

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP

Matheus Torres Branca

**INVESTIGAÇÃO DOS POTENCIAIS ANTIBACTERIANO E
CITOTÓXICO DE COMPOSTOS DERIVADOS DO NÚCLEO BASE
[Fe-CYCLAM]**

Juiz de Fora

2022

MATHEUS TORRES BRANCA

**INVESTIGAÇÃO DOS POTENCIAIS ANTIBACTERIANO E
CITOTÓXICO DE COMPOSTOS DERIVADOS DO NÚCLEO BASE
[Fe-CYCLAM]**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, área de concentração em
Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

Coorientadora: Prof. Dr^a. Ana Carolina Moraes Apolônio

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da
Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Branca, Matheus Torres.

Investigação dos Potenciais Antibacteriano e Citotóxico de
Compostos Derivados do Núcleo Base [Fe-Cyclam] / Matheus Torres
Branca. -- 2022.
100 f.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri
Coorientadora: Prof^a. Dra. Ana Carolina Moraes Apolônio
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz
de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética,
2022.

1. Resistência bacteriana. 2. Complexos. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Drogas antibacterianas. 5. Mecanismo de ação. I. Fabri, Prof. Dr. Rodrigo Luiz, orient. II. Apolônio, Prof^a. Dra. Ana Carolina Moraes, coorient. III. Título.

Matheus Torres Branca

Investigação dos Potenciais Antibacteriano e Citotóxico de Compostos Derivados do Núcleo Base [Fe-Cyclam]

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e Doenças Infectoparasitárias.

Aprovada em 02 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Ana Carolina Moraes Apolônio - Coorientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Fabiana Ourique da Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Daniel de Lima Pontes
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Juiz de Fora, 01/11/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Luiz Fabri, Professor(a)**, em 05/12/2022, às 10:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Moraes Apolonio, Professor(a)**, em 05/12/2022, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Ourique da Silva, Professor(a)**, em 06/12/2022, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Lima Pontes, Usuário Externo**, em 06/12/2022, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uff (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1020079** e o código CRC **F473CBCF**.

DEDICO

Aos meus queridos e amados pais: Benice de Fátima dos Reis e Joaquim Torres Branca pelo incentivo, respeito e amor de vidas durante a minha trajetória.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida”.

(Carl Sagan)

AGRADECIMENTOS

A magia de todo processo está na dedicação, amor, carinho, atenção, garra e muita força de vontade. Diversas vezes, nossos caminhos cruzam com dificuldades que nos fazem refletir, amadurecer e crescer. Parte deste crescimento é entrega verdadeira, quando você transborda por dentro e sente que fez o melhor. Somos feitos de energia, essa, que nos alimenta, que nos faz crescer e que transcende para além do que os olhos possam enxergar. Precisamos cultivar o nosso e o brilho que cada um possui, para assim, formarmos constelações. Agradeço imensamente a Deus por me conceder luz, para que eu possa caminhar, seguir com meus objetivos e metas, e para além disso, iluminar o caminho de quem eu verdadeiramente amo, acredito e respeito.

Agradeço e dedico todos os meus esforços aos meus queridos e amados pais, Benice de Fátima dos Reis e Joaquim Torres Branca, por acreditarem no meu potencial, lutarem ao meu lado, respeitando minhas diferenças e decisões, me acolhendo e me amando como filho, exemplo e pelo homem que me tornei. Vocês são a minha supergigante vermelha Stephenson 2-18 (St2-18). A minha irmã Rosana e minhas sobrinhas Cintia e Mariana pelo carinho, respeito e amor, a minha irmã Tatiane e aos meus sobrinhos Isabela e Kauan por estar ao meu lado sempre, pelos ensinamentos repletos de respeito, garra e muito amor, ao meu irmão Alexandre por acreditar sempre na minha trajetória e a minha pequena e amada Mini. Vocês são a minha hipergigante vermelha UY Scuti.

Ao meu companheiro de vida, amigo, alicerce e amor, Gláucio, que sempre esteve ao meu lado, me motivando, acreditando, cuidando, respeitando e me trazendo paz. Você é a minha hipergigante vermelha VY Canis Majoris. Agradeço também a minha cunhada Thelma pelo carinho e respeito.

Ao meu querido amigo Lucas de Franca-SP, que levo da graduação para a vida e as minhas amigas, Ana Carolina do Amaral e Vanessa.

Agradeço imensamente ao meu amigo Júlio que cultivei ao longo de toda a pós-graduação. Obrigado pelos ensinamentos, paciência, amor e amizade.

As minhas luzes (corpos celestes) que tive e tenho a oportunidade de conhecer todos os dias, Lara e Ari. Vocês me pegaram pela mão e me arrastaram em suas caudas para o conhecimento, amor e amizade. Minha maior fonte de alegria, luz, dedicação e disciplina dentro e fora da universidade.

Aos meus queridos amigos e integrantes do Bioensaios e LPNB, Priscila, pela sua autenticidade e acolhimento, a Thalita, Thayná, Irley Olívia, Lucas, pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo.

A minha co-orientadora Ana Carolina, pela dedicação, empenho, ensinamentos e por ter me recebido como seu aluno.

Ao meu querido orientador Rodrigo, por me orientar e acreditar no meu potencial. Pela amizade e ensinamentos que compartilhamos ao longo de toda a vida. Agradeço imensamente pela oportunidade, carinho, atenção, dedicação, maturidade e empenho que sempre teve e tem comigo. Muito feliz de estar fazendo o que me identifico como pesquisador e por continuar fazendo parte do seu grupo de pesquisa.

RESUMO

O gênero *Staphylococcus* compõe a microbiota de humanos, animais e são um dos patógenos colonizadores de maior sucesso, pois estão entre as principais causas de infecções em ambientes de saúde e comunitários. A resistência alcançada por esses microrganismos emergiu e disseminou-se globalmente, principalmente pela espécie *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA), representando um enorme desafio clínico e epidemiológico. O presente estudo teve por objetivo a investigação dos potenciais antibacteriano e citotóxico de compostos derivados do núcleo base [Fe-Cyclam], a fim de descobrir novos ativos capazes de conter e controlar infecções causadas por *S. aureus*. Inicialmente, estudos *in silico* das propriedades farmacocinéticas e alvos biológicos dos complexos *cis*-[Fe(cyclam)Cl₂]Cl (**D1**), [Fe(cyclam)ox]PF₆ (**D2**), *trans*-[Fe(cyclam)(acet)₂]PF₆ (**D3**) e [Fe(cyclam)sal]PF₆ (**D4**) foram realizados utilizando-se de plataformas *on-line* (*pkCSM*[®] e *Pass online*[®]). Os resultados foram promissores, demonstrando que os complexos atendem a critérios aceitáveis para possíveis classificações de um novo candidato a fármaco e agente antibacteriano. Em seguida, foi determinada a viabilidade celular em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e células J774A.1 expostos aos complexos (**D1**) a (**D4**). Somente o complexo (**D3**), na concentração de 300 µg/mL, apresentou citotoxicidade para J774A.1. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) contra linhagens de *S. aureus* ATCC[®] 25904[™], *S. aureus* ATCC[®] 33591[™] e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052, foram determinadas. Os complexos (**D2**) e (**D4**) apresentaram valores de CIM de 50 µg/mL para as três linhagens de *S. aureus* e os complexos (**D1**) e (**D3**) apresentaram valores de CIM de 100 µg/mL para as mesmas linhagens testadas. Os complexos (**D2**) e (**D4**) foram selecionados para os demais testes, afim de elucidar os possíveis mecanismos de ação. Por meio do estudo de densidade celular foi possível observar uma redução da quantidade celular bacteriana tanto para (**D2**) quanto para (**D4**). Estudos de mecanismo de ação também foram realizados para os complexos (**D2**) e (**D4**) em envoltório celular por meio da permeabilidade com cristal violeta, extravasamento de membrana e atividade metabólica e viabilidade. Os resultados mostraram que os complexos possuem ação em envoltório, interferindo na integridade da membrana celular, acarretando na sua inibição. Ademais, foram avaliadas a ação de concentração inibitória e sub-inibitórias dos complexos na expressão de fatores de virulência. Os resultados mostraram que a melhor ação foi na enzima catalase. Também foram avaliadas ações dos complexos (**D2**) e (**D4**) sobre biofilmes de população, por meio de estudos nas fases de adesão e proliferação por espectrofotometria e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Além disso, foi investigado se os complexos (**D2**) e (**D4**) interferem na composição da matriz. As análises indicaram redução das fases de adesão e proliferação dos biofilmes, entretanto, essa mesma redução não foi acompanhada pelas análises de carboidratos e proteínas presentes na matriz. Os resultados apresentados proporcionaram uma excelente perspectiva, indicando os complexos como um potencial antibacteriano na terapêutica contra infecções causadas por *S. aureus*.

Palavras-chave: Resistência bacteriana. Complexos. *Staphylococcus aureus*. Drogas antibacterianas. Mecanismo de ação.

ABSTRACT

The genus *Staphylococcus* makes up the microbiota of humans, animals and are one of the most successful colonizing pathogens, as they are among the leading causes of infections in healthcare and community settings. The resistance achieved by these microorganisms has emerged and spread globally, mainly by the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) species, posing a huge clinical and epidemiological challenge. The present study aimed to investigate the antibacterial and cytotoxic potentials of compounds derived from the base nucleus [Fe-Cyclam] in order to discover new actives capable of containing and controlling infections caused by *S. aureus*. Initially, *in silico* studies of the pharmacokinetic properties and biological targets of the *cis*-[Fe(cyclam)Cl₂]Cl (**D1**), [Fe(cyclam)ox]PF₆ (**D2**), *trans*-[Fe(cyclam)(acet)₂]PF₆ (**D3**) and [Fe(cyclam)salt]PF₆ (**D4**) complexes were performed using *online* platforms (*pkCSM*® and *Pass online*®). The results were promising, demonstrating that the complexes meet acceptable criteria for possible classification as a new candidate drug and antibacterial agent. Next, cell viability was determined in peritoneal macrophages from BALB/c mice and J774A.1 cells exposed to the complexes (**D1**) to (**D4**). Only the complex (**D3**), at the concentration of 300 µg/mL, showed cytotoxicity to J774A.1. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against *S. aureus* strains ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ and the clinical isolate of *S. aureus* 05-0052, were determined. The complexes (**D2**) and (**D4**) showed MIC values of 50 µg/mL for all three *S. aureus* strains and the complexes (**D1**) and (**D3**) showed MIC values of 100 µg/mL for the same strains tested. The complexes (**D2**) and (**D4**) were selected for further tests, in order to elucidate the possible mechanisms of action. Through the cell density study it was possible to observe a reduction in the bacterial cell quantity for both (**D2**) and (**D4**). Mechanism of action studies were also performed for the complexes (**D2**) and (**D4**) in cell envelope by means of permeability with crystal violet, membrane leakage and metabolic activity and viability. The results showed that the complexes have an envelope action, interfering in the integrity of the cell membrane, leading to its inhibition. Furthermore, the action of inhibitory and subinhibitory concentrations of the complexes on the expression of virulence factors were evaluated. The results showed that the best action was on the enzyme catalase. Actions of complexes (**D2**) and (**D4**) on population biofilms were also evaluated by studying the adhesion and proliferation phases by spectrophotometry and scanning electron microscopy (SEM). In addition, it was investigated whether complexes (**D2**) and (**D4**) interfere with matrix composition. The analyses indicated a reduction in the adhesion and proliferation phases of the biofilms, however, this same reduction was not accompanied by the analysis of carbohydrates and proteins present in the matrix. The results presented provided an excellent perspective, indicating the complexes as a potential antibacterial therapy against infections caused by *S. aureus*.

Keywords: Bacterial resistance. Complexes. *Staphylococcus aureus*. Antibacterial drugs. Mechanism of action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação estrutural de uma célula bacteriana.....	20
Figura 2 - Paredes celulares bacterianas	21
Figura 3 - Representação estrutural de <i>S. aureus</i> resistente a meticilina	25
Figura 4 - Mecanismos de resistência bacteriana contra antimicrobianos	30
Figura 5 - Etapas de formação e dispersão do biofilme bacteriano	31
Figura 6 - Representação estrutural do ligante macrocíclico Cyclam	34
Figura 7 - Avaliação da citotoxicidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com os complexos (D1) a (D4).....	56
Figura 8 - Avaliação da citotoxicidade de células J774A.1 com os complexos (D1) a (D4)	57
Figura 9 - Densidade celular das linhagens de <i>S. aureus</i> expostas aos complexos (D2) e (D4)	60
Figura 10 - Permeabilidade celular de <i>S. aureus</i> por % de captação do cristal violeta	61
Figura 11 - Liberação de conteúdo intracelular (nucleotídeos) e proteínas de <i>S. aureus</i> ATCC® 25904™, <i>S. aureus</i> ATCC® 33591™ e o isolado clínico de <i>S. aureus</i> 05-0052 após exposição aos complexos (D2) e (D4)	62
Figura 12 - Viabilidade e atividade metabólica bacteriana de linhagens de <i>S. aureus</i> expostas aos complexos (D2) e (D4)	64
Figura 13 - Atividade hemolítica das linhagens de <i>S. aureus</i> ATCC® 25904™, <i>S. aureus</i> ATCC® 33591™ e o isolado clínico de <i>S. aureus</i> 05-0052 após a exposição de concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4)	67
Figura 14 - Efeito dos complexos (D2), (D4) e amoxicilina (Amoxi) sobre as etapas de proliferação e adesão de biofilmes formados pelas linhagens de <i>S. aureus</i> ATCC® 25904™, <i>S. aureus</i> ATCC® 33591™ e o isolado clínico de <i>S. aureus</i> 05-0052.....	70
Figura 15 - Imagens ilustrativas da atividade antibiofilme dos complexos (D2) e (D4) diante da linhagem de <i>S. aureus</i> ATCC® 25904™ por meio de MEV	72
Figura 16 - Imagens ilustrativas da atividade antibiofilme dos complexos (D2) e (D4) diante da linhagem de <i>S. aureus</i> ATCC® 33591™ por meio de MEV	73
Figura 17 - Imagens ilustrativas da atividade antibiofilme dos complexos (D2) e (D4) diante da linhagem de <i>S. aureus</i> 05-0052 por meio de MEV	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de agentes patogênicos prioritários divulgada pela OMS	33
Tabela 2 - Representação dos complexos, fórmula mínima, identificação e estrutura.....	36
Tabela 3 - Propriedades farmacocinéticas de (D1) a (D4)	54
Tabela 4 - Predições das atividades biológicas <i>in silico</i> relacionadas aos efeitos antibacterianos dos complexos (D1) a (D4)	55
Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM), Efeito sobre o valor de CIM, Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos complexos (D1) a (D4) e Amoxicilina contra linhagens de <i>S. aureus</i>	58
Tabela 6 - Atividade catalase das linhagens de <i>S. aureus</i> ATCC® 25904™, <i>S. aureus</i> ATCC® 33591™ e o isolado clínico de <i>S. aureus</i> 05-0052 após exposições inibitória e subinibitórias com os complexos (D2) e (D4)	65
Tabela 7 - Atividade Coagulase das linhagens de <i>S. aureus</i> ATCC® 25904™, <i>S. aureus</i> ATCC® 33591™ e o isolado clínico de <i>S. aureus</i> 05-0052 após exposição inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4).....	66
Tabela 8 - Atividade lipolítica das linhagens de <i>S. aureus</i> ATCC® 25904™, <i>S. aureus</i> ATCC® 33591™ e o isolado clínico de <i>S. aureus</i> 05-0052 após exposição de concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4)	68
Tabela 9 - Atividade DNase de linhagens de <i>S. aureus</i> ATCC® 25904™, <i>S. aureus</i> ATCC® 33591™ e o isolado clínico de <i>S. aureus</i> 05-0052 após exposições de concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4).....	68
Tabela 10 - Composição bioquímica de biofilmes expostos aos complexos (D2) e (D4) e amoxicilina	75

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo de viabilidade	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Acet	Íon acetato
ATCC	do Inglês <i>American Type Culture Collection</i>
CA-MRSA	<i>Community-Acquired</i> MRSA
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	do Inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Cyclam	1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Ótica
D1	<i>cis</i> -[Fe(cyclam)Cl ₂]Cl
D2	[Fe(cyclam)ox]PF ₆
D3	<i>trans</i> -[Fe(cyclam)(acet) ₂]PF ₆
D4	[Fe(cyclam)sal]PF ₆
HA-MRSA	<i>Healthcare-Associated</i> MRSA
LA-MRSA	<i>Livestock-Associated</i> MRSA
LPS	Lipopolissacarídeo
MH	Caldo Mueller Hinton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
Ox	Íon oxalato
PBP	do Inglês <i>Penicillin Binding Proteins</i>
PF ₆	Íon hexafluorofosfato
PVL	Leucocidina de Panton-Valentine
QS	<i>Quorum-sensing</i>
Sal	Íon salicilato
SCCmec	do inglês <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
RAM	Resistência Antimicrobiana

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
CO ₂	Dióxido de Carbono
°C	Grau Celsius
®	Marca Registrada
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
pH	Potencial Hidrogeniônico
Rpm	Rotação por Minuto
™	<i>Trade Mark</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Bactérias	19
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	23
2.2 Infecções bacterianas	27
2.3 Resistência bacteriana	29
2.4 Ligante macrocíclico Cyclam	34
2.5 Ferro	37
3. OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.2 Estudos <i>in silico</i>	40
4.3 Ensaios de citotoxicidade	41
4.4 Atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	43
4.4.1 Linhagens bacterianas	44
4.4.2 Preparação do inóculo bacteriano	44
4.4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	44
4.4.4 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	45
4.5 Avaliação da densidade celular bacteriana	45
4.6 Estudo em envoltório celular bacteriano	46
4.7 Avaliação do efeito de concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4) na expressão de fatores de virulência de linhagens de <i>S. aureus</i>	48
4.8 Avaliação da atividade antibiofilme formados por linhagens de <i>S. aureus</i>	50
4.9 Análise estatística	53
5. RESULTADOS	54
5.1 Estudos <i>in silico</i>	54
5.2 Avaliação da viabilidade celular em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e J774A.1 expostos aos complexos (D1) a (D4)	56
5.3 Avaliação da atividade antibacteriana dos complexos (D1) a (D4)	58
5.4 Avaliação da densidade celular bacteriana	59
5.4.1 Estudo em envoltório celular bacteriano	60
5.4.1.2 Avaliação do Extravasamento de membrana e Teor de proteínas ...	61
5.5 Avaliação do efeito de concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4) na expressão de fatores de virulência de linhagens de <i>S. aureus</i>	65
5.6 Avaliação da atividade antibiofilme formados por linhagens de <i>S. aureus</i>	69
6. DISCUSSÃO	76
7. CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS	87

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, grande atenção tem se voltado para a evolução e disseminação de patógenos bacterianos multirresistentes, devido ao crescente aumento de resistência às terapias convencionais e a indisponibilidade de novos medicamentos, representando em sua totalidade, séria ameaça à saúde pública global (ASLAM et al., 2018). A influência de fatores ambientais (pressão de seleção) acompanhada da superpopulação humana, migração e contaminação de ambientes naturais com baixas quantidades de antimicrobianos, tornou esse problema ainda mais grave e pode ter contribuído direta ou indiretamente para a propagação da resistência em larga escala (MAHRT et al., 2021).

A resistência aos antimicrobianos pode se desenvolver por dois processos distintos: evolução vertical, em que mutações podem alterar os alvos celulares do antimicrobiano e/ou diminuir sua concentração ou transferência horizontal, onde genes de resistência são adquiridos de outras bactérias por mecanismos de conjugação, transdução ou transformação e transferidos para sua progênie (SOMMER et al., 2017; BAKER et al., 2018; BOTELHO; SCHULENBURG, 2021). Ainda assim, é possível que determinadas linhagens bacterianas sejam mais propensas a desenvolver resistência que outras a depender da localidade e populações que são encontradas (SOMMER et al., 2017).

Atualmente, a resistência aos antimicrobianos tem sido considerada uma das maiores ameaças aos sistemas públicos de saúde, afetando não somente países em desenvolvimento, mas de forma heterogênea e global (WHO, 2021). O fato do grande arsenal de antimicrobianos clinicamente disponíveis e a crescente resistência a eles enunciada, retrata um futuro desconhecido, perigoso e incerto na área da saúde (CHOKSHI et al., 2019). Além disso, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO), somente infecções bacterianas resistentes estão associadas a quase 4,95 milhões de mortes a cada ano, com 1,27 milhão de mortes associadas diretamente à resistência antimicrobiana (WHO, 2022).

A resistência à meticilina-oxacilina em *Staphylococcus aureus* (MRSA) é o exemplo mais claro e conhecido de resistência a antimicrobianos e que tem sido associado a altas taxas de morbimortalidade em todo o mundo. Logo, o controle e tratamento de infecções por bactérias multirresistentes tornou-se um

problema grave sem soluções imediatas, passíveis de controle (FOUNOU et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2020).

Em particular, está claro que a carga global desses microrganismos é uma realidade notável e não apresenta sinais de recuo, nem tão pouco controle, pelo contrário, é crescente e carece fortemente de novas abordagens para prever e prevenir essa ameaça crescente que assola a humanidade ao longo dos tempos (SINGH et al., 2017; BELL; MACLEAN, 2018).

Neste sentido, os compostos de coordenação têm ganhado prestígio em diversos estudos como notáveis agentes antimicrobianos, além de possuírem atividades antitumorais e anticancerígenas (APOHAN et al., 2017; PILON et al., 2019). Logo, esses compostos podem ser melhor definidos como substâncias que contém um átomo ou íon metálico central ao qual estão ligados covalentemente a íons, moléculas e radicais. Estes últimos são denominados de ligantes (PILON et al., 2019).

Dentre os ligantes macrocíclicos de grande interesse, o Cyclam (1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano), um composto orgânico, com uma estrutura altamente versátil e modificável devido às suas propriedades de coordenação e forte ligação a uma ampla gama de íons metálicos, tem se destacado como candidato promissor no combate a infecções, resistência antimicrobiana e na busca de novos medicamentos (GRABCHEV et al., 2017).

Diante do exposto acima e necessidade crescente de novas terapias antimicrobianas, o presente trabalho justifica-se na investigação dos potenciais antibacteriano e citotóxico de compostos derivados do núcleo base [Fe-cyclam] contra a espécie *S. aureus*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

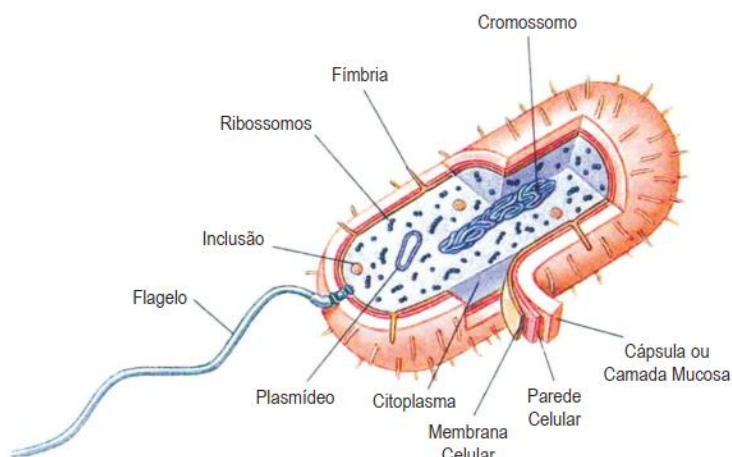
2.1 Bactérias

As bactérias são organismos unicelulares relativamente simples, classificados como procariontes, onde seu material genético, cromossomo circular e autorreplicante, é desprovido de membrana nuclear bem definida. Além disso, não possuem organelas membranosas em seu citoplasma como mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e lisossomos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Normalmente, sua forma de reprodução se dá por meio de fissão binária, originando duas células-filhas geneticamente idênticas ou clones (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

As células bacterianas possuem uma ampla diversidade de formas e tamanhos, a grande maioria variando de 0,2 e 2 μm de diâmetro a 2 e 8 μm de comprimento e apresentam algumas formas básicas como esféricas (cocos) variando entre 0,8 a 1,0 μm , cilíndricas (bacilos) e espiraladas (espirilos e espiroquetas). Quanto ao seu arranjo, pode-se observar algumas bactérias aderidas umas às outras formando cadeias, pares ou até mesmo grupos, enquanto que outras espécies são individuais, podendo ser característica de um gênero em específico (Kyselá et al., 2016; CACCAMO et al., 2018).

De acordo com sua estrutura, as células bacterianas também são compostas por um citoplasma, que é uma porção fluida contendo substâncias dissolvidas e partículas como ribossomos, material genético (plasmídeo circular) e substâncias insolúveis denominadas grânulos ou inclusões (reserva de nutrientes), membrana plasmática, composta principalmente por fosfolipídios e uma rígida e consistente parede celular (Figura 1) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; LADDOMADA et al., 2016).

Figura 1 - Representação estrutural de uma célula bacteriana.



Fonte: TRABULSI; ALTERTHUM, 2015.

