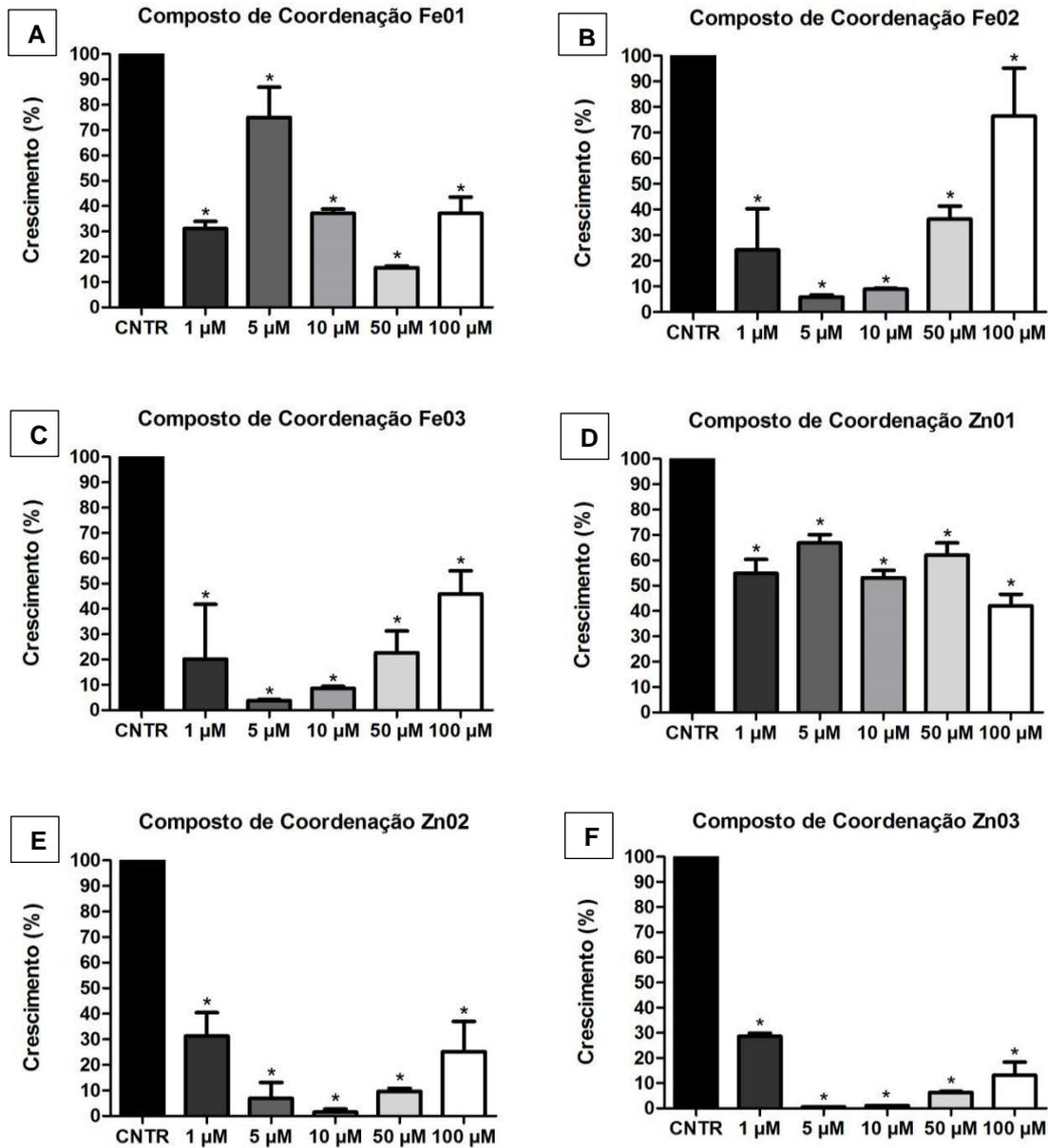
Para seleção dos compostos de coordenação com melhor atividade antibacteriana, foi empregado o método de microdiluição em caldo. Inicialmente, os seis compostos de coordenação foram testados nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ .

A partir dos experimentos realizados com *S. aureus* ATCC 25923, foi possível observar que os compostos Fe02 e Fe03 foram os mais ativos, com MIC de 5  $\mu\text{M}$  (Fig. 3 B e 3 C).



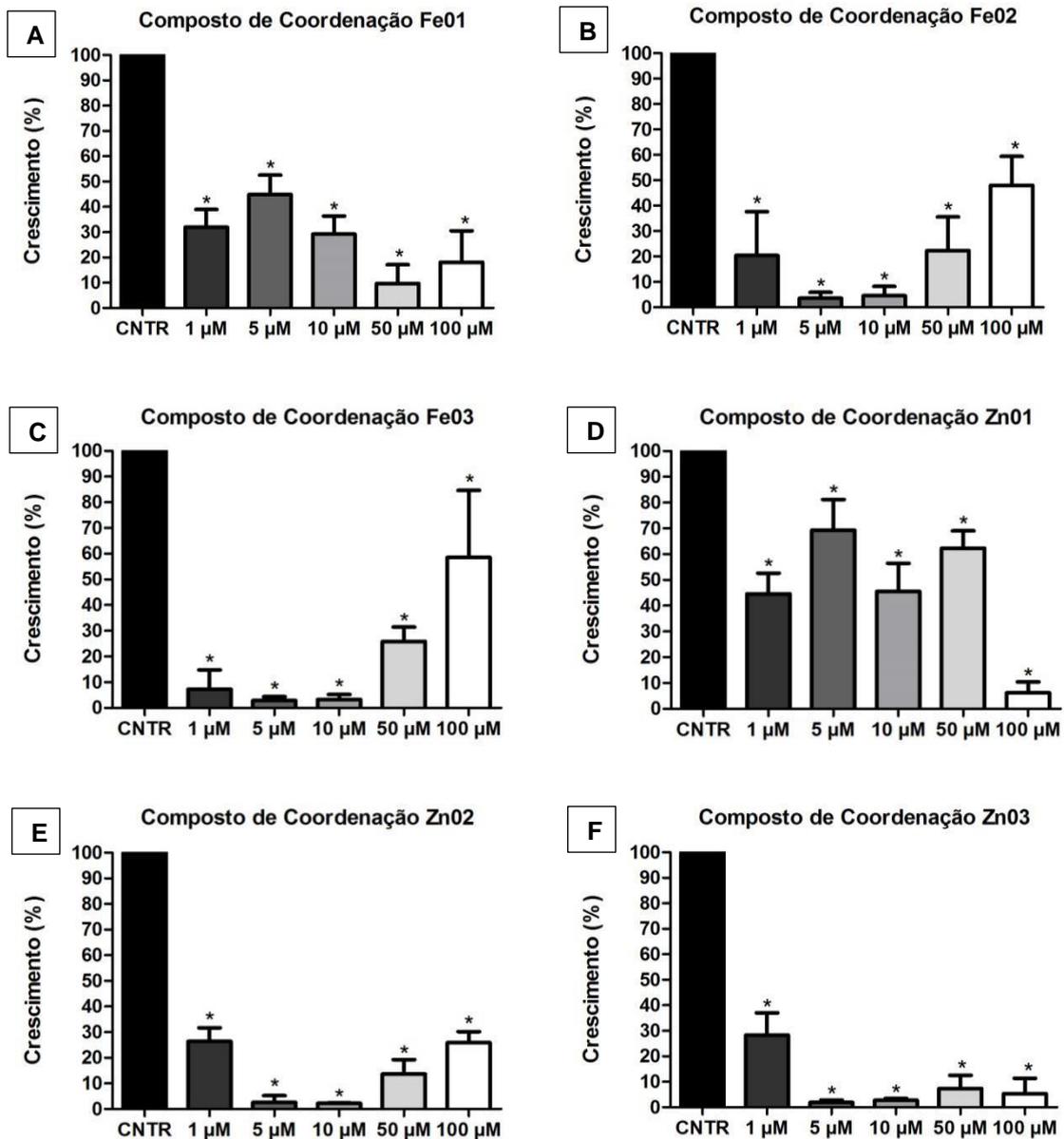
**Figura 3:** Visualização gráfica do ensaio de microdiluição de onde foi tirada a concentração mínima inibitória dos compostos Fe01 (A), Fe02 (B), Fe03 (C), Zn01 (D), Zn02 (E) e Zn03 (F) sobre *S. aureus* ATCC 25923, após 20 h de incubação. \* $p < 0,05$

Para *S. aureus* MRSA 33591, foi possível observar que os compostos Fe02, Fe03, Zn02 e Zn03 foram os mais ativos, com MIC de 5 µM para os compostos de ferro (Fig. 4 B e 4 C) e 10 µM para os compostos de zinco (Fig. 4 E e 4 F).



