



Novos compostos antimicrobianos no combate à resistência bacteriana a antibióticos

Bruno Diogo Dias Ribeiro

Mestrado em Bioquímica

Faculdade de Ciências e Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade do Porto

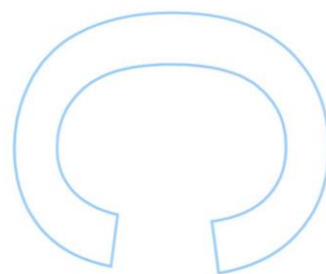
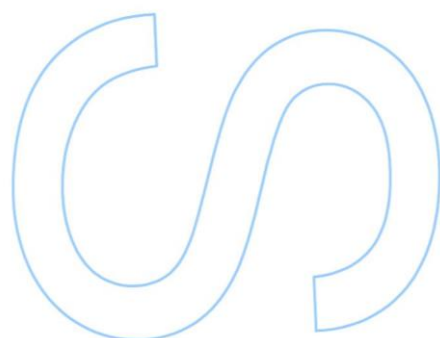
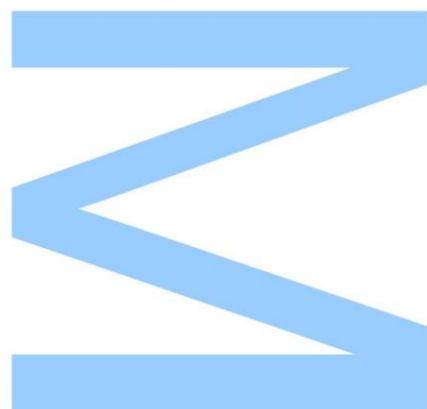
2020/2021

Orientador

Doutora Mariana Ferreira, investigadora REQUIMTE/FCUP

Coorientador

Professora Doutora Paula Gameiro, Professora Auxiliar do Departamento de Química
Bioquímica, FCUP



U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

U. PORTO

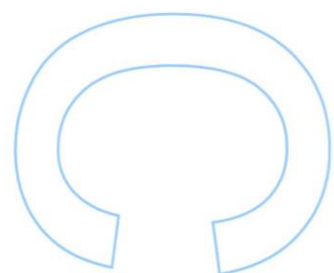
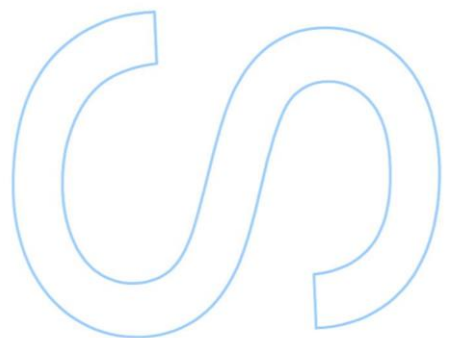
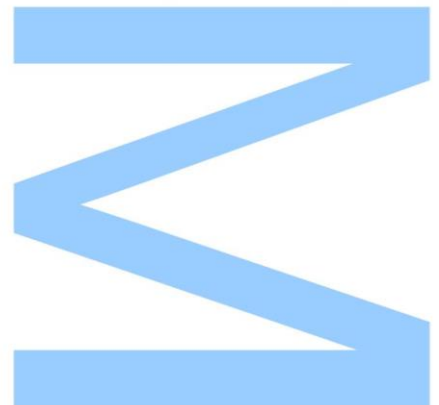


FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Em primeiro lugar queria agradecer à Doutora Mariana Ferreira e à Doutora Paula Gameiro pela enorme oportunidade que me deram. Foi uma longa jornada de um ano mas foi tão satisfatória como julguei que seria. Acolheram-me da melhor maneira e não podia pedir melhores pessoas com quem trabalhar. Para além do vosso excelente profissionalismo têm um excelente coração. Obrigado pelas vossos conselhos e por me fazerem sentir parte da equipa.

Obrigado também a todas as pessoas da FCUP com quem ia trocando umas conversas ocasionais e em especial à Rita por tornar os dias menos monótonos.

Obrigado aos meus pais por fazerem de mim quem sou. Por todo o apoio incondicional em qualquer decisão e por me inspirarem todos os dias a ser uma pessoa mais responsável, mais adulta.

À minha avó, por me fazer sorrir todos os dias. À Li e ao Telmo, pelo vosso carinho ao longo de todos estes anos. Vocês são mesmo os meus segundos pais.

À Bia, pelo apoio, felicidade e companhia constante que me inspiram a dar o melhor de mim todos os dias. A todos os amigos do fojo e da faculdade, vamos celebrar mais um ano de muitos juntos. A toda a gente que tira tempo do seu dia para sair à noite comigo. Um obrigado ao Luís, ao Vasco, ao Bruno, à Márcia, ao Nísio e ao Carlos por todas as conversas que marcaram a minha vida.

E por fim ao Rafael, que me conhece melhor que toda a gente. Obrigado pelas horas noturnas diárias ao longo destes anos todos, nunca passei nenhum momento mau contigo e a nossa interação já é praticamente uma necessidade

Resumo

A resistência bacteriana a antibióticos é atualmente uma das principais ameaças à saúde pública. A utilização cada vez mais frequente, prolongada e, muitas vezes, inadequada de antibióticos, contribui para o desenvolvimento cada vez mais rápido de mecanismos de resistência a antibióticos por parte das bactérias.

As fluoroquinolonas (FQs) constituem uma classe de antibióticos com espectro de ação alargado. Paralelamente a outros antibióticos, a sua utilização generalizada está na origem do rápido desenvolvimento de mecanismos de resistência contra esta família. Uma das estratégias exploradas recentemente visa combater a resistência bacteriana a FQs através da complexação das mesmas com metais de transição, nomeadamente Cu(II), e 1,10-fenantrolina (phen), os quais originam complexos (Cu(II)/FQ/phen) bastante estáveis, designados por metaloantibióticos.

Com este trabalho pretende-se explorar a viabilidade destes metaloantibióticos, nomeadamente metaloantibióticos de ciprofloxacina (cpx) e da moxifloxacina (mxfx), como resposta ao problema crescente da resistência bacteriana de *Staphylococcus aureus* a FQs, através de ensaios biofísicos, bioquímicos e microbiológicos.

Os estudos espectralfluorimétricos de determinação das constantes de partição, K_p , mostraram uma forte interação dos metaloantibióticos com a componente lipídica das membranas bacterianas de três modelos miméticos de *S. aureus* estudados. Os resultados sugerem que o mecanismo de influxo dos metaloantibióticos poderá ser diferente do das FQs puras, o que corrobora dados previamente reportados para bactérias Gram-negativas. O presente estudo prosseguiu com a caracterização dos diferentes sistemas miméticos de *S. aureus*, através da determinação das temperaturas de transição, T_m , por anisotropia de fluorescência em estado estacionário, recorrendo à incubação de uma sonda fluorescente com localização membranar conhecida. A influência da presença de FQs puras e dos seus metaloantibióticos nas T_m foi também avaliada. Os resultados experimentais sugerem que os metaloantibióticos se localizam preferencialmente em domínios ricos em cardiolipina.

O presente trabalho termina com a realização de ensaios microbiológicos com vista à determinação da atividade antibiofilme dos metaloantibióticos. Os resultados experimentais evidenciaram uma redução do crescimento da matriz extracelular do biofilme na presença de todos os compostos testados, embora se mantenha a viabilidade celular bacteriana.

Em conclusão, os metaloantibióticos testados parecem constituir uma alternativa promissora às suas FQs puras no que diz respeito ao tratamento de infeções causadas por *S. aureus*. Estes metaloantibióticos mostraram uma interação forte com a componente membrana bacteriana e poderão ter localização preferencial por domínios ricos em cardiolipina. No que respeita à atividade antibiofilme, estes complexos evidenciaram capacidade de reduzir a biomassa total de um biofilme pré-formado.

Palavras-chave: Fluoroquinolonas, resistência bacteriana, biofísica, metaloantibióticos, fluorescência, microbiologia, biofilmes, lipossomas, bactérias, constante de partição, temperatura de transição,

Abstract

Antimicrobial resistance occurs when bacteria develop the ability to overcome the action of a drug. Antimicrobial resistance is one of the biggest public health challenges of this century. The misuse and/or overuse of antibiotics has tremendously accelerated the speed at which bacteria develop resistance mechanisms. A collective and massive global approach is required to fight this public health concern.

Fluoroquinolones (FQs) are a broad-spectrum large family of antibiotics, widely used in the clinical practice. Similar to other classes of antibiotics, the generalized use of FQs allowed bacteria to quickly develop resistance mechanisms against this family. One of the most recent strategies employed to overcome this problem involves the complexation of FQs with divalent metal cations, namely Cu(II), and 1,10-phenanthroline (phen). This complexation forms stable complexes, known as metalloantibiotics.

The main aim of the present work is to explore the viability of these metalloantibiotics, namely ciprofloxacin (cpx) and moxifloxacin (mxfx) metalloantibiotics, to fight bacterial infections caused by *Staphylococcus aureus*. The present work combined biophysical, biochemical and microbiological approaches.

Spectrofluorimetric studies on the determination of the partition constant, K_p , of metalloantibiotics on three mimetic membrane systems of *S. aureus* revealed a strong interaction of the metalloantibiotics with the lipidic components of the bacterial membrane, compared to the free FQs. Moreover, experimental data suggests that metalloantibiotics might have a different influx pathway compared to the free FQs, which was previously proposed for Gram-negative models.

The present study proceeded with the characterization of the three mimetic membrane systems, through the determination of the membrane transition temperatures, T_m , by steady-state anisotropy. The influence of the presence of the compounds on the T_m was also evaluated. The obtained results suggest that metalloantibiotics may have a preferential location by cardiolipin enriched domains.

The present work ends with microbiological assays in order to determine the antibiofilm activity of the metalloantibiotics. Experimental data showed that metalloantibiotics are able to reduce the growth of the extracellular matrix of the preformed biofilm, although cell viability is not compromised.

In summary, metalloantibiotics tested in this present work seem a promising alternative to free FQs especially against bacterial infections caused by *S. aureus*.

Metalloantibiotics revealed a strong interaction with the lipidic component of the bacterial membrane and may prefer a location near cardiolipin enriched domains. These complexes revealed antibiofilm activity, being able to reduce the biomass of preformed biofilms.

Keywords: Fluoroquinolones, antimicrobial resistance, biophysics, metalloantibiotics, fluorescence, microbiology, biofilms, liposomes, bacteria, partition constants, phase transition temperature.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1 Resistência bacteriana a antibióticos.....	1
1.2 Uso indevido de antibióticos em humanos	1
1.3 Uso indevido de antibióticos em animais.....	2
1.4 Descoberta de novos antibióticos.....	3
1.5 Quinolonas e fluoroquinolonas	4
1.5.1 História, estrutura e reatividade.....	4
1.5.2 Mecanismo de ação.....	6
1.5.3 Mecanismos de aquisição de resistência	7
1.6 Complexos metálicos de fluoroquinolonas	8
1.7 Modelos miméticos de membranas.....	9
1.7.1 Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	9
1.7.2 Fosfolípidos	11
1.7.3 Temperatura de transição	13
1.8 Lipossomas e proteolipossomas	14
1.9 Biofilmes bacterianos.....	17
1.10 Objetivo do trabalho.....	18
2. Material e métodos	20
2.1 Reagentes	20
2.2 Preparação dos lipossomas.....	21
2.3 Determinação de constantes de partição por espectralfluorimetria	21
2.3.1 Modelos matemáticos na determinação das constantes de partição	22
2.4 Determinação de temperaturas de transição de fase por anisotropia de fluorescência.....	24
2.4.1 Modelos matemáticos na determinação das temperaturas de transição de fase	25

2.4.2 Condições experimentais nos ensaios de anisotropia de fluorescência.....	26
2.5 Determinação da atividade dos compostos na neutralização de lipopolissacarídeos e ácidos lipoteicóicos.....	27
2.6 Determinação da atividade antibiofilme	28
2.6.1 Ensaios de viabilidade celular.....	29
2.6.2 Ensaios de quantificação da biomassa.....	29
3. Resultados.....	30
3.1 Determinação das constantes de partição por espectralfluorimetria	30
3.2 Determinação das temperaturas de transição de fase por anisotropia de fluorescência.....	35
3.3 Determinação da atividade contra lipopolissacarídeos, LPS, e ácidos lipoteicóicos, LTA	39
3.4 Ensaios microbiológicos.....	40
3.4.1 Quantificação da biomassa total pelo método do cristal violeta	40
3.4.2 Estudo da viabilidade celular pelo método do MTT	41
4. Conclusão.....	43
5. Bibliografia.....	46

Lista de figuras

- Figura 1 – Agentes antimicrobianos aprovados pela FDA no período temporal de 1983 a 2012. Imagem retirada de [17].....4
- Figura 2 – Relação estrutura-reatividade para a família das quinolonas. A atividade antibacteriana das quinolonas é melhorada de acordo com as diferentes modificações nos diversos substituintes. Imagem retirada de [19].....5
- Figura 3 – Modelo representativo do mecanismo de ação das quinolonas e fluoroquinolonas. (1) A fluoroquinolona estabiliza o complexo de clivagem topoisomerase-ADN onde existe a quebra da dupla-hélice. (2) Se o complexo de clivagem não for resolvido (3) A replicação/transcrição não podem acontecer, causando uma morte bacteriana lenta, mas assegurada (4) A topoisomerase é removida e o complexo de clivagem do ADN liberta-se desta, estando livre para interagir com os mecanismos de reparação. No entanto, se não for reparado (5) leva à fragmentação do cromossoma, causando morte celular rápida. (6) O complexo de clivagem agora estabilizado pode levar à acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS), que causam elevado disfuncionamento celular, culminando em morte celular rápida. Imagem retirada de [24].....6
- Figura 4 – Linha temporal entre a descoberta e introdução na prática clínica das primeiras FQ e o aparecimento de mecanismos de resistência. Os primeiros mecanismos transferíveis de resistência a FQ (TMQR) foram primeiramente descritos em 1990, sendo que a primeira evidência clara de um TMQR foi o *qnrA* – *quinolone resistant determinant*, uma proteína de 218 aminoácidos que protege a topoisomerase IV da ação inibitória das FQ. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para estirpes resistentes que exibem *qnrA* são até 32 vezes maiores [8]. A *OqxAB*, descoberta em 2003 é um gene que codifica para uma bomba de efluxo capaz de eliminar vários fármacos de dentro da célula, entre eles as fluoroquinolonas. Mais tarde, em 2007, um novo gene que confere resistências a FQ foi descoberto, o *QepA*. Este gene, de uma forma semelhante ao *OqxAB*, também codifica para proteínas que montam uma bomba de efluxo e eliminam a fluoroquinolona de dentro da célula bacteriana.....7
- Figura 5 – Representação de ciprofloxacina, uma FQ (esquerda) e o complexo de ciprofloxacina com Cu(II) e 1,10-fenantrolina (direita).....8