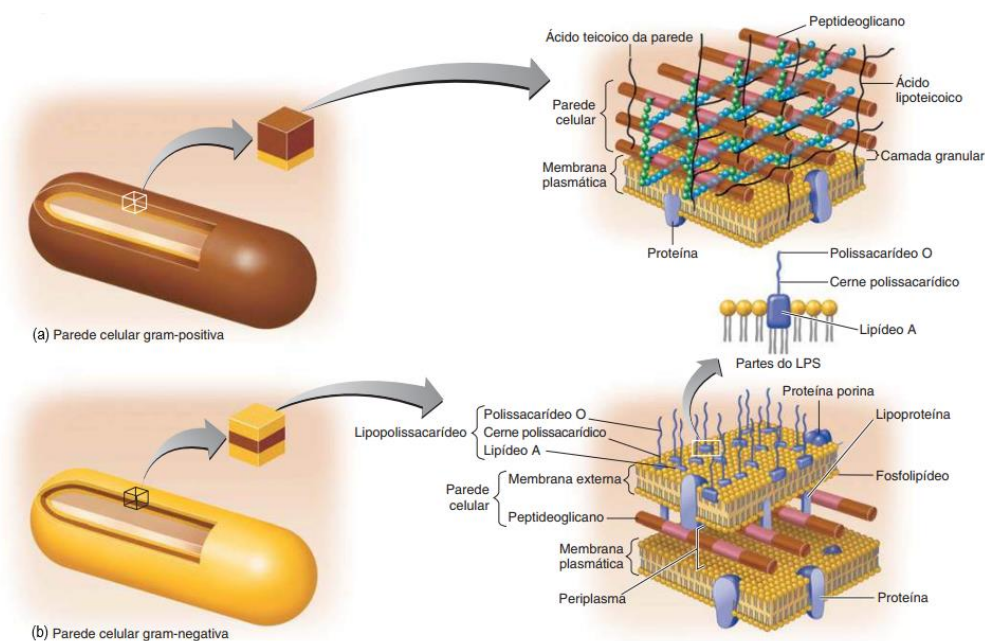
A membrana plasmática ou citoplasmática é uma fina camada localizada abaixo da parede celular. Possui espessura de aproximadamente 7,5 nm, com cerca de 20 a 30% da sua estrutura constituída de fosfolipídios, originando a bicamada embebida de proteínas. A membrana plasmática também é um grande sítio de atividade enzimática, servindo como transporte de moléculas para o meio interno e externo da célula. Em determinadas ocasiões, pode se estender para o citoplasma formando o conhecido mesossomo (invaginação da membrana), que participa diretamente do metabolismo e respiração celular (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

A parede celular por sua vez é essencial para a sobrevivência de muitos microrganismos, inclusive para as bactérias. Sua principal função é proporcionar um envelope rígido, capaz de proteger e suportar as estruturas protoplasmáticas, evitando a evasão de certas enzimas, assim como o influxo de substâncias que podem ser danosas ou prejudiciais à célula. Além disso, a parede rígida de peptídeoglicano (ou mureína) é responsável por manter a forma característica da célula bacteriana e protegê-la de altas pressões de turgescência (VOLKE et al., 2018). O peptídeoglicano, por sua vez, é constituído por um dissacarídeo repetitivo ligado por peptídeos para formar uma estrutura que circunda e protege a célula bacteriana. Essa porção dissacarídica consiste em monossacarídeos,

denominados de N-acetilglicosamina (NAG), e ácido N-acetilmurâmico (NAM), intimamente relacionados à glicose (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são distintas por diferirem na constituição da parede celular (Figura 2). Bactérias Gram-positivas apresentam uma espessa parede celular, constituída de múltiplas camadas de peptídeoglicano (cerca de 70 a 75%), ácido teicoico e lipoteicoico, enquanto que as Gram-negativas são mais complexas estrutural e quimicamente, exibindo uma fina camada de peptídeoglicano, seguida por uma membrana externa adicional e ausentes de ácidos teicoicos (TEESELING et al., 2017). Além disso, a fina camada de peptídeoglicano dessas bactérias as tornam mais susceptíveis a ação e rompimento mecânico. O peptídeoglicano de bactérias Gram-negativas encontra-se no espaço periplasmático, localizado entre a membrana citoplasmática e a membrana externa, local onde também são encontradas diversas enzimas hidrolíticas (lipases, fosfatases, nucleases), proteínas e aminoácidos. Em determinadas espécies patogênicas, fatores líticos de virulência, como proteases e β -lactamases também são encontrados no espaço periplasmático dessas bactérias (TYPAS et al., 2012).

Figura 2 - Paredes celulares bacterianas. Representação da parede celular de uma bactéria Gram-positiva (a) e de uma bactéria Gram-negativa (b).



Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2017.

A membrana externa das bactérias Gram-negativas consiste em lipopolissacarídeos (LPS), proteínas (porinas, proteínas de membrana externa e lipoproteínas) e fosfolipídios. Essa membrana adicional oferece proteção contra ação de diversas enzimas digestivas, sais de bile, corantes, metais pesados, detergentes e mesmo a antimicrobianos (MAY; GRABOWICZ, 2018). De fato, bactérias Gram-negativas são naturalmente mais resistentes à ação de compostos antimicrobianos, até mesmo pela complexidade da parede celular que apresentam. Assim, para que os antimicrobianos tenham acesso a célula bacteriana, os mesmos devem cruzar com efetividade a barreira lipídica através de canais proteicos de porina presentes na sua estrutura (HAO et al., 2018; ROJAS et al., 2018).

O lipopolissacarídeo de membrana externa (LPS) é uma molécula relativamente grande e complexa, que contém lipídios e carboidratos em sua estrutura, constituído de lipídeo A, cerne polissacarídeo (cadeia de oligossacarídeo central) e polissacarídeo O (cadeia polissacarídica variável) (SIMPSON et al., 2019). Essa endotoxina de membrana compreende o maior fator de virulência dessas bactérias, que a depender do organismo pode potencializar reações de caráter inflamatório, com ativação de células B e indução de macrófagos, células dendríticas e outras células a liberarem IL-1, IL-6, IL-7, TNF e vários outros fatores, culminando para a ativação da cascata do sistema complemento (RATHINAM et al., 2019).

Certas espécies bacterianas podem ainda, apresentar cápsulas, que consistem em uma substância polissacarídica, produzida no citoplasma e secretada para a superfície celular. As cápsulas são um importante fator de virulência ao conferir as bactérias habilidade de causar doenças, responsáveis pela adesão nos mais diferentes substratos (biofilmes), protegem contra ação de células do sistema imune (macrófagos e neutrófilos), desidratação, choques mecânicos e sobrevivência no hospedeiro (DOYLE et al., 2019; SANDE; WHITFIELD, 2021). Certas bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* apresentam cápsula em sua estrutura.

De acordo com seu padrão de motilidade, as bactérias podem mover-se através de flagelos, que são estruturas propulsoras tipo hélice, constituídos por uma estrutura proteica denominada flagelina, ancorados nas membranas bacterianas através de um gancho e estruturas do corpo basal. Os flagelos podem formar grandes filamentos delgados e ondulados, que partem do corpo da célula bacteriana estendendo externamente à parede celular, permitem também que a mesma se movimente na direção de nutrientes essenciais para sua sobrevivência e distante de certas substâncias que possa agredir sua integridade (NAKAMURA et al., 2019).

As bactérias podem apresentar fímbrias e/ou pilus, que são estruturas semelhantes à pelos presentes em sua superfície e que se estendem da membrana plasmática, parede celular e cápsula, elevando-se para o meio externo. Essas estruturas desempenham diversas funções, como adesão, fixação e formação de biofilmes, que são fatores cruciais de virulência durante uma infecção. Além disso, os pilus são extremamente importantes para a formação da ponte citoplasmática ao permitir que certas bactérias compartilhem material genético por meio do processo de conjugação, e consequentemente resistência bacteriana, outro importante fator de virulência (HOSPENTHAL et al., 2017; LAI et al., 2020).

2.1.1 ***Staphylococcus aureus***

A espécie *Staphylococcus aureus* pertence à família *Staphylococcaceae*, e ao gênero *Staphylococcus*, sendo caracterizada como uma bactéria Gram-positiva em formato de cocos, com cerca de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóvel, não esporulada e reações de catalase, coagulase e DNase positivas. Crescem bem em ágar sangue, formando colônias de 1 a 3 mm de diâmetro, circulares, lisas, geralmente de coloração amarelada e/ou dourada e com um aspecto meio amanteigado. *S. aureus* podem crescer aerobicamente ou anaerobicamente (facultativo) entre temperaturas que variam de 18°C à 40°C e toleram concentração de até 25% de cloreto de sódio (TAYEB-FLIGELMAN et al., 2017; TAYLOR; UNAKAL, 2022).

Esses microrganismos são comumente encontrados no meio ambiente e fazem parte da microbiota humana normal, podendo ser localizados na pele e

em membranas mucosas, principalmente na área superior nasal (nasofaringe) de 20 a 40% de indivíduos saudáveis (TAYLOR; UNAKAL, 2022). Além disso, também são encontradas por colonizarem sítios não nasais, como garganta, amígdalas, faringe, regiões do tronco, axilas, mãos (principalmente em ambientes nosocomiais por profissionais de saúde), região umbilical, virilha, períneo e vagina (BECKER et al., 2017a).

Normalmente, *S. aureus* não causa infecções na pele, nem tão pouco em vias aéreas superiores, entretanto, se rompidas barreiras cutâneas e mucosas, devido a doenças de pele de caráter crônico, feridas expostas (queimaduras) ou até mesmo intervenções cirúrgicas, essas bactérias podem acessar a corrente sanguínea e causar infecções graves, com risco de sepse (LEE et al., 2018). Logo, *S. aureus* torna-se patogênico ao evadir o sistema imune do hospedeiro (defesa inata), levando a formação de uma cápsula antifagocítica (protetora), sequestro de anticorpos do próprio hospedeiro ou mascaramento de antígeno pela proteína A, formação de biofilme (mecanismo de resistência) e bloqueio da quimiotaxia de leucócitos, para assim, conferir sucesso a sua sobrevivência e propagação (DE JONG et al., 2019).

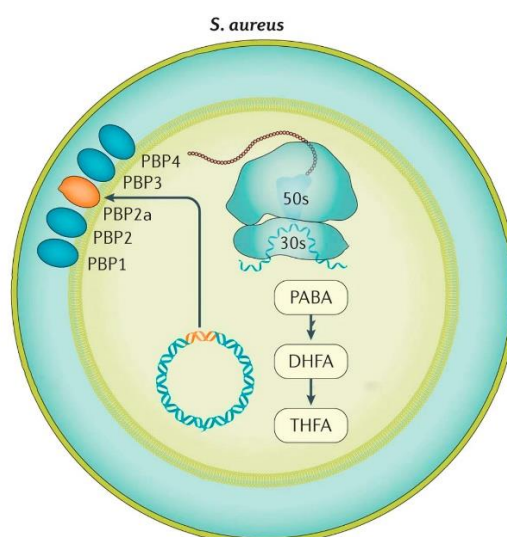
Notavelmente, infecções causadas por *S. aureus* não estão restritas somente a pele e a tecidos moles (por exemplo, impetigo, foliculite, furúnculos, carbúnculos, celulite, síndrome da pele escaldada e abscessos), podendo, dessa forma, levar a doenças graves invasivas, como infecções pleuropulmonares, osteoarticulares, bacteremia, endocardite, osteomielite, artrite séptica, meningite, infecções associadas a dispositivos protéticos, síndrome do choque tóxico (complicação rara e potencialmente fatal, causada por toxinas bacterianas, com perda de homeostasia do hospedeiro), gastroenterite (intoxicação alimentar) e infecções do trato urinário (HASSOUN et al., 2017; TAYLOR; UNAKAL, 2022; TONG et al., 2015). Essas doenças estão amplamente associadas a fatores de riscos como hospitalizações por longos períodos, pacientes com dispositivos invasivos (cateteres venosos periféricos ou centrais), imunocomprometidos, pacientes em terapias (câncer) e até mesmo, o fator idade (LEE et al., 2018).

O *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi identificado pela primeira vez na década de 1960, logo após a inserção da meticilina como opção de tratamento na prática clínica. Esse medicamento foi extensivamente usado ao

longo dos anos, porém, devido sua toxicidade foi substituído pelas penicilinas (oxacilina, flucloxacilina, cloxacilina, dicloxacilina e nafcilina) que são antimicrobianos β -lactâmicos semelhantes e mais estáveis (GRAYSON, 2018). Na década seguinte, MRSA foi responsável por inúmeros surtos hospitalares em diversas partes do mundo, evidenciando sua rápida disseminação e conferindo resistência a ampla classe de antimicrobianos β -lactâmicos clinicamente disponíveis (CHAMBERS; DELEO, 2009).

O mecanismo de resistência primário de clones MRSA está diretamente relacionado a alteração de proteínas ligadoras de penicilinas (PBP - *penicillin binding proteins*) do tipo 2' ou 2a (forma alternativa PBP2a), que é codificada pelo gene *mecA*, apresentando baixa afinidade para os agentes β -lactâmicos (Figura 3). Por sua vez, o gene *mecA* é carregado por um elemento genético móvel (ilha genômica) chamado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec* - *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*), altamente diversificado e classificado atualmente em 13 tipos de acordo com seu tamanho e composição genética (URUSHIBARA et al., 2020). Especificamente em MRSA, o SCC*mec* encontra-se inserido no cromossomo bacteriano, no sítio de ligação (*attB**scc*), próximo a região de replicação do DNA de *S. aureus* (LAKHUNDI; ZHANG, 2018).

Figura 3 - Representação estrutural de *S. aureus* resistente a meticilina MRSA.



Fonte: Adaptado de LEE et al., 2018.

Determinadas linhagens de *S. aureus* podem apresentar ainda, um tipo menos comum de resistência a oxacilina, não relacionada diretamente a presença do gene *mecA*, a resistência *boderline* (*Borderline Oxacillin-Resistant S. aureus* - BORSA), mediada por plasmídeos, configurando hiperprodução de enzimas β -lactamases (NOMURA et al., 2020). Não obstante, há também clones conhecidas como MODSA (*Modified Penicillin-Binding Protein S. aureus*) que produzem proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) modificadas estruturalmente, que não a comum e típica PBP2a (ARGUDÍN et al., 2018).

Particularmente, MRSA tem sido considerado um patógeno de grande relevância em ambientes hospitalares e na comunidade. Todavia, clones típicos de MRSA associados a instituições de saúde HA-MRSA (Healthcare-Associated MRSA) são responsáveis pelo aumento das taxas de morbimortalidade de pacientes hospitalizados por longos períodos, devido a resistência a múltiplas classes de antimicrobianos, inclusive aos conhecidos β -lactâmicos utilizados rotineiramente (LINDSAY, 2013).

Em contrapartida, clones de MRSA associados a comunidade CA-MRSA (Community-Acquired MRSA) diferem tanto em características genéticas, quanto fenotípicas de HA-MRSA, apresentando sobretudo, resistência exclusivamente a antimicrobianos β -lactâmicos e por estarem associados a infecções de pele e tecidos moles, bem como, a pneumonias necrosantes fatais (OTTO, 2013). Além disso, o fator de virulência Leucocidina de Panton-Valentine (PVL) encontra-se intimamente ligado à gravidade dessas infecções comunitárias (FIGUEIREDO, 2017).

Cabe ressaltar, que desde meados dos anos 2000, inúmeros clones de MRSA associado à pecuária LA-MRSA (Livestock-Associated MRSA) emergiram e ganharam atenção há mais de uma década. Os clones de LA-MRSA são geneticamente distintos de clones hospitalares encontrados em humanos, com características específicas, representando grande preocupação ao causar infecções graves e fatais em animais economicamente importantes, interferindo diretamente na saúde, bem-estar e consequentemente cadeia produtiva de alimentos (BECKER et al., 2017b).

Com o advento de MRSA resistente à ampla classe dos β -lactâmicos clinicamente disponíveis, em 1958 foi introduzido o glicopeptídeo tricíclico vancomicina ($C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$), uma droga de espectro estreito, cuja efetividade

está direcionada a bactérias Gram-positivas alvo (VAN HAL; FOWLER, 2013). Em 1997, foram isoladas as primeiras linhagens MRSA com sensibilidade reduzida à vancomicina (VISA) no Japão, atraindo grande atenção e preocupação da comunidade médica e científica (LEVINE, 2006).

A vancomicina, assim como os outros antimicrobianos β -lactâmicos são inibidores da biossíntese da parede celular bacteriana, entretanto, ao invés de inibir as enzimas (PBPs), a vancomicina liga-se a um dos substratos das PBPs, o resíduo D-alanil-D-alanina precursor do peptídeoglicano. Como tal, as enzimas PBPs não efetuam a transpeptidação (ligação cruzada) do peptídeoglicano devido a vancomicina encontrar-se ligada ao seu substrato, o resultado é que a síntese do peptídeoglicano fica prejudicada, com consequente enfraquecimento da parede celular, tornando a célula bacteriana mais suscetível a morte celular (lise) (HU et al., 2016; MCGUINNESS et al., 2017).

A resistência completa à vancomicina (VRSA - CIM >16 μ g/mL) foi descrita pela primeira vez em dois isolados clínicos de *S. aureus* em 2002 nos Estados Unidos (CDC, 2002). O mecanismo pleno de resistência à vancomicina está diretamente relacionado à aquisição / transferência horizontal de um plasmídeo contendo o gene *vanA*, encontrado em *Enterococcus faecalis* (PILLAI et al., 2009). Desse modo, para que o glicopeptídeo vancomicina consiga atuar na célula bacteriana alvo, o mesmo precisa se ligar com especificidade ao terminal D-alanil-D-alanina da molécula de peptídeoglicano. No entanto, no lugar do terminal D-alanil-D-alanina, clones VRSA conseguem expressar efetivamente D-alanil-D-lactato, consequentemente levando perda da especificidade de ligação da vancomicina ao seu alvo, não acarretando riscos para a síntese da parede celular bacteriana, culminando para sua propagação e disseminação bem-sucedida (SCHITO, 2006; VESTERGAARD et al., 2019).

2.2 Infecções bacterianas

Infecções causadas por microrganismos patogênicos acometem seres humanos e animais por gerações. Com o advento dos antimicrobianos essas infecções tiveram tendência de regressão por um determinado período, entretanto, diversos microrganismos desenvolveram mecanismos de resistência,

culminando para uma era pós-antimicrobiana representando ameaça constante a qualidade de vida das populações (CHENG et al., 2016).

O aumento exponencial de bactérias multirresistentes está amplamente associado ao uso indiscriminado e generalizado de antimicrobianos, de tal modo, a provocar pressão seletiva dessas populações bacterianas, contribuindo diretamente para que determinadas linhagens resistentes persistam, propaguem-se de maneira desordenada e consequentemente acúmulo de mecanismos de resistência (BOTTERY et al., 2021).

A incidência de infecções graves em ambientes hospitalares está intimamente relacionada a colonização, transmissão e disseminação de microrganismos multirresistentes (MDR), principalmente em unidades críticas de cuidados intensivos, como UTIs (adulto, pediátrico ou neonatal), unidades ambulatoriais e unidades de atenção primária, como queimados (SOUSA et al., 2021). Geralmente esse grave problema de saúde pública está ligado a um maior tempo de permanência hospitalar e por consequência, maiores índices de morbimortalidade dos pacientes acometidos, gerando desta forma, enormes impactos sociais e econômicos, elevando todos os anos, os custos com os sistemas de saúde (SCHRADER et al., 2020). Além disso, as espécies mais frequentemente encontradas causando infecções graves de grandes dimensões dentro do ambiente hospitalar são por *S. aureus* resistente à meticilina, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus spp* (*Enterococcus faecium*) e *P. aeruginosa* (SIKORA; ZAHRA, 2022; SOUSA et al., 2021).

Neste sentido, medidas de prevenção e controle frente à disseminação de tais patógenos nos ambientes de assistência à saúde torna-se desafiador à medida que novas contaminações emergem. Portanto, medidas de precaução padrão estabelecidas dentro dos ambientes de saúde, devem, por si só, serem seguidas, independentes de microrganismo multirresistente (MDR) ou não. Além disso, procedimentos de biossegurança como o monitoramento de superfícies, uso adequado de equipamentos médicos compartilháveis e técnicas de assepsia, como higiene correta das mãos e uso de desinfetantes devem ser seguidas com rigor e atenção, evitando assim, a incidência de colonização, transmissão e surtos nestes locais (BALABAN et al., 2019).

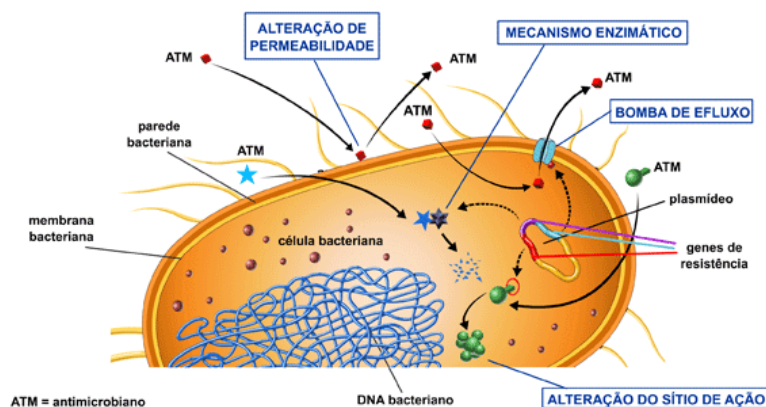
2.3 Resistência bacteriana

A resistência bacteriana tem aumentado gradativamente ao longo dos anos, representando grande ameaça à saúde humana, animal e ambiental. Esse mecanismo de “escape”, típico desses patógenos, é melhor compreendido através da sua ecologia, evolução e adaptação (ALI et al., 2018). O surgimento de resistência é um fenômeno natural e característico desses microrganismos, entretanto, o uso generalizado, excessivo e indiscriminado de antimicrobianos por parte de humanos, animais e na agricultura impõe pressões seletivas nas comunidades microbianas, intensificando sua propagação e disseminação nos mais diversos ecossistemas (SUGDEN et al., 2016; LARSSON; FLACH, 2021).

As bactérias possuem ampla capacidade de expressar resistência intrínseca aos antimicrobianos, ou seja, mecanismo de resistência natural (característica inata) de um gênero ou espécie e, podem também expressar resistência adquirida, quando uma bactéria adquire mecanismos de resistência por mutação ou pela aquisição exógena de genes potenciadores de resistência (transferência horizontal) (HOLMES et al., 2016). A transferência horizontal de genes pode ocorrer por mecanismos de conjugação (plasmídeo, transposons e integrons), transdução (bacteriófagos) e transformação (ambiental, via recombinação genética) (JIANG et al., 2017; DURÃO et al., 2018). Além disso, também podem expressar resistência adaptativa, que consiste em resistência induzida por um sinal ou fator ambiental específico, como por exemplo, estresse, temperatura, disposição de nutrientes, condições de crescimento e até mesmo pH. Por outro lado, se comparada a resistência intrínseca e adquirida, a resistência adaptativa é rápida e transitória, podendo reverter seu fenótipo de resistente para não resistente de acordo com a disponibilidade do antimicrobiano presente no ambiente (MOTTA et al., 2015; LEE et al., 2019).

De fato, o mecanismo de resistência bacteriano é tipicamente resultado da produção de enzimas que degradam ou modificam os antimicrobianos (β -lactamases que atuam na clivagem dos anéis β -lactâmicos), alteração de permeabilidade da membrana externa, sistema de efluxo hiperexpressos (bombas de efluxo), alteração do sítio (alvo) de ligação dos antimicrobianos e bloqueio ou proteção desses sítios de ligação (Figura 4) (CROFTS et al., 2017; ANVISA, 2022).

Figura 4 - Mecanismos de resistência bacteriana contra antimicrobianos.



Fonte: ANVISA, 2022.

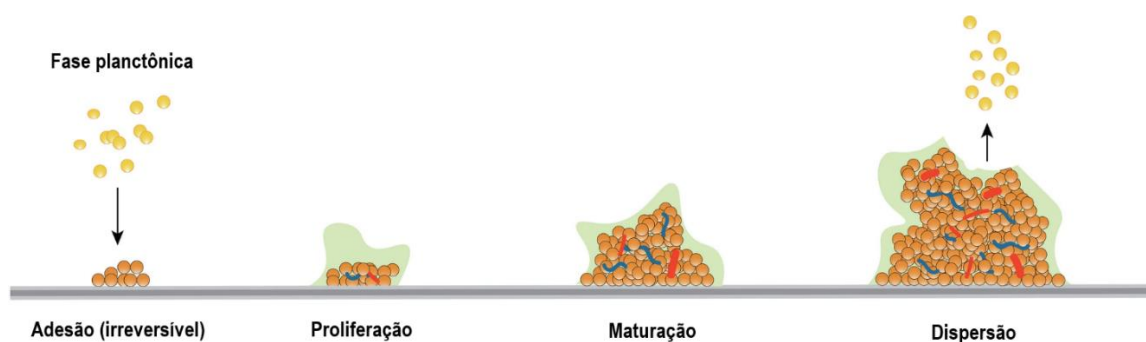
Adicionalmente, patógenos bacterianos podem ainda, se organizar em uma variedade de estados coletivos, sendo estes, denominados biofilmes. Os biofilmes são um dos estilos de vida bacteriano mais bem sucedidos e estudados, em que agregados de microrganismos formadores de comunidades altamente estruturadas, são embebidos por uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), constituída em sua grande maioria por água (97%) e polissacarídeos solúveis, embora possa ser encontrada juntamente com proteínas, fosfolípídios e DNA extracelular (FLEMMING et al., 2016; KOO et al., 2017; JAMAL et al., 2018). Todavia, essa rede de proteção possui capacidade de evitar ações diretas contra agentes que compõem essas unidades, podendo levar ao aprisionamento e inativação de antimicrobianos e mecanismos de defesa do próprio hospedeiro (MAGANA et al., 2018).

Surpreendentemente, essas comunidades multiestruturadas e complexas podem estabelecer comunicação célula-célula denominada *quorum-sensing* (QS) por moléculas de sinalização intercelular (FLEMMING et al., 2016; WELLINGTON; GREENBERG, 2019). No sistema de QS, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas compartilham de diversos mecanismos, como a formação de biofilmes monoespécies ou mistos, expressão de fatores de virulência, esporulação, regulação de bioluminescência e transferência de genes, podendo conferir resistência aos antimicrobianos, comprometendo diretamente as defesas naturais do organismo acometido (WHITELEY et al., 2017; RUHAL; KATARIA et al., 2021).

Nas últimas décadas, a incidência de infecções recorrentes de caráter crônico em seres humanos tem sido amplamente associada a bactérias formadoras de biofilmes, correspondendo a 80% de todos os casos, elevando todos os anos as taxas de hospitalização e os índices de morbimortalidade (SHARMA et al., 2019). O desenvolvimento de biofilmes clinicamente relevantes está frequentemente associado a superfícies abióticas, incluindo dispositivos médicos como cateteres intravasculares e urinários, válvulas cardíacas, próteses articulares, implantes neurocirúrgicos e dispositivos oculares (PERCIVAL et al., 2015; WOLFMEIER et al., 2018; DOSTERT et al., 2019). Os microrganismos mais associados a esses dispositivos incluem bactérias Gram-positivas como *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e Gram-negativas como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, que, em muitos casos, representam um enorme desafio na sua erradicação (PERCIVAL et al., 2015).

A formação e instalação dos biofilmes bacterianos consiste de etapas distintas com características próprias. Esse processo dinâmico inicia-se com o transporte de bactérias (fase planctônica) para a superfície de um substrato, posteriormente adesão bacteriana ao mesmo de forma reversível, seguida de transição da forma reversível para irreversível, maturação em larga escala dessa comunidade estrutural e dispersão, quando ocorre a deformação da matriz polimérica extracelular e liberação desse microrganismo para o meio, que por sua vez, retornam a sua fase inicial (estilo de vida planctônico) do ciclo de aderência e colonização (Figura 5) (CARNIELLO et al., 2018; RUMBAUGH; SAUER, 2020; HOU et al., 2022).

Figura 5 - Etapas de formação e dispersão do biofilme bacteriano.



Fonte: Adaptado de HOU et al., 2022.