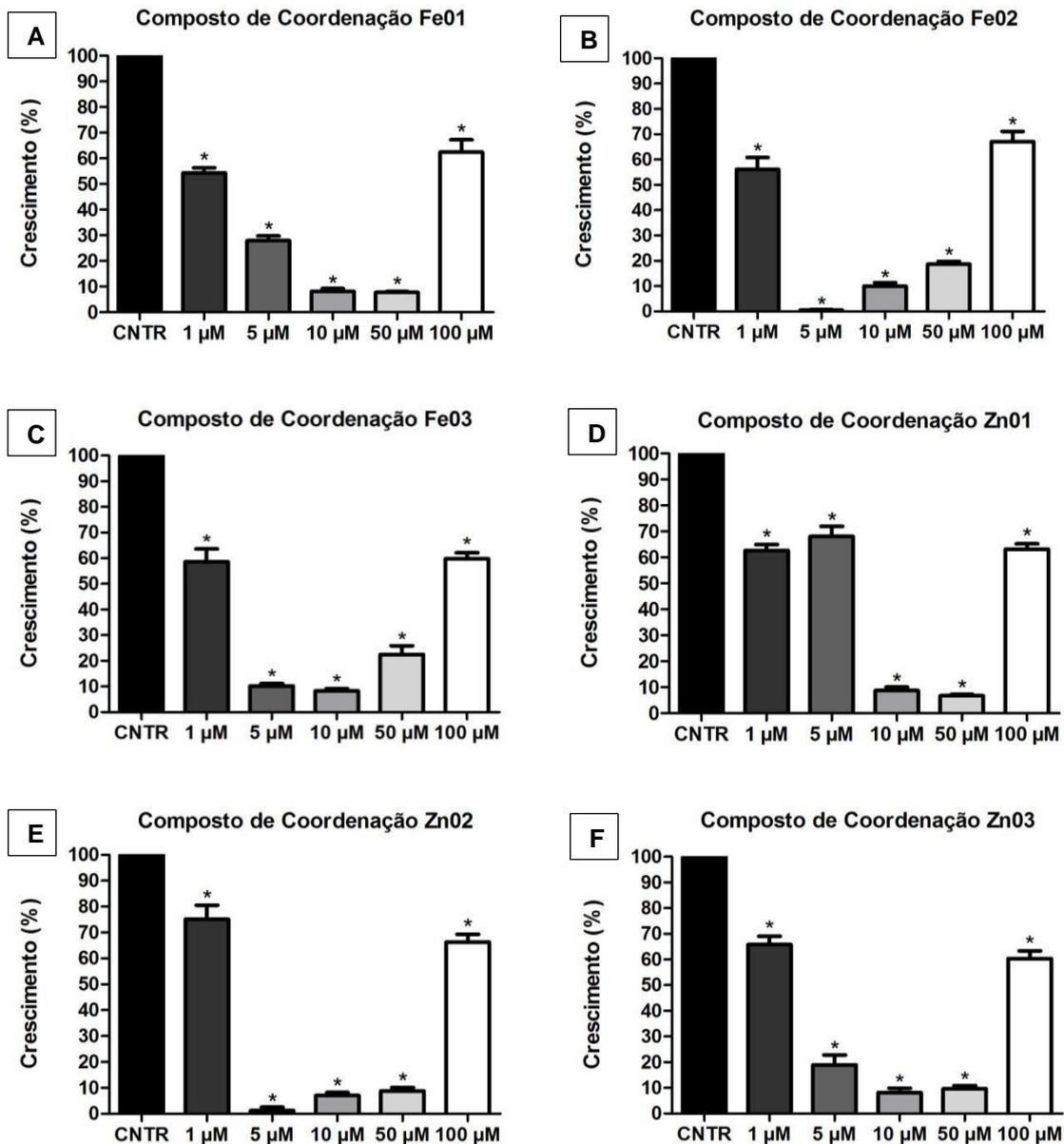
**Figura 4:** Visualização gráfica do ensaio de microdiluição de onde foi tirada a concentração mínima inibitória dos compostos Fe01 (A), Fe02 (B), Fe03 (C), Zn01 (D), Zn02 (E) e Zn03 (F) sobre *S. aureus* MRSA 33591, após 20 h de incubação. \*p < 0,05

Nos ensaios realizados com *P. aeruginosa* ATCC 9027, foi possível observar que os compostos Fe02, Fe03, Zn02 e Zn03 foram os mais ativos, com MIC de 5 µM, não havendo diferença significativa de quando tratadas com 10 µM (Fig. 5 B, 5 C, 5 E e 5 F).



**Figura 5:** Visualização gráfica do ensaio de microdiluição de onde foi tirada a concentração mínima inibitória dos compostos Fe01 (A), Fe02 (B), Fe03 (C), Zn01 (D), Zn02 (E) e Zn03 (F) sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027, após 20 h de incubação. \*p < 0,05

Nos ensaios realizados com *P. aeruginosa* ATCC 15442, foi possível observar que os compostos Fe02 e Zn02 foram os mais ativos, com MIC de 5 µM (Fig. 6 B e 6 E). Ao contrário de *P. aeruginosa* ATCC 9027, os compostos Zn03 e Fe03 não apresentaram atividade antibacteriana significativa nesta concentração.



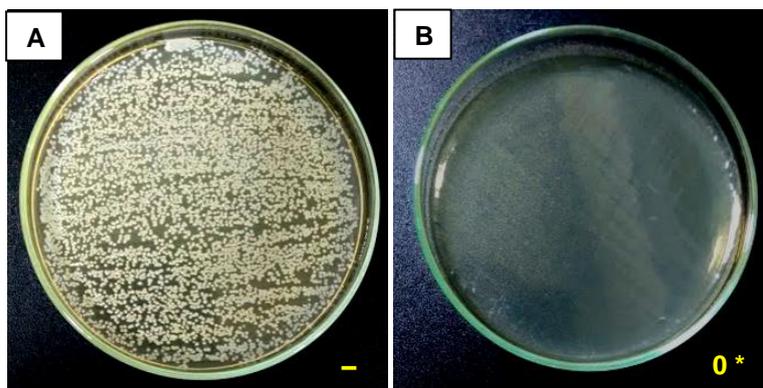
**Figura 6:** Visualização gráfica do ensaio de microdiluição de onde foi tirada a concentração mínima inibitória dos compostos Fe01 (A), Fe02 (B), Fe03 (C), Zn01 (D), Zn02 (E) e Zn03 (F) sobre *P. aeruginosa* ATCC 15442, após 20 h de incubação. \* $p < 0,05$

Ao final dos ensaios de MIC, os compostos Zn02 e Fe02 na concentração de 5 µM foram escolhidos para a realização dos próximos testes, exceto para *S. aureus* ATCC 25923, que não teve o crescimento inibido pelo composto de zinco. Os compostos Zn03 e Fe03 não foram escolhidos, pois mesmo que estes tenham possuído boa atividade antibacteriana, seu ligante L3 foi tão ativo quanto, ou seja, a

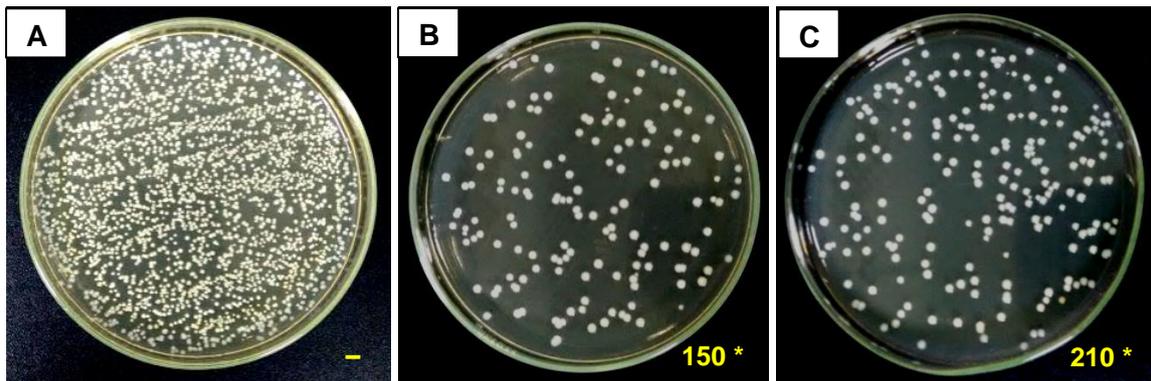
presença do metal não fez uma diferença significativa na ação do composto (Anexo 1).

#### 4.2. Viabilidade Celular Bacteriana

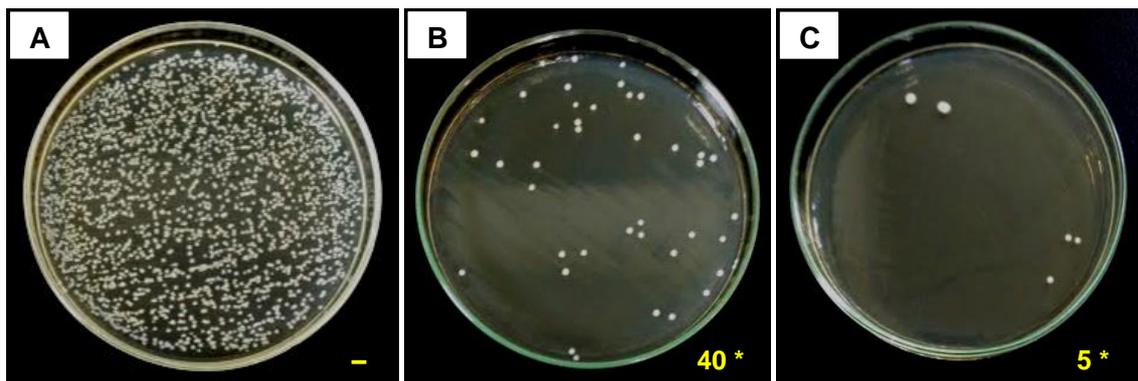
Ao final do ensaio de MIC, as bactérias tratadas com 5  $\mu$ M dos compostos de coordenação foram plaqueadas em placas de Petri contendo ágar MH para determinar se os compostos nesta concentração possuíam atividade bacteriostática ou bactericida. Para *S. aureus* ATCC 25923 o composto Fe02 foi bactericida (Fig. 7 B), para *S. aureus* MRSA 33591, *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *P. aeruginosa* ATCC 15442 este foi bacteriostático (Fig. 8 B, 9 B e 10 B) assim como o composto Zn02 (Fig. 8 C, 9 C e 10 C). O controle foi considerado como 100% viável, sendo assim, o composto Fe02 inibiu 100% do crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 (Fig. 7 B), cerca de 50% do crescimento de *S. aureus* MRSA 33591 (Fig. 8 B), 86% do crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 9027 (Fig. 9 B) e 98% do crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 15442 (Fig. 10 B). Já o composto Zn02 foi capaz de inibir cerca de 30% do crescimento de *S. aureus* MRSA 33591 (Fig. 8 C), 98% do crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 9027 (Fig. 9 C) e 92% do crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 15442 (Fig. 10 C).