Figura 6 – Estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Figura retirada de [36].	10
Figura 7 – Arranjos de moléculas lipídicas em ambiente aquoso. (A) Moléculas com formas cónicas tendem a formar micelas (em cima) enquanto moléculas com formas cilíndricas tendem a formar bicamadas lipídicas (em baixo). (B) Uma micela e uma bicamada lipídica em corte transversal. Figura adaptada de [42].	11
Figura 8 – Representação das diferentes estruturas e respetivas cargas de diversos fosfolípidos. Figura retirada de [44].	12
Figura 9 – Classificação dos lipossomas mediante o seu número de camadas e tamanho relativo. Figura retirada de [56].	15
Figura 10 – Esquema de preparação de LUVs ou SUVs a partir de uma mistura de lípidos inicial. O processo de redução do tamanho dos lipossomas (em baixo) pode ser feito por várias maneiras. Os procedimentos mais comuns envolvem sonicação ou extrusão. Adaptado de [59].	16
Figura 11 – Representação da formação de um biofilme. Numa fase inicial, as bactérias plânticas (não estão em biofilme) aderem a uma superfície através de forças não-físicas, como interações de Van der Waals, eletrostáticas e hidrofóbicas. Estas bactérias apresentam inicialmente flagelo e boa motilidade. De seguida, numa segunda fase, as bactérias passam por uma alteração na expressão genética e começam a aderir irreversivelmente à superfície: elas expressam adesinas, alteram a sua carga superficial e têm uma melhor comunicação célula-a-célula. Há a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS [63]. Numa terceira fase, há a maturação ou crescimento do biofilme, onde se dá a acumulação destes EPS e um fenómeno designado por Quorum Sensing – regulação de expressão genética em resposta à densidade populacional de outras bactérias (por exemplo para secretar inibidores de crescimento). Numa última fase, quando o biofilme já estiver maturado o suficiente, há a libertação de algumas bactérias para que possam colonizar outros tecidos ou formar biofilmes noutra lugar. Imagem retirada de [62].	17
Figura 12 – Espectros de dispersão de luz de referências de lipossomas de POPG, em tampão HEPES. Concentrações de lipossoma ($\mu\text{mol.dm}^{-3}$): (r1) $99 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r2) $196 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r3) $291 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ (r4) $384 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r5) $476 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r6) $566 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r7) $654 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r8) $740 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r9) $826 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r10) $909 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r11) $991 \mu\text{mol.dm}^{-3}$. Comprimento de onda de excitação de 290 nm. Cada espectro representa a média de três replicados, com início a 320 nm.	31

Figura 13 – Espectros de emissão da cpx ($8 \mu\text{mol.dm}^{-3}$) na ausência (A0) e presença (A1-A11) de LUVs de POPG e respectivas referências (R1-R11). Concentrações de lipossoma ($\mu\text{mol.dm}^{-3}$): (r1 e a1) $99 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r2 e a2) $196 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r3 e a3) $291 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r4 e a4) $384 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r5 e a5) $476 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r6 e a6) $566 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r7 e a7) $654 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r8 e a8) $740 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r9 e a9) $826 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r10 e a10) $909 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r11 e a11) $991 \mu\text{mol.dm}^{-3}$. Comprimento de onda de excitação de 290 nm. Cada espectro representa a média de três replicados, com início a 320 nm.....32

Figura 14 – Espectros de emissão do metaloantibiótico Cucpxphen ($7 \mu\text{mol.dm}^{-3}$) na ausência (A0) e presença (A1-A11) de LUVs de POPG e respectivas referências (R1-R11). Concentrações de lipossoma ($\mu\text{mol.dm}^{-3}$): (r1 e a1) $99 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r2 e a2) $196 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r3 e a3) $291 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r4 e a4) $384 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r5 e a5) $476 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r6 e a6) $566 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r7 e a7) $654 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r8 e a8) $740 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r9 e a9) $826 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r10 e a10) $909 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r11 e a11) $991 \mu\text{mol.dm}^{-3}$. Comprimento de onda de excitação de 290 nm. Cada espectro representa a média de três replicados, com início a 320.....32

Figura 15 - Ajuste não linear da equação (2) aos valores experimentais da integração das intensidades a partir de 395 nm de fluorescência do metaloantibiótico Cucpxphen ($7 \mu\text{mol.dm}^{-3}$), obtidos ao comprimento de onda máximo de emissão de 415 nm, na ausência e presença de concentrações crescentes de lipossomas de POPG. Os valores experimentais traduzem uma média de, pelo menos, três ensaios independentes, razão pela qual cada ponto representado graficamente apresenta um desvio padrão associado.....34

Figura 16 – Estrutura do 1,3,5-difenil-hexatrieno (DPH).....35

Figura 17– Incorporação do DPH (vermelho) na membrana fosfolipídica. Imagem adaptada de [81].....36

Figura 18 – Variação da anisotropia de fluorescência (r_s), com a temperatura, da sonda DPH incubada em lipossomas de POPG:CL:DG (11:5:4), na ausência (preto) e presença (vermelho) de cpx ($8 \mu\text{mol.dm}^{-3}$).....36

Figura 19 – Ajuste não linear da equação (8) aos dados experimentais da variação fluorescência (r_s), com a temperatura, da sonda DPH incubada em lipossomas de POPG:CL (58:42), para o cálculo da T_237

Figura 20– Reta padrão, obtida através de soluções-padrão de endotoxina fornecido no kit.....	39
Figura 21 – Quantificação da biomassa total de biofilmes de <i>S. aureus</i> (ATCC 25923), após 24h de incubação de compostos (cpx, Cucpxphen e Cumxfxphen). O tracejado laranja corresponde à biomassa total do biofilme pré-formado, determinada previamente à incubação dos compostos. Dados experimentais representativos de 1 ensaio.....	41
Figura 22 - Quantificação da viabilidade celular de biofilmes de <i>S. aureus</i> (ATCC 25923), após 24h de incubação de compostos (cpx, Cucpxphen e Cumxfxphen). Dados experimentais representativos de 1 ensaio.....	42

Lista de tabelas

Tabela 1 - Constantes de partição ($\text{Log } K_p \pm s$) entre uma fase aquosa de tampão HEPES e uma fase lipídica membranar de POPG, POPG:CL (58:42) e POPG:CL:DG (11:5:4), determinados por espectralfluorimetria, por ajuste não linear (K_p). Os valores calculados e respetivos desvio-padrão representam uma média de, pelo menos, três ensaios independentes.....33

Tabela 2 - Temperaturas de transição de fase (T_m) de lipossomas de POPG:CL (58:42) e de POPG:CL:DG (11:5:4) e valores de r_s em lipossomas de POPG, determinadas espectralfluorimetricamente, por incubação da sonda DPH, na ausência e presença de compostos. Os valores calculados e respetivos desvios-padrão (s) representam a média de, pelo menos, três ensaios independentes.....37

Lista de abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

CBM – Concentração bactericida mínima

CIM – Concentração inibitória mínima

CL – Cardiolipina

Cpx – Ciprofloxacina

DG – Diacilglicerol

DLS – Espetroscopia de correlação fotónica

DPH – 1,6-difenil-1,3,5-difenil-hexatrieno

E. coli – *Escherichia coli*

EPS – Substâncias poliméricas extracelulares

FDA – Agência Americana para Comida e Medicamentos

FQ – Fluoroquinolonas

HEPES - (Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfónico

IM – Membrana interna

K_p – Constante de partição

LAL – Lisado amebócito de límulo

LPS – Lipopolissacarídeos

LTA – Ácido lipoteicóico

LUV – Grandes vesículas unilamelares

MHA - Mueller-Hinton agar

MLV – Vesículas multilamelares

MRSA – *Staphylococcus Aureus* resistentes à meticilina (multiresistentes)

MTT - Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio

Mxfx – moxifloxacina

NAG – N-acetilglucosamina

NAM – Ácido N-acetil murâmico

OD – Densidade ótica

OM – Membrana externa

OMS - Organização mundial de saúde

ONU – Organização das nações unidas

PBS – Tampão fosfato salino

PC – Fosfatidilcolina

PDI – Índice de polidispersão

PE – Fosfatidiletanolamina

PG – Fosfatidilglicerol

Phen – 1,10-fenantrolina

POPE - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina

POPG – 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidil-(1'-rac-glicerol)

Qnr – Determinante de resistente a fluoroquinolona

ROS – Espécies reativas de oxigênio

r_s – Anisotropia de fluorescência em estado estacionário

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

Spx – Sparfloxacin

SUV – Vesícula grande unilamelar

T_m – temperatura de transição de fase

TMQR – Mecanismos transferíveis de resistência a fluoroquinolonas

TSB – Triptona de soja

UFC – Unidades formadoras de colónia

1. Introdução

1.1 Resistência bacteriana a antibióticos

Os antibióticos são fármacos capazes de combater uma infeção bacteriana. Atualmente, a resistência bacteriana a antibióticos está a atingir níveis extremamente elevados em todas as partes do mundo [1]. Infeções previamente controladas com antibióticos, como a gonorreia e a pneumonia, estão a ficar cada vez mais difíceis de combater, devido ao aparecimento de mecanismos de resistência antimicrobiana. Desta forma, sem ação urgente, existe a possibilidade de uma era futura onde infeções comuns e pequenas lesões poderão começar de novo a matar [1]. A resistência bacteriana a antibióticos é acelerada por diversos fatores, destacando, entre estes, a indevida utilização dos antibióticos em humanos e animais e o pobre investimento no desenvolvimento de novos fármacos por parte das grandes empresas farmacêuticas [2]. O combate da resistência bacteriana tem sido considerado altamente prioritário pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Paralelamente, em Setembro de 2016, a Organização das Nações Unidas (ONU) organizou uma assembleia geral (apenas a quarta vez até então em que um tópico de saúde era discutido em assembleia geral) com o propósito de combater a resistência bacteriana a antibióticos em múltiplas frentes e empregar um plano de ação global [3].

1.2 Uso indevido de antibióticos em humanos

A resistência bacteriana a antibióticos ocorre quando as bactérias desenvolvem estratégias para conseguir destruir os antibióticos e/ou escapar aos seus efeitos. As bactérias conseguem fazê-lo através de diversos mecanismos, nomeadamente por resistência adquirida, transferência de ácido desoxirribonucleico (ADN) por outras bactérias resistentes ou por possuir resistência intrínseca a uma família específica de antibióticos. Quanto maior e mais disseminado for o uso de antibióticos, maior será a exposição das bactérias a estes fármacos, o que contribui para um célere desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antibióticos.

A problemática do uso abusivo de antibióticos em humanos é reportada desde 1945, quando Alexander Fleming alertou para a sobreprescrição de antibióticos por

parte dos médicos da época [4]. O uso inapropriado e/ou abusivo dos antibióticos tem implicações diretas no aumento da resistência antimicrobiana desenvolvida nos dias de hoje. Mais especificamente, o uso inapropriado dos antibióticos geralmente entende um uso funcionalmente desnecessário do antibiótico em questão, por exemplo para tratar uma infeção vírica, e o uso abusivo compreende uma utilização demasiado curta ou demasiado prolongada da terapia com o antibiótico. O centro para o controlo e prevenção de doenças (CDC) estima que 30% das prescrições não são necessárias [5] e que muitas vezes são prescritos antibióticos que não são de primeira linha ou que são antibióticos com um espectro de ação extremamente alargado para uma infeção susceptível, capaz de ser tratada com um antibiótico de espectro mais reduzido [5]. A sobreprescrição tem vindo a agravar-se, em particular na era da COVID-19. Um estudo conduzido em janeiro de 2020 mostrou que 71% dos pacientes hospitalizados numa unidade de doença infecciosa na China tinha recebido antibióticos, apesar de a taxa de co-infeção ser apenas de 1% [6]. Outros estudos, realizados em dois hospitais chineses, mostraram que 95% dos pacientes com COVID-19 tinham recebido tratamento com antibióticos, apesar de uma segunda infeção bacteriana só ter sido registada em 15% dos pacientes [7].

Ao nível de ações futuras e iniciativas necessárias para reduzir o impacto desta problemática podem-se considerar i) o maior investimento na educação da população, ii) a implementação de políticas que regulem a utilização de antibióticos e iii) a diminuição na prescrição médica. A existência de legislação é especialmente importante porque é possível comprar antibióticos sem receita médica em alguns países e a prática da automedicação por parte dos pacientes é bastante comum [8, 9]. Foi também mostrado que a prescrição de antibióticos é influenciada por vários fatores como aspetos culturais e socioeconómicos. Países onde os antibióticos são mais vendidos e receitados, como os países do sul da Europa, possuem uma população com mais resistência a antibióticos do que os países nórdicos [10, 11]. Neste sentido, os governos devem fazer um esforço no sentido de combater a resistência bacteriana dentro dos seus países, prevenindo várias mortes, contribuindo para o desenvolvimento social e reduzindo as perdas económicas do sistema nacional de saúde.

1.3 Uso indevido de antibióticos em animais

Para além da prescrição indevida de antibióticos em animais de estimação ou em procedimentos veterinários, um dos principais fatores que contribuem para o célere

aumento global da resistência bacteriana é a utilização de antibióticos na indústria da agropecuária. As classes de antibióticos mais prescritos para animais são tetraciclina, aminoglicosídeos, β -lactamases, lincosamidas, macrólidos e sulfonamidas. A incorporação de produtos animais e/ou seus derivados na dieta humana (sobretudo em países mais desenvolvidos) resulta na ingestão de antibióticos através da alimentação, a qual contribui para o desenvolvimento de mecanismos de resistência bacteriana [12].