Em particular, está claro que a resistência global aos antimicrobianos não apresenta sinais de declínio, embora possa mudar de direção. Esse problema multifatorial tem colocado em risco a saúde humana e carece fortemente de iniciativas imediatas. No entanto, investigar a resistência aos antimicrobianos não é uma tarefa tão simples, pois envolve processos complexos, dinâmicos e multifacetados que refletem as grandes mudanças nas comunidades microbianas induzidas pela humanidade ao longo dos tempos (ZHU et al., 2017). Assim, uma melhor compreensão de habitat, fatores genéticos, sociais e ambientais ainda precisam ser levados em consideração. Além disso, os antimicrobianos disponíveis atualmente não acompanham a resistência bem sucedida alcançada por esses microrganismos (ANDERSSON et al., 2020). Como resultado, estima-se que infecções causadas por organismos resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos cause 700.000 mil mortes por ano e prevê ainda que esse percentual aumente para 10,5 milhões até 2050, gerando dessa forma, enormes impactos sociais e econômicos para todo o mundo (O'NEILL, 2016, GHOSH et al., 2019).

Desde seu surgimento em dezembro de 2019 (doravante COVID-19), a síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) representou, em sua totalidade, um grave problema emergente de saúde pública globalmente. Além disso, o uso inicial e ainda desconhecido de determinados antimicrobianos em seu tratamento, pode, por sua vez, ter agravado ainda mais a disseminação da resistência antimicrobiana no ambiente hospitalar e na comunidade. O impacto causado ainda permanece desconhecido e carece fortemente de ações conjuntas a longo prazo no monitoramento e controle da grave resistência antimicrobiana sob a pandemia de COVID-19 (RAWSON et al., 2020).

Segundo a OMS (2020) é preocupante a crescente escassez de incentivo e inovação do poder público e privado frente ao desenvolvimento de novos antimicrobianos para o combate de bactérias multirresistentes. Neste sentido, em fevereiro de 2017 foi divulgada a primeira lista dos “agentes patogênicos prioritários” resistente aos antimicrobianos, contendo 12 famílias de bactérias, o que representa grande ameaça à saúde humana. A lista foi dividida em três categorias de acordo com a urgência / prioridade em: crítica, alta e média, como mostrado na tabela 1 (WHO, 2017).

Tabela 1 - Lista de agentes patogênicos prioritários divulgada pela OMS.

Categoria de prioridade	Patógenos	Resistência a antibióticos
1. Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Resistente a carbapenêmicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente a carbapenêmicos
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Resistente a carbapenêmicos, produtoras de ESBL
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Serratia spp</i> <i>Proteus spp</i>	Resistente a cefalosporinas de terceira geração
2. Alta	<i>Enterococcus faecium</i>	Resistente à vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente à meticilina, com sensibilidade intermediária e resistência à vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Resistente à claritromicina
	<i>Campylobacter</i>	Resistente à fluoroquinolona
	<i>Salmonella spp.,</i>	Resistente à fluoroquinolona
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Resistente à cefalosporina e às fluoroquinolonas
3. Média	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina não suscetível
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Resistente à ampicilina
	<i>Shigella spp.</i>	Resistente às fluoroquinolonas

Legenda: ESBL (Beta-lactamase de espectro estendido).

Fonte: Adaptado de WHO, 2017.

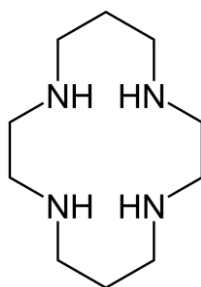
Portanto, esforços no combate à resistência antimicrobiana tem se concentrado em ações conjuntas no melhor diagnóstico, práticas e orientação consciente na prescrição de antimicrobianos e na prevenção de infecções. Além disso, a grande escassez de recursos tem impossibilitado o desenvolvimento de antimicrobianos clinicamente eficazes, com a maioria não apresentando novas classes, ônus este que precisa ser urgentemente revertido (CHRISTAKI et al., 2020). Neste contexto, uma estratégia que vem sendo amplamente explorada é a complexação de moléculas ativas a íons metálicos, para assim, potencializar

a atividade antimicrobiana (SANTI et al., 2016). Alternativamente, a química de coordenação tem visado a junção / complexação desses íons metálicos no intuito de conter e controlar infecções e, mesmo na modificação dessas moléculas para o desenvolvimento de novos ativos antimicrobianos (GRABCHEV et al., 2017).

2.4 Ligante macrocíclico Cyclam

O ligante Cyclam (1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano) é um composto orgânico, com estrutura altamente versátil e modificável, devido sua constituição de uma tetraamina macrocíclica, apresentando 14 átomos em sua estrutura e ampla capacidade de ligação a íons metálicos bioativos, como o ferro (Fe) (Figura 6). Essa molécula foi sintetizada em 1937 por Van Alphen, porém somente na década de 60 que abriu-se discussões sobre sua estabilidade termodinâmica e cinética (MEYER et al., 1998).

Figura 6 - Representação estrutural do ligante macrocíclico Cyclam



Fonte: Autor, 2022.

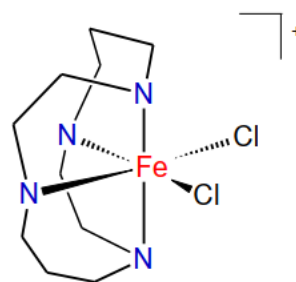
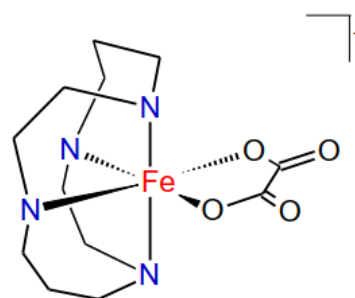
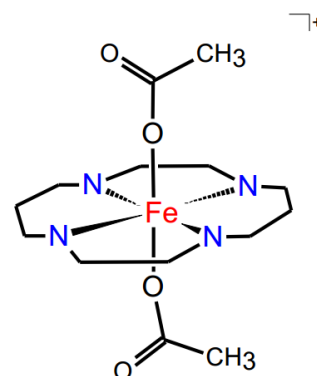
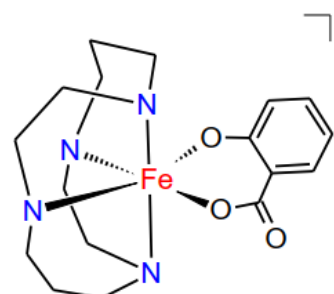
Este ligante coordena-se a centros metálicos com quatro átomos de nitrogênio em sua estrutura. Dessa forma, metais com número de coordenação 6, como por exemplo, o ferro, o cyclam, disponibiliza ainda duas posições lábeis na esfera de coordenação do metal, permitindo, dessa forma, a síntese de duas formas isoméricas, conhecidas como *cis* e *trans* (BAREFIELD, 2010).

Devido a sua versatilidade de ligação a íons metálicos, principalmente metais de transição como Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Níquel (Ni), Ouro (Au) e Prata (Ag), este ligante tem despertado grande interesse na síntese

de compostos com potencial atividade biológica. Todavia, complexos macrocíclicos tem se destacado pelo notável potencial antibacteriano, antifúngico, antiviral, anticarcinogênico, antimalárico, antiesquistossomose, bem como, para o desenvolvimento de compostos ativos antileishmania (HUBIN et al., 2014; KHAN et al., 2016; AMMETER et al., 2019; SAKYIAMAHA et al., 2019; HUBIN et al., 2019; ALVES et al., 2019).

O Cyclam possui ainda uma ampla variedade de aplicações nos mais diversos campos da pesquisa, que vão desde sua utilização em sondas luminecentes, identificação molecular de ácidos nucleicos (DNA e RNA), inibidores de células tumorais e fotoquímica (WEN et al., 2011; WONG et al., 2017; PILON et al., 2019). Além disso, propriedades antimicrobianas do Cyclam e seus derivados contra *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* tem sido amplamente relatadas (ALVES et al., 2019; AMMETER et al., 2019; CLAUDEL et al., 2020; SMITH et al., 2022).

Adicionalmente, um estudo realizado do sistema Fe-cyclam com os ligantes carboxilatos, cloro (Cl), oxalato (ox), acetato (acet) e salicilato (sal) a partir da síntese do complexo precursor *cis*-[Fe(cyclam)Cl₂]Cl nomeado (**D1**) e seus derivados [Fe(cyclam)ox]PF₆ (**D2**), *trans*-[Fe(cyclam)(acet)₂]PF₆ (**D3**) e [Fe(cyclam)sal]PF₆ (**D4**) (OLIVEIRA, 2018), tem despertado grande interesse com potencial antibacteriano, uma vez que, sua utilização torna a pesquisa imprescindível e inédita na busca de novos ativos (Tabela 2).

Tabela 2 - Representação dos complexos, fórmula mínima, identificação e estrutura.**Complexo:** *cis*-[Fe(cyclam)Cl₂]Cl**Fórmula Mínima:** FeC₁₀H₂₄N₄Cl₃**Identificação:** D1**Estrutura:****Complexo:** [Fe(cyclam)ox]PF₆**Fórmula Mínima:** FeC₁₂H₂₄N₄O₄PF₆**Identificação:** D2**Estrutura:****Complexo:** *trans*-[Fe(cyclam)(acet)₂]PF₆**Fórmula Mínima:** FeC₁₄H₃₀N₄O₄PF₆**Identificação:** D3**Estrutura:****Complexo:** [Fe(cyclam)sal]PF₆**Fórmula Mínima:** FeC₁₇H₂₈N₄O₃PF₆**Identificação:** D4**Estrutura:**

2.5 Ferro

O ferro (Fe) é um dos elementos mais facilmente encontrados no universo e o quarto mais abundante na crosta terrestre, com aproximadamente 5% em massa, dando lugar apenas ao alumínio em termos de grandeza e abundância. Também se encontra presente no sol, diversas estrelas e provavelmente o principal constituinte do núcleo externo do planeta terra, enquanto que o núcleo interno é formado por ferro e níquel (ILBERT; BONNEFOY, 2013).

Este metal de transição é utilizado pela grande maioria dos organismos e essencial em diversos processos biológicos vitais, incluindo desde o transporte de oxigênio, fixação de nitrogênio, respiração celular nas mitocôndrias, biossíntese de DNA, reparo de ácidos nucleicos, até o crescimento, morte celular e proteção contra espécies reativas de oxigênio (EROS) (BROWN et al., 2021; VOGT et al., 2021). Além disso, o ferro pode existir em dois diferentes estados de oxidação, Fe^{2+} (íon ferroso) e Fe^{3+} (íon férrico) envolvidos em processos de oxi-redução. A forma ferrosa (Fe^{2+}) é bem mais solúvel, porém, encontrada em ambientes com baixo pH ou condições com depleção de oxigênio (anóxia), enquanto que a forma férrica (Fe^{3+}) é altamente insolúvel em água e encontrada na presença de altas concentrações de oxigênio (ANDREWS et al., 2013).

Particularmente, o ferro (Fe) é um micronutriente de extrema importância no metabolismo das bactérias, sendo necessários para diversas enzimas e proteínas que utilizam esse metal como cofator na sua constituição. Logo, esses patógenos também enfrentam grandes problemas em condições de pH neutro e alcalino, pois os sais de ferro disponíveis encontram-se insolúveis, acarretando no seu não aproveitamento pelas bactérias. No entanto, para lidar com a escassez desse importante oligoelemento, as bactérias utilizam de diferentes estratégias para adquiri-lo do ambiente (SHELDON; HEINRICHS, 2015). Esses mecanismos podem incluir a absorção de ferro por meio de moléculas orgânicas, como citrato ou heme e produção de sideróforos (do grego 'transportador de ferro'), que são metabólitos secundários específicos para íons de ferro, principalmente Fe^{3+} (ANDREWS et al., 2013; KRAMER et al., 2020).

A grande maioria das espécies bacterianas são reconhecidas por produzirem e secretarem sideróforos, tornando esse mecanismo altamente prevalente e essencial na captação, transporte e internalização de ferro no

universo microbiano (MIETHKE; MARAHIEL, 2007). Os quatro tipos principais de sideróforos são distinguíveis por meio das suas proporções de quelação de ferro, em catecolato, fenolato, hidroxamato e carboxilato, podendo também ser encontrados diversos outros tipos (KRAMER et al., 2020). E como exemplo de sideróforos secretados pela espécie *S. aureus* temos a estafiloferrina A e B (MIETHKE; MARAHIEL, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Determinar o potencial antibacteriano dos complexos *cis*-[Fe(cyclam)Cl₂]Cl (**D1**), [Fe(cyclam)ox]PF₆ (**D2**), *trans*-[Fe(cyclam)(acet)₂]PF₆ (**D3**) e [Fe(cyclam)sal]PF₆ (**D4**) contra linhagens de *Staphylococcus aureus*, bem como avaliar o potencial citotóxico dessas moléculas, visando a descoberta de novos ativos contra infecções causadas por esse patógeno.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas *in sílico* dos complexos (**D1**) a (**D4**);
- Avaliar a influência da exposição com os complexos (**D1**) a (**D4**) na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e macrófagos murinos (J774A.1);
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos complexos (**D1**) a (**D4**) diante das linhagens referência de *S. aureus*;
- Avaliar o efeito dos complexos (**D2**) e (**D4**) sobre a densidade celular de linhagens referência de *S. aureus*;
- Investigar o efeito dos complexos (**D2**) e (**D4**) no envoltório celular de linhagens de *S. aureus*;
- Determinar o efeito de concentrações subinibitórias dos complexos (**D2**) e (**D4**) na expressão de fatores de virulência de linhagens de *S. aureus*;
- Investigar a ação dos complexos (**D2**) e (**D4**) em biofilmes de população formados pelas linhagens de *S. aureus* por meio de estudos nas fases de adesão e proliferação de biofilmes pré-formados e na composição da matriz polimérica extracelular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Compostos de estudo

Os complexos *cis*-[Fe(cyclam)Cl₂]Cl (**D1**), [Fe(cyclam)ox]PF₆ (**D2**), *trans*-[Fe(cyclam)(acet)₂]PF₆ (**D3**) e [Fe(cyclam)sal]PF₆ (**D4**) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Daniel de Lima Pontes do Laboratório de Química de Coordenação e Polímeros (LQCPol) do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN.

4.2 Estudos *in silico*

Os estudos *in silico* para avaliar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (alvos biológicos) dos complexos (**D1**) a (**D4**) foram conduzidos utilizando-se de duas plataformas *on-line* (*pkCSM*® e *Pass online*®).

4.2.1 Avaliação das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (alvos biológicos) dos complexos (**D1**) a (**D4**)

Notações SMILE (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) foram inseridas na versão livre dos softwares (*pkCSM*® e *Pass online*®) para os complexos (**D1**) a (**D4**). A análise (*pkCSM*®) seguiu-se avaliando os parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade). Para o parâmetro absorção, foram utilizados os modelos de absorção intestinal e permeação cutânea em humanos. Quanto ao parâmetro distribuição dos complexos, foi avaliado a permeabilidade no sistema nervoso central em humanos (SNC). No que diz respeito ao metabolismo, foram observados se os complexos (**D1**) a (**D4**) teriam capacidade de potencializar ou inibir enzimas do complexo citocromo P 450 (CYP 450). O parâmetro excreção foi avaliado pela capacidade de inibição do transporte renal de cátions orgânicos. O perfil citotóxico foi avaliado pelos parâmetros de toxicidade AMES (potencial mutagênico), hepatotoxicidade e sensibilização cutânea.

Em seguida, foram analisados possíveis alvos farmacodinâmicos dos complexos (**D1**) a (**D4**) pelo software *Pass online*® (FILIMONOV et al., 2014). E

dentre os alvos moleculares de interesse, analisou-se as enzimas microbianas, ação de membrana e inibição de replicação do DNA. Os valores encontrados foram tabelados seguindo o parâmetro “Capacidade de ser Ativo (Pa) e Inativo (Pi)”. O ponto de corte utilizado foi de 30% (0,30).

4.3 Ensaios de citotoxicidade

4.3.1 Linhagens celulares

Nos ensaios de viabilidade celular foram utilizadas as linhagens J774A.1 ATCC® TIB-67™ cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Gilson Costa Macedo (Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia - UFJF) e macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c cedidos gentilmente pela Profa. Dra. Elaine Soares Coimbra (Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia - UFJF).

4.3.2 Cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c

Macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c previamente inoculados com meio tioglicolato (Sigma®) a 3% foram utilizados para a realização dos ensaios de viabilidade celular. Inicialmente os macrófagos foram cultivados em microplacas (96 poços) de poliestireno, na concentração de 2×10^5 células por poço em meio RPMI-1640 (Gibco®) suplementado com 2 mM de L-glutamina (5% de SFB e 100 µg/mL de penicilina / estreptomicina) mantidos a 37°C com atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂) até a realização do ensaio. Em seguida, diferentes concentrações dos complexos (D1) a (D4) foram acrescidas (300; 150; 75; 37,5 e 18,75 µg/mL) em triplicata e o volume final foi completado para 100 µL. Posteriormente, seguiu-se uma nova incubação por 48 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e realização do teste do MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Dimetilsufóxido (DMSO) a 0,06% (veículo) foi utilizado como controle negativo. O protocolo para a utilização dos animais foi seguido pela aprovação do Comitê de Ética em

Pesquisa Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) - Minas Gerais sob (nº 007/2018-CEUA).

4.3.3 Cultura de células J774A.1

As células J774A.1 (linhagem imortalizada) foram cultivadas inicialmente em garrafas de cultura de 25cm² (Nunc™) usando meio RPMI-1640 (Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina - Gibco®) e incubadas a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias a partir do segundo dia após a semeadura, as células foram então colhidas na fase logarítmica de crescimento após atingir 80-90% de confluência e transferidas para garrafas de cultura de 75cm². Devido a linhagem utilizada ser aderente, para sua raspagem / remoção no interior da garrafa, utilizou-se cabos de poliestireno flexíveis (*cell scraper* - Sigma®).

Após um período de incubação de aproximadamente 3 dias, as células passaram pelo mesmo processo de tratamento, porém desta vez, não foram transferidas para garrafas de cultura como mencionado acima, mas sim, ressuspensas em meio RPMI-1640 (Gibco®) suplementado e a sua concentração foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer, utilizando o corante *Trypan blue*. Posteriormente, as células J774A.1 foram semeadas em microplacas de 96 poços de fundo chato, na concentração de 1x10⁵ células por poço, em um volume final de 100 µL. Em seguida, foram incubadas por 24 horas a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. O processo seguinte consistiu na retirada do meio de cultura presente nas microplacas de 96 poços e adição de 200 µL de meio RPMI-1640 (Gibco®) suplementado (2% de SFB e 1% de penicilina / estreptomicina) contendo o tratamento com os complexos (**D1**) a (**D4**) nas concentrações de (300 a 18,75 µg/mL) em triplicata. Por fim, seguiu-se uma nova incubação por 24 horas, quando foi realizado o teste do MTT. DMSO a 0,06% (veículo) foi utilizado como controle negativo.

4.3.4 Avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT

Para determinar a viabilidade celular após a exposição com os complexos (D1) a (D4) foi utilizado o método colorimétrico do MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). O método é amplamente utilizado para avaliação de citotoxicidade, viabilidade e proliferação celular. Baseia-se na metabolização do sal MTT pelas células, que no interior das mitocôndrias é reduzido a um produto chamado formazan (coloração violeta). Uma vez solubilizado, o produto formado (formazan), pode ser quantificado e sua intensidade colorimétrica é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983). Após o período de incubação, foram adicionados 10 µL do corante MTT (5 mg/mL, Sigma®) completando o volume do poço com meio RPMI-1640 (Gibco®) ou DMEN suplementado para 100 µL, posteriormente incubação por 2 horas e 30 minutos a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ para a formação de cristais de formazan. Ao final da incubação, o meio foi removido e adicionado 100 µL de DMSO (Sigma®) a cada poço para solubilizar os cristais. Ao final, após a estabilização da cor, as placas foram lidas a um comprimento de onda de 595 nm.

Para o cálculo de viabilidade a seguinte equação foi utilizada:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{100 \times \text{DO}_{595a}}{\text{DO}_{595\text{CTe}}}$$

Equação 1 - Cálculo de viabilidade: Onde DO 595a é o valor médio da densidade óptica das amostras testadas e DO 595 (CTe) valor médio da densidade óptica do controle estimulado e não tratado. (Fonte: ISO 10993-5:2009).

4.4 Atividade antibacteriana *in vitro*

A determinação da atividade antibacteriana dos complexos (D1) a (D4) foi realizada nos Laboratórios de Produtos Naturais Bioativos (LPNB) e Bioensaios, no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) - Minas Gerais.

4.4.1 Linhagens bacterianas

Neste estudo foram utilizadas as seguintes linhagens bacterianas: *S. aureus* ATCC® 25904™ sensível a amoxicilina, *S. aureus* ATCC® 33591™ resistente a meticilina (MRSA) e um isolado clínico resistente de *S. aureus* 05-0052. Esses microrganismos foram cedidos pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brasil.

4.4.2 Preparação do inóculo bacteriano

Todas as linhagens bacterianas foram semeadas em placas de Petri com ágar Mueller Hinton (MH) em fluxo laminar, e posteriormente incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas para verificação do seu crescimento e utilização. Após o período de incubação, as colônias de bactérias foram transferidas para tubos de vidro contendo 5 mL de solução salina estéril a 0,85% com uma concentração alvo de 10^8 UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia por mililitro), correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, foram feitas diluições, transferindo 100 μL da suspensão bacteriana para um tubo de vidro contendo 9,9 mL de solução salina para posterior obtenção do inóculo na concentração de 10^6 UFC/mL. Por fim, o inóculo com concentração de 10^6 UFC/mL foi diluído em microplacas de 96 poços (KASVI® K12-096), obtendo uma concentração final no poço de 10^5 UFC/mL.

4.4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O ensaio para determinação da atividade antibacteriana foi realizado utilizando o método de microdiluição seriada em microplacas estéreis de 96 poços (KASVI® K12-096), seguindo os padrões do CLSI (2018). Os complexos (D1) a (D4) foram preparados a 500 $\mu\text{g/mL}$ em DMSO 1%, em seguida, diluídos sucessivamente, obtendo concentrações de 200 a 1,56 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, foram transferidos 80 μL da solução estoque a 500 $\mu\text{g/mL}$ para microplacas de 96 poços, que já continham 100 μL de caldo MH. Para completar o volume final de 200 μL , foram adicionados 20 μL do inóculo bacteriano a 10^6 UFC/mL de

acordo com o padrão de turbidez 0,5 da escala de McFarland a amostra contida em cada um dos poços. As placas foram então, incubadas em uma estufa bacteriológica a uma temperatura de $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Simultaneamente foi realizado o controle de crescimento das bactérias, utilizando caldo MH e o inóculo bacteriano isento do complexo e controle negativo (esterilidade/branco da amostra). Amoxicilina foi utilizada como controle positivo. A concentração inibitória mínima foi considerada a menor concentração dos complexos (**D1**) a (**D4**) capaz de inibir o crescimento bacteriano, mediante a inspeção a olho nu (ausência de turvação visível). Todas as análises foram realizadas por meio de duplicata de três experimentos independentes.

4.4.4 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada por meio do método de Spencer e Spencer (2004) com algumas modificações. Após definido os valores da CIM, uma alíquota de 10 μL da amostra foi retirada da microplaca de 96 poços (KASVI® K12-096), onde não houve crescimento bacteriano visível e posteriormente cultivadas em placas de Petri com ágar MH. Em seguida, as placas foram incubadas a uma temperatura de $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para avaliação.

4.5 Avaliação da densidade celular bacteriana

A contagem de células bacterianas foi realizada em preparações de citocentrifugação de acordo com Silva et al. (2014), onde, utilizou-se um marcador que se liga a fita dupla de DNA, emitindo uma fluorescência azul ciano, chamado DAPI (JOUX e LEBARON, 2000). Linhagens de *S. aureus* em solução salina, foram inoculadas em tubos com caldo MH contendo os complexos (**D2**) e (**D4**) (valor de CIM) e incubadas a 37°C durante 24 horas. Linhagens bacterianas inoculadas somente em caldo MH serviram como controles de crescimento. Posteriormente, as amostras foram fixadas em formaldeído 4%, coradas com o marcador fluorescente DAPI na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ e preparadas em citocentrífuga (Shandon cytospin 4, Thermo Electron) a 452g/ 10 minutos em alta aceleração. As linhagens bacterianas nas lâminas de vidro foram contadas em

microscópio de fluorescência (Olympus BX-60) em 10 campos aleatórios, com aumento de 1000x, utilizando-se o óleo de imersão. Para a quantificação bacteriana foi utilizada a seguinte fórmula: $(N \times A) / (V \times A)$, onde N= corresponde ao número de células contadas, A= área da grande contada e V= volume da amostra x volume contado / volume total.

4.6 Estudo em envoltório celular bacteriano

As análises em envoltório celular bacteriano consistiram na avaliação da capacidade dos complexos (D2) e (D4) em romper o envoltório celular, por meio dos ensaios de permeabilidade com cristal violeta, extravasamento de membrana, dosagem de proteínas totais e viabilidade e atividade metabólica bacteriana.

4.6.1 Permeabilidade com cristal violeta

Os ensaios de permeabilidade com cristal violeta foram conduzidos de acordo com o método descrito por Devi et al. (2010) com algumas modificações. As linhagens bacterianas de *S. aureus* recém cultivadas em caldo MH foram inoculadas em tubos suplementados com os complexos (D2) e (D4) (valores de CIM) e incubadas a 35°C por 4 horas. As suspensões de células bacterianas foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos. Após centrifugados, os *pellets* foram ressuspensos em 10 µg/mL de uma solução de cristal violeta e incubados por 10 minutos a 35°C. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados a 1000 rpm por 15 minutos e a densidade óptica (DO) do sobrenadante foi medida a 570 nm em um espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). A DO do sobrenadante do grupo de células não tratadas foi utilizado como controle de crescimento. O valor de DO da solução de cristal violeta foi considerado como 100%. A porcentagem de absorção do cristal violeta foi expressa pela seguinte fórmula: $(\text{valor de DO da amostra} / \text{valor de DO da solução de CV}) \times 100 = \text{captação percentual de cristal violeta}$.

4.6.2 Extravasamento de membrana

O ensaio de extravasamento de membrana foi realizado de acordo com o método de Tang et al. (2008) com algumas modificações. Linhagens bacterianas de *S. aureus* foram previamente cultivadas e posteriormente incubadas em caldo MH a 35°C por 24 horas. Decorrido esse tempo, a cultura foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos, lavada e ressuspensa com solução tampão de salina com fosfato (PBS) 10 mM (pH 7,4), atingindo uma densidade final de 10^6 UFC/mL. As linhagens de *S. aureus* foram incubadas com os complexos (**D2**) e (**D4**) (valor de CIM) nos seguintes tempos: 0, 1, 2, 3, e 4 horas. As culturas bacterianas incubadas com PBS 10 mM (pH 7,4), foram utilizadas como controle de crescimento. Seguido o período de incubação, as suspensões celulares foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos e posteriormente realizou-se a leitura dos sobrenadantes a 260 nm em um espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). O experimento foi realizado em triplicata. Após a leitura de 4 horas, o sobrenadante foi reservado para dosagem de proteínas totais.