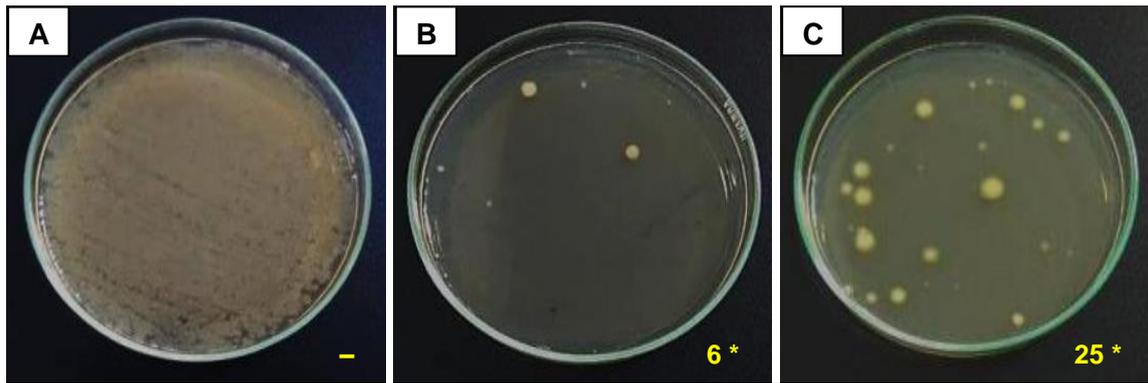
**Figura 7:** Imagem de placas de Petri contendo colônias de *S. aureus* ATCC 25923 tratada com o composto Fe02 (B), após 20 h de incubação. Abaixo da imagem é mostrado o número de colônias, (-) indica um número excessivo de colônias que impedem a contagem e o asterisco indica significância  $p < 0,05$ .



**Figura 8:** Imagem de placas de Petri contendo colônias de *S. aureus* MRSA 33591 tratada com o composto FeO<sub>2</sub> (B) e ZnO<sub>2</sub> (C), após 20 h de incubação. Abaixo da imagem é mostrado o número de colônias, (-) indica um número excessivo de colônias que impedem a contagem e o asterisco indica significância  $p < 0,05$ .



**Figura 9:** Imagem de placas de Petri contendo colônias de *P. aeruginosa* ATCC 9027 tratada com o composto FeO<sub>2</sub> (B) e ZnO<sub>2</sub> (C), após 20 h de incubação. Abaixo da imagem é mostrado o número de colônias, (-) indica um número excessivo de colônias que impedem a contagem e o asterisco indica significância  $p < 0,05$ .



**Figura 10:** Imagem de placas de Petri contendo colônias de *P. aeruginosa* ATCC 15442 tratada com o composto FeO<sub>2</sub> (B) e ZnO<sub>2</sub> (C), após 20 h de incubação. Abaixo da imagem é mostrado o número de colônias, (-) indica um número excessivo de colônias que impedem a contagem e o asterisco indica significância  $p < 0,05$ .

### 4.3. Inibição da Produção de Biofilme

A partir dos experimentos realizados foi possível observar que os compostos de coordenação FeO<sub>2</sub> e ZnO<sub>2</sub> foram capazes de diminuir a produção de biofilme tanto de *S. aureus* (Quadro 1 e 2) como de *P. aeruginosa* (Quadro 3 e 4).

**Quadro 1:** Densidades ópticas de *S. aureus* ATCC 25923 crescidos na ausência e presença dos compostos de coordenação e determinação da produção de biofilme segundo Stepanovic *et al.* (2007). O asterisco indica significância  $p < 0,05$ .

Tempo (h)	Ponto de Corte do Controle	Densidade óptica FeO <sub>2</sub>	Densidade óptica ZnO <sub>2</sub>	Biofilme
2	2,27 ± 0,08	0,99 ± 0,05*	1,50 ± 0,07	Não produtor
4	3,47 ± 0,17	0,98 ± 0,31*	1,39 ± 0,17*	Não produtor
6	1,79 ± 0,09	0,74 ± 0,01	0,50 ± 0,05*	Não produtor

**Quadro 2:** Densidades ópticas de *S. aureus* MRSA 33591 crescidos na ausência e presença dos compostos de coordenação e determinação da produção de biofilme segundo Stepanovic *et al.* (2007). O asterisco indica significância  $p < 0,05$ .

Tempo (h)	Ponto de Corte do Controle	Densidade óptica Fe02	Densidade óptica Zn02	Biofilme
2	0,93 ± 0,01	0,48 ± 0,04	0,66 ± 0,02	Não produtor
4	1,12 ± 0,01	0,72 ± 0,01	0,72 ± 0,02	Não produtor
6	0,51 ± 0,00	0,45 ± 0,01	0,36 ± 0,00*	Não produtor

**Quadro 3:** Densidades ópticas de *P. aeruginosa* ATCC 9027 crescidos na ausência e presença dos compostos de coordenação e determinação da produção de biofilme segundo Stepanovic *et al.* (2007).

Tempo (h)	Ponto de Corte do Controle	Densidade óptica Fe02	Densidade óptica Zn02	Biofilme
2	0,50 ± 0,00	0,28 ± 0,00	0,28 ± 0,00	Não produtor
4	0,36 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,32 ± 0,00	Não produtor
6	0,42 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,23 ± 0,00	Não produtor

**Quadro 4:** Densidades ópticas de *P. aeruginosa* ATCC 15442 crescidos na ausência e presença dos compostos de coordenação e determinação da produção de biofilme segundo Stepanovic *et al.* (2007). O asterisco indica significância  $p < 0,05$ .

Tempo (h)	Ponto de Corte do Controle	Densidade óptica Fe02	Densidade óptica Zn02	Biofilme
2	3,22 ± 0,15	1,93 ± 0,17	2,05 ± 0,33	Não produtor
4	3,99 ± 0,15	2,94 ± 0,31	2,34 ± 0,11*	Não produtor
6	2,70 ± 0,12	1,38 ± 0,19	1,52 ± 0,18	Não produtor

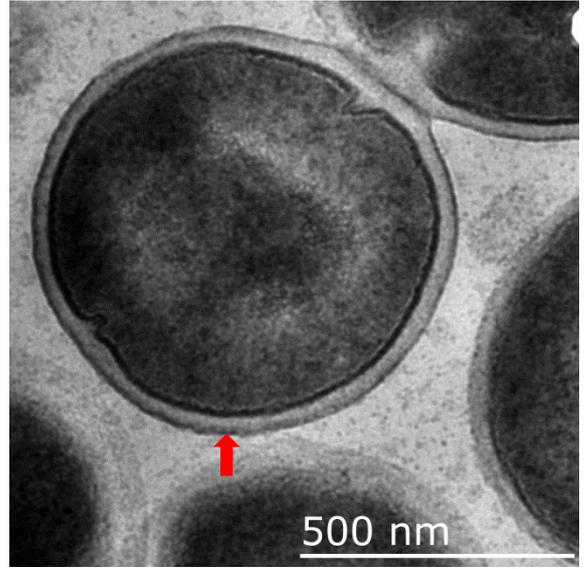
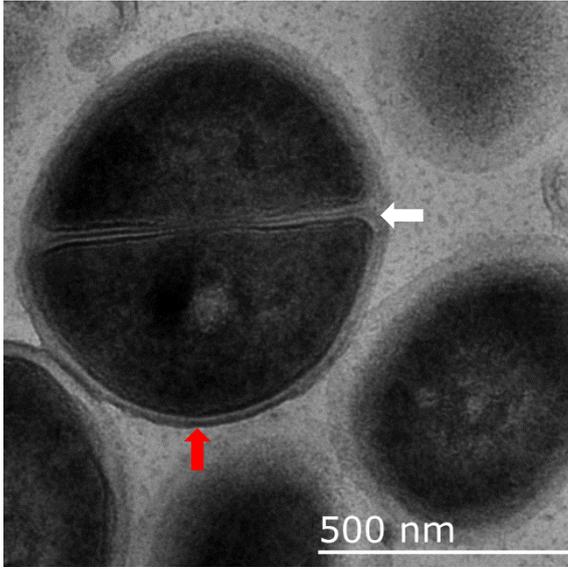
Ao final do ensaio foi possível observar a presença de material aderente no fundo da placa, indicando que apesar da atividade antibiofilme dos compostos de coordenação, estes não foram capazes de eliminar totalmente o biofilme bacteriano. Sendo assim, para determinar a porcentagem de inibição dos compostos sobre o biofilme bacteriano foi feita a leitura de DO. Esta indicou que não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e o tratamento, exceto para *S. aureus* ATCC 25923 (Anexos 2, 3 e 4).

#### **4.4. Alterações Ultraestruturais**

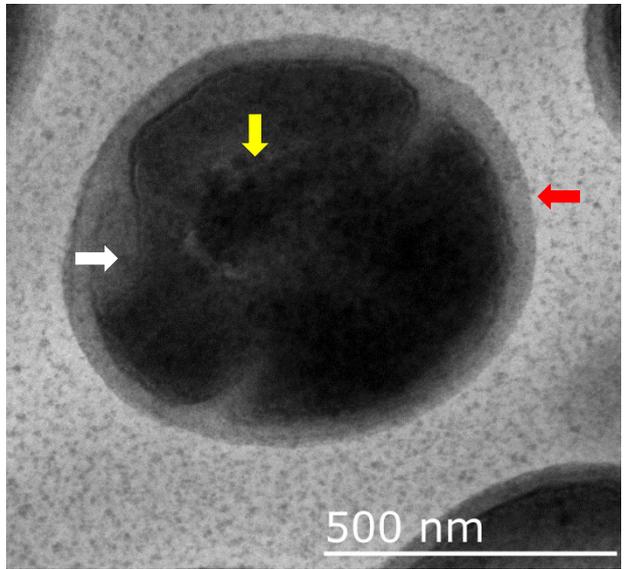
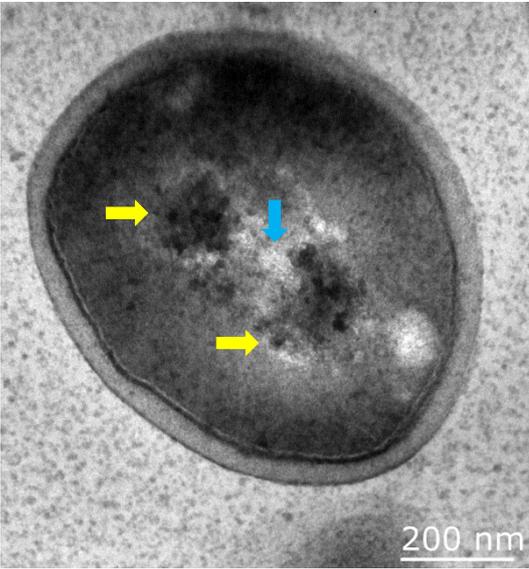
Para tentar identificar os possíveis alvos celulares dos compostos de coordenação, foi utilizada a microscopia eletrônica de transmissão.