O consumo de antibióticos nesta indústria apresenta um grande desafio global, particularmente em países menos desenvolvidos, onde a utilização de antibióticos que foram proibidos em outros países ainda é comum [13]. Esta utilização é tão comum que um estudo publicado em 2015 por Van Boeckel *et al.* mostrou que o consumo de antibióticos por parte de países como Brasil, China, Rússia, Índia e África do Sul iria duplicar até 2030, à medida que estes países se adaptariam a uma maior necessidade de produtos animais por parte dos consumidores e, conseqüentemente, recorreriam à utilização de antibióticos para manter a saúde e produtividade animal [14].

Para se minimizarem estes problemas é necessário uma contribuição global no sentido de limitar o uso de antibióticos em animais, recorrendo a um melhoramento na nutrição animal, melhores condições de vida e gestão de resíduos, medidas de biosegurança e utilização, por exemplo, de alternativas a antibióticos, como as vacinas [15].

1.4 Descoberta de novos antibióticos

Em 2012, a Agência Americana de Alimentos e Medicamentos (FDA) reconheceu que existe uma crise de saúde pública que advém da resistência a antibióticos [16]. Este problema existe à escala mundial e desenvolve-se a ritmo crescente e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para combater esta ameaça tem-se mostrado insuficiente [16]. O aumento da pressão e a implementação de critérios cada vez mais rigorosos da FDA tornou os ensaios clínicos de antibióticos inviáveis e muitas vezes pouco adequados e atraentes em termos lucrativos. Isto levou a uma diminuição do número de antibióticos aprovados pela FDA ao longo do tempo (Figura 1) e a que as grandes empresas farmacêuticas investissem cada vez menos no desenvolvimento de agentes antimicrobianos em detrimento de outros fármacos [17]. Há cerca de 25 anos atrás, mais de 20 grandes empresas farmacêuticas tinham programas ativos de descoberta e desenvolvimento de agentes antimicrobianos. Em 2013, este número caiu para 4 [17]. Isto leva, obviamente, a uma hesitação por parte

das empresas farmacêuticas a investir no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

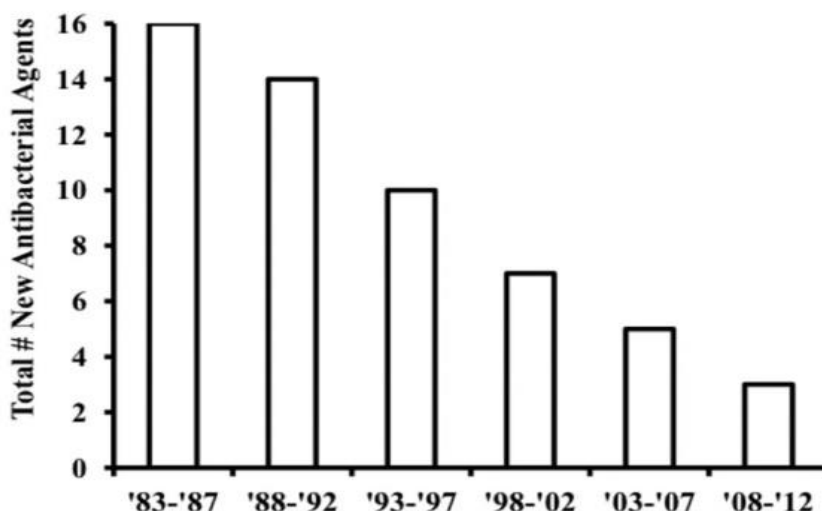


Figura 1 – Agentes antimicrobianos aprovados pela FDA no período temporal de 1983 a 2012. Imagem retirada de [17].

Devido a toda esta combinação de fatores, a FDA decidiu então, em 2012, fazer um reinício no seu processo para aprovar agentes antimicrobianos e conduzir os respetivos ensaios [17].

1.5 Quinolonas e fluoroquinolonas

1.5.1 História, estrutura e reatividade

As quinolonas e fluoroquinolonas (FQ) são uma família de antibióticos sintéticos de largo espectro de ação, derivadas do ácido nalidíxico. Estes antibióticos são principalmente ativos contra bactérias Gram-negativas e algumas bactérias Gram-positivas e, até ao momento, consistem numa das classes de antibióticos mais prescritas mundialmente [18]. As FQ diferem das quinolonas porque possuem na sua estrutura um átomo de fluor (geralmente na posição C6) potenciando assim a sua atividade contra bactérias Gram-negativas [19].

O ácido nalidíxico surgiu no início de 1960 para combater infeções do trato urinário [20] quando George Leshner e os seus colegas de trabalho o sintetizaram acidentalmente quando tentavam sintetizar cloroquina [21]. Desde a sua introdução, mais de 10.000 análogos de ácido nalidíxico foram sintetizados, sendo que apenas uma pequena percentagem destes chegaram a ser desenvolvidos e utilizados em

estudos clínicos. Estes fármacos eram inicialmente utilizados como tratamentos de primeira linha para várias infeções, incluindo infeções bastante comuns como sinusite aguda e infeções do trato urinário [22]. Ao longo dos anos, e com o desenvolvimento de novos métodos de síntese química, a estrutura das quinolonas e fluoroquinolonas foi sofrendo alterações em diversas posições, gerando diferentes gerações de quinolonas (Figura 2). Todas as seguintes gerações advêm de modificações das quinolonas de primeira geração e podem ser diferenciadas com base nas suas propriedades farmacocinéticas [22].

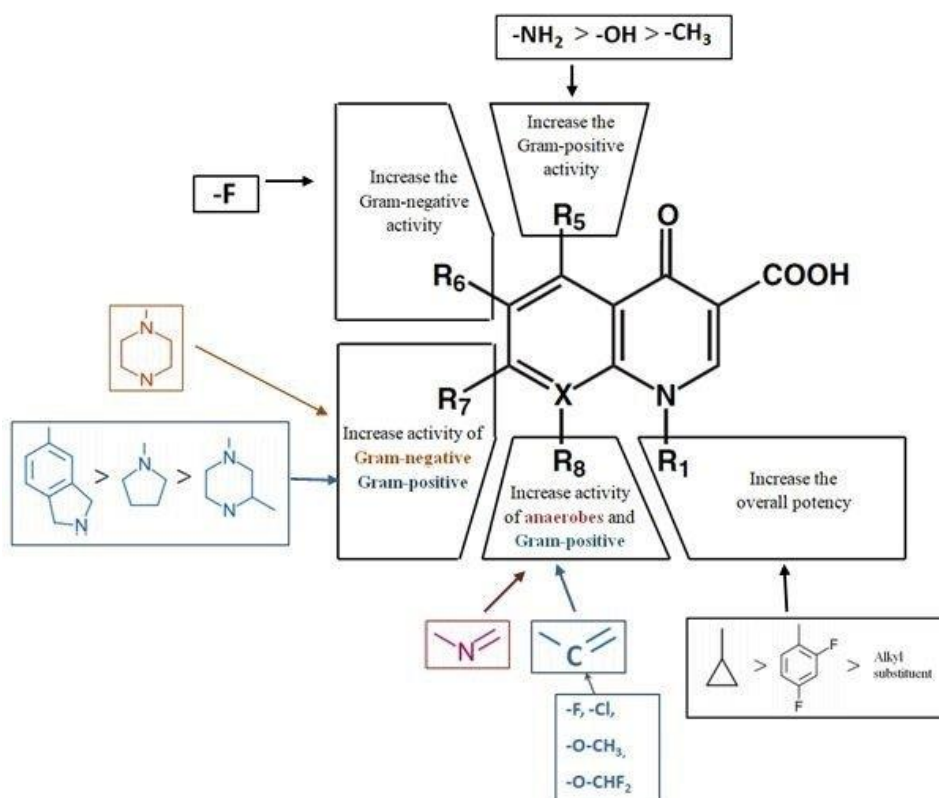


Figura 2 – Relação estrutura-reatividade para a família das quinolonas. A atividade antibacteriana das quinolonas é melhorada de acordo com as diferentes modificações nos diversos substituintes. Imagem retirada de [19].

Na segunda geração deu-se o surgimento das FQ: quinolonas que apresentavam na sua constituição um átomo de flúor, na posição C6. Estas fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina e a norfloxacina, tinham uma maior atividade contra bactérias Gram-negativas e um espectro de ação mais largo [22].

As FQ de terceira geração, como a moxifloxacina, sparfloxacina e levofloxacina, têm, em comparação com as FQ de segunda geração, uma atividade alargada contra bactérias do Gram-positivas (particularmente *Streptococcus*

pneumoniae e agentes patogênicos atípicos como *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae*) [22].

Atualmente, o único membro pertencente à família das FQ de quarta geração é a Trovafloxacina, que exibe atividade antimicrobiana significativamente aumentada contra bactérias anaeróbias, mantendo atividade semelhante à das FQ de terceira geração contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [22].

1.5.2 Mecanismo de ação

As quinolonas atuam no processo de replicação do ADN bacteriano, inibindo o controlo que a célula tem sobre o superenrolamento. Mais precisamente, durante a replicação, as girases e as topoisomerases levam à formação de quebras na dupla hélice de ADN, com formação do chamado complexo de clivagem de ADN. As quinolonas ligam-se a estes complexos de enzima-ADN e inibem o processo de replicação levando à morte celular por dois mecanismos reportados: inibição do ADN ou ativação da resposta SOS de reparação do ADN (Figura 3) [23].

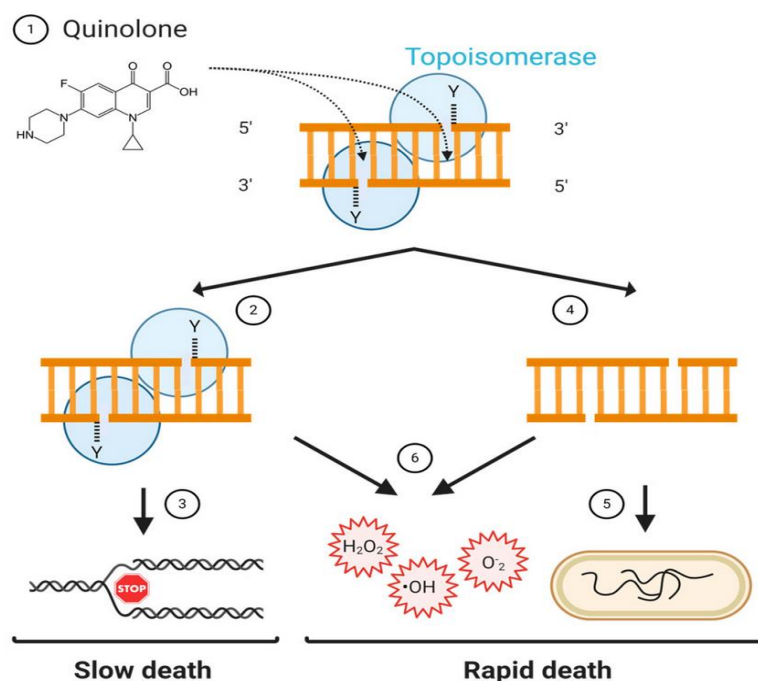


Figura 3 – Modelo representativo do mecanismo de ação das quinolonas e FQ. (1) A FQ estabiliza o complexo de clivagem topoisomerase-ADN onde existe a quebra da dupla-hélice. (2) Se o complexo de clivagem não for resolvido (3) A replicação/transcrição não podem acontecer, causando uma morte bacteriana lenta, mas assegurada (4) A topoisomerase é removida e o complexo de clivagem do ADN liberta-se desta, estando livre para interagir com os mecanismos de reparação. No entanto, se não for reparado (5) leva à fragmentação do cromossoma, causando morte celular rápida. (6) O complexo de clivagem agora estabilizado pode levar à acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam elevado disfuncionamento celular, culminando em morte celular rápida. Imagem retirada de [24].

1.5.3 Mecanismos de aquisição de resistência

De uma forma geral, a DNA girase é o alvo principal destes antibióticos em bactérias Gram-negativas e a topoisomerase IV em bactérias Gram-positivas [23]. O aparecimento de mecanismos de resistência bacteriana às quinolonas é um fator que limita bastante o uso desta família de antibióticos (Figura 4). Geralmente, estes mecanismos de resistência podem ser de dois tipos, mediante a sua origem. Concretamente, a bactéria pode sofrer mutações nos genes que codificam para enzimas (DNA girase e topoisomerase IV, por exemplo) ou pode adquirir plasmídeos de resistência.

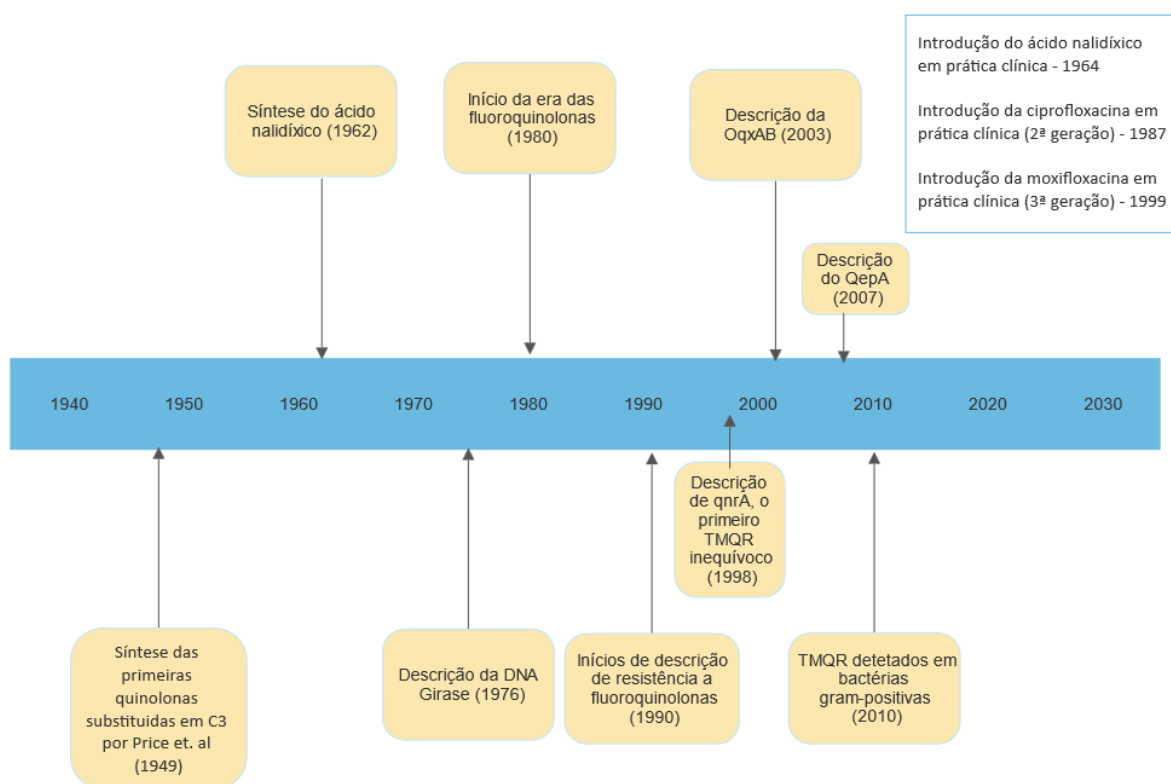


Figura 4 – Linha temporal entre a descoberta e introdução na prática clínica das primeiras FQ e o aparecimento de mecanismos de resistência. Os primeiros mecanismos transferíveis de resistência a FQ (TMQR) foram primeiramente descritos em 1990, sendo que a primeira evidência clara de um TMQR foi o *qnrA* – *quinolone resistant determinant*, uma proteína de 218 aminoácidos que protege a topoisomerase IV da ação inibitória das FQ. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para estirpes resistentes que exibem *qnrA* são até 32 vezes maiores [26]. A *OqxAB*, descoberta em 2003 é um gene que codifica para uma bomba de efluxo capaz de eliminar vários fármacos de dentro da célula, entre eles as fluoroquinolonas. Mais tarde, em 2007, um novo gene que confere resistências a FQ foi descoberto, o *QepA*. Este gene, de uma forma semelhante ao *OqxAB*, também codifica para proteínas que montam uma bomba de efluxo e eliminam a fluoroquinolona de dentro da célula bacteriana.