4.6.3 Dosagem de proteínas totais

O ensaio da dosagem de proteínas totais foi realizado de acordo com o item 4.6.2, que após 4 horas foram coletados os sobrenadantes e realizada a dosagem conforme o método adaptado de Lowry (1951). Inicialmente 10 µL do sobrenadante foram aliquotados em tubos de ensaio contendo água e 2 mL de solução reativa (tartarato de sódio de potássio 2%, sulfato de cobre 1% e solução alcalina de NaOH e Na₂CO₃). Após homogeneização, seguiu-se 10 minutos de repouso. Após este período, foram adicionados 2 mL da solução de Follin. Os tubos foram novamente homogeneizados e deixados em repouso por mais 30 minutos. Posteriormente, uma alíquota de cada tubo foi passada para uma placa de 96 poços e lida a 660 nm em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) e as absorbâncias foram comparadas com uma curva de calibração de albumina feita no mesmo dia. O ensaio foi realizado em duplicata.

4.6.4 Viabilidade e atividade metabólica bacteriana

A viabilidade das células bacterianas foi avaliada pela atividade metabólica intracelular utilizando o kit *LIVE/DEAD® BacLight™* (Molecular Probes), que consiste em dois marcadores fluorescentes: Syto 9 e Iodeto de propídeo (PI). Linhagens de *S. aureus*, previamente cultivadas conforme item 4.4.3, foram preparadas em salina estéril (10^8 UFC/mL) e posteriormente inoculadas em tubos com caldo MH contendo os complexos (D2) e (D4) (valor de CIM), obtendo uma concentração final de 10^6 UFC/mL. Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas. Uma Alíquota de 1 mL das células bacterianas em suspensão foram coradas com os reagentes e incubadas por 30 minutos sob abrigo de luz. As amostras foram preparadas por citocentrifugação (Shandon cytopspin 4, Thermo Electron) a 500g/10 minutos em alta aceleração (SILVA, et al. 2014). Em seguida, as lâminas resultantes foram analisadas em microscópio de fluorescência BX-60 (Olympus). Para a contagem das células totais, 10 campos aleatórios foram utilizados. Por fim, a densidade celular foi expressa pela quantidade total de células e a proporção células vivas / ativas e mortas / inativas foi estabelecida. O experimento foi realizado em triplicata.

4.7 Avaliação do efeito de concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4) na expressão de fatores de virulência de linhagens de *S. aureus*

A avaliação da alteração na expressão de fatores de virulência causadas por linhagens de *S. aureus* pela ação de concentração inibitória e subinibitórias com os complexos (D2) e (D4) foram avaliadas por meio da atividade Anti-catalase, Anti-coagulase, Anti-hemolítica, Anti-lipolítica e Anti-DNAse (LINHARES; XIMENES, 2011).

4.7.1 Atividade Anti-catalase

A atividade da enzima extracelular catalase foi determinada pela intensidade de degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. Para tanto, alíquotas da cultura microbiana (100 μ L) previamente expostas por 24 horas a concentração inibitória e subinibitórias (CIM, 1/2 CIM e

1/4 CIM) dos complexos (**D2**) e (**D4**) foram transferidas para uma microplaca (96 poços) de poliestireno e posterior adição de peróxido de hidrogênio a 3% (100 µL). A formação de bolhas foi avaliada atribuindo aos escores a sua intensidade de reação (+) fraca; (++) moderada e (+++) intensa. O experimento foi realizado em triplicata (LINHARES; XIMENES, 2011).

4.7.2 Atividade Anti-coagulase

A atividade de coagulase foi determinada, após 45 segundos da aglutinação, utilizando o kit Staphiclin Látex (Laborclin) que detecta a formação de coágulos pela ação instantânea da coagulase (fator clumping) e da proteína A. Dessa maneira, uma alíquota de 20 µL da cultura microbiana previamente exposta por 24 horas a concentração inibitória e subinibitórias (CIM, 1/2 CIM e 1/4 CIM) dos complexos (**D2**) e (**D4**) foram adicionadas a um cartão do teste kit juntamente com 20 µL de látex contendo as partículas sensibilizadas. O experimento foi realizado em triplicata (LINHARES; XIMENES, 2011).

4.6.3 Atividade Anti-hemolítica

O teste da atividade hemolítica detecta a ação de hemolisinas (exotoxinas bacterianas) promovendo a lise de eritrócitos *in vitro*. Neste sentido, as culturas bacterianas previamente expostas a concentração inibitória e subinibitórias (CIM, 1/2 CIM e 1/4 CIM) dos complexos (**D2**) e (**D4**) foram avaliadas quanto o perfil hemolítico de linhagens de *S. aureus*. Para tanto, as culturas previamente expostas durante 24 horas, foram centrifugadas e filtradas em uma membrana (0,45 µm). Posteriormente, uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi adicionada a 180 µL de uma suspensão de hemácias a 2% e incubada por 45 minutos a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, a suspensão de eritrócitos foi centrifugada e o sobrenadante foi transferido para uma microplaca de 96 poços para leitura das absorbâncias a 570 nm em um espectrofotômetro. O experimento foi realizado em triplicata (LINHARES; XIMENES, 2011). O parecer para a utilização de eritrócitos humanos foi seguido pela aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) - Minas Gerais sob (nº 3.697.188 - CEP).

4.7.3 Atividade Anti-lipolítica

O teste da atividade lipolítica consiste na detecção da degradação de lipídios contidos no meio de cultura, por meio de uma enzima extracelular, a lipase. Para tanto, alíquotas de (50 µL) de culturas previamente expostas durante 24 horas a concentração inibitória e subinibitórias (CIM, 1/2 CIM e 1/4 CIM) dos complexos (D2) e (D4) foram adicionados a poços confeccionados na superfície do ágar MH, adicionado de uma emulsão lipídica a 500 µL (gema de ovo a 50%). Após um período de incubação de 24 horas a 37°C, os halos de lipólise foram medidos com auxílio de um paquímetro. O experimento foi realizado em triplicata (LINHARES; XIMENES, 2011).

4.7.4 Atividade Anti-DNAse

O teste da atividade DNAse consiste na detecção da degradação do DNA contido no meio de cultura, por uma enzima extracelular, a desoxirribonuclease. Inicialmente, uma alíquota de 5 µL das culturas previamente expostas durante 24 horas a concentração inibitória e subinibitórias (CIM, 1/2 CIM e 1/4 CIM) dos complexos (D2) e (D4) foram semeadas na superfície do ágar DNAse Teste Base (HIMEDIA®). Decorrido o período de incubação de 24 horas a 37°C, a superfície do ágar foi recoberta por uma solução de ácido clorídrico (HCl) - 1N, para visualização da atividade enzimática da DNAse (precipitação do DNA não degradado), através de zonas opacas ao redor das culturas. Culturas produtoras de DNAse apresentam uma área transparente ao redor de seu crescimento, evidenciando a degradação do DNA no meio, não precipitando na presença do HCl. O experimento foi realizado em triplicata (LINHARES; XIMENES, 2011).

4.8 Avaliação da atividade antibiofilme formados por linhagens de *S. aureus*

4.8.1 Interferência na fase de proliferação dos biofilmes

O ensaio de ação na fase de proliferação do biofilme pré-formado foi realizado de acordo com Nostro et al. (2007) com algumas modificações. Linhagens de *S. aureus* foram cultivadas como biofilmes usando caldo MH

suplementado com 1% de glicose em microplacas (96 poços) de poliestireno durante um período de 24 horas a 37°C. Após o crescimento, células planctônicas foram removidas cuidadosamente, os poços foram lavados com salina estéril três vezes e preenchidos com 200 µL de diluições dos complexos (D2) e (D4) (valor de CIM). As placas de 96 poços foram então incubadas em uma estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C. Decorrido o prazo de incubação, as placas foram lidas a 600 nm usando um espectrofotômetro. Amoxicilina (valor de CIM) foi utilizada como controle positivo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A porcentagem de redução da proliferação do biofilme foi estabelecida de acordo com a seguinte fórmula: % de redução = (DO no controle - DO no tratamento) × 100 / DO no controle. O experimento foi realizado em triplicata.

4.8.2 Interferência na fase de adesão do biofilme

4.8.2.1 Estudo por espectrofotometria

O ensaio de ação na fase de Adesão dos biofilmes foi conduzido de acordo com Plyuta et al. (2013) com pequenas modificações. Inicialmente foram adicionados 100 µL das suspensões celulares de *S. aureus* (2×10^8 UFC/mL) em microplacas de 96 poços, seguida de adição das concentrações dos complexos (D2) e (D4) (valores de CIM) e incubadas por 24 horas a 37°C. Decorrido o período de incubação, seguiu-se com a remoção das suspensões líquidas e os poços foram lavados com 200 µL de salina tamponada estéril (PBS) 10 mM (pH 7,4), para remoção de bactérias livres e flutuantes (não aderentes). Os biofilmes formados por células aderentes foram corados com 200 µL de cristal violeta (0,1%) e posteriormente incubados a temperatura ambiente por 30 minutos. O excesso de cristal violeta contido foi lavado com PBS e as placas foram fixadas com 200 µL de etanol (96%) e seguido de incubação por 15 minutos. A quantificação da biomassa dos biofilmes foi realizada por medida da densidade óptica à 570 nm. A redução da adesão do biofilme foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: % de redução = (DO no controle - DO em tratamento) × 100 / DO no controle. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.8.2.2 Estudo por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Linhagens de *S. aureus* foram semeadas em ágar MH, incubadas por 24 horas a 37°C e inoculadas em um tubo contendo 5 mL de caldo MH suplementado com 1% de glicose. Em seguida, foram adicionados 500 µL do caldo inoculado (2×10^8 UFC/mL) em placas de 24 poços de poliestireno contendo lamínulas de vidro redondas (13 mm, Glasscyto®). A exposição foi realizada adicionando 500 µL dos complexos (**D2**) e (**D4**) (valor de CIM). Para controles negativo e positivo foram adicionados 500 µL de salina estéril ou amoxicilina (valor de CIM). Os biofilmes formados em lamínulas de vidro (13 mm, Glasscyto®) foram incubados por 24 horas a 37°C e posteriormente fixados em 2,5 de glutaraldeído (C₅H₈O₂) em tampão de cacodilato 0,1 M (pH 7,2). Após a fixação, os biofilmes em lamínulas de vidro foram lavados em tampão de cacodilato e desidratados através de uma série graduada de soluções de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 2x em 100%) durante 15 minutos em cada concentração. Por fim, as amostras foram metalizadas com ouro durante 15 minutos. A ultraestrutura nos biofilmes e na morfologia bacteriana foram observadas por microscopia eletrônica de varredura - MEV (JEOL JSM-6390LV, Tóquio, Japão).

4.8.3 Composição bioquímica da matriz polimérica extracelular

Inicialmente a análise da composição bioquímica da matriz polimérica extracelular foi realizada conforme item 4.8.2.1. Os biofilmes aderentes foram sonicados por 5 minutos em banho-maria ultrassônico para desprendimento. As suspensões celulares foram então reunidas e centrifugadas (3.000 rpm por 10 minutos). O sobrenadante foi utilizado como fonte para estudar a composição bioquímica da matriz polimérica extracelular utilizando a dosagem de carboidratos (CHO) pelo método do ácido fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e dosagem de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

4.9 Análise estatística

Os dados foram expressos utilizando-se de análise paramétrica de variância (ANOVA) seguido do pós teste de Bonferroni. O programa computacional GraphPAD Prism 8 (La Jolla CA, USA) foi empregado para realização das análises. Todos os dados foram reportados como média e desvio padrão, sendo considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Estudos *in silico*

5.1.1 Avaliação das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (alvos biológicos) dos complexos (D1) a (D4).

Os valores dos estudos *in silico* das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas são apresentados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Propriedades farmacocinéticas dos complexos (D1) a (D4) e Amoxicilina.

Absorção	D1	D2	D3	D4	Amoxicilina
Absorção intestinal (humano)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Permeabilidade cutânea	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Distribuição					
Permeabilidade no SNC	Não	Não	Não	Não	Sim
Metabolismo					
Substrato CYP2D6	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor de CYP1A2	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor de CYP2C19	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor de CYP2C9	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor de CYP2D6	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor de CYP3A4	Não	Não	Não	Não	Não
Excreção					
Substrato para transportador renal de cátions orgânicos	Não	Não	Não	Não	Não
Toxicidade					
Toxicidade AMES (Potencial Mutagênico)	Não	Não	Não	Não	Não
Hepatotoxicidade	Não	Não	Não	Não	Sim
Sensibilização cutânea	Não	Não	Não	Não	Não

Fonte: Autor, 2022.

Os resultados apresentados na tabela 3 dos estudos *in silico* das propriedades farmacocinéticas demonstraram que os complexos (D1) a (D4) possuem probabilidades de absorção intestinal em humanos e permeabilidade cutânea. Não foram encontradas probabilidades dos complexos em serem ativos no perfil distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (Tabela 3).

Tabela 4 - Predições das atividades biológicas *in silico* relacionadas aos efeitos antibacterianos dos complexos (D1) a (D4).

Classe	Alvo	D1		D2		D3		D4	
		Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi
Enzimas microbianas	Inibidor de glicosiltransferase de peptídeoglicano	0.641	0.005	0.644	0.005	0.674	0.004	0.509	0.020
	Potencializador da permeabilidade de membrana	0.454	0.031	0.473	0.024	0.473	0.024	0.415	0.050
Ação de Membrana	Antagonista da integridade de membrana	0.461	0.054	0.473	0.051	0.515	0.041	0.370	0.081
	Antagonista do ácido paraaminobenzóico	0.413	0.022	0.432	0.019	0.328	0.053	0.374	0.033
Inibidor de Replicação do DNA	Inibidor de DNA ligase (ATP)	0.335	0.033	0.358	0.025	0.327	0.035	-	-

Legenda - capacidade de ser ativo (Pa); capacidade de ser inativo (Pi).

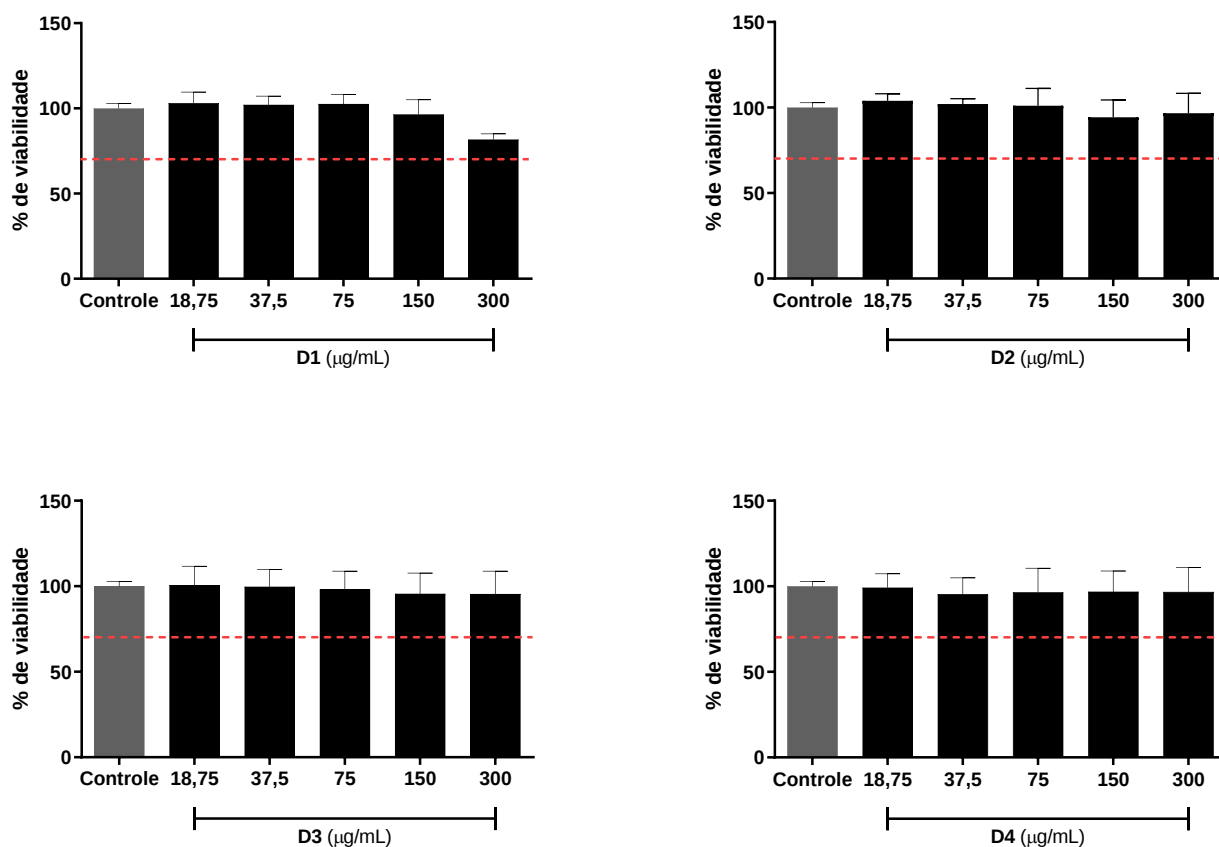
Fonte: Autor, 2022.

Em seguida foi avaliado a propriedade farmacodinâmica (alvos biológicos) dos complexos (D1) a (D4). Os alvos biológicos analisados foram: enzimas microbianas, ação de membrana e inibidor de replicação do DNA. Dentre os alvos biológicos com maior probabilidade de os complexos serem ativos, grande destaque se deu para o inibidor de glicosiltransferase de peptídeoglicano, enzima responsável pela síntese do peptídeoglicano (Tabela 4).

5.2 Avaliação da viabilidade celular em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e J774A.1 expostos aos complexos (D1) a (D4).

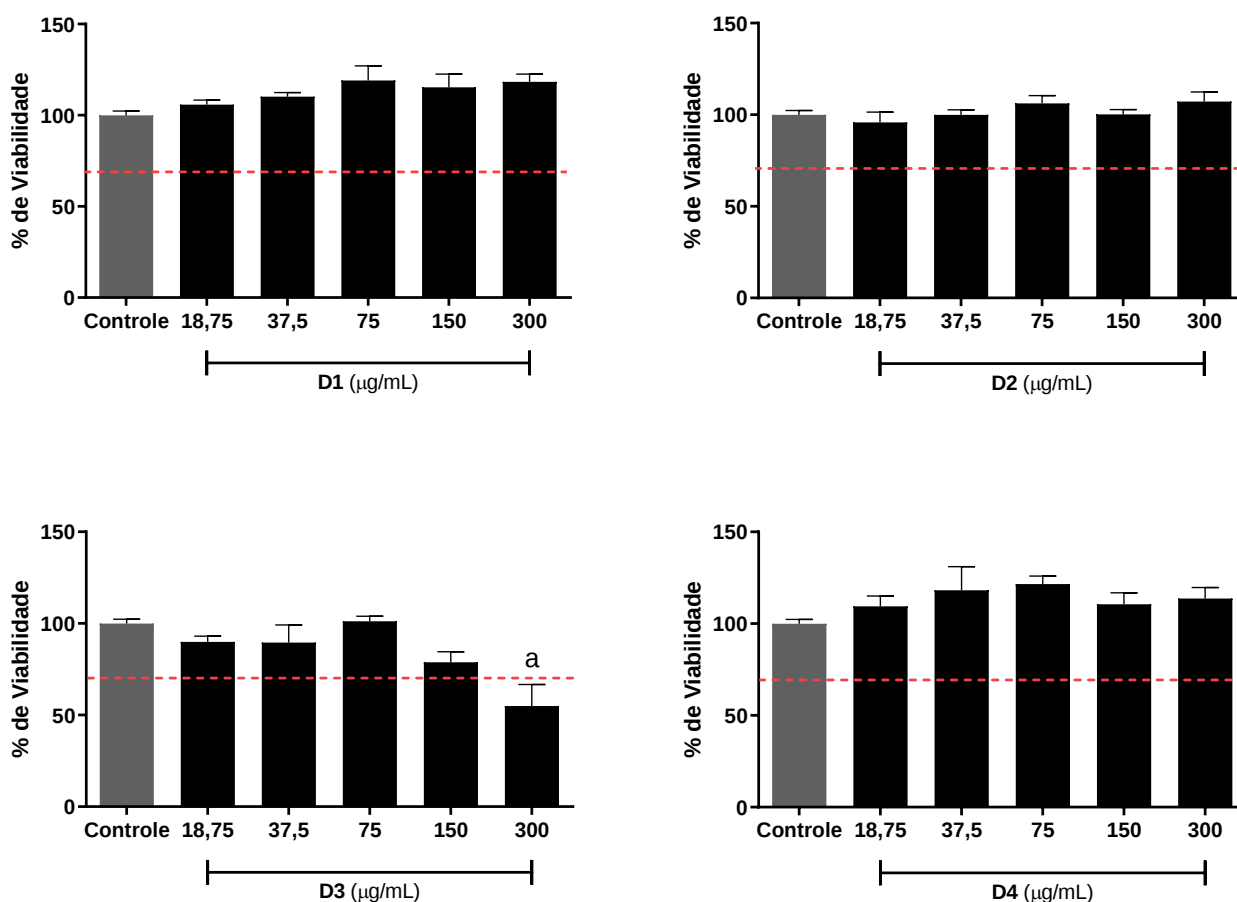
Para avaliar a influência dos complexos na viabilidade celular, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram expostos e submetidos ao teste do MTT (Figura 7). Os resultados demonstram que nenhum dos complexos (D1) a (D4) reduziu significativamente a viabilidade celular das células testadas ($p < 0,05$). Vale ressaltar que a linha tracejada representa a taxa de viabilidade celular de 70% de acordo com os parâmetros da ISO10993-5:2009.

Figura 7 - Avaliação da citotoxicidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com os complexos (D1) a (D4). Macrófagos peritoneais foram cultivados e expostos a diferentes concentrações dos complexos (18,75 a 300 $\mu\text{g/mL}$). Após 48 horas a viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico do MTT. O resultado foi expresso em percentual de sobrevivência em relação às células não tratadas. A linha tracejada em vermelho indica o percentual de viabilidade celular de 70% (ISO10993-5:2009). Legenda: Controle (ANOVA seguido de Bonferroni, $p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média $\pm$ DP.



Em seguida foi investigada a viabilidade celular de células J774A.1 com o intuito de prever segurança na utilização dos complexos (D1) a (D4) (Figura 8). Considerando a taxa de sobrevivência de 70% ou superior (ISO10993-5:2009), o complexo (D3) na concentração de 300 µg/mL se mostrou citotóxico ($p < 0,05$), ou seja, células metabolicamente menos ativas, evidenciado pela linha tracejada em vermelho. Os outros complexos não apresentaram citotoxicidade nas demais concentrações testadas.

Figura 8 - Avaliação da citotoxicidade de células J774A.1 com os complexos (D1) a (D4). Células J774A.1 foram incubadas com diferentes concentrações dos complexos (18,75 a 300 µg/mL) durante 48 horas, respectivamente. Após este tempo, seguiu-se com o teste de viabilidade celular pelo método colorimétrico do MTT como descrito anteriormente. ^aIndica diferença estatística quando comparado ao controle ($p < 0,05$). Legenda: Controle. (ANOVA seguido de Bonferroni, $p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média $\pm$ DP.



5.3 Avaliação da atividade antibacteriana dos complexos (D1) a (D4).

5.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) diante de linhagens referência e um isolado clínico de *S. aureus* são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM), Efeito sobre o valor de CIM, Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos complexos (D1) a (D4) e Amoxicilina contra linhagens de *S. aureus*.

Amostras	Microrganismos	CIM (µg/mL)	Efeito no Valor de CIM	CBM (µg/mL)
D1	<i>S. aureus</i> ATCC® 25904™	100,00	Bacteriostático	>200
	<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	100,00	Bacteriostático	>200
	<i>S. aureus</i> 05-0052	100,00	Bacteriostático	>200
D2	<i>S. aureus</i> ATCC® 25904™	50,00	Bacteriostático	>200
	<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	50,00	Bacteriostático	>200
	<i>S. aureus</i> 05-0052	50,00	Bacteriostático	>200
D3	<i>S. aureus</i> ATCC® 25904™	100,00	Bacteriostático	>200
	<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	100,00	Bacteriostático	>200
	<i>S. aureus</i> 05-0052	100,00	Bacteriostático	>200
D4	<i>S. aureus</i> ATCC® 25904™	50,00	Bacteriostático	>200
	<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	50,00	Bacteriostático	>200
	<i>S. aureus</i> 05-0052	50,00	Bacteriostático	>200
Amoxicilina	<i>S. aureus</i> ATCC® 25904™	0,14	-	-
	<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	12,50	-	-
	<i>S. aureus</i> 05-0052	25,00	-	-

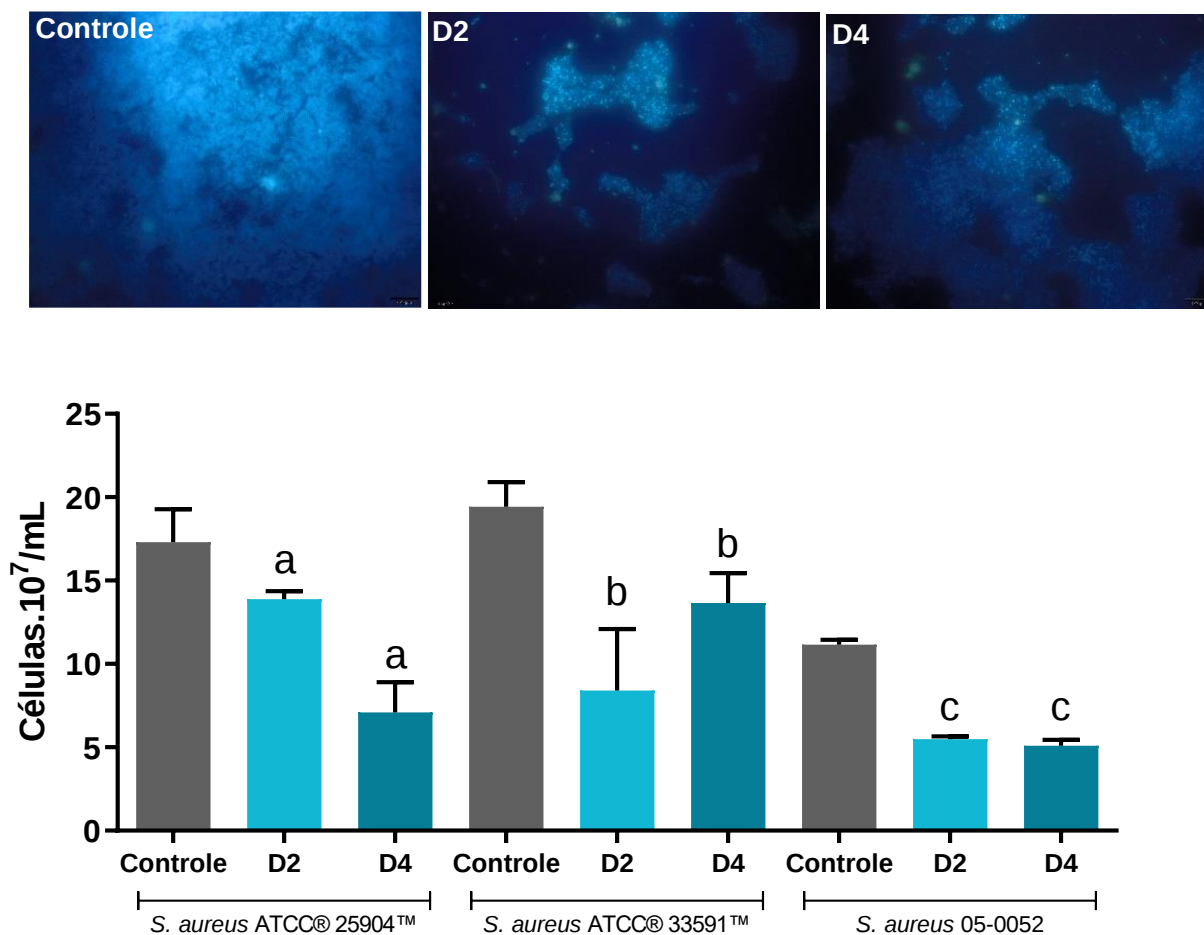
Fonte: Autor, 2022.