Foi possível observar que as células de *S. aureus* MRSA 33591 sem nenhum tipo de tratamento apresentou forma, parede e divisão celular regular. Após 6 h de tratamento com o composto FeO<sub>2</sub> as células apresentaram divisão celular irregular, esvaziamento pontual do citoplasma e grânulos eletrondensos no citoplasma, provavelmente cromatina condensada. As células tratadas com ZnO<sub>2</sub> apresentaram alteração morfológica e na parede celular (Fig.11).

Controle



Fe02



Zn02

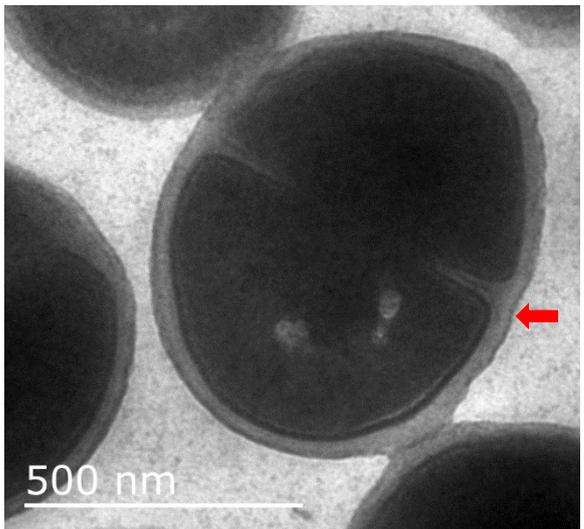
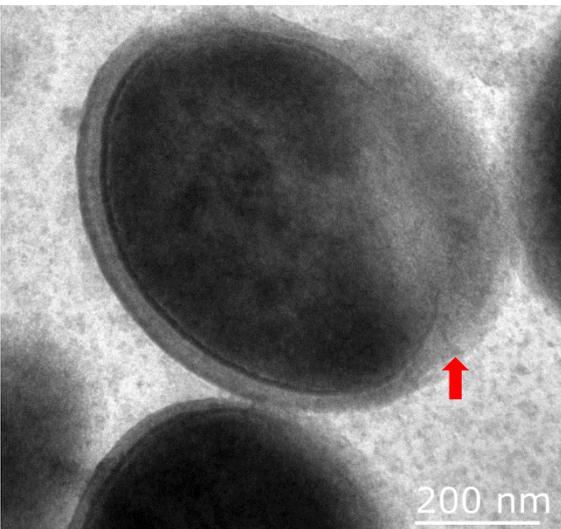
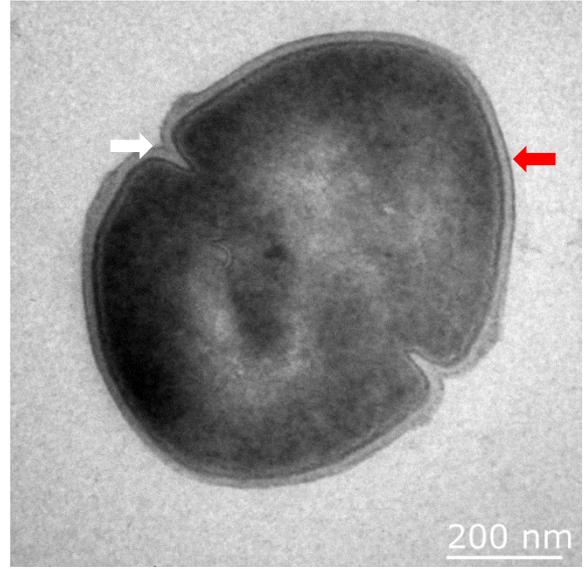
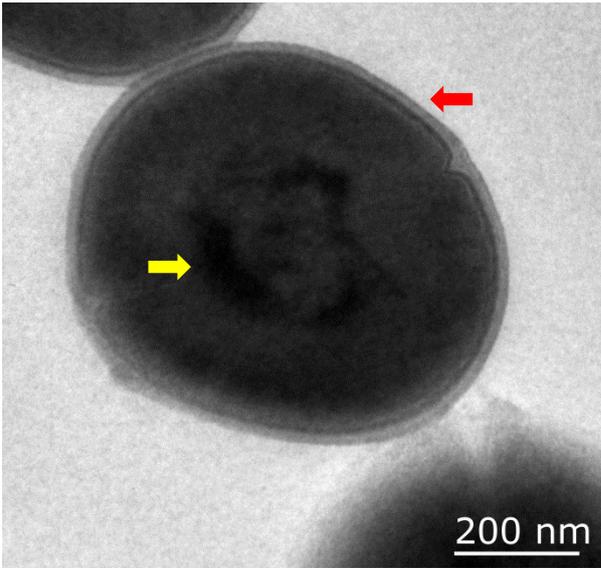


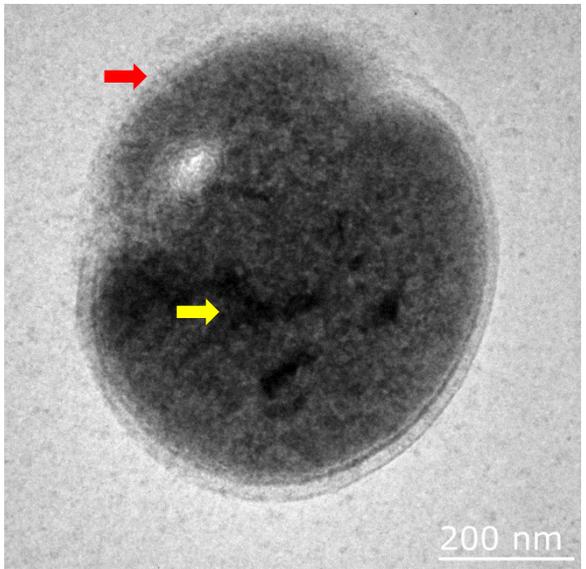
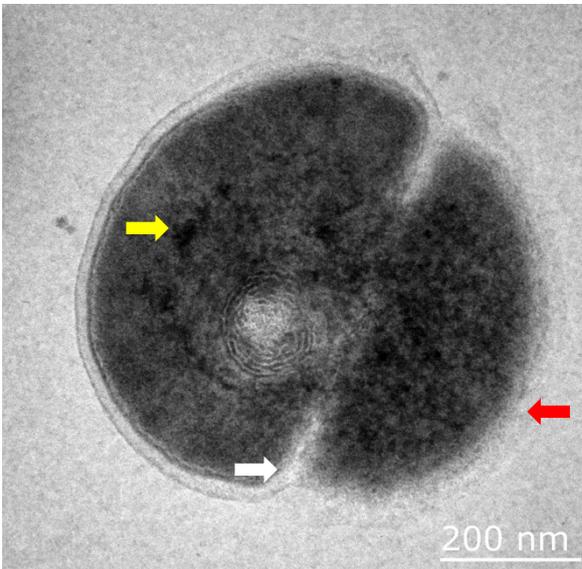
Figura 11: Imagens de *S.aureus* ATCC 25923 na ausência (controle) e presença dos compostos de coordenação após 6 h de incubação. Controle, as células apresentaram aspecto regular. A parede (seta vermelha) e a divisão celular (seta branca) também estão normais. FeO<sub>2</sub>, células apresentaram divisão irregular (seta branca), esvaziamento pontual do citoplasma (seta azul) e grânulos eletrondensos no citoplasma (seta amarela), indicando provável condensação de cromatina. ZnO<sub>2</sub>, células apresentaram alterações na morfologia e parede celular (seta vermelha).

As células de *P. aeruginosa* ATCC 9027 sem nenhum tratamento apresentaram morfologia regular, parede celular e cromatina normais. Após 6 h de tratamento com o composto FeO<sub>2</sub>, as células apresentaram divisão irregular, alterações na morfologia e parede celular. Além disso, foi possível observar grânulos eletrondensos no citoplasma, provavelmente cromatina condensada. Quando tratadas com o composto ZnO<sub>2</sub>, as células de *P. aeruginosa* ATCC 9027 apresentaram divisão irregular, condensação de cromatina, degradação na parede e esvaziamento do citoplasma (Fig. 12).

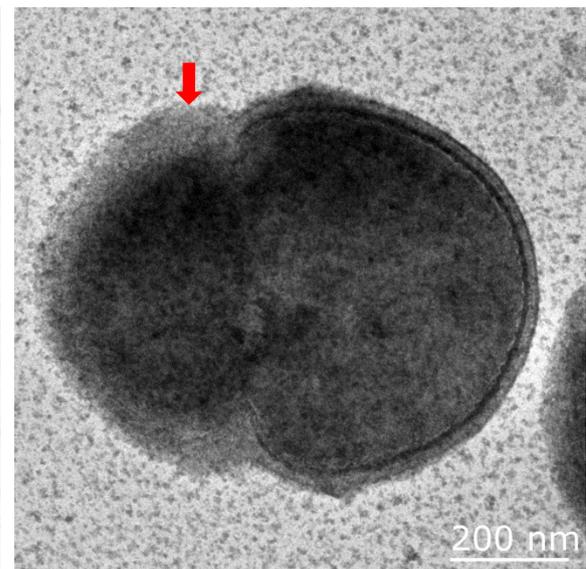
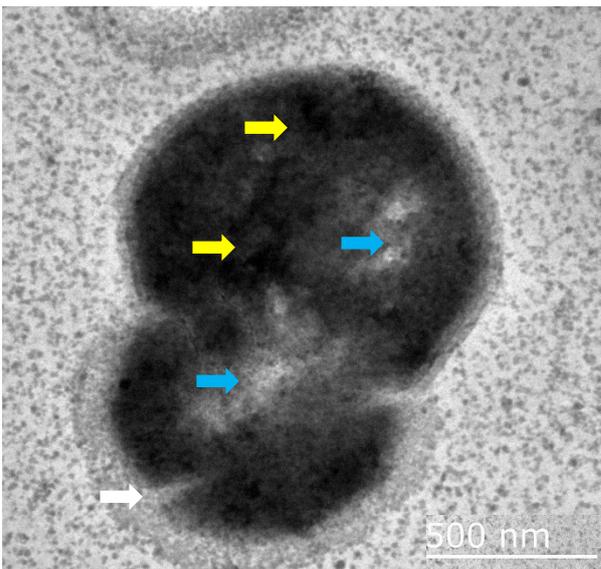
Controle