Relativamente às mutações nos genes que codificam para enzimas, estas geralmente acontecem nos alvos principais para estes fármacos (DNA girase ou topoisomerase IV). Como a ligação FQ-complexo enzimático não é uma ligação

covalente, uma simples troca de aminoácido (causada por uma *single point mutation* por exemplo) é geralmente suficiente para enfraquecer a ligação. É reportado para *Escherichia coli*, por exemplo, que os aminoácidos mais frequentemente mutados são a Ser83 e o Asp87 [25].

Os plasmídeos que transportam genes de resistência a quinolonas podem ser transmitidos através de transferência horizontal bem como por transferência vertical às gerações seguintes [26, 27]. Estes plasmídeos codificam para proteínas envolvidas na resistência às quinolonas através de diferentes mecanismos, entre eles a de competição para o local de ligação das quinolonas [27] ou por funcionarem como bombas de efluxo [28].

1.6 Complexos metálicos de fluoroquinolonas

A maior parte das estratégias para combater a resistência bacteriana a antibióticos centra-se na produção de novos compostos antimicrobianos ou no refinamento de certos compostos já utilizados na prática clínica. Destas duas opções, opta-se muitas vezes pelo refinamento de fármacos já existentes, uma vez que estes fármacos já têm as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas descritas, tornando o processo bastante mais rápido e mais barato, comparativamente à síntese de um novo fármaco.

Uma das abordagens mais exploradas no combate à resistência bacteriana a FQ baseia-se na produção de complexos metálicos de FQ [29]. A complexação da FQ a 1,10-fenantrolina, em conjunto com metais de transição, como um catião divalente Cu(II) por exemplo, forma complexos bastante estáveis (Figura 5) que mostram ter atividade antimicrobiana acrescida em diversos isolados clínicos e aparentam ter um mecanismo de ação semelhante [29, 30].

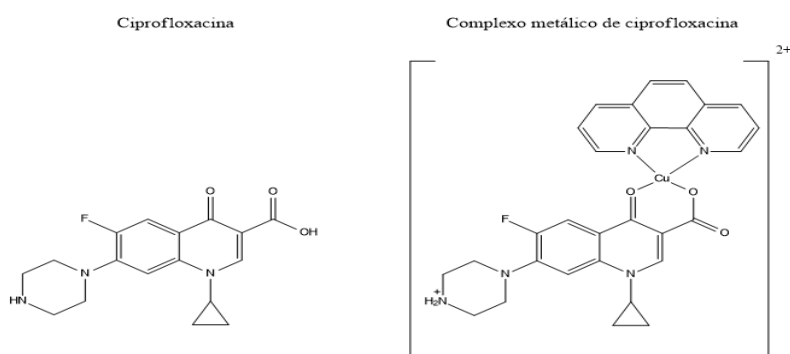


Figura 5 – Representação de ciprofloxacina, uma FQ (esquerda) e o complexo de ciprofloxacina com Cu(II) e 1,10-fenantrolina (direita).

A química das próprias FQ torna-as bons candidatos para complexação com diferentes tipos de ligandos. Mais concretamente, as FQ possuem um oxigénio exocíclico e um grupo carboxílico, onde ocorre a quelatação. Um leque de estudos mostrou que, de vários metais de transição estudados, apenas os complexos de Cu(II) são verdadeiramente estáveis [31, 32]. Estes resultados vão ao encontro da série de Irving-Williams, que prevê uma maior estabilidade de complexos de Cu(II) comparativamente a Fe(II), Co(II), Ni(II) e Zn(II). Estes complexos também mostraram grande estabilidade em condições fisiológicas de pH, concentração, temperatura e solubilidade em água [33].

1.7 Modelos miméticos de membranas

1.7.1 Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

As bactérias podem ser divididas em duas grandes classes, de acordo com as características da sua membrana (Figura 6): bactérias Gram-positivas (coradas pela coloração de Gram) e Gram-negativas (não coradas pela coloração de Gram). As bactérias Gram-positivas possuem apenas uma membrana (a membrana citoplasmática) e uma camada rica de peptidoglicano, enquanto as bactérias Gram-negativas possuem, para além da membrana citoplasmática, uma membrana externa (que contém um espaço intermembranar) e uma camada fina de peptidoglicano [34]. É possível, ainda, distinguir um pequeno subgrupo de bactérias, as Micobactérias, que não são classificadas como Gram-positivas ou Gram-negativas.

Em termos de constituição lipídica as membranas têm uma constituição maioritária em lípidos aniónicos e zwitteriónicos, destacando o fosfatilglicerol (PG), a cardiolipina (CL) e a fosfatidiletanolamina (PE). O peptidoglicano consiste num polímero de duas subunidades: ácido N-acetilmurámico (NAM) e N-acetilglucosamina (NAG). Estas características fisiológicas distintas destes dois grandes tipos de bactérias parece justificar a tendência natural das bactérias Gram-negativas serem geralmente mais difíceis de combater do que as bactérias Gram-positivas [35].

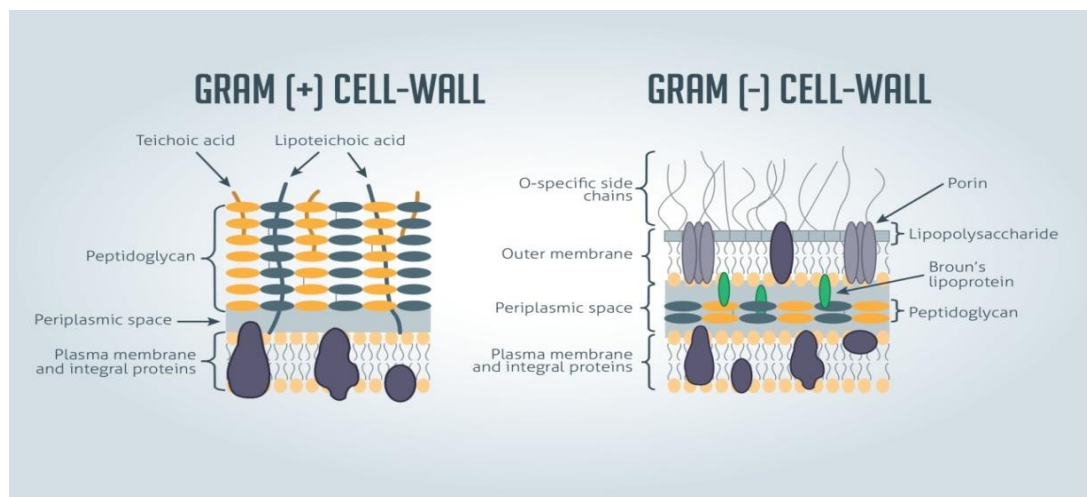


Figura 6 – Estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Figura retirada de [36].

A membrana citoplasmática das bactérias Gram-positivas é constituída essencialmente por fosfolípidos aniônicos (PG e CL) numa proporção bastante próxima de 1:1. No entanto, existem espécies que possuem uma percentagem considerável de fosfolípidos zwitteriônicos (40 a 60% de PE), como o *Bacillus spp.* [37]. O seu peptidoglicano é constituído por diversas camadas de NAM e NAG e possui ácidos teicóicos e lipoteicóicos (LTA) – polímeros aniônicos [38]. As proteínas presentes nestas membranas celulares estão geralmente dentro ou perto da membrana, ancoradas por caudas lipídicas ou ligadas covalentemente ao peptidoglicano/ácidos teicóicos [34].

Em bactérias Gram-negativas, a membrana interna (IM) é constituída maioritariamente por fosfolípidos aniônicos e zwitteriônicos: cerca de 60 a 80% de PE, 20% de PG e 10% de CL. O peptidoglicano presente nas bactérias Gram-negativas é mais simples e não possui ácidos teicóicos ou LTA, comparativamente às bactérias Gram-positivas [39]. A membrana externa (OM) é uma membrana assimétrica, sendo a sua parte interna extremamente semelhante à IM, enquanto a parte externa é muito rica em glicolípidos, particularmente lipopolissacarídeos (LPS), que são um fator de virulência único deste tipo de bactérias [40]. É, ainda, de salientar que a OM é bastante rica em proteínas, lipoproteínas e proteínas integrais da membrana, conhecidas como Omps [41].

1.7.2 Fosfolípidos

Os fosfolípidos são os principais constituintes da membrana celular das bactérias e da parte interna da OM das bactérias Gram-negativas. Quimicamente, estas moléculas são compostas por uma cabeça polar (um álcool ligado a um grupo fosfato) e uma cauda apolar, constituída por um número variável de cadeias de ácidos gordos. Esta diferença de polaridades na estrutura do lípido confere-lhes características anfipáticas [42]. A composição específica dos grupos polares e apolares pode variar significativamente. Por exemplo, diferenças na extensão ou saturação das cadeias influenciam a habilidade do fosfolípido interagir e empacotar com outros fosfolípidos semelhantes, conferindo diferenças na fluidez da membrana [42].

A natureza anfipática dos lípidos faz com que estes formem espontaneamente diferentes tipos de estruturas quando expostos a ambientes aquosos ou polares. Mais concretamente, as moléculas lipídicas tentam minimizar a exposição da sua cauda hidrofóbica ao ambiente aquoso/polar e podem fazê-lo essencialmente de duas maneiras (Figura 7): formando micelas ou bicamadas lipídicas. A preferência por um por outro depende de vários fatores, como por exemplo a forma do lípido em questão [42].

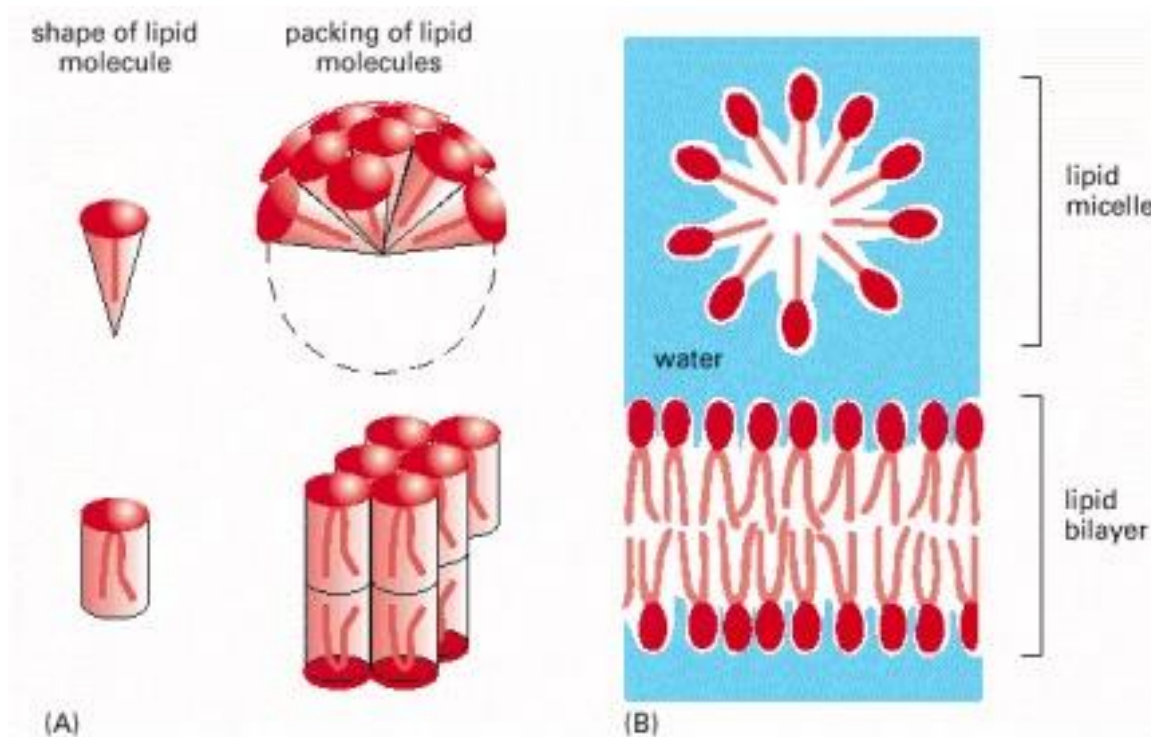


Figura 7 – Arranjos de moléculas lipídicas em ambiente aquoso. (A) Moléculas com formas cónicas tendem a formar micelas (em cima) enquanto moléculas com formas cilíndricas tendem a formar bicamadas lipídicas (em baixo). (B) Uma micela e uma bicamada lipídica em corte transversal. Figura adaptada de [42].

Os fosfolípidos mais abundantes nas bactérias: o PE, o PG e a CL podem, ainda, ser classificados como glicerofosfolípidos, isto é, fosfolípidos cujo álcool constituinte é o glicerol (Figura 8).