De acordo com os dados representados, foi observado que os complexos (D1) a (D4) exibiram valores de CIM que variam de 100 a 50 µg/mL para as linhagens ATCC de referência e isolado clínico de *S. aureus*. Os complexos (D1) e (D3) apresentaram CIM de 100 µg/mL para linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052. Além disso, os complexos (D2) e (D4) apresentaram resultados promissores com valor de CIM de 50 µg/mL para as três linhagens de estudo. Para as linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 valores de CIM de 0,14, 12,5 e 25 µg/mL também foram encontrados para amoxicilina. Logo, considera-se que a sensibilidade a amoxicilina pode ser designada por uma CIM ≤ 2 µg/mL e resistência ≥ 4 µg/mL (CLSI, 2018). Não foi possível determinar o CBM dos complexos (CBM >200 µg/mL). Vale ressaltar que para os valores de CIM, todos os complexos apresentaram efeito bacteriostático na inibição da multiplicação das bactérias testadas (Tabela 5).

5.4 Avaliação da densidade celular bacteriana

Para investigar o efeito dos complexos mais ativos (D2) e (D4) sobre a densidade celular de linhagens de *S. aureus*, as culturas bacterianas foram coradas com o corante DAPI e quantificadas por microscopia de fluorescência (Figura 9). As análises quantitativas mostraram que o complexo (D2) reduziu em 80, 43 e 49% a densidade celular de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052, respectivamente, em relação aos controles. Já o complexo (D4) mostrou uma redução de 40, 70 e 44% de redução da densidade celular de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052, em relação aos controles ($p < 0,05$).

Figura 9 - Densidade celular das linhagens de *S. aureus* expostas aos complexos (D2) e (D4). Células bacterianas cultivadas foram coradas com DAPI e contadas sob microscopia de fluorescência para análise da densidade celular. ^{abc}Indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle. (ANOVA seguido de Bonferroni, $p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média $\pm$ DP.



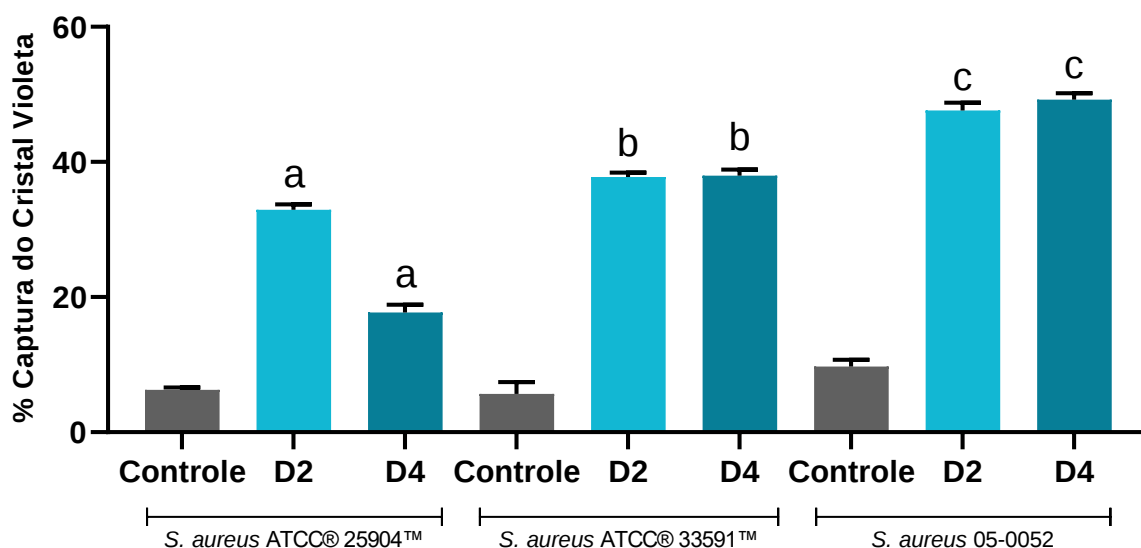
5.4.1 Estudo em envoltório celular bacteriano

5.4.1.1 Permeabilidade com cristal violeta

Os resultados apresentados na (Figura 10) evidenciam que nas células bacterianas expostas ao complexo (D2), houve um aumento de 5,2 vezes da porcentagem da captação de cristal violeta para *S. aureus* ATCC® 25904™; 6,6 vezes para *S. aureus* ATCC® 33591™ e 4,8 vezes para o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052. Para o complexo (D4) houve um aumento de 2,8 vezes da captação de cristal violeta para *S. aureus* ATCC® 25904™; 6,6 vezes para *S.*

aureus ATCC® 33591™ e 5,0 vezes para o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052, respectivamente, quando comparadas aos controles ($p < 0,05$).

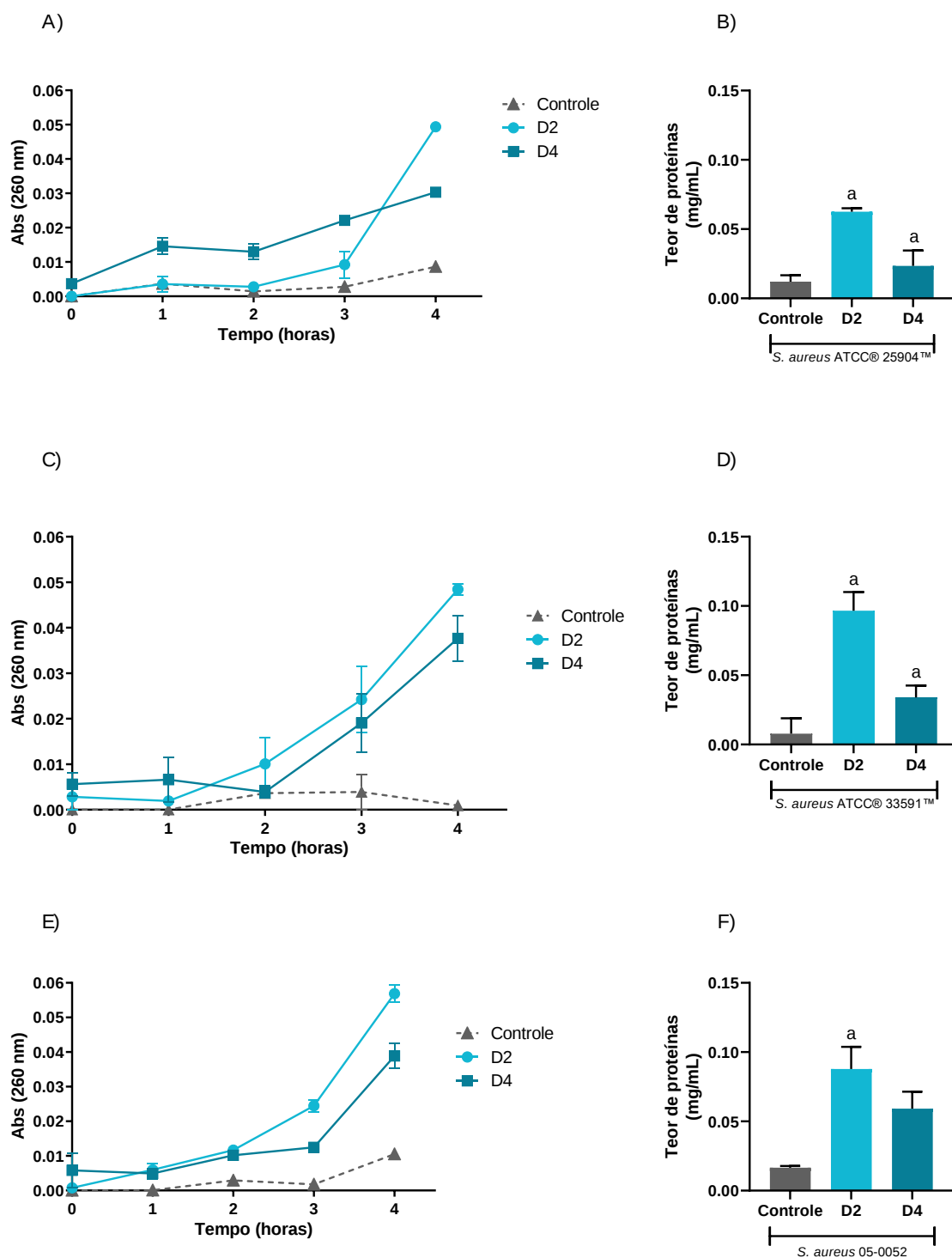
Figura 10 - Permeabilidade celular de *S. aureus* por % de captação do cristal violeta. Linhagens bacterianas expostas aos complexos (D2) e (D4) foram avaliadas por meio da permeabilidade com cristal violeta. ^{abc}Indicam diferença estatística quando comparado aos respectivos controles. Legenda: Controle. (ANOVA seguido de Bonferroni, $p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média $\pm$ DP.



5.4.1.2 Avaliação do Extravasamento de membrana e Teor de proteínas

Os ensaios de extravasamento de membrana e teor de proteínas buscaram determinar o efeito da exposição com os complexos (D2) e (D4) na permeabilidade celular das células bacterianas. Os resultados estão apresentados na Figura 11.

Figura 11 - Liberação de conteúdo intracelular (nucleotídeos) e proteínas de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 após exposição aos complexos (D2) e (D4). (A, C e E) representa as curvas de extravasamento de material intracelular (nucleotídeos) para o meio, medido por densidade óptica a 260 nm por um período de 4 horas em intervalos de 1 hora e (B, D e F) Teor de proteínas após 4 horas de exposição com os complexos (D2) e (D4). ^aIndica diferença estatística quando comparado ao controle. (ANOVA seguido de Bonferroni, $p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média $\pm$ DP.



A Figura 11A demonstra que a exposição com os complexos **(D2)** e **(D4)** alterou a permeabilidade celular de *S. aureus* ATCC® 25904™ após 4 horas, gerando dessa maneira, um maior extravasamento de conteúdo intracelular (nucleotídeos) para o meio em comparação ao controle, evidenciado a partir de 3 horas após a exposição. O teor de proteínas após a exposição com o complexo **(D2)** teve um aumento de 5,1 vezes, enquanto que para o complexo **(D4)** esse aumento foi de 1,9 vezes quando comparado ao controle ($p < 0,05$) (Figura 11B).

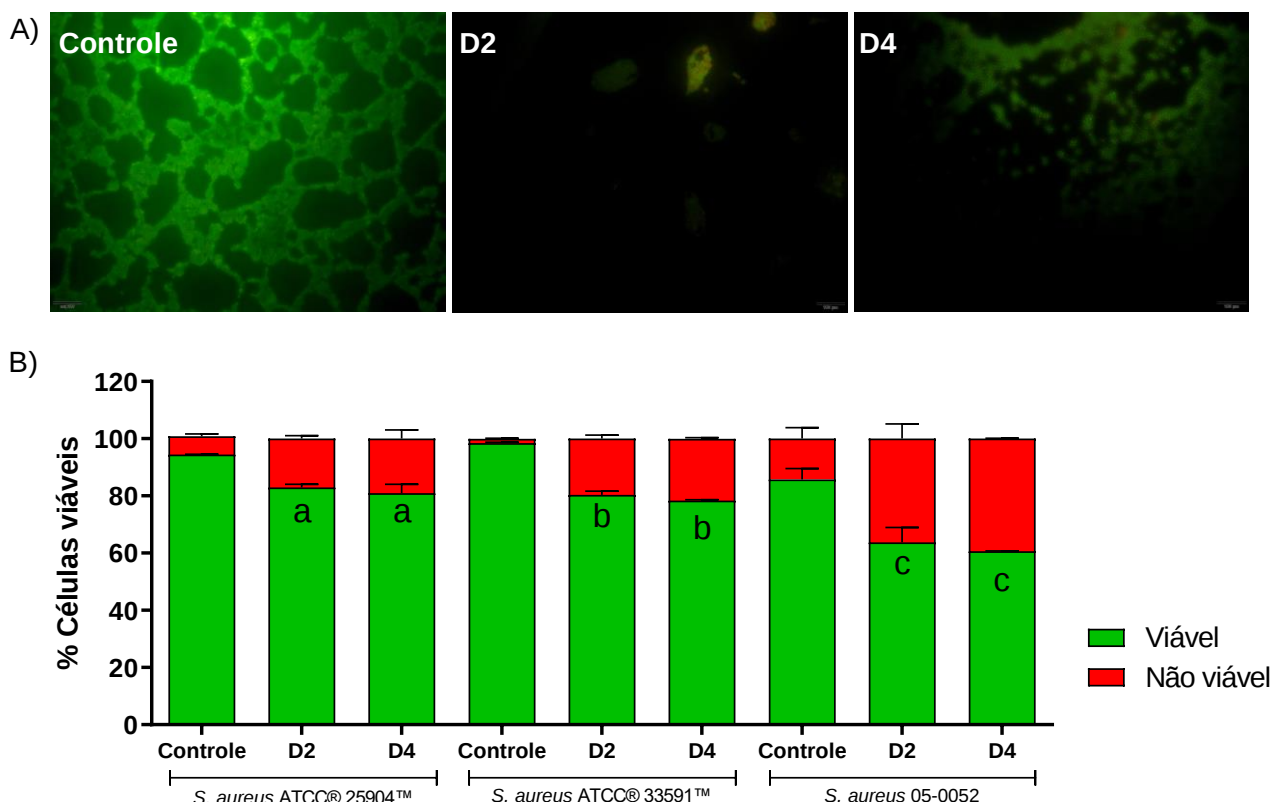
Os resultados apresentados na Figura 11C também mostram que a exposição com os complexos **(D2)** e **(D4)** alteraram a permeabilidade celular de *S. aureus* ATCC® 33591™ após 4 horas, evidenciado pelo maior extravasamento de conteúdo intracelular (nucleotídeos) para o meio em comparação com o controle, principalmente a partir de 3 horas de exposição. Com relação ao teor de proteínas liberadas intracelularmente, o complexo **(D2)** teve um aumento de 13,7 vezes, enquanto que o complexo **(D4)** esse aumento foi de 4,71 vezes se comparado ao controle ($p < 0,05$) (Figura 11D).

Os complexos **(D2)** e **(D4)** como demonstrado acima, também foram capazes de interferir na permeabilidade celular do isolado clínico de *S. aureus* 05-0052, após 4 horas de exposição (Figura 11E), indicando um maior extravasamento de conteúdo intracelular (nucleotídeos) para o meio a partir de 3 horas se comparado ao controle. Em relação ao teor de proteínas, nota-se um aumento de 5,4 vezes para o complexo **(D2)** e 3,6 vezes para o complexo **(D4)**, em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 11F).

5.4.1.3 Viabilidade e atividade metabólica bacteriana

A viabilidade celular das linhagens de *S. aureus* expostas aos complexos **(D2)** e **(D4)** foram analisadas por meio do kit *LIVE/DEAD® BacLight* (Figura 12). A Figura 12A representa imagens do ensaio destacando as células bacterianas, coradas com Syto 9, um dos corantes presentes no kit, que cora todas as células íntegras e também aquelas que apresentam dano em sua membrana de verde. Já o Iodeto de propídeo (PI) penetra somente em células com danos em sua membrana, por consequência, redução na fluorescência do Syto 9, corando assim, as células em vermelho. A Figura 12B representa a porcentagem de células viáveis e não viáveis após tratamento com os complexos **(D2)** e **(D4)**.

Figura 12 - Viabilidade e atividade metabólica bacteriana de linhagens de *S. aureus* expostas aos complexos (D2) e (D4). Células bacterianas foram coradas com o kit LIVE/DEAD® BacLight, analisadas e contadas sob microscopia de fluorescência. (A) representa as imagens ilustrativas das células de *S. aureus* expostas aos complexos e coradas com Syto 9 e Iodeto de propídeo. (B) representa a porcentagem de células viáveis e não viáveis após tratamento com os complexos (D2) e (D4). ^{abc}Indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle. (ANOVA seguido de Bonferroni, $p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média $\pm$ DP.



Os resultados evidenciaram que a linhagem de *S. aureus* ATCC® 25904™ exposta aos complexos (D2) e (D4) tiveram porcentagens de células viáveis de 82,9 e 80,9%, respectivamente, enquanto que o controle foi de 94,4%. Logo, houve diferença estatística entre as células bacterianas expostas aos complexos (D2) e (D4) quando comparadas ao controle (Figura 12B) ($p < 0,05$).

A linhagem de *S. aureus* ATCC® 33591™ exposta aos complexos (D2) e (D4) apresentaram 80,3 e 78,3% de células viáveis, ao passo que o controle apresentou 98,4%. Também foi observado diferença estatística entre as células bacterianas expostas aos complexos (D2) e (D4) quando comparadas ao controle (Figura 12B) ($p < 0,05$).

O isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 exposto aos complexos (D2) e (D4) apresentaram 63,7 e 60,6% de células viáveis, respectivamente, enquanto que o controle foi de 85,7%. Assim, como mencionado acima, foi observado diferença estatística entre as células bacterianas expostas aos complexos quando comparadas ao controle (Figura 12B) ($p < 0,05$).

5.5 Avaliação do efeito de concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4) na expressão de fatores de virulência de linhagens de *S. aureus*

5.5.1 Atividade Anti-catalase

Os resultados apresentados na Tabela 6 demonstram o efeito da exposição a concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4) sobre a atividade da enzima catalase por linhagens de *S. aureus*, sendo os valores expressos em escores de intensidade de reação. Pode-se constatar uma redução na atividade da catalase pelas linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, de *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052, principalmente no valor de CIM (50 µg/ml). Vale ressaltar que *S. aureus* 05-0052 foi a mais sensível para esse ensaio tendo alteração da produção de catalase em todas as concentrações testadas (Tabela 6).

Tabela 6 - Atividade anti-catalase das linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 após exposição de concentração inibitória e subinibitórias com os complexos (D2) e (D4).

Intensidade da atividade Catalase							
	CC	D2 µg/ml			D4 µg/ml		
		50	25	12,5	50	25	12,5
<i>S. aureus</i> ATCC® 25904™	(+++)	(+)	(++)	(+++)	(+)	(++)	(++)
<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	(+++)	(+)	(++)	(+++)	(++)	(++)	(+++)
<i>S. aureus</i> 05-0052	(+++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
		CIM	1/2 CIM	1/4 CIM	CIM	1/2 CIM	1/4 CIM
Intensidade de reação: (+) fraca; (++) moderada; (+++) intensa; CC (Controle de crescimento)							

Fonte: Autor, 2022.

5.5.2 Atividade Anti-coagulase

A Tabela 7 expressa o efeito da exposição a concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4) sobre a atividade da enzima coagulase para as linhagens de *S. aureus*. Os resultados demonstraram que a expressão da atividade da enzima coagulase pelas linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, de *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 não foram alteradas pela exposição de concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4).

Tabela 7 - Atividade anti-coagulase das linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 após exposição de concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4).

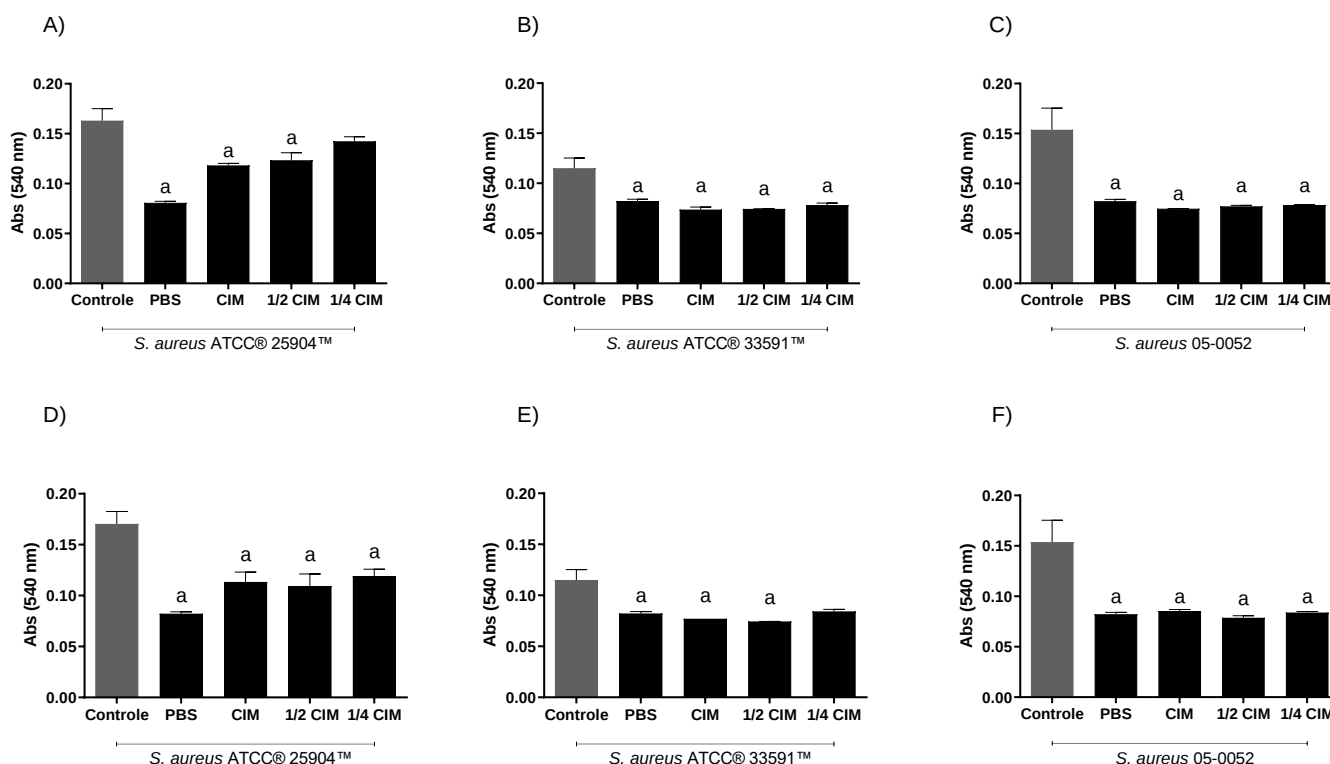
Atividade Coagulase							
	CC	D2 µg/ml			D4 µg/ml		
		50	25	12,5	50	25	12,5
<i>S. aureus</i> ATCC® 25904™	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>S. aureus</i> 05-0052	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
		CIM	1/2 CIM	1/4 CIM	CIM	1/2 CIM	1/4 CIM
Reação da Coagulase: (+) positiva; (-) negativa							

Fonte: Autor, 2022.

5.5.3 Atividade Anti-hemolítica

A Figura 13 evidencia o efeito da exposição a concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4) sobre a atividade de hemolisinas pelas linhagens de *S. aureus*.

Figura 13 - Atividade anti-hemolítica das linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 após a exposição de concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4). (A, B e C) representa o efeito de concentração inibitória e subinibitórias do complexo (D2) sobre a expressão de hemolisinas pelas linhagens de *S. aureus* e (D, E e F) representa o efeito de concentração inibitória e subinibitórias do complexo (D4). Os valores são expressos por densidade óptica a 540 nm. (ANOVA seguido de Bonferroni, $p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média $\pm$ DP.



O tratamento com os complexos em suas diferentes concentrações foi capaz de reduzir significativamente a atividade hemolítica de todas as linhagens de *S. aureus*. Entretanto, no valor de 1/4 CIM não houve uma redução significativa para as linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™ e *S. aureus* ATCC® 33591™ quando expostas aos complexos (D2) e (D4) (Figura 13).

5.5.4 Atividade Anti-lipolítica

Os resultados exibidos na Tabela 8 demonstram o efeito da exposição a concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4) sobre a atividade de enzimas lipolíticas pelas linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, de *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052, com

valores expressos em milímetros. A análise não foi capaz de determinar qualquer inibição da atividade lipolítica (formação de halos de lipólise).

Tabela 8 - Atividade anti-lipolítica das linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 após exposição de concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4).

Diâmetro do halo de Lipólise (mm)							
	CC	D2 µg/ml			D4 µg/ml		
		50	25	12,5	50	25	12,5
<i>S. aureus</i> ATCC® 25904™	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
<i>S. aureus</i> 05-0052	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
		CIM	1/2 CIM	1/4 CIM	CIM	1/2 CIM	1/4 CIM

Fonte: Autor, 2022.

5.5.5 Atividade Anti-DNAse

A Tabela 9 apresenta o efeito da exposição de concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4) sobre a atividade da enzima DNAse pelas linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, de *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052. Os resultados demonstraram que nenhuma das concentrações testadas foram capazes de inibir a ação da enzima DNAse.

Tabela 9 - Atividade anti-DNAse de linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 após exposições de concentração inibitória e subinibitórias dos complexos (D2) e (D4).

Atividade DNAse							
	CC	D2 µg/ml			D4 µg/ml		
		50	25	12,5	50	25	12,5
<i>S. aureus</i> ATCC® 25904™	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>S. aureus</i> 05-0052	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
		CIM	1/2 CIM	1/4 CIM	CIM	1/2 CIM	1/4 CIM

(+) Indica presença de atividade DNAse (-) Indica ausência de atividade

Fonte: Autor, 2022.