FeO2



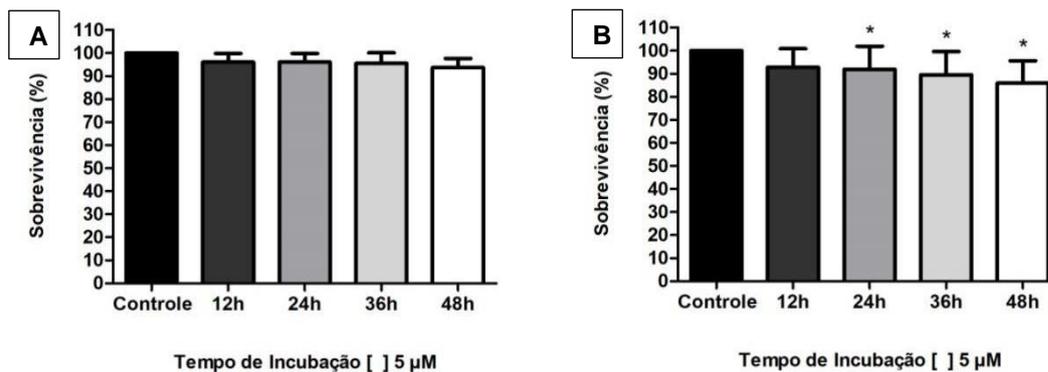
ZnO2



**Figura 12:** Imagens de *P. aeruginosa* ATCC 9027 na ausência (controle) e presença dos compostos de coordenação, após 6 h de incubação. Controle, as células apresentaram morfologia regular, parede celular uniforme (seta vermelha), cromatina com distribuição normal (seta amarela) e divisão celular (seta branca) também normal. FeO<sub>2</sub>, células apresentaram alterações na parede celular (seta vermelha), divisão celular irregular (seta branca) e provável condensação de cromatina (seta amarela). ZnO<sub>2</sub>, as células apresentaram degradação da parede celular (seta vermelha), alteração na divisão celular (seta branca), condensação de cromatina (seta amarela) e esvaziamento pontual do conteúdo citoplasmático (seta azul).

#### 4.5. Análise da Toxicidade dos Compostos de Coordenação

Para análise do nível de toxicidade dos compostos de coordenação, nematoides de vida livre *P. redivivus* foram incubados com os compostos FeO<sub>2</sub> e ZnO<sub>2</sub>, na concentração de 5 µM, por 48 h. Foi possível observar que o composto FeO<sub>2</sub> foi mais tóxico que o composto ZnO<sub>2</sub>, matando cerca de 10% da população de nematoides (Fig. 13).



**Figura 13:** Visualização gráfica do ensaio de toxicidade para o nematoide de vida livre *P. redivivus* incubado com o composto de coordenação ZnO<sub>2</sub> (A) e FeO<sub>2</sub> (B). \*p < 0,05

## 5. DISCUSSÃO

Apesar do avanço tecnológico e do grande número de antimicrobianos conhecidos, o surgimento de cepas de bactérias multirresistentes está avançando mais rapidamente do que as pesquisas para novos fármacos. Relatórios de saúde do mundo todo mostram que a ameaça da resistência aos antibióticos está aumentando a cada dia, o que torna cada vez menor o número de antibióticos eficazes, fazendo um regresso da medicina quase à “era pré-antibióticos”, quando as doenças bacterianas não podiam ser tratadas e a maioria dos pacientes morria de infecção.

Durante a última década as taxas de infecções por bactérias multirresistentes têm aumentado rapidamente e um relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) deste ano lista as bactérias mais preocupantes. Entre elas estão *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos, considerada um dos patógenos de nível crítico (nível 1) e MRSA um dos patógenos de alta prioridade (nível 2) para o desenvolvimento de antimicrobianos (WHO, 2017). Nos Estados Unidos, em 2014, *P. aeruginosa* foi responsável por 8.458 (5,7%) casos de infecções hospitalares. Já na Europa, em 2015, esta bactéria apresentando resistência combinada a vários antibióticos foi encontrada em 14,9% dos isolados bacterianos sendo reconhecida como uma das principais causas de infecções. No Brasil, em 2012, dos adultos hospitalizados em UTIs, 8,9% das infecções foram causadas por *P. aeruginosa*. Nas UTIs pediátricas, esta foi responsável por 8,5% das infecções. As infecções causadas por MRSA sofreu um decréscimo nos últimos anos, no entanto os números ainda são altos. Em 2014, nos Estados Unidos, ocorreram 30.902 infecções severas por esta bactéria, cerca de 20% das infecções hospitalares. Na União Europeia houve um decréscimo de infecções de 18,8% em 2011 para 16,8% em 2015, no entanto infecções causadas por MRSA continuam a ser uma prioridade de saúde pública já que oito dos 30 países reportaram percentagens de infecções acima de 25%. No Brasil, em 2012, dos adultos hospitalizados em UTIs, 16,5% das infecções foram causadas por *S. aureus* e nas UTIs pediátricas, *S. aureus* foi responsável por 11,7% das infecções hospitalares. É importante destacar que o alto índice de resistência verificado em vários países está associado à utilização

indiscriminada de antimicrobianos pela população (ANVISA, 2015; ECDC, 2017; CDC, 2016).

Nesse contexto, é necessária maior inovação e investimento na investigação e desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos, vacinas e ferramentas de diagnóstico. A OMS juntamente com os centros de pesquisa em vários países está desenvolvendo planos de ação que reforcem os sistemas de saúde e de vigilância, a fim de prevenir e controlar a resistência aos antimicrobianos em todos os setores para garantir a disponibilidade de novos agentes antimicrobianos para o futuro (WHO, 2017).

Estudos recentes tem demonstrado que compostos de coordenação possuem alta atividade antimicrobiana. Foi mostrado que compostos de zinco possuem atividade antitoxoplasma, antifúngica e antibacteriana, incluindo *S. aureus* e *P. aeruginosa* (POULTER *et al.*, 2011; BATISTA *et al.*; CHIEM *et al.*, EBRAHIMI *et al.*, 2015). Já os compostos de ferro tem apresentado atividade significativa como antifúngicos, antibacterianos e contra protozoários (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2013; MATHIAS *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*; PORTES *et al.*; RIBEIRO *et al.*, 2015)

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade antibacteriana de compostos de coordenação de zinco e ferro. Os resultados obtidos mostraram que dois dos seis compostos de coordenação testados (ZnO<sub>2</sub> e FeO<sub>2</sub>), possuem atividade sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa*, bactérias responsáveis por inúmeras infecções hospitalares. Inicialmente foi determinada a MIC destes compostos para em seguida analisar como estes agiam na morte celular. Neste trabalho, os compostos de coordenação que apresentaram mais de 95% de inibição foram selecionados para os ensaios. Foi observado que altas concentrações dos compostos não inibem o crescimento bacteriano, provavelmente pela precipitação destes. Concentrações abaixo de 5 µM também não mostraram boa atividade, indicando que as bactérias conseguem reverter a ação dos compostos ao montar uma resposta de defesa contra estes, provavelmente super expressando bombas de efluxo ou degradando os compostos de coordenação (BLAIR *et al.*, 2011). No entanto, estudos mais aprofundados em biologia molecular são necessários.

Nos ensaios realizados foi possível observar que, de maneira geral, os ligantes dos compostos (L2 e L3) possuíam atividade antibacteriana. Esta atividade inibitória também foi demonstrada por Morcelli e colaboradores (2016) que testou os compostos de ferro FeO<sub>2</sub> e FeO<sub>3</sub> em várias linhagens de células leucêmicas e observou que para algumas linhagens (THP-1 e U937) o ligante foi mais ativo que o composto de coordenação. Desse modo, nesse trabalho, não se justificaria continuar utilizando um composto, cujo ligante seja tão ativo quanto ao composto coordenado a um metal, seria mais barato e mais viável utilizar apenas o ligante. Como o objetivo foi estudar a ação de compostos de coordenação, para dar continuidade nos testes, foram selecionados apenas os compostos cuja atividade antibacteriana foi mais significativa que a de seus ligantes.

A produção de biofilmes bacterianos é um importante indicador epidemiológico de distintos processos infecciosos, tanto em humanos quanto em animais. (COSTERTON *et al.*, 1999; FITZPATRICK *et al.*, 2005). Biofilmes produzidos por *S. aureus* e *P. aeruginosa* estão frequentemente relacionados a infecções nosocomiais, tais como infecções no trato urinário através da formação de biofilmes na superfície de cateteres permanentes. Tais infecções são altamente resistentes, de difícil tratamento necessitando de concentrações mais elevadas de antibiótico e eventualmente são fatais (SINGH *et al.*, 2009; GHAFOR *et al.*, 2011; COLE *et al.*, 2014; MCCARTHY *et al.*, 2015). Neste trabalho foi investigado se os compostos de coordenação ZnO<sub>2</sub> e FeO<sub>2</sub> são capazes de inibir o biofilme produzido por estas duas bactérias. Os resultados indicaram que estes compostos foram capazes de diminuir o biofilme bacteriano, mas não foram capazes de eliminá-lo completamente. São poucos os trabalhos que mostram compostos de coordenação com atividade antibiofilme. Atualmente, os compostos de coordenação de gálio (III) são os que apresentaram melhores resultados, tanto *in vitro* quanto em modelos de infecções *in vivo*, sendo capazes de inibir biofilmes produzidos por *P. aeruginosa*, inibir a liberação de exotoxinas e agir sinergicamente com outros antibióticos melhorando a atividade destes (KANEKO *et al.*, 2007; RZHEPISHEVSKAA *et al.*, 2014; HAKOBYAN *et al.*, 2016). As propriedades farmacológicas do gálio (III) dependem do mimetismo químico, substituindo o ferro (III) dentro de moléculas celulares, perturbando o metabolismo bacteriano. Dessa forma, os distúrbios causados por compostos de coordenação de gálio (III) são afetados pela

disponibilidade de ferro e pelo estado metabólico das células (MINANDRI *et al.*, 2014).