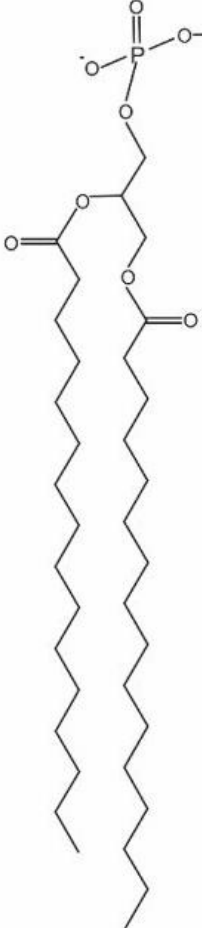
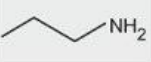
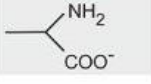
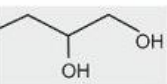
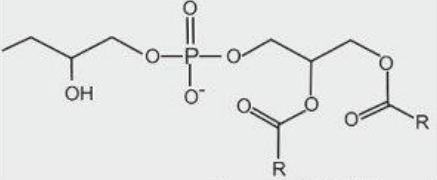
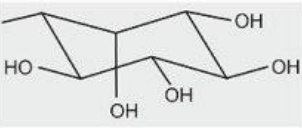
Basic phospholipid structure	Substituent (X)		Phospholipid/Characteristic	
		hydrogen	PA	anionic
		ethanolamine	PE	zwitterionic
		choline	PC	zwitterionic
		serine	PS	anionic
		glycerol	PG	anionic
	 phosphatidylglycerol		CL	anionic
		inositol	PI	anionic

Figura 8 – Representação das diferentes estruturas e respetivas cargas de diversos fosfolípidos. Figura retirada de [44].

Como referido anteriormente, as características das caudas hidrofóbicas vão influenciar a estrutura molecular do lípido e, conseqüente, organização dos fosfolípidos. Geralmente, o PE possui forma cônica enquanto a CL e o PG possuem forma cilíndrica [43].

Os diacilgliceróis (DG) são também lípidos com forma intrinsecamente cônica [45] presentes nas membranas, embora em quantidades muito mais pequenas. Provavelmente devido à sua baixa concentração nas membranas, estes fosfolípidos

não foram extensivamente estudados do ponto de vista das suas propriedades físico-químicas, embora o seu papel na sinalização celular esteja vastamente caracterizado [46]. Do ponto de vista físico-químico, sabe-se que a principal função dos DG na membrana consiste no aumento do espaçamento entre os grupos polares dos fosfolípidos. A incorporação dos DG dá-se de uma forma semelhante à de outros fosfolípidos, embora ligeiramente mais próximos do interior hidrofóbico [46].

1.7.3 Temperatura de transição

Conhecer o perfil lipídico de uma membrana é importante para prever as suas diferentes propriedades físico-químicas, como permeabilidade, fluidez e temperatura de transição (T_m). Estas características membranares são únicas para cada sistema membranar e são influenciadas essencialmente pelo grau de saturação das cadeias alifáticas, o tipo de grupos polares e a concentração relativa a que os diferentes lípidos estão presentes na sua composição. Além disso, a adição de outros constituintes membranares, por exemplo proteínas, pode também alterar as características destes sistemas.

As membranas lipídicas podem exibir duas principais fases termodinâmicas: uma fase de gel (mais rígida e mais ordenada) e uma fase líquida-desordenada (mais fluida e menos ordenada). A integridade estrutural da membrana é mantida em ambos os casos, através de interações eletrostáticas entre as moléculas de água e os grupos polares dos fosfolípidos, embora estas interações sejam menos pronunciadas na fase de gel, na qual o sistema membranar tem menos liberdade de movimentos [47]. A própria difusão de substâncias é bastante facilitada na fase líquida-desordenada, cujos coeficientes de difusão são cerca de três a cinco vezes maiores comparativamente à sua fase de gel [47]. É também de notar que, frequentemente, a transição entre estas duas fases admite uma fase intermédia, designada por líquida-ordenada, caracterizada por uma fluidez e ordem moderadas [48, 49].

A T_m é definida como a temperatura (ou pequeno intervalo de temperatura) para o qual esta mudança de fase ocorre. Como já tinha sido referido anteriormente, este parâmetro é fortemente influenciado pelo tipo, concentração e grau de saturação dos lípidos que constituem o modelo membranar em causa. Um exemplo visível desta influência pode ser a diferença das T_m de membranas de fosfatidilcolina (PC), com diferentes graus de saturação. Por exemplo, a 19:0 PC tem uma $T_m = 62\text{ }^{\circ}\text{C}$, a qual sobe para $66\text{ }^{\circ}\text{C}$ para 20:0 PC e para $71\text{ }^{\circ}\text{C}$ quando mudamos o sistema para 21:0 PC

[50]. Por sua vez, os lípidos 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (POPE) e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidil-(1'-rac-glicerol) (POPG) diferem apenas no grupo polar (o POPG contém um álcool vicinal e o POPE uma amina). Estas diferenças conferem uma T_m de 25°C ao POPE e de -2 °C ao POPG [50]. No entanto, uma mistura de POPE:POPG (75/25) tem uma $T_m \approx 21$ °C [51]. Conforme a heterogeneidade do sistema aumente (por exemplo um sistema composto por uma mistura lipídica) a existência de uma única T_m é improvável. Em vez disso, o que usualmente se observa é um intervalo de temperatura onde o sistema coexiste nas duas fases – fase líquida ordenada – mas em diferentes proporções. Este tipo de sistemas pode possuir mais do que uma T_m . Um exemplo bastante evidente de um sistema complexo que possui várias T_m é o de lipossomas de extratos lipídicos de *E. coli* [51].

1.8 Lipossomas e proteolipossomas

A complexidade e a diversidade das membranas celulares fazem com que seja difícil a utilização/criação de um modelo único apropriado para o seu estudo. No entanto, os principais sistemas miméticos membranares vastamente estudados são os lipossomas e proteolipossomas [52]. Estes modelos miméticos são compostos por vesículas esféricas constituídas por uma (ou mais) bicamada lipídica, cujas cabeças polares estão voltadas para o solvente e as caudas lipídicas compõem uma zona hidrofóbica. Esta disposição particular dos lipossomas confere-lhes um caráter anfifílico e uma elevada similaridade às membranas plasmáticas. No entanto, a membrana celular é tão complexa e variada que não há de todo um modelo mimético perfeito [53, 54]. É também importante acrescentar que os lipossomas são também utilizados como um veículo de encapsulação de fármacos, devido à sua capacidade de penetração nos tecidos, aumento da solubilidade para fármacos anfifílicos ou lipofílicos, transferência melhorada de moléculas hidrofílicas carregadas, entre outros [55].

Dependendo do modelo membranar que queremos mimetizar, os lipossomas podem variar bastante em tamanho, composição lipídica, método de preparação e número de bicamadas lipídicas [55]. Estes sistemas classificam-se normalmente pelo número de bicamadas lipídicas e tamanho. Os lipossomas que constituem apenas uma bicamada lipídica são denominados de unilamelares (LUV e SUV) e os lipossomas que contêm mais do que uma bicamada multilamelares (MLV) - Figura 9.

Relativamente ao tamanho das vesículas, elas podem variar de 25 nm a poucos μm [55], sendo os SUV os lipossomas de tamanho mais reduzido e os LUV os mais utilizados como sistemas miméticos membranares.

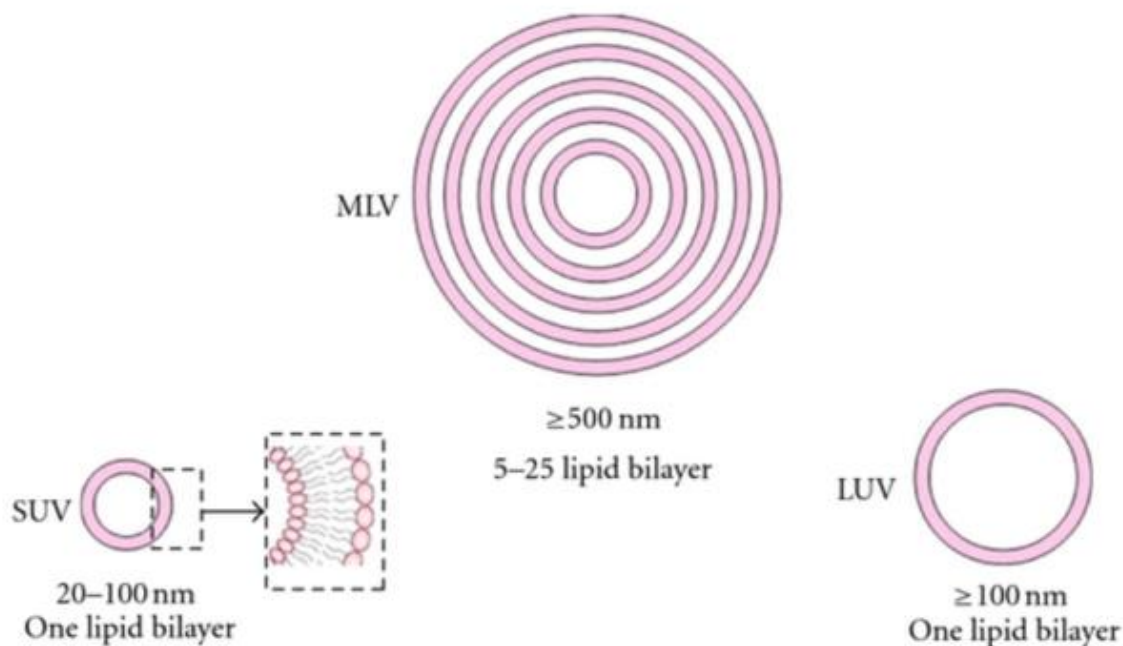


Figura 9 – Classificação dos lipossomas mediante o seu número de camadas e tamanho relativo. Figura retirada de [56].

A preparação de uma suspensão homogênea de lipossomas é relativamente fácil e existem vários métodos desenvolvidos para preparação dos lipossomas. O método amplamente mais utilizado é o método da hidratação do filme lipídico (Figura 10). Neste método, solubiliza-se o lípido (ou uma mistura de lípidos) num solvente orgânico, por exemplo clorofórmio, seguindo-se a sua evaporação num balão de fundo redondo, sob atmosfera inerte (geralmente azoto ou árgon). Esta evaporação origina um filme lipídico homogêneo, formado nas paredes do balão, o qual é submetido a um período de vácuo (geralmente de três a quatro horas) para garantir que todo o solvente é removido. De seguida, dá-se o passo da hidratação do filme lipídico, através da adição de uma solução tampão. A suspensão de lipossomas é posteriormente vortexada até se atingir a total remoção do filme lipídico das paredes do balão [57]. Durante este passo há a formação de MLV, os quais são submetidos a uma série de ciclos de congelação (com N líquido) e descongelação (em água quente), seguindo-se vários ciclos de extrusão com filtros de polycarbonato, cuja porosidade pode variar de acordo com o diâmetro pretendido para as vesículas. Neste passo, o choque térmico aumenta o volume do compartimento aquoso central das

vesículas e a extrusão origina LUV com tamanho semelhante ao da porosidade dos filtros escolhidos para a extrusão [57, 58]. O tamanho das partículas obtidas é posteriormente confirmado por espectroscopia de correlação fotónica (DLS).

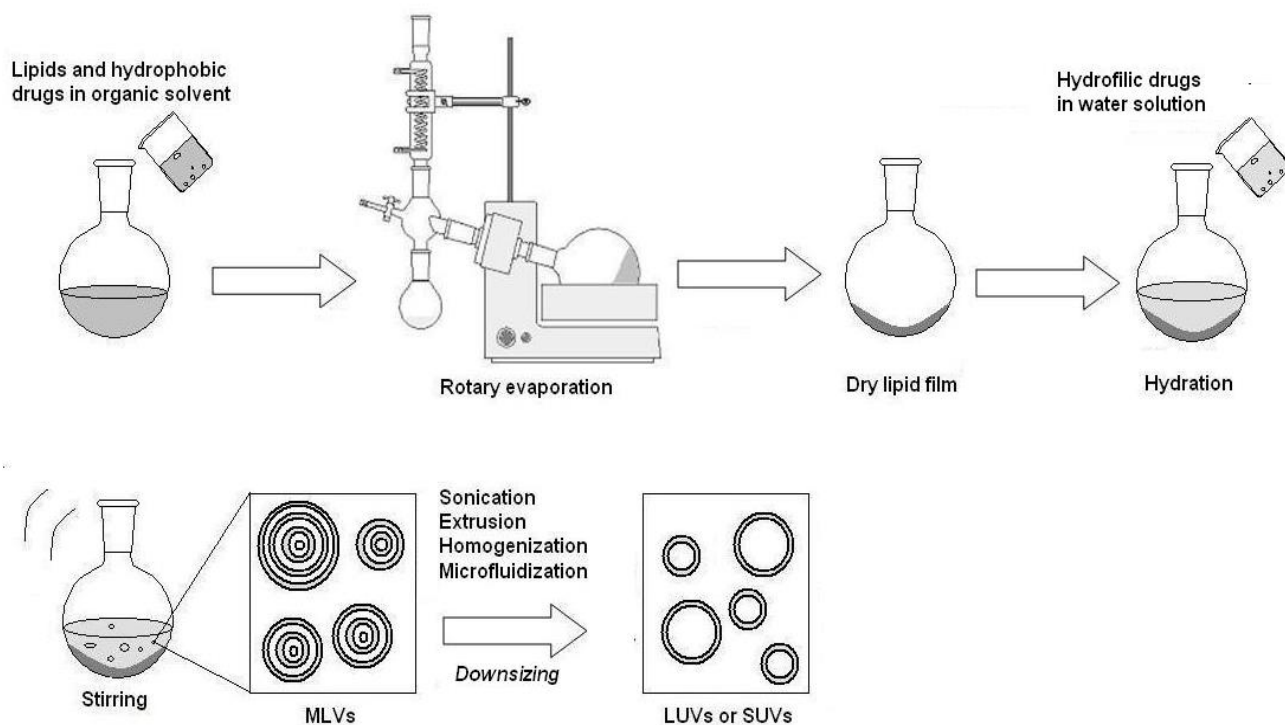


Figura 10 – Esquema de preparação de LUVs ou SUVs a partir de uma mistura de lípidos inicial. O processo de redução do tamanho dos lipossomas (em baixo) pode ser feito por várias maneiras. Os procedimentos mais comuns envolvem sonicação ou extrusão. Adaptado de [59].