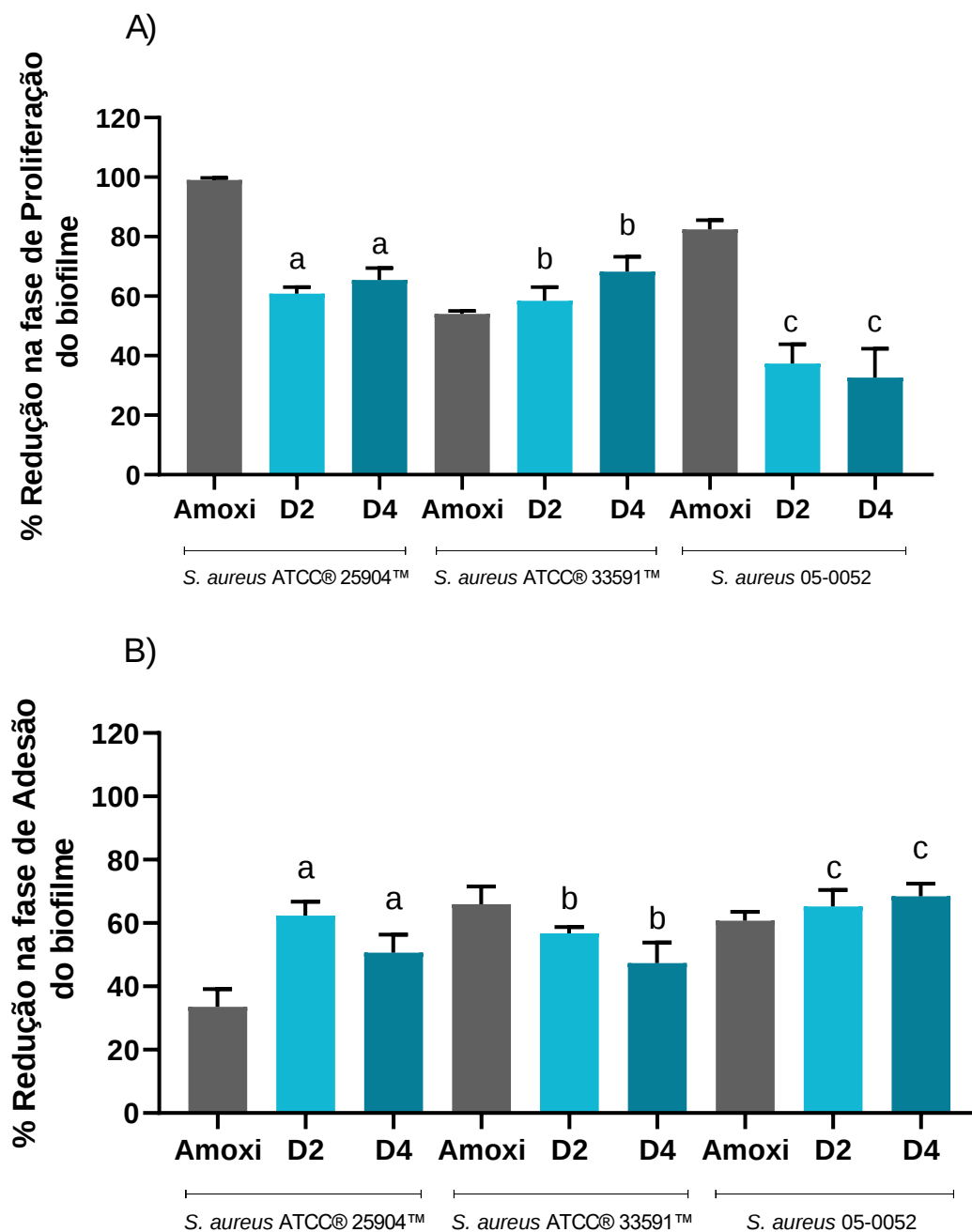
5.6 Avaliação da atividade antibiofilme formados por linhagens de *S. aureus*

As análises realizadas buscaram avaliar a ação dos complexos **(D2)**, **(D4)** e amoxicilina em impedir que os microrganismos se multipliquem em um biofilme de população e também que os impeça de serem aderidos a determinadas superfícies.

O complexo **(D2)** apresentou uma porcentagem de redução na fase de proliferação do biofilme em 60% para *S. aureus* ATCC® 25904™ e 99% para amoxicilina, 58% para *S. aureus* ATCC® 33591™ e 54% para amoxicilina, 37% para o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 e 82% para amoxicilina, ao passo que o complexo **(D4)** apresentou uma redução de 65% para ATCC® 25904™, 68% para ATCC® 33591™ e 32% para o isolado clínico 05-0052 (Figura 14A).

O efeito dos complexos **(D2)** e **(D4)** na fase de adesão dos biofilmes também foram observados. O complexo **(D2)** apresentou uma redução de 62% para a linhagem de *S. aureus* ATCC® 25904™ e 33% para amoxicilina, 56% para *S. aureus* ATCC® 33591™ e 65% para amoxicilina, 65% para o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 e 60% para amoxicilina. O complexo **(D4)** seguiu apresentando redução de 50% para *S. aureus* ATCC® 25904™, 47% para *S. aureus* ATCC® 33591™ e 68% para o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 (Figura 14B).

Figura 14 - Efeito dos complexos (D2), (D4) e amoxicilina (Amoxi) sobre as etapas de proliferação e adesão de biofilmes formados pelas linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052. Biofilmes expostos aos complexos (D2), (D4) e amoxicilina foram avaliados de acordo com a porcentagem de inibição. (A) Porcentagem de redução na fase de proliferação do biofilme e (B) porcentagem de redução na fase de adesão do biofilme. ^{abc}Indicam diferença estatística quando comparado aos respectivos controles. (ANOVA seguido de Bonferroni, $p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média $\pm$ DP.

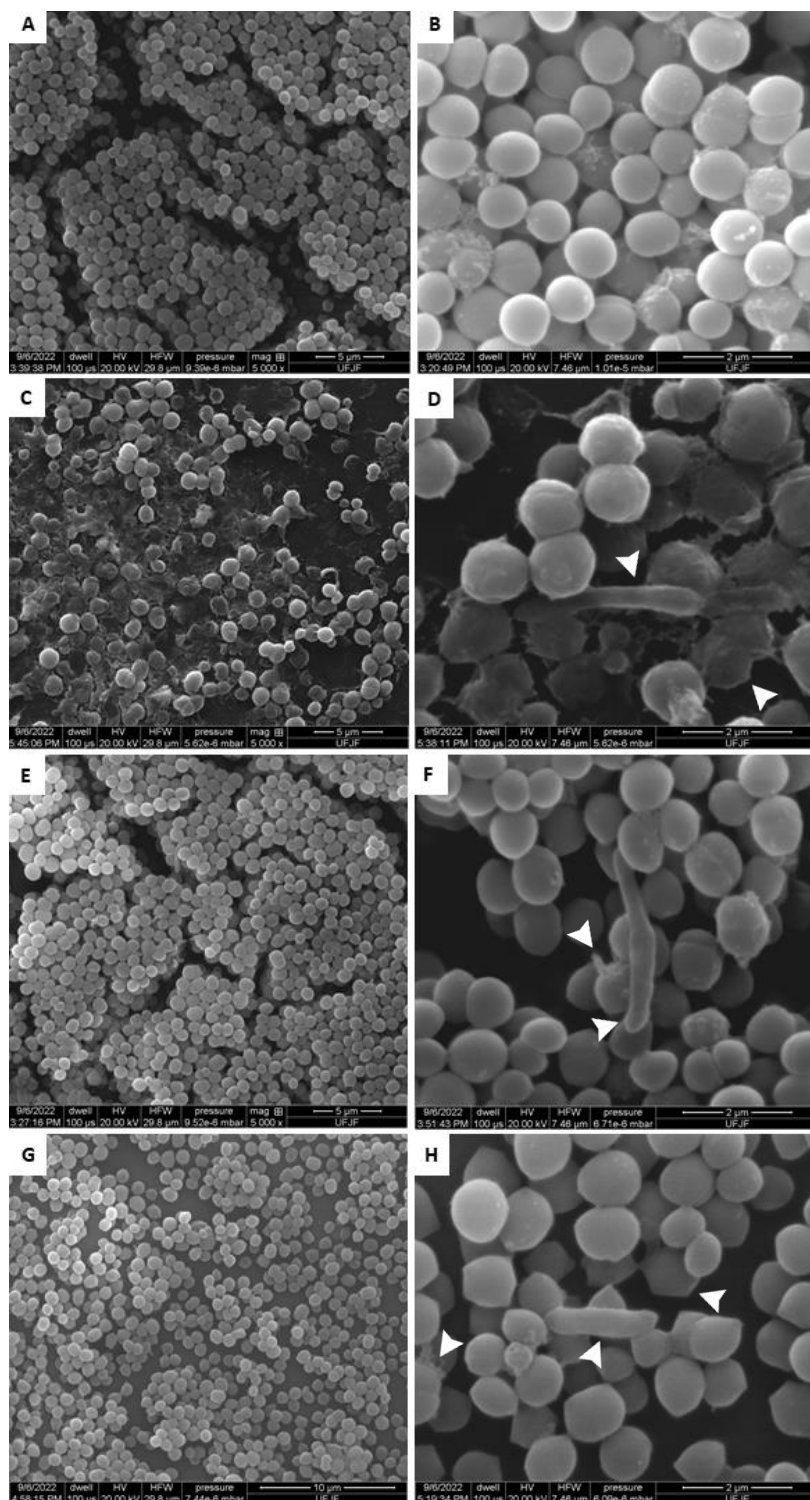


5.6.1 Avaliação dos complexos (D2) e (D4) sobre a fase de adesão dos biofilmes de *S. aureus* por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A ultraestrutura e morfologia dos biofilmes formados por linhagens de *S. aureus* pôde ser analisada por MEV. As imagens partiram de um aumento de 5.000x e 20.000x, onde foi possível analisar a densidade celular e características notáveis na ultraestrutura da célula bacteriana.

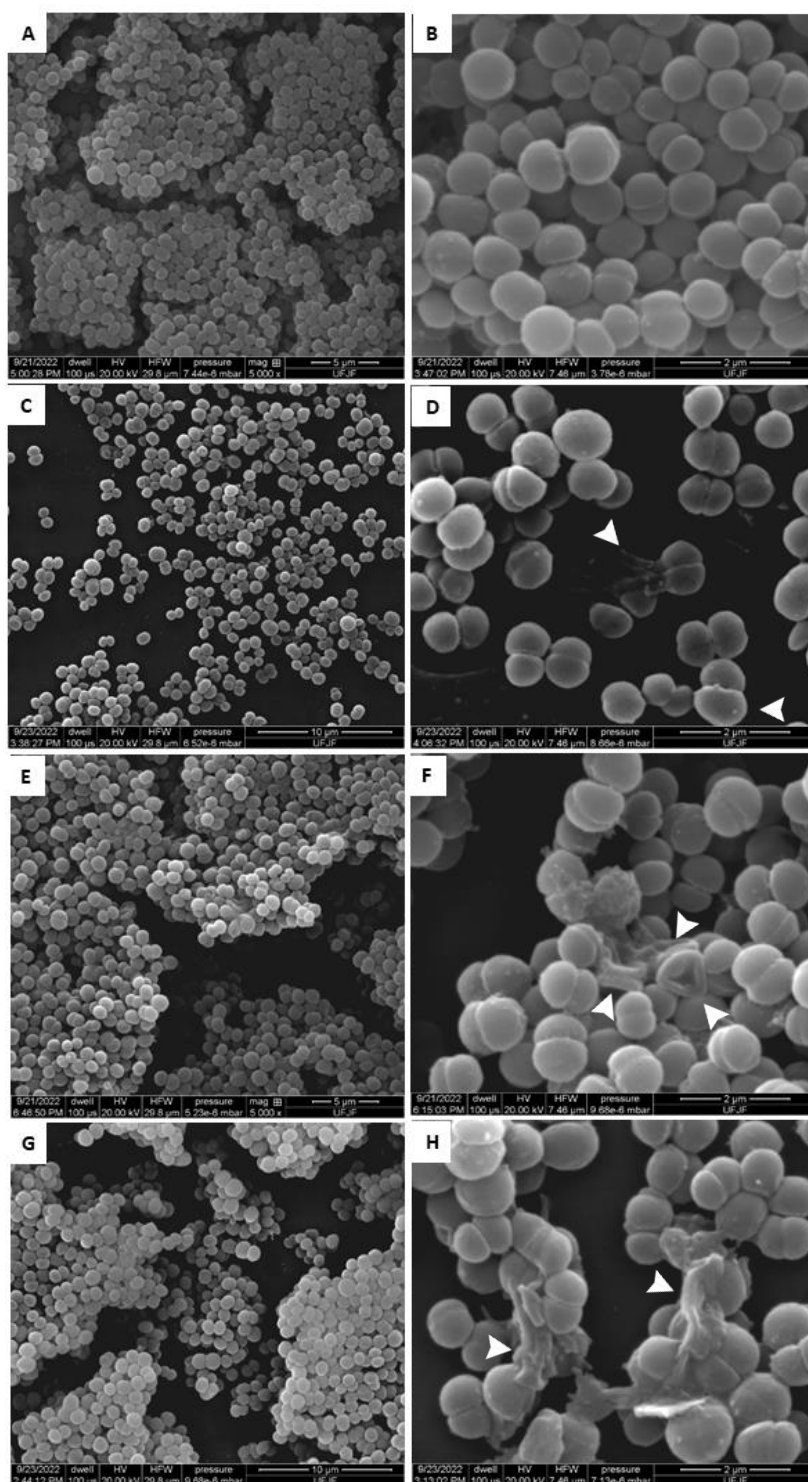
Os biofilmes de população formados pelas linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 sem quaisquer exposições, apresentam elevada densidade celular, com campos totalmente preenchidos e conglomerados de células sobrepostas umas às outras. Quando os biofilmes são cultivados e expostos a amoxicilina e aos complexos (D2) e (D4), observa-se uma diminuição da densidade celular dessas populações. Além disso, pode-se observar que a exposição com o controle positivo e os complexos (D2) e (D4) levam ao comprometimento da integridade da célula bacteriana, causando danos em seu envoltório, liberação de conteúdo intracelular para o meio e morte celular. Esses achados corroboram com os resultados encontrados no estudo em células planctônicas.

Figura 15 - Imagens ilustrativas da atividade antibiofilme dos complexos (D2) e (D4) diante da linhagem *S. aureus* ATCC® 25904™ por meio de microscopia eletrônica de varredura. Biofilmes de células bacterianas cultivadas em lamínulas redondas. As imagens obtidas permitiram a análise da estrutura das bactérias em (A e B) grupo controle, (C e D) exposto com amoxicilina - valor de CIM, (E e F) exposto com o complexo (D2) e (G e H) exposto com o complexo (D4) - valor de CIM. Setas brancas indicam alterações na morfologia da célula bacteriana. Ampliação de 5.000x e 20.000x. Barras de escala de 2 µm e 5 µm.



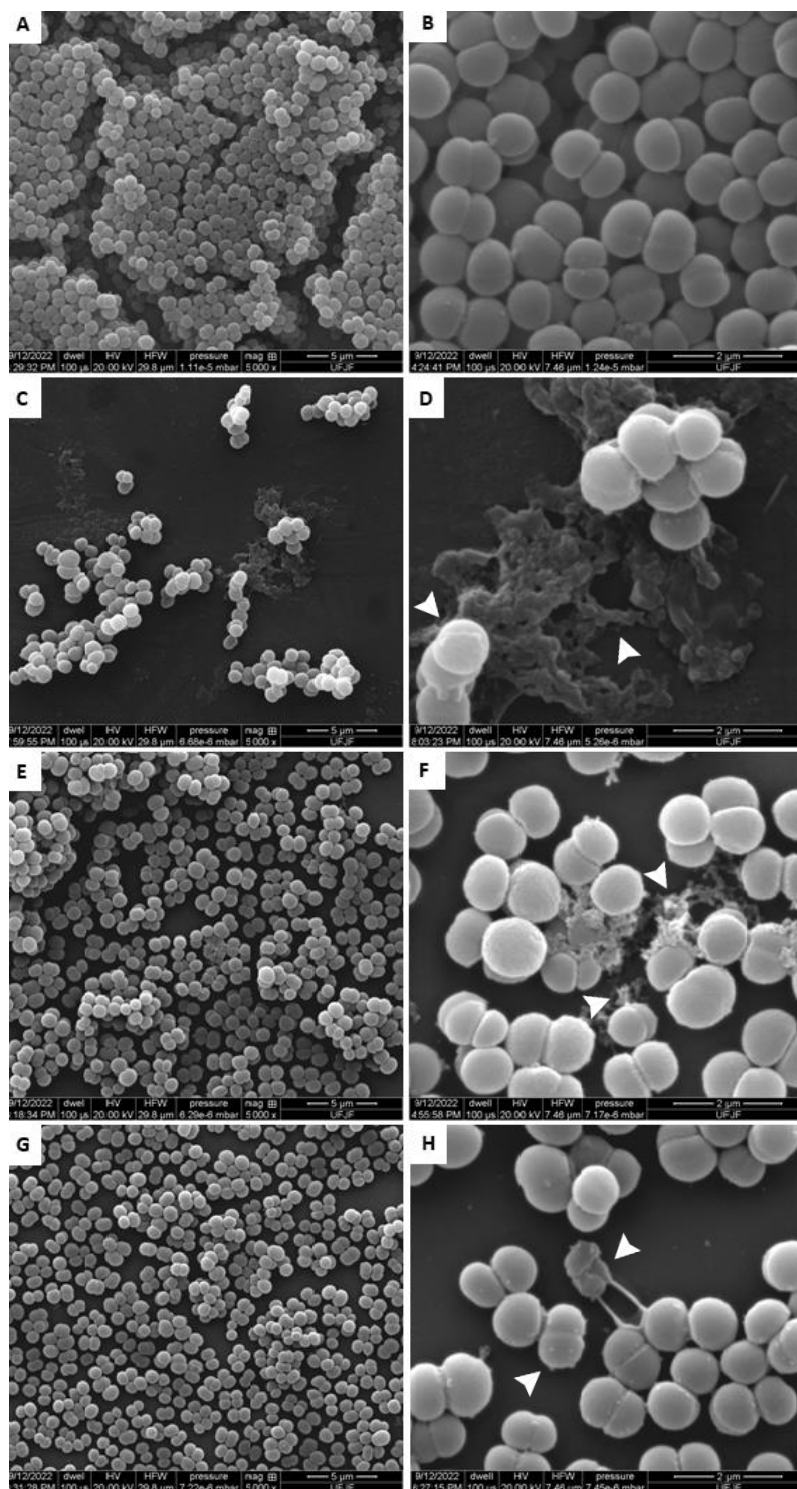
Fonte: Autor, 2022.

Figura 16 - Imagens ilustrativas da atividade antibiofilme dos complexos **(D2)** e **(D4)** diante da linhagem *S. aureus* ATCC® 33591™ por meio de microscopia eletrônica de varredura. Biofilmes de células bacterianas cultivadas em lamínulas redondas. As imagens obtidas permitiram a análise da estrutura das bactérias em (A e B) grupo controle, (C e D) exposto com amoxicilina - valor de CIM, (E e F) exposto com o complexo **(D2)** e (G e H) exposto com o complexo **(D4)** - valor de CIM. Ampliação de 5.000x e 20.000x. Setas brancas indicam alterações na morfologia da célula bacteriana. Barras de escala de 2 µm, 5 µm e 10 µm.



Fonte: Autor, 2022.

Figura 17 - Imagens ilustrativas da atividade antibiofilme dos complexos (D2) e (D4) diante da linhagem *S. aureus* 05-0052 por meio de microscopia eletrônica de varredura. Biofilmes de células bacterianas cultivadas em lâminulas redondas. As imagens obtidas permitiram a análise da estrutura das bactérias em (A e B) grupo controle, (C e D) exposto com amoxicilina - valor de CIM, (E e F) exposto com o complexo (D2) e (G e H) exposto com o complexo (D4) - valor de CIM. Setas brancas indicam alterações na morfologia da célula bacteriana. Ampliação de 5.000x e 20.000x. Barras de escala de 2 μ m e 5 μ m.



Fonte: Autor, 2022.

5.6.2 Avaliação dos complexos (D2) e (D4) sobre a composição da matriz polimérica extracelular

O teor de proteínas e carboidratos foi mensurado através da análise de matriz polimérica extracelular, sendo possível demonstrar a composição bioquímica em biofilmes formados por diferentes linhagens de *S. aureus*. De acordo com a tabela 10, foi possível constatar que os complexos (D2) e (D4) não foram capazes de interferir diretamente na síntese de carboidratos e proteínas dentro dessas matrizes complexas e autoproduzidas, embora, possam estar atuando em outras vias que ainda necessitam de análises mais robustas.

Tabela 10 - Composição bioquímica de biofilmes expostos aos complexos (D2) e (D4) e amoxicilina. ^aIndica diferença estatística quando comparado aos respectivos controles. Legenda: Carboidratos (CHO) e proteínas. (ANOVA seguido de Bonferroni, $p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a média $\pm$ DP.

Microrganismos	Controle	D2	D4	Amoxicilina
	CHO ($\mu\text{g/mL}$)	CHO ($\mu\text{g/mL}$)	CHO ($\mu\text{g/mL}$)	CHO ($\mu\text{g/mL}$)
ATCC® <i>S. aureus</i> 25904™	26,34 $\pm$ 1,50	25,19 $\pm$ 1,83	26,88 $\pm$ 3,29	31,21 $\pm$ 4,66 ^a
ATCC® <i>S. aureus</i> 33591™	26,63 $\pm$ 3,12	27,90 $\pm$ 4,96	25,16 $\pm$ 2,62	32,06 $\pm$ 4,16 ^a
<i>S. aureus</i> 05-0052	25,72 $\pm$ 4,44	26,74 $\pm$ 2,74	25,41 $\pm$ 3,37	46,07 $\pm$ 6,54 ^a
Microrganismos	Controle	D2	D4	Amoxicilina
	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)
ATCC® <i>S. aureus</i> 25904™	1,38 $\pm$ 0,07	1,35 $\pm$ 0,08	1,36 $\pm$ 0,005	1,51 $\pm$ 0,01
ATCC® <i>S. aureus</i> 33591™	1,40 $\pm$ 0,07	1,35 $\pm$ 0,05	1,29 $\pm$ 0,08	1,43 $\pm$ 0,04
<i>S. aureus</i> 05-0052	1,39 $\pm$ 0,10	0,71 $\pm$ 0,62 ^a	0,63 $\pm$ 0,65 ^a	1,24 $\pm$ 0,24

Fonte: Autor, 2022.

6. DISCUSSÃO

O uso indiscriminado de antimicrobianos por parte de humanos, animais e mesmo na agricultura, elevou as taxas de resistência bacteriana ao longo dos anos e trouxe consigo, um grave problema de saúde pública de âmbito global (VESTERGAARD et al., 2019). Não obstante, infecções de grandes dimensões e a resistência alcançada por *S. aureus* (MRSA) ainda é uma realidade notável que necessita fortemente da atenção de órgãos públicos e federais. Portanto, torna-se imprescindível o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos para combater efetivamente tais infecções e a resistência a eles enunciada.

Como alternativa, a química de coordenação, tem visado a junção e/ou complexação de íons metálicos a moléculas ativas, como forma de potencializar sua ação antimicrobiana (SANTI et al., 2016). Logo, complexos metálicos podem ser utilizados na busca de novos ativos antimicrobianos. Diante disso, o estudo com complexos derivados do núcleo base [Fe-cyclam] contra linhagens sensível e resistentes de *S. aureus* se faz necessário com possibilidade de um potencial antibacteriano.

Inicialmente foram correlacionadas ações dos complexos (D1) a (D4), a um possível tratamento contra infecções bacterianas, por meio de análises preditivas *in silico* das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (alvos biológicos). Os princípios da farmacocinética consiste em avaliar o perfil ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) de um fármaco, composto ou entidade química após sua administração no organismo, enquanto que a farmacodinâmica (alvos biológicos) explora a relação entre a concentração de um composto em seu local de ação e, por isso, avalia os mecanismos a níveis moleculares, os quais regulam o reconhecimento do medicamento pelo receptor, transportadores e até enzimas (FAN J; DE LANNOY, 2014; BIAN et al., 2022).

Os resultados encontrados para as análises farmacocinéticas indicaram que os complexos (D1) a (D4) e amoxicilina possuem probabilidades consideráveis de absorção intestinal em seres humanos. Essa absorção é melhor compreendida pela via transcelular passiva, ou seja, principal mecanismo de absorção de um fármaco pelo trato gastrointestinal quando administrado por via oral (HOMAYUN et al., 2019). A permeabilidade cutânea também foi observada para os complexos (D1) a (D4). Esse resultado é promissor para a

administração tópica de um medicamento transdérmico, que para um lado torna-se mais vantajosa, ao passo que, reduz os riscos de efeitos colaterais de forma local e até mesmo sistêmica (MACIEL et al., 2021). Logo, para o antimicrobiano amoxicilina, a permeabilidade cutânea não foi encontrada.

Quanto à distribuição dos complexos **(D1)** a **(D4)** no organismo, os resultados revelaram que os mesmos possuem incapacidade de permear a barreira hemato encefálica (BHE), portanto, sem contato direto com o sistema nervoso central (SNC). Importante ressaltar que a BHE é uma importante barreira física que limita a entrada de diversos componentes que podem ser danosos ao cérebro, como substâncias tóxicas e patógenos (ZHAO et al., 2015). Para amoxicilina, uma probabilidade de ser ativo foi encontrado.

Diversas substâncias são metabolizadas pelo fígado por meio de enzimas do citocromo P450 (GILANI; CASSAGNOL, 2021). Os resultados encontrados para essas análises preditivas *in silico* demonstraram que os complexos **(D1)** a **(D4)** e amoxicilina não são substratos para a enzima CYP 2D6 (relacionada ao metabolismo de xenobióticos) e não apresentam inibição das enzimas CYP 1A2, CYP 2C19, CYP 2C9, CYP 2D6 e CYP 3A4. Logo, a inibição ou indução de algumas dessas enzimas poderia levar a interações medicamentosas. Portanto, devido a sua não interação com as enzimas CYP, tais complexos possivelmente não possuem efeitos adversos em humanos.

Os rins possuem um papel fundamental no processo de eliminação de diversas substâncias do organismo. Neles são encontrados os transportadores renais de cátions orgânicos (TCO) e proteínas de extrusão de múltiplas drogas e toxinas (MOTOHASHI; INUI, 2013). Os resultados encontrados, sugerem que os complexos **(D1)** a **(D4)** e amoxicilina não apresentam excreção renal, tornando estes resultados promissores, principalmente no que diz respeito a pacientes que possuem lesões ou doenças renais.

O parâmetro toxicidade também foi analisado para os complexos **(D1)** a **(D4)** e amoxicilina. As previsões encontradas sugerem que os complexos não apresentam toxicidade pelo teste AMES, que, por sua vez, avalia o potencial mutagênico de certas substâncias (VIJAY et al., 2018). Além disso, também foi constatado que os complexos são compostos sem toxicidade hepática e cutânea. Tais previsões são promissoras, pois, para a descoberta e desenvolvimento de novos ativos e/ou medicamentos, a segurança é sempre

uma das questões mais importantes (HE et al., 2019). Amoxicilina apresentou probabilidades de hepatotoxicidade para essa análise.