Para tentar melhor entender o mecanismo de ação e os alvos intracelulares dos compostos de coordenação ZnO<sub>2</sub> e FeO<sub>2</sub>, foi utilizada a microscopia eletrônica de transmissão. A partir das imagens obtidas, foi possível observar que, de maneira geral, estes compostos parecem agir alterando a parede celular e a divisão celular. Além disso, foi possível observar grânulos eletrondensos no citoplasma que podem indicar provável condensação de cromatina. Uma das hipóteses é que o íon metálico do composto de coordenação poderia se ligar ao DNA e promover a formação destas aglomerações eletrondensas, embora sejam necessários maiores estudos para comprovar essa hipótese. Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos. Fernandes e colaboradores (2010), em um trabalho que testou vários compostos de coordenação, entre eles de ferro e zinco, observaram grânulos eletrondensos no citoplasma de células de *S. aureus*. Neste trabalho o composto de zinco foi mais ativo que o composto de ferro, mas ambos levaram ao aparecimento destes grânulos. Os autores ainda associaram a ação do composto de ferro às alterações na parede celular e o composto de zinco às alterações no DNA bacteriano e divisão celular. Em outro trabalho, Fernandes e colaboradores (2014) observaram que compostos de zinco, entre outras alterações, foram capazes de levar à condensação do DNA de células leucêmicas. López-Heras e colaboradores (2015) também analisaram alterações ultraestruturais causadas por íons metálicos em *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Em seus estudos eles mostraram que os íons de prata se dissociavam do composto e levavam à degradação da parede celular, esvaziamento do citoplasma e, em *P. aeruginosa*, a um destacamento da membrana plasmática da parede celular.

Os íons metálicos, tais como zinco e ferro, são essenciais para virulência e realização das funções metabólicas vitais de diversos patógenos, incluindo *S. aureus* e *P. aeruginosa* (MA *et al.*, 2016). No entanto, em excesso, estes metais são tóxicos para as células. Foi visto que o excesso de íons de zinco prejudica o crescimento bacteriano e reduz a capacidade de resposta ao estresse oxidativo (MCDEVITT *et al.*, 2011). O excesso de íons de ferro, por sua vez, é responsável pelo aumento do estresse oxidativo que levam a alterações na parede celular e

peroxidação lipídica (ANZALDI & SKAAR, 2010). Estes trabalhos ajudam a reforçar a ideia de que os compostos de coordenação de zinco e ferro possam estar atuando na alteração da divisão celular, parede celular e material genético das bactérias.

A toxicidade induzida por metais, principalmente na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) é bastante estudada. Sabe-se que a formação de radicais livres mediada por metais provoca várias modificações nas bases nitrogenadas do DNA, peroxidação lipídica e alteração na homeostase celular. O íon de ferro, por exemplo, está envolvido na geração do radical superóxido e do radical hidroxila em condições fisiológicas, sendo tóxico para as células (CRONIN *et al.*, 2005). Neste contexto, foi analisada a toxicidade dos compostos de coordenação ZnO<sub>2</sub> e FeO<sub>2</sub> em nematoides de vida livre.

O uso do nematoide *Caenorhabditis elegans* já está bem definido como um modelo pertinente e prático para seleção de novos compostos com atividades antimicrobianas, mas este é incapaz de sobreviver a 37 °C, sendo assim o nematoide *P. redivivus* foi escolhido (GRAVATO-NOBRE & HODGKINE, 2005; MOY *et al.*, 2006). As vantagens de se usar este modelo invertebrado estão relacionadas ao curto tempo experimental, poucas despesas para sua manutenção e sua homologia genética com mamíferos (KURZ & EWBANK, 2000). Mathias (2014) obteve bons resultados ao utilizar o *P. redivivus* como modelo *in vivo*. Em seu trabalho, a autora testou a toxicidade de compostos de coordenação (entre outras substâncias bioativas) e a capacidade destes em aumentar a sobrevivência dos nematoides quando infectados com o fungo *Sporothrix schenckii*. Nos ensaios com ZnO<sub>2</sub> e FeO<sub>2</sub> foi possível observar que apenas o composto de coordenação de ferro possui toxicidade estatisticamente significativa quando comparado ao controle. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para esclarecer tal resultado.

A crescente necessidade de novos fármacos para combater as bactérias multirresistentes é um estímulo para dar continuidade aos estudos com compostos de coordenação. Os compostos ZnO<sub>2</sub> e FeO<sub>2</sub> apresentaram bons resultados, porém as descobertas aqui apresentadas necessitam de aprofundamento por estudos moleculares, para assim ser possível identificar os mecanismos de ação pelo qual estes inibem o crescimento bacteriano.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos nos experimentos realizados neste trabalho é possível concluir que:

- Dos seis compostos de coordenação testados, dois (ZnO<sub>2</sub> e FeO<sub>2</sub>) possuem atividade antibacteriana, inibindo o crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa* na concentração de 5 µM;
- Os compostos de coordenação testados são capazes de diminuir o biofilme formado por *S. aureus* e *P. aeruginosa*, mas não são capazes de eliminá-lo totalmente;
- Os compostos ZnO<sub>2</sub> e FeO<sub>2</sub> atuaram na alteração da morfologia bacteriana, provocando alterações na parede celular, divisão celular e provável condensação da cromatina.
- O composto ZnO<sub>2</sub> não apresentou toxicidade estatisticamente significativa para os nematoides *P. redivivus*. Já o composto FeO<sub>2</sub> foi tóxico para os nematoides após 24 h de incubação.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN L.H., et al. Design, characterization, teratogenicity testing, antibacterial, antifungal and DNA interaction of few high spin Fe(II) schiff base amino acid complexes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 111, p. 266–276, 2013.

AGARWALA, M.; CHOUDHURY, B.; YADAV, R.N.S. Comparative study of antibiofilm activity of copper oxide and iron oxide nanoparticles against multidrug resistant biofilm forming uropathogens. **Indian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 365-368, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resistência Microbiana – Mecanismos e Impacto Clínico, 2007**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo3/mecanismos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm)>. Acesso em: 07 fev. 2016

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde nº 11, ano VI**. Brasília, 2015.

ALMEIDA, V.L., et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução, **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

ANZALDI, L.L.; SKAAR, E.P. Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 4977-4989, 2010.

ARCHER, N.K., et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. **Virulence**, v. 5, n. 3, p. 445-459, 2011.

BATISTA, L.C., et al. Antiproliferative activity and conversion of tachyzoite to bradyzoite of *Toxoplasma gondii* promoted by new zinc complexes containing sulfadiazine. **Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 1000606-100617, 2015.

BERALDO, H. Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, N°6, p. 4-6, 2005.

BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.10, p. 91-100, 1990.

BLAIR, J.M.A., et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 42, n. 13, p. 42–51, 2011.

BRUIJNINCX, P.; SADLER, P. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 2, p. 197–206, 2008.

CARREL M., PERENCEVICH E.N., DAVID M.Z. USA300 Methicillin-Resistant. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 11, p. 1973-1980, 2015.

CASTILLO-JUÁREZ, I. et al. Role of quorum sensing in bacterial infections. **World Journal of Clinical Cases**, v. 3, n. 7, p. 575–599, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **National action plan for combating antibiotic-resistant bacteria**. Washington, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the national healthcare safety network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014**. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, p. 14, 2016.

CHRISTENSEN G.D., et al. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985.

CHIEM, K., et al. Inhibition of aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase type Ib-mediated amikacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* by zinc and copper pyrithione. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5851-5853, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing**. American Society for Microbiology. p. 53-62, 2005

COHEN, S.M. New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, p. 115-120, 2007.

COLE, S.J., et al. Catheter-associated urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by exopolysaccharide-independent biofilms. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 5, p. 2048-2058, 2014.

COSTERTON, J.W., et al. Microbial biofilms. **Annual Review Microbiology**. v. 49, p. 711–745, 1995.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.

CREAVEN B.S., et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper(II) and manganese(II) complexes of coumarin-6,7-dioxyacetic acid (cdoaH<sub>2</sub>) and 4-methylcoumarin-6,7-dioxyacetic acid (4-MecdoaH<sub>2</sub>): X-ray crystal structures of [Cu(cdoa)(phen)<sub>2</sub>].8.8H<sub>2</sub>O and [Cu(4-Mecdoa)(phen)<sub>2</sub>].13H<sub>2</sub>O (phen=1,10-phenanthroline). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, p. 1108-1119, 2007.

CRONIN M.T.; MORRIS H.; VALKO M. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1161-1208, 2005.

CROW, D. **In search of medicine buddha: a Himalayan journey**. São Paulo: Pensamento, p. 229, 2004.

DEL FILHO, F.S.; FILHO, T.R.; GROppo, F.C. Resistência Bacteriana. **Portal Educação**, 2008.

DESOIZE, B. Antibodies in cancer treatment. **Critical Reviews Oncology Hematology**, v. 62, p. 23, 2007.

DESOIZE, B.; MADOULET, C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. **Critical Reviews Oncology Hematology**, v. 42, p. 317, 2002.

DEURENBERG, R. & STOBBERINGH, E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, p. 747-763, 2008.

DREIER, J.; RUGGERONE, P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 660, 2015.

EBRAHIMI, H.P., et al. Metal-based biologically active azoles and b-lactams derived from sulfa drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 1121-1131, 2016.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). **Antimicrobial Resistance and Healthcare-Associated Infections**. Annual Epidemiological Report, Stockholm, 2014.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). **Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance 2015**. Stockholm, p. 120, 2017.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: < <http://www.bacterio.net/pseudomonas.html> >. Acesso em: 20 jan. 2017.