Os proteolipossomas são também vastamente utilizados como modelos membranares de excelência, diferindo dos lipossomas por possuírem, adicionalmente, proteínas. Estes sistemas são nada mais do que LUV com proteínas inseridas na sua bicamada lipídica. A presença de proteínas na membrana é de extrema importância, uma vez que os lipossomas não conseguem mimetizar a maquinaria proteica presente numa membrana biológica, que tem um papel relevante em termos da sua componente estrutural, propriedades físico-químicas e sinalização. No entanto, embora estes sistemas sejam mais aproximados às membranas reais, eles são muito mais difíceis de preparar por diversas razões. Em primeiro lugar, tem de garantir-se que a inserção das proteínas é realizada com a correta orientação e, em segundo lugar, que as proteínas mantêm a sua atividade funcional [60].

1.9 Biofilmes bacterianos

Os biofilmes são estruturas bacterianas desenvolvidas por comunidades de bactérias organizadas e funcionais. A sua arquitetura, extremamente complexa, possui uma matriz extracelular, produzida e sustentada pelas próprias bactérias (Figura 11) [61]. A capacidade de formar biofilmes é uma característica inerente a algumas bactérias, embora certas estirpes consigam formar um biofilme mais facilmente do que outras. A formação de um biofilme é um processo complexo, mas que implica a adesão de bactérias a uma determinada superfície, secreção e formação da matriz extracelular e libertação de bactérias aquando da maturação e crescimento do biofilme. Por esta razão, estas estruturas são mais difíceis de combater, comparativamente a bactérias planctónicas.

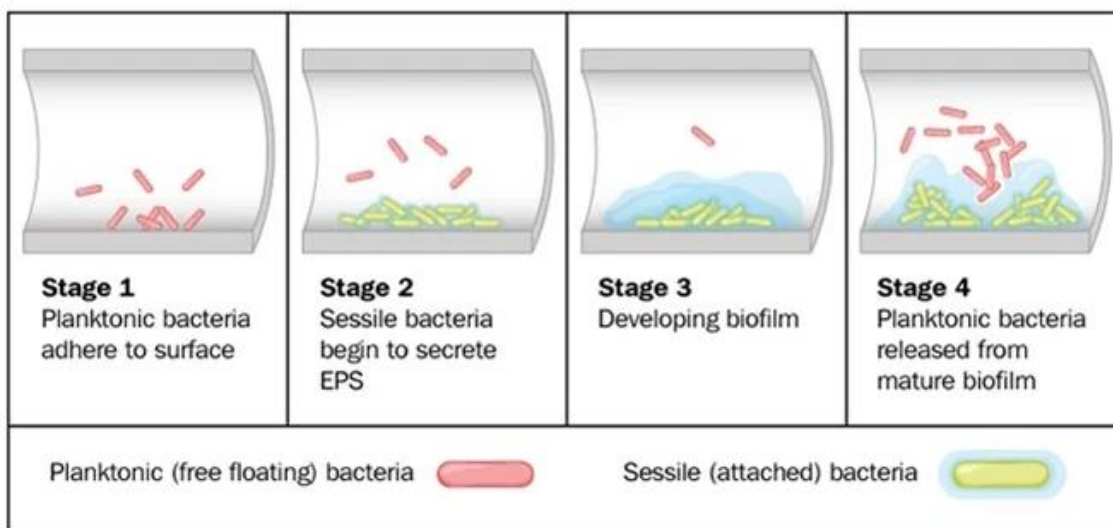


Figura 21 – Representação da formação de um biofilme. Numa fase inicial, as bactérias planctónicas (não estão em biofilme) aderem a uma superfície através de forças não-físicas, como interações de Van der Waals, eletrostáticas e hidrofóbicas. Estas bactérias apresentam inicialmente flagelo e boa motilidade. De seguida, numa segunda fase, as bactérias passam por uma alteração na expressão genética e começam a aderir irreversivelmente à superfície: elas expressam adesinas, alteram a sua carga superficial e têm uma melhor comunicação célula-a-célula. Há a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS [63]. Numa terceira fase, há a maturação ou crescimento do biofilme, onde se dá a acumulação destes EPS e um fenómeno designado por Quorum Sensing – regulação de expressão genética em resposta à densidade populacional de outras bactérias (por exemplo para secretar inibidores de crescimento). Numa última fase, quando o biofilme já estiver maturado o suficiente, há a libertação de algumas bactérias para que possam colonizar outros tecidos ou formar biofilmes noutra lugar. Imagem retirada de [62].

Os biofilmes são extremamente importantes em contexto medicinal. Por exemplo, a formação de biofilmes é extremamente frequente em dispositivos médicos como cateteres ou implantes. A formação de biofilmes resulta, muitas vezes, em infeções crónicas e extremamente difíceis de tratar [64, 65, 66]. Para além disso, algumas infeções em humanos foram associadas à formação de biofilmes em

superfícies humanas, como a pele, trato urinário e dentes [66]. Contudo, a presença de biofilmes no organismo nem sempre é má. Especificamente, a formação de biofilmes na placa dentária incorpora dezenas de espécies, pelo que a sua composição e equilíbrio entre as espécies determina frequentemente a presença ou ausência de doença [67].

As bactérias diferem na sua fisiologia quando estão incorporadas em biofilme ou se encontram em estado planctónico. Em geral, as bactérias num biofilme estão numa fase mais dormente e sob uma limitação maior de nutrientes. Assim, os biofilmes possuem uma maquinaria própria que maximiza o espaço, oxigénio, a energia e o movimento de nutrientes. Esta característica dos biofilmes confere-lhes robustez contra as defesas do hospedeiro e uma maior resistência a agentes antimicrobianos [68]. A pesquisa científica debruçada sobre biofilmes está a aumentar em muitas dimensões. Nomeadamente, se se pretende combater estas estruturas, é necessário ter informação sobre os genes que são especificamente expressos em determinadas fases da formação dos biofilmes e sobre os tipos de fármacos que se revelam melhores alternativas para o seu combate, sobretudo nos biofilmes associados em contexto médico que originam infeções crónicas extremamente difíceis de combater.

1.10 Objetivo do trabalho

Com este trabalho pretende-se explorar complexos metálicos de Cu(II)/fluoroquinolona/fenantrolina (metaloantibióticos) como resposta ao problema crescente da resistência bacteriana a antibióticos, em particular às fluoroquinolonas, através da combinação de estudos biofísicos, bioquímicos e microbiológicos. O presente estudo teve como principal foco o combate de bactérias Gram-positivas, especificamente *Staphylococcus aureus*.

A primeira parte do trabalho consistiu na preparação de soluções de metaloantibióticos e de fluoroquinolonas puras (ciprofloxacina e moxifloxacina), assim como de sistemas miméticos membranares (lipossomas) de *S. aureus*, com diferentes composições: POPG, POPG:CL (58:42) e POPG:CL:DG (11:5:4). De seguida, estudaram-se as interações dos fármacos com a componente membranares, através da determinação dos coeficientes de partição (K_p), recorrendo a técnicas de espectroscopia de fluorescência em estado estacionário. Na segunda parte do trabalho, procedeu-se à caracterização dos diferentes sistemas miméticos, através da

determinação das T_m . Adicionalmente, avaliou-se a influência da presença dos vários fármacos na fluidez dos lipossomas. Estes estudos foram realizados recorrendo à incorporação de uma sonda fluorescente (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno - DPH), cuja anisotropia foi medida. A terceira parte do trabalho englobou estudos bioquímicos, com vista à determinação da atividade dos fármacos na neutralização de LPS e LTA. O presente trabalho terminou com a realização de ensaios microbiológicos, com vista à clarificação da atividade antibiofilme de metaloantibióticos e fluoroquinolonas puras contra biofilmes de *S. aureus*.

2. Material e métodos

2.1 Reagentes

Todos os reagentes foram utilizados como recebidos, seguindo as suas indicações do fornecedor. A ciprofloxacina (cpx), moxifloxacina (mxfx) e sparfloxacina (spx) foram compradas à Sigma-Aldrich e guardadas à temperatura ambiente, protegidas da luz. A 1,10-fenantrolina e o sal de cobre, necessários à preparação das soluções de metaloantibióticos (Cu(II)/Fluoroquinolona/Fenantrolina), foram adquiridos à Sigma-Aldrich e as suas soluções foram preparadas recorrendo a tampão HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfónico - Sigma-Aldrich) e a água desionizada, respetivamente. Todos os metaloantibióticos foram preparados em proporções estequiométricas de 1:1:1 dos respetivos componentes. As respetivas fluoroquinolonas foram pesadas recorrendo a uma balança analítica e quantidades respetivas de cobre e fenantrolina foram então adicionadas para um balão volumétrico, em tampão HEPES. As soluções foram posteriormente guardadas no frigorífico, a 4 °C e protegidas da luz.

Todos os lípidos utilizados foram comprados à Avanti® Polar Lipids (Sigma-Aldrich) e, posteriormente, armazenados a -20 °C, num congelador. A sonda fluorescente, 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) foi comprada à Sigma-Aldrich e também armazenada no congelador. O tampão HEPES, utilizado para preparar grande parte das soluções utilizadas neste trabalho, foi preparado com concentração de 10 mmol. dm⁻³, com 0,1 mol.dm⁻³ de NaCl (Sigma-Aldrich) para ajuste de força iónica e pH = 7,4.

O *kit* de lisado amebócito de límulo (*limulus amebocyte lysate* - LAL), QCL-1000™ foi comprado à Lonza.

O meio de cultura de triptona de soja (TSB) foi adquirido à Sigma-Aldrich. O tampão-fosfatos (PBS) 1x (pH 7,4) utilizado nos ensaios microbiológicos, foi preparado por pesagem rigorosa dos sais de fosfato dissódico, dihidrogenofostato de potássio, cloreto de sódio e cloreto de potássio, adquiridos à Sigma-Aldrich.

A solução de cristal violeta (2% cristal violeta, 20% de etanol e 0.8% de oxalato de amónio), utilizada nos ensaios microbiológicos, foi adquirida à Liofilchem.

Todos os restantes reagentes foram adquiridos à Sigma-Aldrich.

As pesagens dos reagentes foram feitas utilizando uma balança analítica Mettler AT201 ($\pm 2 \times 10^{-5}$ g).

2.2 Preparação dos lipossomas

Para a realização do presente trabalho, preparam-se lipossomas de diferentes composições: lipossomas de POPG, uma mistura binária de POPG:CL (58:42) e uma mistura ternária de POPG:CL:DG (11:5:4).

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico [55], com concentração de 10 mmol.dm^{-3} , em tampão HEPES. Para a preparação dos lipossomas pesou-se a respetiva massa de lípido(s), recorrendo a uma balança analítica, seguindo-se a dissolução dos mesmos em clorofórmio, num balão de fundo redondo. O filme lipídico formado ao longo das paredes do balão foi obtido após evaporação do solvente orgânico (realizada sob atmosfera inerte), com recurso a nitrogénio, seguido de 3 horas de vácuo, de modo a garantir a total remoção do solvente. De seguida, procedeu-se à hidratação do filme lipídico, em tampão HEPES, com recurso a um vórtex. Este processo originou MLVs, as quais foram submetidas a 5 ciclos de congelação-descongelação, recorrendo a nitrogénio líquido e a um banho de água quente. Por fim, a suspensão de lipossomas foi submetida a 10 ciclos de extrusão [55], realizados num extrusor da Lipex Biomembranes, com filtros de polycarbonato de 100 nm (Whatman®), a uma temperatura específica para cada sistema (temperatura ambiente para POPG e 65°C para as misturas binária e ternária), com vista à obtenção de uma suspensão homogénea de LUVs.

A homogeneidade e tamanho das vesículas foi determinada por espectroscopia de correlação fotónica (DLS Zetasizer ZS da Malvern Instruments). Os lipossomas preparados apresentavam um diâmetro aproximado de 100nm e um índice de polidispersão (PDI) $< 0,1$, garantindo a homogeneidade da suspensão [69]. Os LUVs foram posteriormente guardados no frigorífico a 4°C e protegidos da luz.

2.3 Determinação de constantes de partição por espectralfluorimetria

As constantes de partição foram determinadas através de estudos de espectroscopia de fluorescência. Os ensaios foram realizados tirando partido da

fluorescência intrínseca das fluoroquinolonas e dos metaloantibióticos. Prepararam-se soluções de composto ($8 \mu\text{mol}.\text{dm}^{-3}$ para a cpx e mxfx, $7 \mu\text{mol}.\text{dm}^{-3}$ para Cucpxphen e $6 \mu\text{mol}.\text{dm}^{-3}$ para Cumxfxphen) em tampão HEPES. As concentrações dos vários compostos utilizadas nos ensaios de partição foram selecionadas de acordo com as suas Leis de Lambert-Beer, previamente estudadas (dados não mostrados), de forma a garantir $\text{OD} < 0,1$ aos comprimentos de onda de excitação e emissão, para evitar o fenómeno de efeito de filtro interno.

A intensidade de fluorescência dos compostos foi determinada num fluorímetro PTI QuantaMaster™ Series QM-8075-21 (Horiba Scientific), na ausência (A0) e presença (A1-A11) de concentrações crescentes ($\approx 100 \mu\text{mol}.\text{dm}^{-3}$ – $1 \text{mmol}.\text{dm}^{-3}$) de suspensão de LUVs. As adições de suspensão de lipossomas foram realizadas diretamente na cuvete, sob agitação. O espectro de fluorescência das soluções foi traçado 5 minutos após adição. Os ensaios foram realizados a 37°C , numa cuvete de quartzo, com fendas de excitação de 5;5;5 (3.84nm, 3.98nm e 3,84nm respetivamente) e de emissão de 3;4 (1.54nm e 1.15nm respetivamente) para o Cucpxphen; de 3;3;3 e 3;4 para a cpx e Cumxfxphen, e de 2;2;2 e 3;4 para a mxfx. Os espectros de fluorescência foram traçados de 1 em 1 nm, com comprimento de onda de excitação de 290 nm e emissão de 300 a 550 nm, com um máximo de emissão observável a 415 nm para a cpx e CuCpxPhen e 460 nm para a mxfx e Cumxfxphen.