Quanto aos aspectos farmacodinâmicos para os complexos **(D1)** a **(D4)**, as análises preditivas *in silico* buscaram avaliar os principais alvos moleculares envolvidos com as possíveis atividades dos complexos, principalmente no que diz respeito ao seu potencial antibacteriano alvo. Dentre os alvos moleculares com maior capacidade de ser ativo, pode-se constatar que a enzima glicosiltransferase de peptídeoglicano (responsável pela síntese do peptídeoglicano) (GARDE et al., 2021), foi o melhor alvo encontrado para todos os complexos. Portanto, este resultado revela que a inibição enzimática corrobora com a ação em parede celular desses complexos por possuírem maior capacidade de serem ativos, além de poderem também levar a um comprometimento da membrana celular bacteriana.

Neste sentido, também foi observado que os complexos **(D1)** a **(D4)** foram capazes de reduzir o crescimento bacteriano, devido a inibição da replicação de DNA, evidenciado pelo antagonismo com o ácido paraaminobenzóico. Este, é uma importante molécula para a produção de DNA bacteriano (LADE; KIM, 2021). Além disso, a enzima DNA ligase também foi uma candidata a alvo molecular para os complexos. Importante ressaltar que a enzima DNA ligase tem como principal função a união/junção das cadeias de DNA, ao passo que catalisam a formação de uma ligação fosfodiéster, o que implica na síntese do DNA bacteriano, impedindo sua replicação (VIJAYALAKSHMI; DAISY, 2015). Não foram encontrados alvos biológicos para o antimicrobiano amoxicilina.

Para que novas terapias medicamentosas sejam desenvolvidas e incorporadas, essas devem apresentar efetividade com baixa ou nenhuma citotoxicidade para células humanas (GUO et al., 2020). Logo, foram realizados testes de citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e J774A.1. Considerando a taxa de sobrevivência de 70% ou superior (ISO10993-5:2009), foi possível constatar que, para os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c os complexos **(D1)** a **(D4)** não apresentaram potenciais citotóxicos, reiterando sua utilização nas demais investigações. Os resultados obtidos para as células J774A.1 demonstraram que somente o complexo **(D3)**, na maior concentração (300 µg/mL) apresentou uma redução da atividade metabólica celular, indicativo de uma potencial citotoxicidade em relação às

demais concentrações e aos demais complexos, caracterizando dessa maneira, uma triagem dos complexos para análises e experimentos futuros. Em geral, esses resultados indicaram que os complexos **(D1)** a **(D4)** apresentaram baixa citotoxicidade para macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e células J774A.1, tornando esses complexos alvos para novas investigações e, mesmo o desenvolvimento de protótipos de novos medicamentos.

Subsequentemente a atividade antibacteriana foi realizada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), que corresponde a menor concentração efetiva do composto, capaz de inibir o crescimento do microrganismo após o período de incubação, ao passo que a Concentração Bactericida Mínima (CBM) corresponde a menor concentração do composto capaz de impedir o crescimento bacteriano em subculturas isentas de substâncias antimicrobianas, predizendo assim, possíveis ações dos compostos (BELANGER; HANCOCK, 2021).

A atividade antibacteriana dos complexos **(D1)** a **(D4)** apresentaram valores de CIM diante das linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052, que variam de 50 a 100 µg/mL. Esses resultados podem estar associados aos ligantes carboxilatos presentes (cloro, oxalato, acetato e salicilato), além do sistema Fe-cyclam, indicando algum efeito sobre essas bactérias Gram-positivas alvo. Segundo Liang e colaboradores (2021), íons metálicos potencializam a ação de antimicrobianos em comparação com o ligante livre, essa compreensão tem despertado grande interesse na atualidade.

Na busca por novos candidatos a medicamentos, diversos estudos têm relatado grandes avanços na utilização de íons metálicos, principalmente como agentes antimicrobianos. Todavia, metais de transição como prata (Ag), ouro (Au), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e níquel (Ni) tem passado por inúmeras análises e testes, com resultados prospectivos e promissores no combate a infecções e a crescente resistência antimicrobiana (WANG et al., 2021; EVANS; KAVANAGH, 2021). Logo, a utilização da molécula Cyclam complexada com o metal de transição ferro (Fe) condiz com a literatura encontrada e pelo mecanismo facilitado de internalização do metal por bactérias.

Com o intuito de investigar o potencial dos complexos contra células bacterianas, uma possível triagem para a escolha dos complexos mais ativos foi

realizada. E, de acordo com os resultados obtidos pelo teste da CIM e perfil de citotoxicidade, os complexos mais ativos (**D2**) e (**D4**) foram escolhidos para avaliar a densidade celular, análises em envoltório e biofilmes de população.

A estrutura química dos complexos (**D2**) e (**D4**) é composta pela molécula Cyclam ligada ao íon ferro formando assim um centro metálico capaz de se ligar às moléculas oxalato (coordenação bidentada) e salicilato (coordenação monodentada), respectivamente. Esta estrutura forma moléculas carregadas positivamente (cátions) que são balanceadas pelo contra íon hexafluorofosfato (PF_6) e se encontram no formato de sais. A análise da estrutura destes compostos nos permite sugerir suas possíveis interações com a célula bacteriana. As membranas bacterianas são carregadas negativamente, logo, substâncias catiônicas podem interagir com esta estrutura através de interações eletrostáticas (KOTYNIA et al., 2021). Os íons metálicos também perdem facilmente elétrons e formam íons com carga positiva que são mais solúveis em fluidos biológicos e que podem interagir facilmente com biomoléculas ricas em elétrons como DNA e proteínas (CLAUDEL et al., 2020). Sendo assim, a presença de ferro (Fe) nos complexos (**D2**) e (**D4**) pode ser determinantes para a atividade biológica, uma vez que, poderia conduzir ao aumento da solubilidade dos complexos e favorecer suas interações com o DNA ou proteínas.

A complexação à base de metal ainda pode fornecer modos de ação únicos, como a troca ou liberação dos ligantes do centro metálico, formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e depleção de substratos essenciais, sendo assim, capazes de reduzir as atividades enzimáticas e perturbar o funcionamento da membrana plasmática (CLAUDEL et al., 2020). Além disso, o oxalato presente no complexo (**D2**) apresenta duas carbonilas livres, enquanto que o salicilato presente em (**D4**) apresenta apenas uma. A presença destas carbonilas pode justificar as atividades biológicas dos complexos, uma vez que, elas podem ligar-se às proteínas bacterianas por meio de ligações de hidrogênio com grupos nitrogênio hidrogênio e conduzir a uma inibição enzimática (BISSANTZ et al., 2010).

Na avaliação da ação dos complexos (**D2**) e (**D4**) sobre a densidade celular das três linhagens de *S. aureus*, foi utilizado o corante fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) que se liga seletivamente ao DNA das células, sendo excitado com luz ultravioleta e que pode ser detectado por um filtro na cor azul

ciano (JOUX e LEBARON, 2000). Os resultados demonstraram uma redução significativa da densidade celular para as linhagens de *S. aureus* expostas a estes complexos quando comparados aos respectivos controles, corroborando dessa maneira, com os ensaios encontrados para a concentração inibitória mínima (CIM).

Para elucidar os efeitos dos complexos **(D2)** e **(D4)** em envoltório celular, foram realizados ensaios de captação do cristal violeta, que consiste em detectar alterações na permeabilidade da membrana bacteriana, ao passo que sua captação pelas células se torna facilmente aumentada quando o envoltório celular encontra-se danificado. Logo, essa captação é menor quando o envoltório celular está intacto (PINTO et al., 2017). Os resultados demonstraram que há uma maior captação de cristal violeta pelas células bacterianas expostas com os complexos **(D2)** e **(D4)** para a linhagem de *S. aureus* ATCC® 33591™, seguida do isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 e *S. aureus* ATCC® 25904™ quando comparados ao controle ($p < 0,05$).

Em seguida, foram avaliados os ensaios de extravasamento de membrana e teor de proteínas totais presentes na membrana extracelular. O efeito dos complexos **(D2)** e **(D4)** sobre a permeabilidade celular bacteriana é melhor compreendido quando há uma maior liberação de conteúdo intracelular para o meio, ou seja, aumento de nucleotídeos e teor de proteínas, indicando significativa ruptura da membrana bacteriana (HAO et al., 2009). A análise indicou que os complexos **(D2)** e **(D4)**, sobre todas as linhagens de *S. aureus*, foram capazes de agir na membrana celular bacteriana, de modo a liberar tanto nucleotídeos, que são moléculas de baixo peso molecular e que absorvem no comprimento de onda 260 nm, quanto proteínas (macromoléculas) para o meio. Cabe ressaltar ainda, que a liberação do conteúdo intracelular quando exposto aos complexos **(D2)** e **(D4)** torna-se gradativa ao longo do tempo, ou seja, sua forma de atuação é um pouco mais longa, porém mais efetiva a partir de 3 e 4 horas. Esses resultados corroboram com a dosagem de proteínas no meio extracelular para as três linhagens de *S. aureus*. Neste ensaio foi observado uma maior liberação de proteínas totais com o complexo **(D2)** sobre as células bacterianas quando comparado ao complexo **(D4)** e ao controle.

Para concluir os ensaios em envoltório celular, foi realizado o ensaio de viabilidade e atividade metabólica bacteriana após a exposição com os

complexos **(D2)** e **(D4)**, utilizando o kit *LIVE/DEAD® BacLight™* (Molecular Probes), que consiste em dois marcadores fluorescentes, o Syto 9 e o Iodeto de propídeo (PI). De acordo com os resultados encontrados, *S. aureus* ATCC® 25904™ exposta aos complexos apresentaram porcentagens de células viáveis de 82,9 e 80,9%. Com relação a *S. aureus* ATCC® 33591™ essa porcentagem foi de 80,3 e 78,3%. Já o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 mostrou uma porcentagem de 63,7 e 60,6% com diferença estatística se comparados aos respectivos controles.

Os antimicrobianos clinicamente disponíveis são reconhecidos não somente pela sua ampla atividade bactericida / bacteriostática, propriedade farmacocinética e alvos biológicos direcionados, mas também por sua interferência na expressão de outros fatores de virulência em diversos patógenos, principalmente quando são expostos a concentrações abaixo da concentração inibitória mínima (CIM), mas que podem ser consideradas terapêuticas (AOKI, 2008; BELANGER; HANCOCK, 2021).

O alto potencial infeccioso de *S. aureus* está relacionado a genes que codificam múltiplos fatores de virulência, incluindo toxinas, proteases, adesinas e até mesmo fatores imunomoduladores. Parte desses fatores são encontrados no meio extracelular, enquanto que outros são encontrados no envoltório celular da célula bacteriana (THAMMAVONGSA et al., 2015). Além disso, *S. aureus* torna-se competente em sintetizar algumas enzimas como coagulase, desoxirribunuclease e lipases, para assim, aumentar sua patogenicidade e consequente disseminação no hospedeiro (TAM; TORRES, 2019).

Na detecção do efeito de concentração inibitória e subinibitórias dos complexos **(D2)** e **(D4)** na expressão de fatores de virulência de *S. aureus*, foi constatado que os complexos são capazes de reduzir a atividade da enzima catalase. Valores de CIM, 1/2 CIM e 1/4 CIM dos complexos **(D2)** e **(D4)** não foram capazes de bloquear por completo a ação da enzima catalase, porém uma redução na sua intensidade foi observada.

Dentre as enzimas extracelulares produzidas por *S. aureus* a coagulase é de perto uma das mais conhecidas. Logo, a atividade da enzima coagulase nas linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 não foram inibidas pela concentração

inibitória e subinibitórias testadas (CIM, 1/2 CIM e 1/4 CIM) com os complexos (D2) e (D4), respectivamente.

As toxinas estafilocócicas formadoras de poros também são conhecidas como fatores de virulência bacteriana e encontradas em uma ampla gama de doenças em seres humanos. *S. aureus* é um importante patógeno que codifica α , β , γ e δ hemolisinas, sendo a α -hemolisina a mais bem estudada e conhecida, codificada pelo gene Hla (DIVYAKOLU et al., 2019). Em nossas análises, a concentração inibitória e subinibitórias (CIM, 1/2 CIM e 1/4 CIM) dos complexos (D2) e (D4) determinaram uma redução na atividade de hemolisinas para todas as linhagens de *S. aureus* testadas. Logo, não foi observado redução significativa no valor de 1/4 CIM para a linhagem de ATCC® 25904™ e *S. aureus* ATCC® 33591™ quando expostas aos complexos (D2) e (D4).

A redução na atividade da enzima lipase de *S. aureus* mostra-se extremamente importante dentro do processo infeccioso, uma vez que, quando encontradas em tecidos mais profundos a tendência de produção dessas enzimas é mais pronunciada se comparado a tecidos superficiais, facilitando dessa maneira, o sucesso de sua propagação no hospedeiro (FLORES-DÍAZ et al., 2016; TAM; TORRES, 2019). Os dados demonstraram que, a exposição de concentração inibitória e subinibitórias (CIM, 1/2 CIM e 1/4 CIM) dos complexos (D2) e (D4) não foram capazes de inibir a atividade da enzima lipase pelas linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052, evidenciado pelo diâmetro do halo de lipólise.

A detecção da atividade nuclease estafilocócica, conhecida como DNase, que catalisa a hidrólise de ligações fosfodiéster na estrutura do DNA também foi analisada. Os resultados demonstraram que em relação a detecção do efeito de concentração inibitória e subinibitórias (CIM, 1/2 CIM e 1/4 CIM) para os complexos (D2) e (D4) na atividade da enzima DNase, os mesmos não foram capazes inibir sua expressão nas concentrações testadas com as linhagens referência de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052.

O estilo de vida mais bem sucedido entre as bactérias é sua capacidade de formação de biofilmes, em que agregados multicelulares de bactérias estão ligados uns aos outros ou, em superfícies bióticas ou abióticas por uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares, secretadas pelas

mesmas, construída principalmente de polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular (FLEMMING et al., 2016; MUHAMMAD et al., 2020; WORLITZER et al., 2022). Considerando o processo de formação e dispersão desses biofilmes, essa etapa do projeto buscou avaliar o efeito da exposição com os complexos (D2) e (D4) em perturbar biofilmes de população pré-formados e dessa maneira, diminuir sua adesão. Os resultados encontrados para as três linhagens de *S. aureus* expostas aos complexos são promissoras, considerando uma taxa de inibição na fase de proliferação dos biofilmes de população entre 30% e 60%, seguida da taxa de inibição da fase de adesão de 40% á 60%. Importante ressaltar que para a linhagem de *S. aureus* ATCC® 33591™ os complexos (D2) e (D4) foram mais efetivos para a redução na fase de proliferação que amoxicilina. Para as linhagens *S. aureus* ATCC® 25904™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 a melhor redução foi na fase de adesão.

As análises feitas por microscopia eletrônica de transmissão (MEV) de diferentes campos, sugerem que houve uma redução no quantitativo das células e esses dados corroboram com os ensaios de redução da proliferação e adesão de biofilmes de população feitas por espectrofotometria. A ultraestrutura aparente dos biofilmes quando exposta ao antimicrobiano amoxicilina e aos complexos (D2) e (D4) foi nitidamente alterada, apresentando grandes canais e aberturas, indicando ação do antimicrobiano e dos complexos sobre essas estruturas. As linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052 também apresentaram formas alongadas, deformações irregulares no envoltório, achatamento, rugosidade e liberação de conteúdo intracelular para o meio.

A matriz exopolissacarídea (EPS) compreende a maior parte da biomassa de um biofilme, sendo este, um ambiente essencial na manutenção da população bacteriana. Possui uma composição heterogênea, sendo a água o seu principal componente, seguida pelo predomínio de polissacarídeos (formadores de géis), próprias células, proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas e fosfolipídios (FLEMMING et al., 2016). Logo, a interferência em um ou mais componentes dessa estrutura, pode ocasionar o enfraquecimento do biofilme. Além dos benefícios estruturais e funcionais proporcionados aos biofilmes, a matriz tem sido sugerida como um ambiente propício para resistência antimicrobiana (RUMBAUGH; SAUER, 2020). Os ensaios realizados permitiram investigar uma

possível ação dos complexos **(D2)** e **(D4)** na composição da matriz polimérica extracelular das linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052. Dessa maneira foi constatado que os complexos não foram capazes de agir na síntese de proteínas e carboidratos (CHO) presentes na matriz se comparada a amoxicilina, entretanto, sua ação pode estar ligada em outras vias e em outros componentes.

Em particular, está claro que os complexos **(D2)** e **(D4)** possuem ação sobre a densidade celular, de modo a reduzir a população bacteriana, aumento da permeabilidade celular, levando a danos em seu envoltório e atuação sobre biofilmes de população, entretanto, novos estudos devem ser conduzidos para uma melhor compreensão desses complexos em biofilmes de população formados por linhagens de *S. aureus*.

7. CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível inferir que os complexos provenientes do sistema Fe-cyclam (**D1**) a (**D4**) apresentaram probabilidades de serem ativos em um dos perfis avaliados (farmacocinética) e também em alvos biológicos (enzimas microbianas, ação em membrana e inibidor de replicação do DNA). Este método de análise é importante dentro da triagem de novas moléculas com propriedades farmacológicas, levando em consideração a sua forma de atuação no organismo e o direcionamento de seus alvos. Os complexos (**D1**) a (**D4**) apresentaram baixa citotoxicidade para linhagens primárias de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e para J774A.1 reiterando a descoberta de novas terapias medicamentosas com baixa ou nenhuma toxicidade.

Os complexos (**D1**) a (**D4**) apresentam atividade antibacteriana frente às linhagens de *S. aureus* ATCC® 25904™, *S. aureus* ATCC® 33591™ e o isolado clínico de *S. aureus* 05-0052. A atividade antibacteriana dos complexos tem efeito bacteriostático no valor da CIM, sendo comum para as três linhagens. Os complexos mais ativos (**D2**) e (**D4**) demonstraram uma redução na densidade celular bacteriana e foram capazes de agir em seu envoltório, aumentando sua permeabilidade, alterando dessa forma, a membrana celular das linhagens de *S. aureus*. Redução da atividade anti-catalase também foi observada sobre concentração inibitória mínima. Além disso, os complexos (**D2**) e (**D4**) foram capazes de reduzir o biofilme de população pré-formado e interferir na sua adesão.

Este é o primeiro relato de estudo citotóxico em macrófagos e antibacteriano para linhagens sensível e resistente a antimicrobianos e de isolado clínico de *S. aureus* de complexos sintetizados a partir do sistema Fe-cyclam, tornando essa pesquisa inédita e promissora. Logo, esse estudo poderá contribuir na descoberta de novos medicamentos reforçando o combate a infecções e a enunciada resistência antibacteriana.

Perspectivas futuras voltadas para a formação de biofilmes mistos de comunidade entre as linhagens estudadas, análise direcionada em matriz polimérica extracelular e o desenvolvimento de uma nova formulação com os complexos mais ativos (**D2**) e (**D4**) do sistema Fe-cyclam também serão conduzidos.

REFERÊNCIAS

- ALI, J.; RAFIQ, Q. A.; RATCLIFFE, E. Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. **Future Sci OA**. v. 4 (4). p. Fso 290, 2018.
- ALVES, L.G.; PORTEL, J.F.; SOUSA, A.S.; FERREIRA, O.; ALMADA, S.; SILVA, E.R.; MARTINS, A.M.; LEITÃO, J.H. Investigations into the Structure/Antibacterial Activity Relationships of *Cyclam* and *Cyclen* Derivatives. **Antibiotics**. v.8, p. 224, 2019.
- AMMETER, D.; IDOWU, T.; ZHANEL, G.G.; SCHWEIZER, F. Development of a nebramine-cyclam conjugate as an antibacterial adjuvant to potentiate β -lactam antibiotics against multidrug-resistant *P. aeruginosa*. **J Antibiot**. v. 72, p. 816-826, 2019.
- ANDERSSON, D. I.; BALABAN, N.Q.; BAQUERO, F.; COURVALIN, P.; GLASER, P.; GOPHNA, U.; KISHONY, R.; MOLIN, S.; TØNJUN, T. Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality. **FEMS Microbiol. Rev**. v. 44, p. 171-188, 2020.
- ANDREWS, S.; NORTON, I.; SALUNKHE, A. S.; GOODLUCK, H.; ALY, W. S.; MOURAD-AGHA, H.; CORNELIS, P. Control of iron metabolism in bacteria. **Metal Ions Life Sci**. v.12, p. 203-239, 2013.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:< https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/o_pas_web/modulo3/mec_enzimatico.htm>. Acesso em: 07 março 2022.
- AOKI, E. E. **Efeito da concentração subinibitória de amoxicilina e ciprofloxacino sobre alguns fatores relacionados à virulência de *Staphylococcus aureus***. 2008. 93p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- ARGUDÍN, M.A.; ROISIN, S.; NIENHAUS, L.; DODÉMONT, A.; DE MENDONÇA, R.; NONHOFF, C.; DEPLANO, A.; DENIS, O. Genetic diversity among *Staphylococcus aureus* isolates showing oxacillin and/or cefoxitin resistance not linked to the presence of mec genes. **Antimicrob Agents Chemother**. v 62 (7) ; 62:e00091-18, 2018.
- ASLAM, B.; WANG, W.; ARSHAD, M.I.; KHURSHID, M.; MUZAMMIL, S.; RASOOL, M.H.; NISSAR, M.A.; ALVI, R.F.; ASLAM, M.A.; QAMAR, M.U.; SALAMART, M.; BALOCH. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infect. Drug Resist**. v.11, p.1645-1658, 2018.
- APOHAN, E.; YILMAZ, U.; YILMAZ, O.; SERINDAG, A.; KÜÇÜKBAY, H. Synthesis, cytotoxic and antimicrobial activities of novel cobalt and zinc complexes of benzimidazole derivatives. **Journal of Organometallic Chemistry**. v. 828, p. 52-58, 2017.

BABII, C.; BAHRIN, L.G.; NEAGU, A.N.; GOSTIN, I.; MIHASAN, M.; BIRSA, L.M.; STEFAN, M. Antibacterial activity and proposed action mechanism of a new class of synthetic tricyclic flavonoids. **J. Appl. Microbiol.** v.120, p. 630-663, 2016.

BALABAN, N.Q.; HELAINE, S.; LEWIS, K.; ACKERMANN, M.; ALDRIDGE, B.; ANDERSSON, D.I.; BRYNILDSEN, M.P.; BUMANN, D.; CAMILLI, A.; COLLINS, J.J.; DEHIO, C.; FORTUNE, S.; GHIGO, J.M.; HARDT, W.D.; HARMS, A.; HEINEMANN, M.; HUNG, D.T.; JENAL, U.; LEVIN, B.R.; MICHIELS, J.; STORZ, G.; TAN, M.W.; TENSON, T.; MELDEREN, L.V.; ZINKERNAGEL, A. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. **Nat Rev Microbiol.** v.17, p. 441-448, 2019.

BAKER, S.; THOMSON, N.; WEILL, F.X.; HOLT, K. E. Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. **Science.** v. 360, p. 733-738, 2018.

BAREFIELD, E. K. Coordination chemistry of N-tetraalkylated cyclam ligands- A status report. **Coordination Chemistry Reviews.** v 254. ed.15-16. p. 1607-1627, 2010.

BECKER, K.; SCHAUMBURG, F.; FEGELER, C.; FRIEDRICH, A.W.; KÖCH, R. Prevalence of Multiresistant Microorganisms PMM Study. *Staphylococcus aureus* from the German general population is highly diverse. **Int J Med Microbiol.** v 307 (1), p. 21-27, 2017(a).

BECKER, K.; BALLHAUSEN, B.; KAHL, B.C.; KÖCK, R. The clinical impact of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of the clonal complex 398 for humans. **Vet Microbiol.** v. 200. p. 33-38, 2017(b).

BELANGER, C. R.; HANCOCK, R. Testing physiologically relevant conditions in minimal inhibitory concentration assays. **Nature Protocols.** v. 16(8). p. 3761-3774, 2021.

BELL, G.; MACLEAN, C. The search for evolution-proof antibiotics. **Trends Microbiol.** v. 26 (6). p. 471-483, 2018.

BIAN, X.; QU, X.; ZHANG, J.; NANG, S.C.; BERGEN, P.J.; TONY ZHOU, Q.; CHAN, H.K.; FENG, M.; LI, J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of peptide antibiotics. **Adv Drug Deliv Rev.** v. 183. 114171, 2022.

BISSANTZ, C.; KUHN, B.; STAHL, M. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. **Journal of Medicinal Chemistry.** v. 53. n. 14. p. 5061-5084, 2010.

BOTELHO, J.; SCHULENBURG, H. The Role of Integrative and Conjugative Elements in Antibiotic Resistance Evolution. **Trends Microbiol.** v. 29(1). p. 8-18, 2021.

BOTTERY, M.J.; PITCHFORD, J.W.; FRIMAN, V.P. Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. **ISME J.** v.15(4). p. 939-948, 2021.

BROWN, J. B.; LEE, M. A.; SMITH, A. T. Ins and Outs: Recent Advancements in Membrane Protein-Mediated Prokaryotic Ferrous Iron Transport. **Biochemistry.** v. 60(44), p. 3277-3291, 2021.

CACCAMO, P.D.; BRUN, Y.V. The molecular basis of noncanonical bacterial morphology. **Trends in microbiology.** v. 26(3). p.191-208, 2018.

CARNIELLO, V.; PETERSON, B.W.; VAN DER MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surfaceprogrammed biofilm growth. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 261, p. 1-14, 2018.

CHAMBERS, H.F.; DELEO F.R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nat Rev Microbiol.** v. 7. p. 629-641, 2009.

CHENG, G.; DAI, M.; AHMED, S.; HAO, H.; WANG, X.; YUAN, Z. Antimicrobial drugs in fighting against antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v.7. p. 832, 2016.

CHOKSHI, A.; SIFRI, Z.; CENNIMO, D.; HORNG, H. Global Contributors to Antibiotic Resistance. **J Glob Infect Dis.** v. 11(1). p. 36-42, 2019.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **J Mol Evol.** v. 88. p. 26-40, 2020.

CLAUDEL, M.; SCHWARTE, J.V.; FROMM, K. M. New Antimicrobial Strategies Based on Metal Complexes. **Chemistry.** v.2. p.849-899, 2020.

CLINICAL STANDARD LABORATORY INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Twenty-Eight Informational Supplement M07. CLSI, 2018.

CROFTS, T.S.; GASPARRINI, A.J.; DANTAS, G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. **Nat Rev Microbiol.** v. 15(7). p. 422-434, 2017.

DE JONG, N.; VAN KESSEL, K.; VAN STRIJP, J. Immune Evasion by *Staphylococcus aureus*. **Microbiol Spectr.** v. 7(2). 2019.

DE OLIVEIRA, D.; FORDE, B.M.; KIDD, T.J.; HARRIS, P.; SCHEMBRI, M.A.; BEATSON, S.A.; PATERSON, D.L.; WALKER, M.J. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical microbiology reviews.** v.33(3), e00181-19, 2020.