EVANGELISTA S., DE OLIVEIRA A. C. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a global problem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 68, p. 128-35, 136-43, 2015.

FERNANDES, C. et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of FeIII, CoII, CuII and ZnII complexes probed by transmission electron microscopy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, p. 1214-1223, 2010.

FERNANDES, C. et al. Synthesis, characterization, antibacterial and antitumoral activities of mononuclear zinc complexes containing tridentate amine based ligands with N3 or N2O donor groups. **Inorganica Chimica Acta**, v. 416, p. 35-48, 2014.

FERNANDES, C. et al. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by new copper(II) complexes containing naphthyl groups via interaction with death receptors. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 153, p. 68-87, 2015.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R.E.W. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 661–681, 2012.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA J.P. Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1973-1976, 2005.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–33, 2010.

FUQUA, W.C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 2, p. 269–275, 1994.

GARA, J.P.O.; HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **Society**, v. 50, p. 582–587, 2001.

GHAFOOR, A.; HAY, I.D.; REHM, B.H.A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. **American Society for Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5238-5246, 2011.

GOLD, H.S.; MOELLERING, R.C. Antimicrobial-drug resistance. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 19, p. 1445-53, 1996.

GOODMAN, L.S. e GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, ed. 11, 2010.

GOOTZ T.D. The global problem of antibiotic resistance. **Critical Reviews in Immunology**, v. 30, p. 79–93, 2010.

GRAVATO-NOBRE, M.J.; HODGKIN, J. *Caenorhabditis elegans* as a model for innate immunity to pathogens. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 741-751, 2005.

HAKOBYAN, S. et al. Influence of chelation strength and bacterial uptake of gallium salicylidene acylhydrazide on biofilm formation and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 160, p. 24-32, 2016.

HOLM, A.; VIKSTRÖM, E. Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1–7, 2014.

HUANG, K.C. et al. Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 49, p. 19282–19287, 2008.

KALINOWSKA U.L., et al. Antibacterial activity and cytotoxicity of silver(I) complexes of pyridine and (Benz)imidazole derivatives. X-ray crystal structure of [Ag(2,6-di(CH<sub>2</sub>OH)py)<sub>2</sub>]NO<sub>3</sub>. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 87, 2016.

KANEKO, Y. et al. The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa*

iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 877-888, 2007.

KHAN, S.N.; KHAN, A.U. Breaking the spell: combating multidrug resistant “Superbugs”. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–11, 2016.

KONEMAN, E.W., et al. **Diagnóstico Microbiológico**. Medsi Editora Médica e Científica Ltda., p. 466, 2001.

KOREEN, L., et al. Typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic microand macrovariation. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 792–799, 2004.

KURZ, C.L.; EWBANK, J.J. *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. **Trends Microbiololy**, v. 8, n. 3, p. 142-144, 2000.

LI, Y.H.; TIAN, X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. **Sensors**, v. 12, p. 2519–2538, 2012.

LISTER, J.L.; HORSWILL, A.R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 178, 2014.

LÓPEZ-HERAS M., et al. Towards understanding the antibacterial activity of Ag nanoparticles: electron microscopy in the analysis of the materials-biology interface in the lung. **Royal Society of Chemistry**, v. 2, p. 312-326, 2015.

MA, L; TERWILLIGER, A.; MARESSO A.W. Iron and zinc exploitation during bacterial pathogenesis. **Metallomics**, v. 7, n. 12, p. 1541-1554, 2015.

MAI-PROCHNOW, A.; BRADBURY, M.; MURPHY, A.B. Draft genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (DSM 1128), an important rhamnolipid surfactant producer and sterility testing strain. **Genome Announcements**, v. 3, n. 5, p. e01259, 2015.

MATHIAS L.S. ***Sporothrix spp.* e a bioatividade do extrato de *Capsicum annum* L. e moléculas sintéticas não convencionais: multi-avaliação de resposta in vitro e em modelo invertebrado**. Tese de Doutorado em Ciência Animal pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2014

MCCARTHY, H. et al. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p. 1–9, 2015.

MCDEVITT C.A. et al. A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 11, p. 1002357, 2011.

MINANDRI, F. et al. Promises and failures of gallium as an antibacterial agente. **Future Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 379-397, 2014.

MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biology**, v. 5, n. 11, p. 307, 2007.

MORCELLI, S.R., et al. Synthesis, characterization and antitumoral activity of new di-iron(III) complexes containing naphthyl groups: Effect of the isomerism on the biological activity. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 67, p. 22–24, 2016.

MOY, T.I. Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model. **PNAS**, v. 103, n. 27, p. 10414–10419, 2006.

NIKAIDO, H. Multidrug resistance in bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 2, p. 119–146, 2009.

OLIVER, J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 4, p. 415–425, 2010.

OLIVEIRA, R.B.; ALVES, R.J. Agentes Antineoplásicos Biorredutíveis: Uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, p. 976, 2002.

OTTO, M. *Staphylococcal* Biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 207–228, 2009

PANESSO, D. et al. Methicillin-susceptible, vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, Brasil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1844–1848, 2015.

PORTES, J.A. et al. Reduction of *Toxoplasma gondii* development due to inhibition of parasite antioxidant enzymes by a dinuclear iron(III) compound. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7374–7386, 2015.

POULTER N., et al. Plasma deposited metal Schiff-base compounds as antimicrobials. **New Journal of Chemistry**, v. 35, p. 1477–1484, 2011.

PRAGASAM, A.K., et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* with discrepant carbapenem susceptibility profile. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 12, 2016

RIBEIRO, T.P., et al. Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 67–76, 2015.

RODRÍGUEZ-ARGÜELLES, M.C. et al. Antibacterial and antifungal activity of metal(II) complexes of acylhydrazones of 3-isatin and 3-(N-methyl)isatin. **Polyhedron**, v. 28, n. 11, p. 2187–2195, 2009.

ROSSI F., et al. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. **New England Journal of Medicine**, v. 370, p. 1524–1531, 2014

RZHEPISHEVSKA, O. et al. The gallium(III)–salicylidene acylhydrazide complex shows synergistic anti-biofilm effect and inhibits toxin production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 138, p. 1–8, 2014.

SCHAEFLER, S.; PERRY, W.; JONES, D. Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* phage type 92. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, n. 1, p. 74-80, 1979.

SCHLIEVERT, P.M., CASE L.C. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols. **Springer**; New York, USA. Molecular analysis of Staphylococcal superantigens, p. 113–126, 2007.

SILHAVE, T.J.; KAHNE D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 5, p. a000414, 2010.

SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias Utilizadas no Combate a Resistência Bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844–855, 2006.

SINGH, R., et al. Heavy metals and living systems: an overview. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43, n. 3, p. 246-253, 2011.

SINGH, R., et al. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1067-1073, 2009.

SOUZA, N.B., et al. Antiplasmodial activity of iron(II) and ruthenium(II) organometallic complexes against *Plasmodium falciparum* blood parasites. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 981-988, 2015.

SPICER J. **Bacteriologia, micologia e parasitologia clinicas**. Editora Guanabara Koogan. Ed. 1, p. 232, 2002.

STARKEY, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 11, p. 3492–3503, 2009.

STEPANOVIC, S., et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. **APMIS**, v. 115, p. 891–9, 2007.

STORR, T. THOMPSON, K.H., ORVIG, C. Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 35, p. 534-544, 2006.

TAVARES,W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**, 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Medicine**, v.119, p. 3–10, 2006.

THOMPSON, K.H., ORVIG, C. Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. **The Royal Society of Chemistry**, p. 761–764, 2006.

TREANGEN, T.J., et al. Complete genome sequence of the quality control strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923. **Genome Announcements**, v. 2, n. 6, p. e01110-01114, 2014.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, p. 775-781, 2000.

WANG, Y., et al. Genome sequence of the nonpathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 15442. **Genome Announcements**, v. 2, n. 2, p. e00421, 2014.

WILLIAMS, P.; CÁMARA, M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 182–191, 2009.

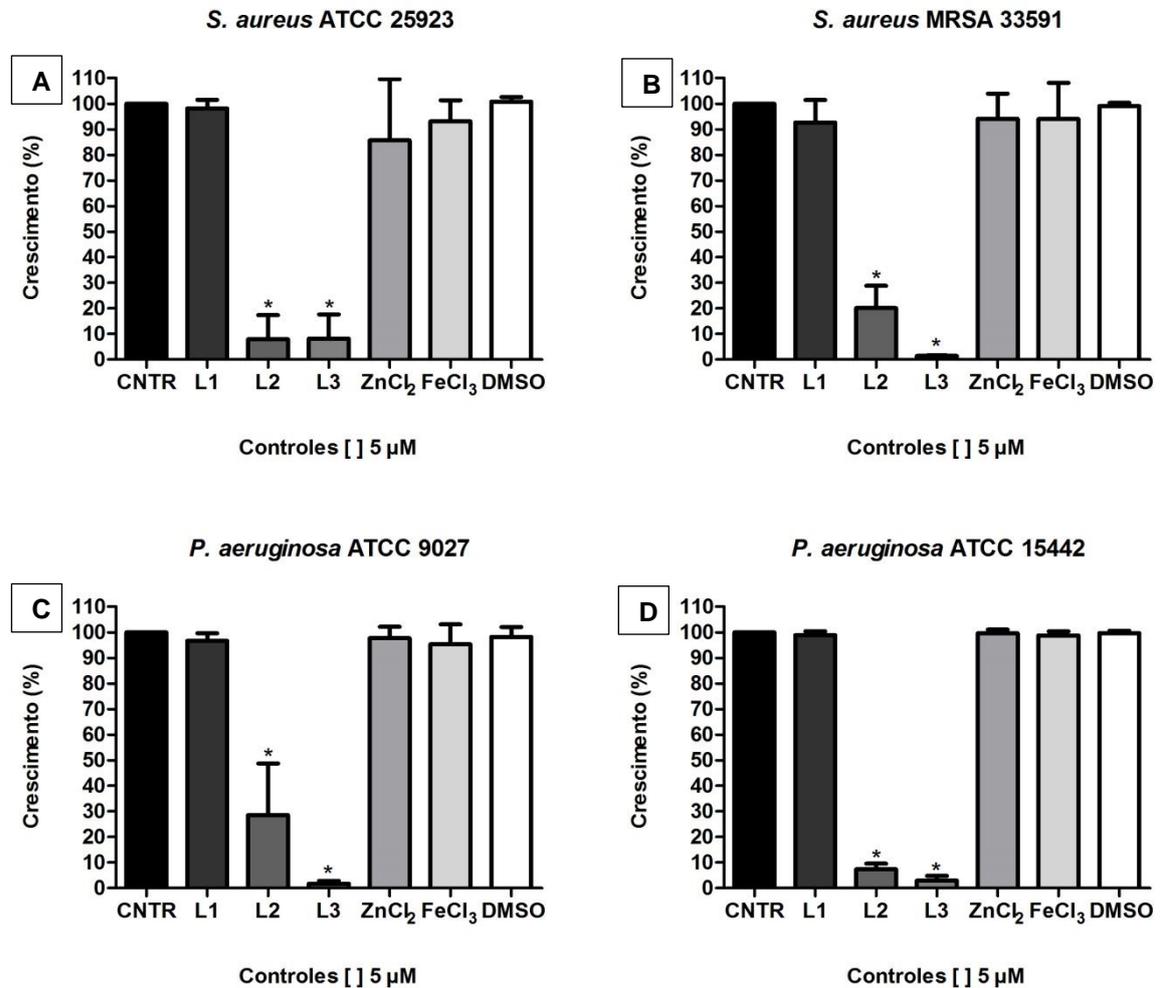
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance 2014**. World Health Organization, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial Resistense**. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/> >. Acesso em: 20 de fev de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. Disponível em: < [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf) >. Acesso em 01 de mar de 2017.