Cada espectro de emissão foi replicado 3 vezes. Para cada sistema estudado foram realizados, pelo menos, 3 ensaios independentes.

2.3.1 Modelos matemáticos na determinação das constantes de partição

A ciprofloxacina, a moxifloxacina e os seus respetivos metaloantibióticos têm propriedades fluorescentes que fazem com que a sua constante de partição possa ser determinada recorrendo à técnica de espectroscopia de fluorescência, por análise do espectro de emissão de fluorescência.

Segundo a IUPAC, a constante de partição K_p de qualquer composto é definida pela razão de partição de um fármaco entre uma solução aquosa e vesículas de lipossomas, a qual pode ser definida por:

$$K_p = \frac{(C_l / C_T) / [L]}{(C_w / C_T) / [W]} \quad (1)$$

nas quais C_T , C_L e C_w representam a concentração molar do fármaco total e a concentração molar do fármaco em lípido e em água (55.3 mol.dm^{-3} a 37°C), respetivamente.

As interações entre um fluoróforo e outra molécula podem resultar em fenómenos de extinção de fluorescência (quenching) ou aumento (enhancement). Desta forma, a equação (1) pode ser reformulada de forma a permitir o cálculo do K_p a partir dos valores de intensidade de fluorescência dos fármacos. As mudanças observadas no espectro de fluorescência dos compostos, resultantes de interações lípido-composto, podem ser utilizadas para determinar o K_p , através de um método de regressão não linear definido por:

$$\Delta I = \frac{\Delta I_{max} K_p [L]}{[W] + K_p [L]} \quad (2)$$

Onde ΔI é a diferença entre a intensidade do fluoróforo na ausência e presença do quencher, $[L]$ é a concentração molar do lípido e $\Delta I_{max} = I_\infty - I_0$ onde I_∞ é o valor limitante de I e K_p é a constante de partição.

O processo de extinção de fluorescência consiste na redução da fluorescência de um fluoróforo e pode ser de dois tipos, colisional ou estática, e pode ser descrito pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (3)$$

Onde I_0 e I representam a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do agente extintor (Q), respetivamente; k_q é a constante bimolecular de velocidade do processo de extinção; τ_0 é o tempo de vida na ausência do agente de extinção; $[Q]$ é a concentração do agente de extinção de fluorescência e K_{SV} é a constante de Stern-Volmer.

Esta equação permite a determinação da constante de partição por um método linear de análise dos dados experimentais.

O fenómeno de extinção de fluorescência colisional resulta da despopulação do estado excitado como uma consequência do contacto entre o agente extintor (quencher) e o fluoróforo no estado excitado, que termina com a passagem do fluoróforo ao estado fundamental, sem emissão de um fóton. Por sua vez, o quenching estático advém da formação de um complexo não fluorescente entre o quencher e o fluoróforo no estado fundamental [70]. Neste caso, a constante pode ser considerada como uma constante de associação para a formação do complexo dado por:

$$K_{ass} = \frac{[F-Q]}{[F][Q]} \quad (4)$$

Onde $[F - Q]$, $[F]$ e $[Q]$ são as concentrações do complexo quencher-fluoróforo, do fluoróforo e do quencher, respetivamente. Como sabemos que a concentração total do fluoróforo terá de ser dada por:

$$[F]_0 = [F] + [F - Q] \quad (5)$$

Rearranjando estas duas equações, e substituindo as concentrações por intensidade de fluorescência temos:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{ass}[Q] \quad (6)$$

Todos os espectros obtidos experimentalmente foram analisados e tratados por métodos lineares e não lineares, quando possível, no comprimento de onda correspondente ao máximo de intensidade de fluorescência. Em muitos dos espectros, observou-se um desvio batocrómico após a primeira adição do lipossoma, o qual se intensificava com a crescente adição lipídica... Por último, a interferência da dispersão de luz dos lipossomas no cálculo dos K_p foi avaliada, tendo-se procedido ao traçado do espectro da dispersão de luz dos lipossomas na ausência de composto (referências). As constantes de partição foram calculadas com e sem subtração dos espectros para cada sistema em estudo.

Todas estas análises foram feitas recorrendo ao programa de computador Origin 9®.

2.4 Determinação de temperaturas de transição de fase por anisotropia de fluorescência

A determinação das T_m dos vários sistemas lipídicos estudados foi realizada por ensaios de anisotropia de fluorescência em estado estacionário. Para os ensaios de anisotropia de fluorescência preparam-se lipossomas com uma sonda fluorescente incubada, a 1,6-bifenil-1,3,5-hexatrieno ou DPH. Os ensaios foram realizados para uma razão de DPH:lípido de 1:300 mol/mol [51].

2.4.1 Modelos matemáticos na determinação das temperaturas de transição de fase

A determinação da T_m é conseguida através da análise dos valores de anisotropia de fluorescência em estado estacionário, (r_s) detetados num intervalo de temperaturas. A r_s é uma medida da extensão da polarização da luz emitida por um fluoróforo, depois de excitado com luz polarizada, que traduz a mudança de orientação da molécula no espaço entre os acontecimentos de absorção e emissão. A despolarização da emissão de luz é um fenómeno que se deve, maioritariamente à difusão rotacional das moléculas de um fluoróforo [94]. O deslocamento angular, dependente da extensão da difusão rotacional durante o tempo médio de vida do estado excitado, é traduzido pelo valor de anisotropia r_s . O fenómeno de despolarização resulta no decréscimo do valor de r_s [93].

Como a anisotropia de fluorescência é uma técnica bastante sensível, ela fornece um parâmetro espectroscópico que pode ser interpretado em termos de fluidez membranar. Como tal, e como se sabe que qualquer lípido passa por uma mudança de fluidez quando atinge uma temperatura acima da sua T_m , a utilização da anisotropia de fluorescência é estabelecida como um método viável, reproduzível e eficaz, para determinar as T_m de lípidos. A anisotropia de fluorescência, em modo estacionário (r_s) é definido pela seguinte equação [73]:

$$r_s = \frac{I_{VV} - I_{VH} G}{I_{VV} + 2 I_{VH} G} \quad (7)$$

Onde I_{VV} e I_{VH} são as intensidades medidas em direções opostas (paralela e perpendicular) ao feixe de excitação e G é o fator de correção e é o rácio da sensibilidade do sistema de deteção para a luz verticalmente e horizontalmente polarizada, respetivamente. Teoricamente, o valor de G deve ser de 1, sofrendo oscilações de acordo com as características específicas dos componentes do sistema de deteção.

A r_s é um parâmetro amplamente utilizado para avaliar a rigidez de ambientes moleculares. A T_m dum sistema lipídico pode ser avaliada recorrendo ao estudo da r_s em função da temperatura, devido à sua elevada sensibilidade para detetar diferenças na viscosidade da membrana [51, 74]. Para calcular os valores das T_m , ajustou-se a seguinte equação aos dados experimentais:

$$r_s = r_{s_2} + \frac{r_{s_1} - r_{s_2}}{1 + 10^{B'(\frac{T}{T_m} - 1)}} \quad (8)$$

nas quais T e T_m representam a temperatura absoluta e a temperatura de transição, respetivamente; r_{s_1} e r_{s_2} são os limites superior e inferior dos valores de anisotropia, respetivamente; e B' é um fator associado ao fator de cooperatividade B , traduzido por: $B = 1 - (1/(1+B'))$.

Os valores de r_s obtidos experimentalmente foram representados graficamente em função da temperatura absoluta ($r_s = f(T)$). Posteriormente, ajustou-se a equação (8) aos dados experimentais, sendo traçada uma curva sigmoideal a partir da qual foi possível determinar as T_m dos sistemas biomembranares em estudo. Todas estas análises foram feitas recorrendo ao programa de computador Origin 9®.

2.4.2 Condições experimentais nos ensaios de anisotropia de fluorescência

A incubação do DPH com os lipossomas deu-se num banho a 65° C durante cerca 30min. A concentração do lipossoma escolhido para estes ensaios foi de $2 \times 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ e a concentração da sonda foi de $6,66 \times 10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$ (razão de 1:300 mol/mol de sonda:lipido, como previamente descrito). O efeito dos vários compostos estudados (cpx, mxfx e respetivos metaloantibióticos) nos perfis anisotrópicos dos vários modelos biomembranares foram também estudados. Nestes casos, incubou-se uma solução de cada composto, utilizando as mesmas concentrações escolhidas para os ensaios de determinação do K_p .

A r_s foi determinada num fluorímetro Varian Cary Eclipse, equipado com um dispositivo de controlo rigoroso de temperatura “Single Cell Peltier Accessory” da VARIAN. Os ensaios foram realizados numa gama de temperatura entre 2 e 80°C, com medições de 3 em 3 graus, após 5 minutos de estabilização de cada temperatura. O valor de temperatura absoluta foi obtido por uma sonda de temperatura incorporada no fluorímetro. Os ensaios foram realizados com comprimento de onda de excitação e de emissão de 360 e 427 nm, respetivamente, voltagem entre 600 e 650V, e fenda de excitação e emissão de 10 nm.

Realizaram-se entre 2 a 3 ensaios independentes para cada sistema biomembranar estudado.

O lipossoma constituído apenas por POPG tem uma $T_m = -2^\circ\text{C}$ [50]. Como tal, o mesmo tipo de ensaio experimental não era viável tanto pelo facto de termos de

aplicar algum tipo de anticongelante à solução contendo o lipossoma mas também porque o controlo de temperatura presente no fluorímetro não permite avaliar temperaturas inferiores a 2°C. Como tal, nestes casos, optou-se por avaliar os valores de r_s do DPH a 37°C, na ausência e presença dos fármacos e respetivos metaloantibióticos.

2.5 Determinação da atividade dos compostos na neutralização de lipopolissacarídeos e ácidos lipoteicóicos

Para se determinar a capacidade dos metaloantibióticos neutralizarem a ação dos LPS ou LTA utilizou-se um *kit* de lisado amebócito de límulo (*limulus amebocyte lysate* - LAL), QCL-1000™. Os ensaios de LAL permitem detetar a presença de endotoxina livre e não neutralizada [71]. Concretamente, este método baseia-se na interação da endotoxina com a proenzima do fator de coagulação C, presente nos amebócitos do *Limulus polyphemus*. A atividade proteolítica desta proenzima é ativada na presença de endotoxinas, e o método cromogénico baseia-se na degradação de um péptido sintético (substrato), fornecido no kit, que liberta *p*-nitroanilina (pNA) quando é clivado pela enzima, produzindo assim uma cor amarelada passível de ser quantificada a 405nm [71]. O kit fornece também um padrão de endotoxina derivado da estirpe O111:B4 de *E. coli*, utilizado para criar uma curva padrão para a posterior quantificação de endotoxinas – interpolando a absorvância de uma amostra com uma concentração desconhecida de endotoxina contra a curva-padrão.

Primeiramente, reconstituíram-se com água (desprovida de endotoxinas, fornecida no kit) todos os reagentes fornecidos pelo kit, nomeadamente o substrato cromogénico, a endotoxina e o lisado de amebócitos. Todas estas reconstituições foram feitas à temperatura ambiente e com recurso a agitação vigorosa no vórtex. Depois de a endotoxina estar devidamente reconstituída, preparam-se soluções-padrão de endotoxina a 0,1, 0,25, 0,5 e 1 EU/ml as quais foram guardadas entre a 2-8°C. Este ensaio pode ser realizado em tubos de ensaio ou em placas de 96 poços, tendo-se optado pelo último na realização do presente trabalho.

Dispensaram-se 50 µL de cada amostra e padrões e 100 µL de cada controlo numa placa de 96 poços, pré-aquecida a 37°C no leitor de placas (Multiskan Go da Thermo Scientific). Todas as condições foram analisadas em duplicado. As amostras correspondiam aos vários metaloantibióticos (de cpx, mxfx e sparfloxacina - spx), um péptido antimicrobiano (BP100) e a cpx pura. Todos estes compostos foram testados

em várias concentrações: 8, 16, 32, 64 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Utilizaram-se dois controlos, um de tampão HEPES e um de cpx, e o branco, constituído apenas por água do kit.

Resumidamente, ao tempo $t=0\text{min}$, adicionaram-se 50 μL de LAL a todos os poços. Esta adição foi feita com recurso a uma pipeta multicanal, de modo a uniformizar o tempo de espera/reação para cada poço. Após a adição, a placa incubou a 37°C, durante 10 minutos. Ao tempo $t=10\text{min}$, adicionaram-se 100 μL do substrato cromogénico (pré-aquecido a 37°C) a todos os poços, deixando incubar durante 6min a 37°C. Ao tempo $t=16\text{min}$, adicionaram-se 100 μL do reagente stop (ácido acético glacial a 25% v/v) para parar a reação, e mediu-se a absorvância a 405 nm.

2.6 Determinação da atividade antibiofilme

Os ensaios de avaliação da atividade antibiofilme dos compostos (cpx pura e metaloantibióticos da cpx e da mxfx) foram realizados contra biofilmes de uma estirpe controlo de *S. aureus*, ATCC 25923. Prepararam-se inóculos bacterianos frescos em TSB, a partir de culturas bacterianas obtidas por crescimento de 18 a 24h em Mueller-Hinton agar (MHA). A turbidez dos inóculos foi ajustada através da medição da densidade ótica a 600 nm ($\text{OD}_{600} = 0,1$), de forma a obter uma suspensão bacteriana final com cerca de 10^8 unidades formadoras de colónias (UFC) por mL.

Dispensaram-se 200 μL de inóculo para placas de 96 poços, os quais incubaram por 24h, a 37°C, com vista à formação do biofilme. Após 24h, incubaram-se diferentes concentrações de cada composto estudado (concentração inibitória mínima (CIM), 2x CIM, 4x CIM, 8x CIM, 16x CIM e 32x CIM), após remoção do meio de cultura em cada poço, os quais incubaram por 24h, a 37 °C. Todos os ensaios contemplaram controlos de inóculo, de meio de cultura (TSB), e de cada composto estudado. Cada condição foi avaliada em quadruplicado, devido à elevada variabilidade deste tipo de ensaios. A atividade antibiofilme dos compostos estudados foi avaliada por ensaios de viabilidade celular (ensaio de MTT) e de quantificação da biomassa (ensaio de cristal violeta).

Os ensaios foram realizados em condições asséticas, numa câmara de fluxo laminar Classe II da ESCO.