DEVI, K.P.; NISHA, S.A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S.K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal Ethnopharmacology**, v.130, n.1, p.107-115, 2010.

DIVYAKOLU, S.; CHIKKALA, R.; RATNAKAR, K.S.; SRITHARAN, V. Hemolysins of *Staphylococcus aureus* - An Update on Their Biology, Role in Pathogenesis and as Targets for Anti-Virulence Therapy. **Adv. Infect. Dis.** v. 9. p. 80-104, 2019.

DOSTERT, M.; BELANGER, C.R.; HANCOCK, R. Design and Assessment of Anti-Biofilm Peptides: Steps Toward Clinical Application. **J Innate Immun.** v.11(3). p.193-204, 2019.

DOYLE, L.; OVCHINNIKOVA, O.G.; MYLER, K.; MALLETT, E.; HUANG, B.S.; LOWARY, T.L.; KIMBER, M.S.; WHITFIELD, C. Biosynthesis of a conserved glycolipid anchor for Gram-negative bacterial capsules. **Nat Chem Biol.** v. 15(6). p. 632-640, 2019.

DROZDZIK, M.; DROZDZIK, M.; OSWALD, S. Membrane Carriers and Transporters in Kidney Physiology and Disease. **Biomedicines.** v.9, p. 426, 2021.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DURÃO, P.; BALBONTÍN, R.; GORDO, I. Evolutionary mechanisms shaping the maintenance of antibiotic resistance. **Trends Microbiol.** v. 26(8). p. 677-691, 2018.

EVANS, A.; KAVANAGH, K.A. Evaluation of metal-based antimicrobial compounds for the treatment of bacterial pathogens. **J Med Microbiol.** v. 70(5). 001363, 2021.

FAN, J.; DE LANNOY, IA. Pharmacokinetics. **Biochem Pharmacol.** v. 87(1). p. 93-120, 2014.

FIGUEIREDO, A.M.S. What is behind the epidemiological difference between community-acquired and health-care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? **Virulence.** v. 8(6). p. 640-642, 2017.

FILIMONOV, D.A.; LAGUNIN, A.A.; GLORIOZOVA, T.A.; RUDIK, A.V.; DRUZHILOVSKII, D.S.; POGODIN, P.V.; POROIKOV, V.V. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. **Chem. Heterocycl. Compd.** v.50, n.3, p. 444-457, 2014.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S.A.; Kjelleberg, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nat Rev Microbiol.** v. 14(9). p. 563-75, 2016.

FLORES-DÍAZ, M.; MONTURIOL-GROSS, L.; NAYLOR, C.; ALAPE-GIRÓN, A.; FLIEGER, A. Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. **Microbiol Mol Biol Rev.** v. 80(3). p 597-628, 2016.

FOUNOU, R.C.; FOUNOU, L.L.; ESSACK, S.Y. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One.** v.12. e018962, 2017.

GARDE, S.; CHODISETTI, P.K.; REDDY, M. Peptidoglycan: Structure, Synthesis, and Regulation. **EcoSal Plus.** v. 9(2). 2021.

GILANI, B.; CASSAGNOL, M. Biochemistry, Cytochrome P450. In: **StatPearls.** 2021.

GRABCHEV, I.; YORDANOVA, S.; BOSH, P.; VASILEVA-TONKOVA, E.; KUKEVA, R.; STOYANOV, S.; STOYANOVA, R. Structural characterization of 1,8-naphthalimides and in vitro microbiological activity of their Cu (II) and Zn (II) complexes. **Journal of Molecular Structure.** v. 1130. p. 974-983, 2017.

GRAYSON, M.L.; COSGROVE, S.E.; CROWE, S.M.; HOPE, W.; MCCARTHY, J.S.; MILLS, J.; MOUTON, J.W.; PATERSON, D.L. Kucers the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, Seventh Edition. **CRC Press.** p. 1-4841, 2018.

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

HAO, G.; SHI, Y.H.; TANG, Y.L.; LE, G.W. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2. **Peptides.** v. 30. p. 1421-1427, 2009.

HAO, M.; YE, M.; SHEN, Z.; HU, F.; YANG, Y.; WU, S.; XU, X.; ZHU, S.; QIN, X.; WANG, M. Porin deficiency in carbapenem-resistant enterobacter aerogenes strains. **Microb. Drug Resist.** v. 24(9). p. 1277-1283, 2018.

HASSOUN, A.; LINDEN, P.K.; FRIEDMAN, B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. **Crit Care.** v. 21(1). p. 211, 2017.

HE, S.; YE, T.; WANG, R.; ZHANG, C.; ZHANG, X.; SUN, G.; SUN, X. An *in silico* model for predicting drug-induced hepatotoxicity. **Int. J. Mol. Sci.** v. 20(8). p.1897, 2019.

HOLMES, A.H.; MOORE, L.S.; SUNDSFJORD, A; STEINBAKK, M.; REGMI, S.; KARKEY, A.; GUERIN, P.J.; PIDDOCK, L.J. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet.** v. 387(10014). p. 176-187, 2016.

HOMAYUN, B.; LIN, X.; CHOI, H. J. Challenges and Recent Progress in Oral Drug Delivery Systems for Biopharmaceuticals. **Pharmaceutics**. v. 11(3). p. 129, 2019.

HOSPENTHAL, M.; COSTA, T.; WAKSMAN, G. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. **Nat Rev Microbiol**. v.15. p. 365-379, 2017.

HOU, H.; LI, Y.; JIN, Y.; CHEN, S.; LONG, J.; DUAN, G.; YANG, H. The crafty opponent: the defense systems of *Staphylococcus aureus* and response measures. **Folia Microbiol (Praha)**. v. 67(2). p. 233-243, 2022.

HUBIN, T.J.; AMOYAW, P.N.A.; ROEWE, K.D.; SIMPSON, N.C.; MAPLES, R.D.; FREEMAN, T.N.C.; AMY, N.C.; LE, J.G.; ARCHIBALD, S.J.; KHAN S.I.; et al. Synthesis and antimalarial activity of metal complexes of cross-bridged tetraazamacrocyclic ligands. *Bioorgan. Med. Chem.* v. 22. p. 3239-3244, 2014.

HUBIN, T.J.; WALKER, A.N.; DAVILLA, D.J.; FREEMAN, T.N.C.; EPLEY, B.M.; HASLEY, T.R.; AMOYAW, P.N.A.; JAIN, S.; ARCHIBALD, S.J.; PRIOR, T.J.; et al. Tetraazamacrocyclic derivatives and their metal complexes as antileishmanial leads. **Polyhedron**. v. 163. p. 42-53, 2019.

HU, Q.; PENG, H.; RAO, X. Molecular Events for Promotion of Vancomycin Resistance in Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*. **Frente. Microbiol**. v. 7. p.1601, 2016.

ILBERT, M.; BONNEFOY, V. Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1827, p. 161-175, 2013.

ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization, Switzerland, 42p.

JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALI, F.; IMRAN, M.; NAZAW, M.A.; HUSSAIN, T.; ALI, M.; RAFIQ, M.; KAMIL, M.A. Bacterial biofilm and associated infections. **J Chin Med Assoc**. v. 81(1). p. 7-11, 2018.

JEAN VAN HEIJENOORT. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan, **Glycobiology**. v. 11. ed. 3.1. p. 25R-36R, 2001.

JIANG, X.; ELLABAAAN, M.M.H.; CHARUSANTI, P.; MUNCK, C.; BLIN, K.; TONG, Y.; WEBER, T.; SOMMER, A.O.M.; LEE, S.Y. Dissemination of antibiotic resistance genes from antibiotic producers to pathogens. **Nat Commun**. v. 8, 15784, 2017.

JOUX, F.; LEBARON, P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection*, v.2, p. 1523-1535, 2000.

KHAN, M. O.; KEISER, J.; AMOYAW, P. N.; HOSSAIN, M. F.; VARGAS, M.; LE, J. G.; SIMPSON, N. C.; ROEWE, K. D.; FREEMAN, T. N.; HASLEY, T. R.; MAPLES, R. D.; ARCHIBALD, S. J.; HUBIN, T. J. Discovery of Antischistosomal Drug Leads Based on Tetraazamacrocyclic Derivatives and Their Metal Complexes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 60(9). p. 5331-5336, 2016.

KOO, H.; ALLAN, R.N.; HOWLIN, R.P.; STOODLEY, P.; HALL-STOODLEY, L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nat Rev Microbiol**. v. 15. p. 740-755, 2017.

KOTYNIA, A.; WIATRAC, B.; KAMYSZ, W.; NEUBAUER, D.; JAWIEN, P.; MARCINIAK, A. Cationic Peptides and Their Cu (II) and Ni (II) Complexes: Coordination and Biological Characteristics. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22. n.12028. p.1-25, 2021.

KRAMER, J.; ÖZKAYA, Ö.; KÜMMERLI, R. Bacterial siderophores in community and host interactions. **Nat Rev Microbiol**. v.18, p.152-163, 2020.

KYSELA, D.T.; RANDICH, A.M.; CACCAMO, P.D.; BRUN, Y.V. Diversity takes shape: understanding the mechanistic and adaptive basis of bacterial morphology. **PLoS Biol**. v.14. e1002565, 2016.

LADDOMADA, F.; MIYACHIRO, M.M.; DESSEN, A. Structural insights into protein-protein interactions involved in bacterial cell wall biogenesis. **Antibiotics**. v. 5. p.14, 2016.

LADE, H.; KIM, J.S. Bacterial Targets of Antibiotics in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics (Basel)**. v. 10(4). p.398, 2021.

LAI, Y.W.; RIDONE, P.; PERALTA, G.; TANAKA, M.M.; BAKER, M.A.B. Evolution of the Stator Elements of Rotary Prokaryote Motors. **J Bacteriol**. v. 202(3). e00557-19, 2020.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. **Clin. Microbiol. Rev**. v. 31(4). e00020-18, 2018.

LARSSON, D.G.J.; FLACH, CF. Antibiotic resistance in the environment. **Nat Rev Microbiol**. v. 20. p. 257-269, 2021.

LEE, A.S.; DE LENCASTRE, H.; GARAU, J.; KLUYTMANS, J.; MALHOTRA-KUMAR, S.; PESCHEL, A.; HARBARTH, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nat Rev Dis Primers**. v.4, p. 18033, 2018.

LEE, JOON-HEE. Perspectives towards antibiotic resistance: from molecules to population. **J Microbiol**. v. 57(3). p.181-184, 2019.

LEVINE, D.P. "Vancomycin: a history". **Clin Infect Dis**. v. 42S1. p. 5-12, 2006.
 LINDSAY, J. A. Hospital-associated MRSA and antibiotic resistance-what have we learned from genomics? **Int. J. Med. Microbiol**. v. 303. p. 318-323, 2013.

LINHARES, L. D. A.; XIMENES, E. C. P. A. **Efeito da concentração subinibitória do extrato de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex. Hayne sobre os fatores de virulência de *S. aureus***. XIX Congresso de Iniciação Científica - UFPE. NABUCO, F. J. Pernambuco - Recife: Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica - UFPE, 2011.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**. v.193(1). p. 265-75,1951.

MACIEL TABOSA, M.A.; HOPPEL, M.; BUNGE, A.L.; GUY, R.H.; DELGADO-CHARRO, M.B. Predicting topical drug clearance from the skin. **Drug Deliv. and Transl. Res**. v. 11(2). p. 729-740, 2021.

MAGANA, M.; SERETI, C.; LOANNIDIS, A.; MITCHELL, C.A.; BALL, A.R.; MAGIORKINIS, E.; CHATZIPANAGIOTOU, S.; HAMBLIN, M.R.; HADJIFRANGISKOU, M.; TEGO, G.P. Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. **Clin Microbiol Rev**. v. 31(3). e00084-16, 2018.

MAHRT, N.; TIETZE, A.; KÜNZEL, S.; FRANZENBURG, S.; BARBOSA, C.; JANSEN, G.; SCHULENBURG, H. Bottleneck size and selection level reproducibly impact evolution of antibiotic resistance. **Nat Ecol Evol**. v. 5. p. 1233-1242, 2021.

MAY, KERRIE L.; GRABOWICZ, MARCIN. The bacterial outer membrane is an evolving antibiotic barrier. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 36, p. 8852-8854, 2018.

MCGUINNESS, W.A.; MALACHOWA, N.; DELEO, F.R. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Yale J Biol Med**. v. 90(2). p. 269-881, 2017.

MEYER, M., V.; DAHAOUI-GINDREY, LECOMTE, C.; GUILARD, R. Conformations and coordination schemes of carboxylate and carbamoyl derivatives of the tetraazamacrocycles *cyclen* and *cyclam*, and the relation to their protonation states. **Coord. Chem. Rev**. v. 178-180. p. 1313-1405, 1998.

MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**. v. 71, p. 413-451, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v. 65. p. 55-63, 1983.

MOTOHASHI, H.; INUI, K.I. Organic Cation Transporter OCTs (SLC22) and MATEs (SLC47) in the Human Kidney. *The AAPS Journal*, v.15, n.2, p.581-588, 2013.

MOTTA, S.S.; CLUZEL, P.; ALDANA, M. Adaptive resistance in bacteria requires epigenetic inheritance, genetic noise, and cost of efflux pumps. **PLoS ONE**. v. 10(3). p. 1-18, 2015.

MUHAMMAD, M.H.; IDRIS, A.L.; FAN, X.; GUO, Y.; YU, Y.; JIN, X.; QIU, J.; GUAN, X.; HUANG, T. Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. **Frente. Microbiol.** v.11. p. 928, 2020.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

NAKAMURA, S.; MINAMINO, T. Flagella-Driven Motility of Bacteria. **Biomolecules**. v. 9(7). p. 279, 2019.

NOMURA, R.; NAKAMINAMI, H.; TAKASAO, K.; MURAMATSU, S.; KATO, Y.; WAJIMA, T.; NOGUCHI, N. A class A β -lactamase produced by borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* hydrolyses oxacillin. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. v. 22. p. 244-247, 2020.

NOSTRO A.; ROCCARO A.S.; BISIGNANO G.; MARINO A.; CANNATELLI M.A.; PIZZIMENTTI F.C.; CIONI P.L.; PROCOPIO F.; BLANCO A.R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v.56. n.4, p. 519-523, 2007.

OLIVEIRA, Verônica da Silva. **Estudo do sistema Fe-cyclam com ligantes carboxilatos e avaliação do efeito spin crossover e atividade antibacteriana do complexo (Fe(cyclam)ox) PF₆**. 2018. 166f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

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

OTTO, M. Community-associated MRSA: what makes them special? Int. **J. Med. Microbiol.** v. 303. p. 324-330, 2013.

PERCIVAL S.L.; SULEMAN L.; VUOTTO C.; DONELLI G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. **J Med Microbiol.** v. 64. p. 323-334, 2015.

PILLAI, S. K.; WENNERSTEN, C.; VENKATARAMAN, L.; ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING, R.C.; KARCHMER, A.W. Development of reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. **Clin. Infect. Dis.**, Oxford, v. 49(8). p.1169-1174, 2009.

PILON, A.; LORENZO, J.; RODRIGUEZ-CALADO, S.; ADÃO, P.; MARTINS A.M.; VALENTE, A.; ALVES, L.G. New Cyclams and their Copper (II) and Iron (III) Complexes: Synthesis and Potential Application as Anticancer Agents. **ChemMedChem**. v.14. p. 770-778, 2019.

PINTO, N.D.C.C.; CAMPOS, L.M.; EVANGELISTA, A.C.S.; LEMOS, A.S.O.; SILVA, T.P.; MELO, R.C.N.; DE LOURENÇO, C.C.; SALVADOR, M.J.; APOLÔNIO, A.C.M.; SCIO, E.; FABRI, R.L. Antimicrobial *Annona muricata* L. (soursop) extract targets the cell membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Ind Crops Prod**. v. 107. p. 332-340, 2017.

PLYUTA, V.; ZAITSEVA, J.; LOBAKOVA, E.; ZAGOSKINA, N.; KUZNETSOV, A.; KHMEL, I. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. v. 121(11). p. 1073-1081, 2013.

RATHINAM, V.A.K.; ZHAO, Y.; SHAO, F. Innate immunity to intracellular LPS. **Nat Immunol**. v. 20. p. 527-533, 2019.

RAWSON, T. M.; MING, D.; AHMAD, R.; MOORE, L. S. P.; HOLMES, A. H. Antimicrobial use, drug-resistant infections and COVID-19. **Nat Rev Microbiol**. v.18(8). p. 409-410, 2020.

ROJAS, E.R.; BILLINGS, G.; ODERMATT, P.D.; AUER, G.K.; ZHU, L.; MIGUEL, A.; CHANG, F.; WEIBEL, D.B.; THERIOT, J.A.; HUANG, K.C. The outer membrane is an essential load-bearing element in Gram-negative bacteria. **Nature**. v. 559(7715). p. 617-621, 2018.

RUHAL, R.; KATARIA, R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. **Microbiol Res**. v. 251. 126829, 2021.

RUMBAUGH, K.P.; SAUER, K. Biofilm dispersion. **Nat Rev Microbiol**. v.18. p. 571-586, 2020.

SANDE, C.; WHITFIELD, C. Capsules and Extracellular Polysaccharides in *Escherichia coli* and *Salmonella*. **EcoSal Plus**. v. 9(2), eESP0033, 2021.

SANTI, E.; FACCHIN, G.; FACCIO, R.; BARROSO, R.P.; COSTA-FILHO, A.J.; BORTHAGARAY, G.; TORRE, M.H. Antimicrobial evaluation of new metallic complexes with xylitol active against *P. aeruginosa* and *C. albicans*: MIC determination, postagent effect and Zn-uptake. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 155, p. 67-75, 2016.

SAKYIAMAHA, M.M.; KOBAYAKAWA, T.; FUJINO, M.; KONNO, M.; NARUMI, T.; TANAKA, T.; NOMURA, W.; YAMAMOTO, N.; MURAKAMI, T.; TAMAMURA, H. Design, synthesis and biological evaluation of low molecular weight CXCR4 ligands. **Bioorgan. Med. Chem**. v. 27. p.1130-1138, 2019.

SCHITO, G.C. The Importance of the Development of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*, **CMI**. v.12(1). p. 3-8, 2006.

SCHRADER, S.M.; VAUBOURGEIX, J.; NATHAN, C. Biology of antimicrobial resistance and approaches to combat it. **Sci. Transl. Med.** v.12(549). eaaz6992, 2020.

SHARMA, D.; MISBA, L.; KHAN, A.U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. **Antimicrob Resist Infect Control.** v. 8, p. 76, 2019.

SHELDON, J. R.; HEINRICHS, D. E. Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of gram positive pathogens. **FEMS microbiology reviews**, v. 39(4), p. 592-630, 2015.

SIKORA, A.; ZAHRA, F. Nosocomial Infections. 2022.

SILVA, T.P.; NOYMA, N.P.; DUQUE, T.L.A.; GAMALIER, J.P.; VIDAL, L.O.; LOBÃO, L.M.; CHIARINI, H.G.; ROLAND, F.; MELO, R.C.N. Visualizing aquatic bacteria by light and transmission electron microscopy. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.105, n. 1, p.1-14, 2014.

SIMPSON, B.W.; TRENT, M.S. Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. **Nat Rev Microbiol.** v. 17. p. 403-416, 2019.

SINGH S.B.; YOUNG, K.; SILVER, L.L. What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. **Biochem. Pharmacol.** v. 133. p. 63-73, 2017.

SMALLA, K.; COOK, K.; DJORDJEVIC, S. P.; KLÜMPER, U.; GILLINGS, M. Environmental dimensions of antibiotic resistance: assessment of basic science gaps. **FEMS Microbiol. Ecol.** v. 94(12), 2018.

SMITH, N.; QUAN, D.; NAGALINGAM, G.; TRICCAS, J. A.; RENDINA, L. M.; RUTLEDGE, P. J. Carborane clusters increase the potency of bis-substituted cyclam derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. **RSC medicinal chemistry.** v. 13(10), p. 1234-1238, 2022.

SPENCER, ALR, SPENCER, JFT. Public Health Microbiology: Methods and Protocols, 1st ed. Human Press Inc., New Jersey, 2004.

SOMMER, M. O. A.; MUNCK, C.; TOFT-KEHLER, R. V.; ANDERSSON, D. I. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? **Nat. Rev. Microbiol.** v.15. p. 689-696, 2017.

SOUSA, S.A.; FELICIANO, J.R.; PITA, T.; SOEIRO, C.F.; MENDES, B.L.; ALVES, L.G.; LEITÃO, J.H. Bacterial Nosocomial Infections: Multidrug Resistance as a Trigger for the Development of Novel Antimicrobials. **Antibiotics (Basel).** v.10(8). p. 942, 2021.

SUGDEN, R.; KELLY, R.; DAVIES, S. Combatting antimicrobial resistance globally. **Nat Microbiol.** v. 1(10), 16187, 2016.

TAM, K.; TORRES, V.J. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. **Microbiol. Spectr.** v. 7(2). p.16, 2019.

TANG, Y-L. et al. Insertion mode of a novel anionic antimicrobial peptide MDpep5 (ValGlu-Ser-Trp-Val) from Chinese traditional edible larvae of housefly and its effect on surface potential of bacterial membrane. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.48, p.1187-1194, 2008.

TAYEB-FLIGELMAN, E.; TABACHNIKOV, O.; MOSHE, A.; GOLDSHMIDT-TRAN, O.; SAWAYA, M. R.; COQUELLE, N.; COLLETIER, J.P.; LANDAU, M. The cytotoxic *Staphylococcus aureus* PSMA α 3 reveals a cross-alpha amyloid-like fibril. **Science**. v. 355(6327). p. 831-833, 2017.

TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. *Staphylococcus aureus*. 2022.

THAMMAVONGSA, V.; KIM, H.K.; MISSIAKAS, D.; SCHNEEWIND, O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. **Nat Rev Microbiol.** v.13(9). p. 529-43, 2015.

TONG, S.Y.; DAVIS, J.S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T.L.; FOWLER, V.G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clin Microbiol Rev.** v. 28(3). p. 603-61, 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed. 12 ed. 2017. 962f.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Editora Atheneu. 6 ed. 2015.

TYPAS, A.; BANZHAF, M.; GROSS, C. A.; VOLLMER, W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. **Nat. Rev. Microbiol.** v.10. p. 123-136, 2012.

URUSHIBARA, N.; AUNG, M.S.; KAWAGUCHIYA, M.; KOBAYASHI, N. Novel staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type XIV (5A) and a truncated SCCmec element in SCC composite islands carrying speG in ST5 MRSA in Japan. **J Antimicrob Chemother.** v. 75(1). p. 46-50, 2020.

US Centers for Disease Control and Prevention. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: Pennsylvania 2002. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** v. 51(40). 902, 2002.

VAN DALEN, R.; PESCHEL, A.; VAN SORGE, N.M. Wall Teichoic Acid in *Staphylococcus aureus* Host Interaction. **Trends in Microbiology**. v. 28(12). p. 985-998, 2020.

VAN HAL, S. J.; FOWLER, V.G.JR. Is it time to replace vancomycin in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections? **Clin. Infect. Dis.** v. 56(12). p. 1779-1788, 2013.

VAN TEESELING, M.; DE PEDRO, M.A.; CAVA, F. Determinants of Bacterial Morphology: From Fundamentals to Possibilities for Antimicrobial Targeting. **Front. Microbiol.** v. 8. 1264. 2017.

VESTERGAARD, M.; FREES, D.; INGMER, H. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. **Microbiol Spectr.** v. 7(2), 2019.

VIJAYALAKSHMI, P.; DAISY, P. Effective interaction studies for inhibition of DNA ligase protein from *Staphylococcus aureus*. **J Recept Signal Transduct Res.** v. 35(1). p.15-25, 2015.

VIJAY, U.; GUPTA, S.; MATHUR, P.; SURAVAJHALA, P.; BHATNAGAR, P. Microbial Mutagenicity Assay: Ames Test. **Bio Protoc.** v. 8(6), e2763, 2018.

VOGT, A. S.; ARSIWALA, T.; MOHSEN, M.; VOGEL, M.; MANOLOVA, V.; BACHMANN, M. F. On Iron Metabolism and Its Regulation. **Int. J. Mol. Sci.** v. 22(9), p. 4591, 2021.

VOLKE, D.C. NIKEL, P.I. Getting bacteria in shape: synthetic morphology approaches for the design of efficient microbial cell factories. **Adv Biosyst.** v. 2. ed.11. 1800111, 2018.

WANG, H.; WANG, M.; XU, X.; GAO, P.; XU, Z.; ZHANG, Q.; LI, H.; YANG, A.; KAO, R.Y.T.; SUN, H. Multi-target mode of action of silver against *Staphylococcus aureus* endows it with capability to combat antibiotic resistance. **Nat Commun.** v.12, p. 3331, 2021.

WELLINGTON, S.; GREENBERG, E.P. Quorum Sensing Signal Selectivity and the Potential for Interspecies Cross Talk. **mBio.** v. 10(2), e00146-19, 2019.

WEN, J. H.; LI, C. Y.; GENG, Z. R.; MA, X. Y.; WANG, Z. L. A potent antitumor Zn²⁺ tetraazamacrocyclic complex targeting DNA: the fluorescent recognition, interaction and apoptosis studies. **Chemical communications.** v. 47, n. 40, p. 11330-11332, 2011.

WHITELEY, M.; DIGGLE, S.; GREENBERG, E. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. **Nature.** v. 551. p. 313-320, 2017.

WHO. Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections, <https://www.who.int/news-room/detail/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections>; 2020 [Accessed in: 07 jan 2022].

WOLFMEIER, H.; PLETZER, D.; MANSOUR S.C.; HANCOCK, R. New perspectives in biofilm eradication. **ACS Infect Dis.** v. 4(2). p. 93-106, 2018.

WONG, J. K.; TODD, M. H.; RUTLEDGE, P. J. Recent Advances in Macrocyclic Fluorescent Probes for Ion Sensing. **Molecules.** v. 22(2). p. 200, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, p.7, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 10 global health issues to track in 2021 (2021). <https://www.who.int/news-room/spotlight/10-global-health-issues-to-track-in-2021>. (Accessed on May 02, 2022).

WORLITZER, V.M.; JOSE, A.; GRINBERG, I.; BÄR, M.; HEIDENREICH, S.; ELDAR, A.; ARIEL, G.; BE'ER, A. Biophysical aspects underlying the swarm to biofilm transition. **Sci Adv.** v. 8(24):eabn8152, 2022.

ZHAO, Z.; NELSON, A. R.; BETSHOLTZ, C.; ZLOKOVIC, B. V. Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier. **Cell.** v.163(5). p. 1064-1078, 2015.

ZHU, Y. G.; GILLINGS, M.; SIMONET, P.; STEKEL, D.; BANWART, S.; Penuelas, J. Microbial mass movements. **Science.** v. 357. p. 1099-1100, 2017.