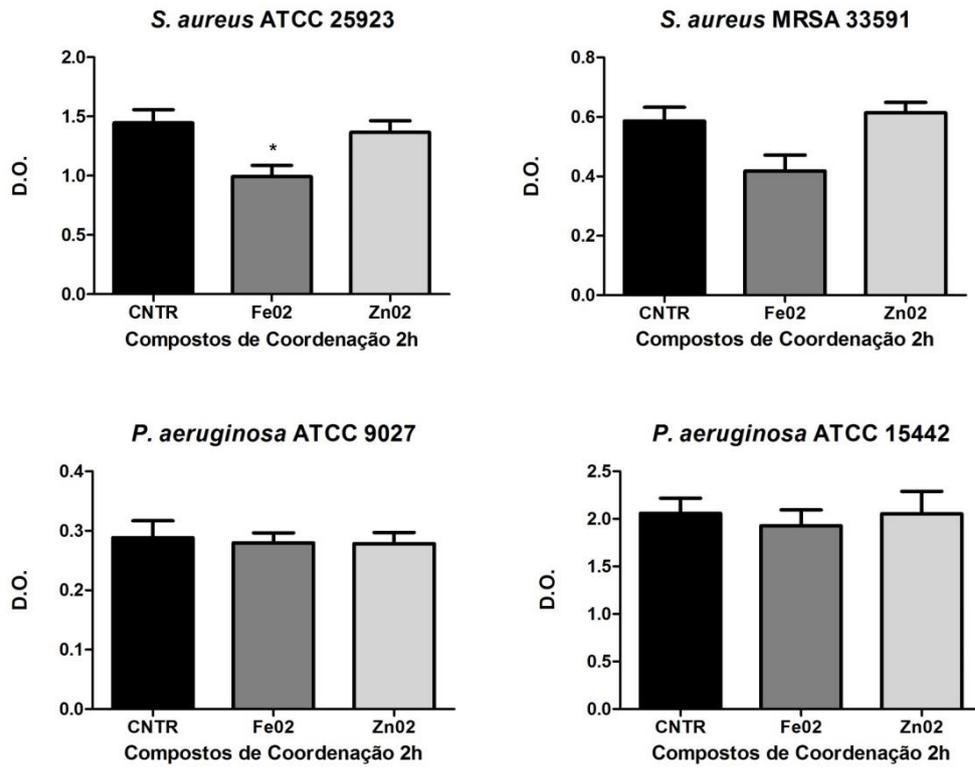
ZHOU, G. et al. The three bacterial lines of defense against antimicrobial agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 21711–21733, 2015.

## 8. ANEXOS

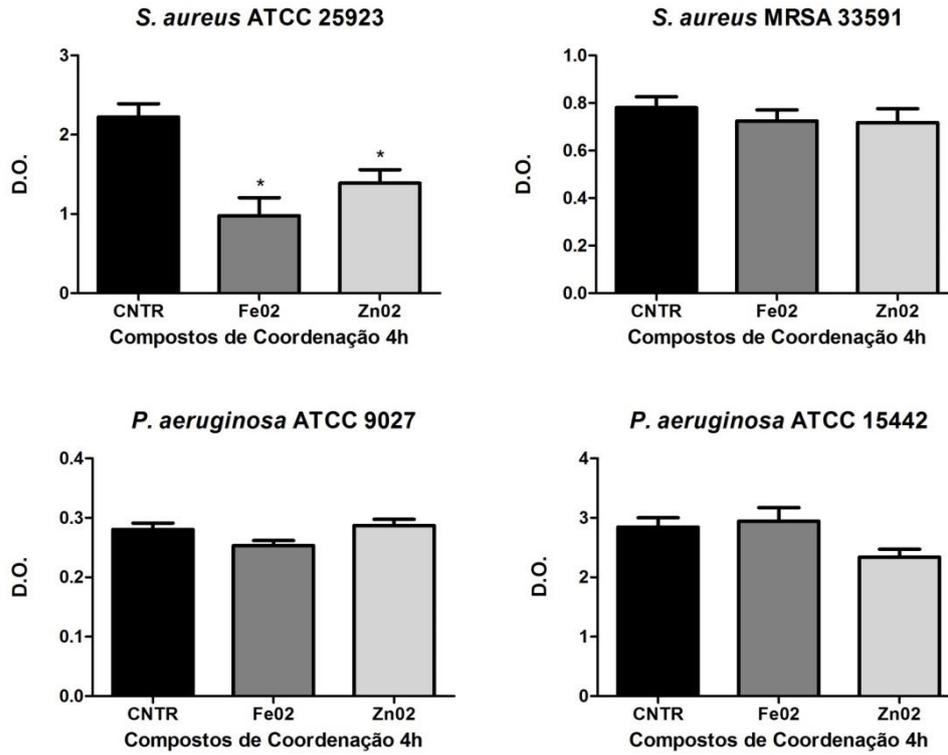


**Anexo 1:** Visualização gráfica do ensaio de microdiluição indicando a inibição dos ligantes, sais metálicos e DMSO sobre *S. aureus* ATCC 25923 (A), *S. aureus* MRSA 33591 (B), *P. aeruginosa* ATCC 9027 (C) e *P. aeruginosa* ATCC 15442 (D), na concentração de 5 µM.

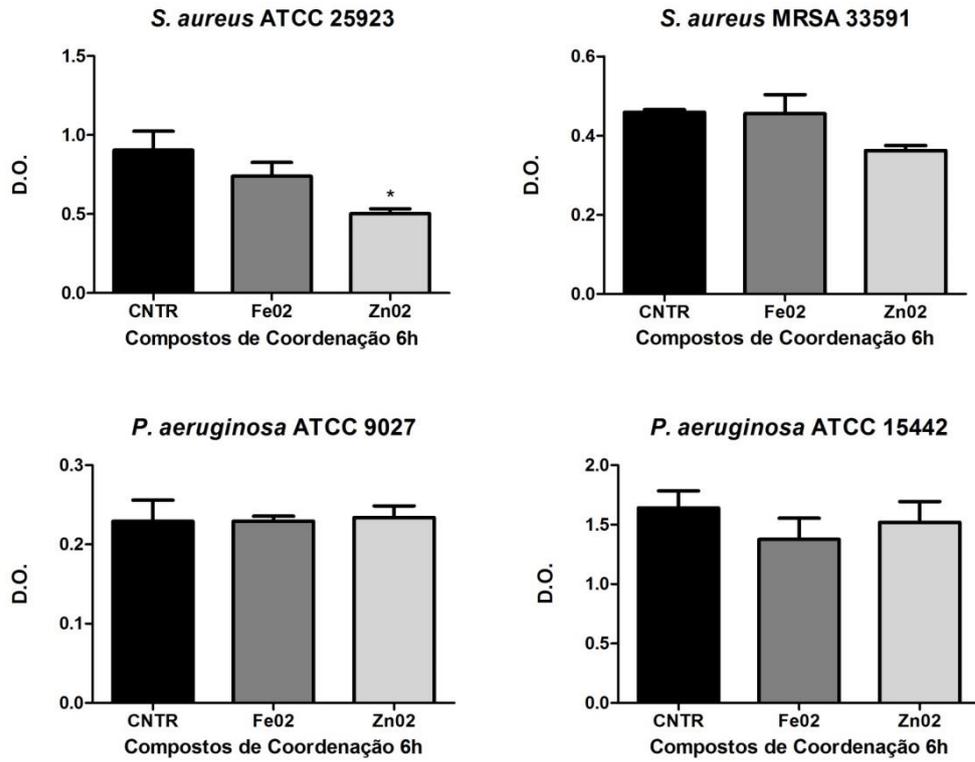
\*  $p < 0,05$



**Anexo 2:** Visualização gráfica da atividade antibiofilme dos compostos de coordenação Fe02 e Zn02, na concentração de 5  $\mu$ M, após 2 h de tratamento. \*  $p < 0,05$



**Anexo 3:** Visualização gráfica da atividade antibiofilme dos compostos de coordenação FeO<sub>2</sub> e ZnO<sub>2</sub>, na concentração de 5  $\mu$ M, após 4 h de tratamento. \* p < 0,05



**Anexo 4:** Visualização gráfica da atividade antibiofilme dos compostos de coordenação FeO<sub>2</sub> e ZnO<sub>2</sub>, na concentração de 5  $\mu$ M, após 6 h de tratamento. \*  $p < 0,05$