2.6.1 Ensaios de viabilidade celular

A viabilidade celular dos biofilmes foi avaliada pelo método do brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio - MTT [75], uma vez que este reagente é reduzido por enzimas de células metabolicamente ativas a cristais de formazan, passíveis de ser quantificados por medição da absorvância a 540 nm.

Resumidamente, preparou-se uma solução stock de MTT de 5 mg/mL, em tampão PBS, que posteriormente foi diluída para 0,5 mg/mL em meio TSB. Aspirou-se o meio dos poços (sem danificar o biofilme formado) e procedeu-se a uma lavagem com tampão PBS 1x, o qual foi de seguida removido. Adicionaram-se 100 µL de solução de MTT a cada poço, seguindo-se a incubação das placas durante 30min, sem agitação, a 37 °C. Após este período, leu-se a absorvância de cada poço, num leitor de placas, a 540nm. Este ensaio implica a preparação de um controlo específico, o controlo da morte bacteriana, realizado por adição de DMSO puro (durante 10 min) a poços com biofilme formado aos t=24 e t=48h.

A viabilidade celular foi determinada assumindo que o biofilme não sujeito à ação dos compostos corresponde a 100% de viabilidade celular.

2.6.2 Ensaios de quantificação da biomassa

A quantificação da biomassa total dos biofilmes foi também determinada, através do método do cristal violeta. Neste ensaio, aspirou-se o meio TSB dos poços (sem danificar o biofilme formado) e procedeu-se a uma lavagem com tampão PBS 1x, o qual foi de seguida removido. Adicionaram-se 200 µL de metanol puro a cada poço, durante 15min, para fixar as células. De seguida, removeu-se o metanol e deixou-se secar os poços ao ar livre. Procedeu-se à adição de 200 µL de uma solução de cristal violeta 0.5% (diluída da solução de 2%, em água desionizada) a cada poço. Após 5min de incubação, realizaram-se 5 lavagens dos poços com água destilada, seguindo-se a leitura da absorvância das placas, no leitor de placas, a 595 nm.

Ao realizar os ensaios de MTT e de cristal violeta é possível comparar a viabilidade celular e biomassa dos biofilmes formados na ausência (controlo) e presença dos compostos analisados, permitindo tirar conclusões sobre a ação dos compostos sobre a estrutura de biofilmes pré-formados.

3. Resultados

O presente trabalho desenvolve-se a partir da problemática de infeções causadas por bactérias resistentes a FQs, em particular *S. aureus*. A OMS publicou, em 2017, uma lista que prioriza a urgência para o desenvolvimento de novos antibióticos contra diferentes estirpes, atribuindo prioridade elevada ao combate de infeções causadas por *S. aureus* [87].

Os metaloantibióticos de Cu(II)/FQ/fenantrolina, vastamente caracterizados nas últimas décadas através de estudos multidisciplinares, revelaram-se bastante efetivos no combate a *S. aureus* multirresistentes (*S. aureus* resistentes à meticilina – MRSA) [29]. A interação metaloantibiótico-lípido está muito caracterizada para bactérias Gram-negativas. No entanto, esta interação está ainda pouco explorada em modelos membranares Gram-positivos, razão que espoletou o desenvolvimento do presente trabalho. Para o estudo biofísico de interação dos compostos com modelos membranares escolheram-se 3 modelos miméticos (lipossomas) de composição distinta, com o intuito de mimetizar a membrana de *S. aureus*: POPG [88], POPG:CL (58:42) [37] e POPG:CL:DG (11:5:4) [89]. Os ensaios experimentais foram realizados com dois metaloantibióticos (Cucpxphen e Cumxfphen), cuja atividade contra MRSA se revelou bastante efetiva.

Realizaram-se, ainda, estudos de interação dos metaloantibióticos com outros componentes membranares (LPS e LTA), os quais foram alargados a um terceiro metaloantibiótico, o Cuspxphen – metaloantibiótico de sparfloxacin (spx).

Por fim, determinou-se a atividade antibiofilme dos metaloantibióticos contra biofilmes de *S. aureus*, uma área pouco explorada.

3.1 Determinação das constantes de partição por espetrofluorimetria

A interação de um fármaco com a membrana pode ser avaliada através da determinação da sua constante de partição, K_p . O K_p depende fortemente das propriedades físico-químicas da membrana e do composto, pelo que é esperado vermos diferenças de interação de um composto em sistemas membranares diferentes.

As vesículas de lipossoma dispersam luz, razão pela qual foi necessário avaliar a interferência da sua dispersão de luz no cálculo dos K_p . Desta forma, traçaram-se os espectros de dispersão de luz das várias concentrações de lipossoma (referências) utilizadas nos ensaios (Figura 12). Todos os ensaios foram realizados com comprimento de onda de excitação de 290 nm para minimizar o efeito de dispersão de luz dos lipossomas. Os K_p foram calculados (Tabela 1) com e sem subtração das referências para todos os sistemas estudados (Tabela 1), uma vez que em alguns casos a dispersão de luz das referências parece negligente (Figura 13) e noutros bastante significativa (Figura 14). As constantes calculadas resultaram de um ajuste não linear da equação (2) aos dados experimentais (Figura 15).

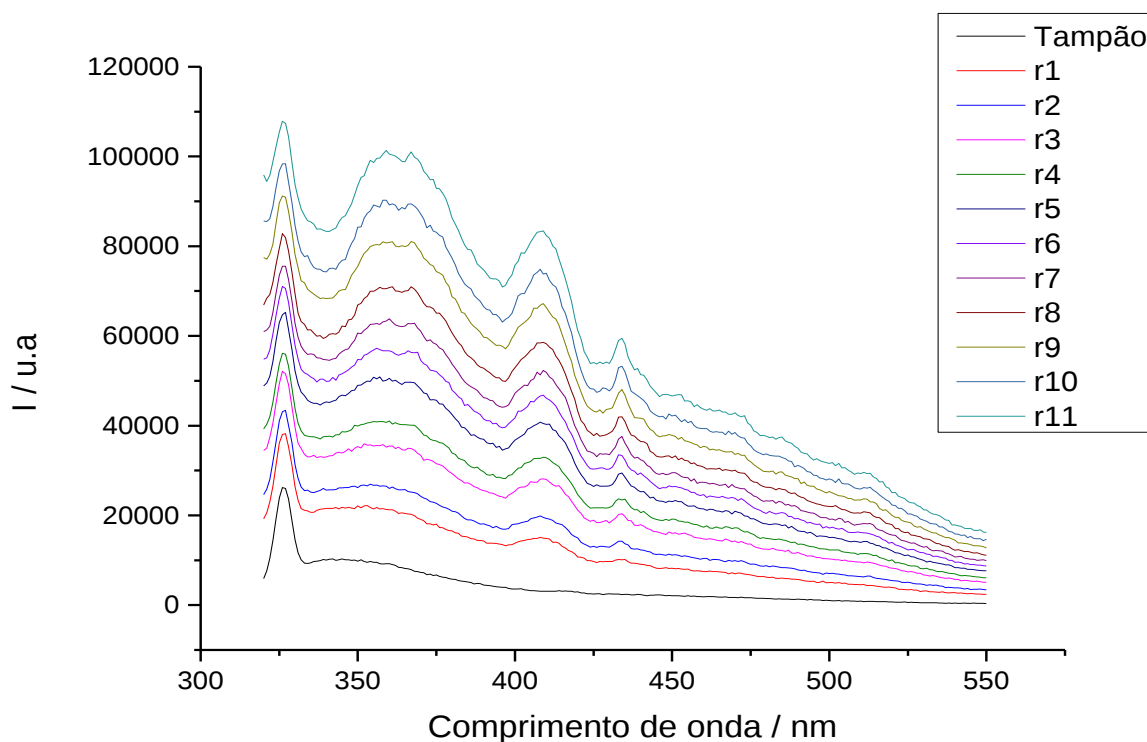


Figura 12 – Espectros de dispersão de luz de referências de lipossomas de POPG, em tampão HEPES. Concentrações de lipossoma ($\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$): (r1) 99 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; (r2) 196 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; (r3) 291 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; (r4) 384 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; (r5) 476 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; (r6) 566 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; (r7) 654 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; (r8) 740 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; (r9) 826 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; (r10) 909 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; (r11) 991 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Comprimento de onda de excitação de 290 nm. Cada espectro representa a média de três replicados, com início a 320 nm.

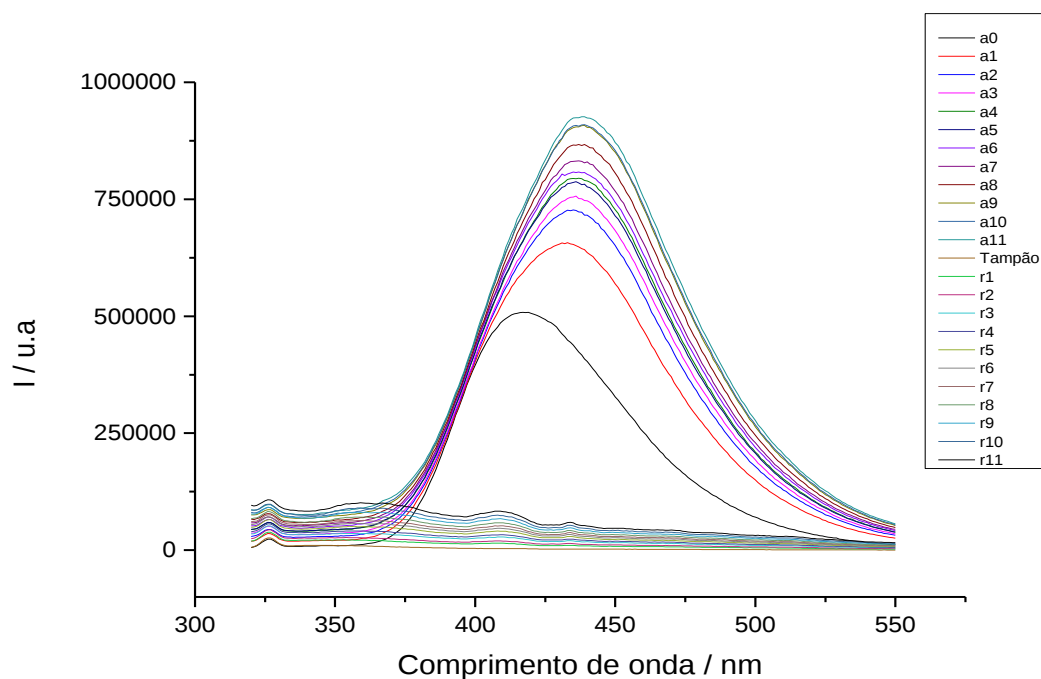


Figura 13 – Espectros de emissão da cpx ($8 \mu\text{mol.dm}^{-3}$) na ausência (A0) e presença (A1-A11) de LUVs de POPG e respetivas referências (R1-R11). Concentrações de lipossoma ($\mu\text{mol.dm}^{-3}$): (r1 e a1) $99 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r2 e a2) $196 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r3 e a3) $291 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r4 e a4) $384 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r5 e a5) $476 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r6 e a6) $566 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r7 e a7) $654 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r8 e a8) $740 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r9 e a9) $826 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r10 e a10) $909 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r11 e a11) $991 \mu\text{mol.dm}^{-3}$. Comprimento de onda de excitação de 290 nm. Cada espectro representa a média de três replicados, com início a 320 nm.

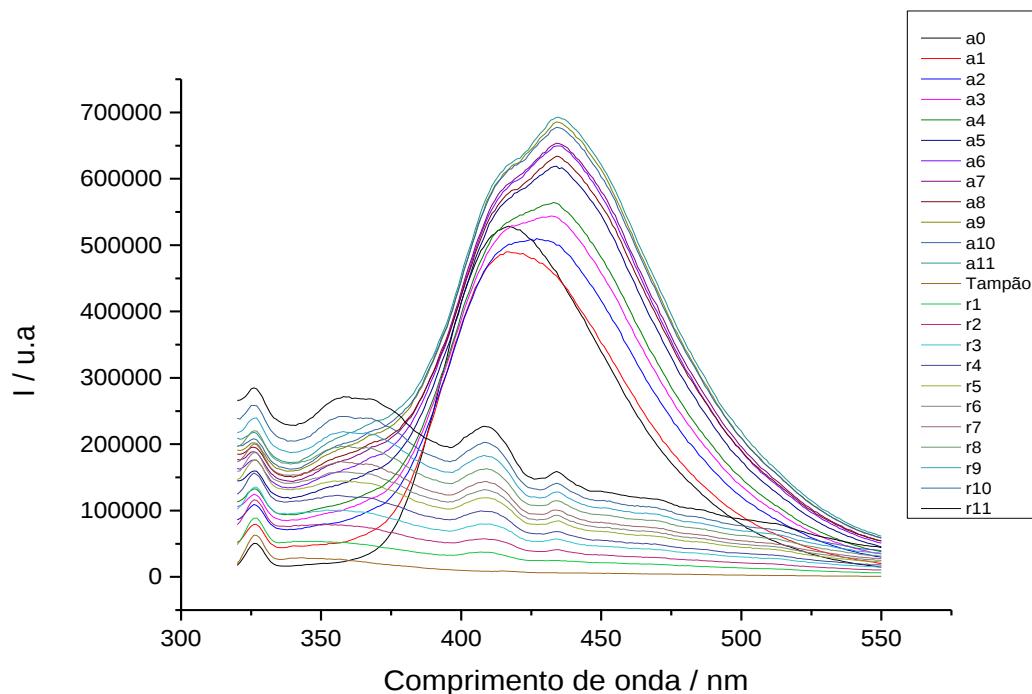


Figura 14 – Espectros de emissão do metaloantibiótico Cucpxphen ($7 \mu\text{mol.dm}^{-3}$) na ausência (A0) e presença (A1-A11) de LUVs de POPG e respetivas referências (R1-R11). Concentrações de lipossoma ($\mu\text{mol.dm}^{-3}$): (r1 e a1) $99 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r2 e a2) $196 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r3 e a3) $291 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r4 e a4) $384 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r5 e a5) $476 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r6 e a6) $566 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r7 e a7) $654 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r8 e a8) $740 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r9 e a9) $826 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r10 e a10) $909 \mu\text{mol.dm}^{-3}$; (r11 e a11) $991 \mu\text{mol.dm}^{-3}$. Comprimento de onda de excitação de 290 nm. Cada espectro representa a média de três replicados, com início a 320 nm.

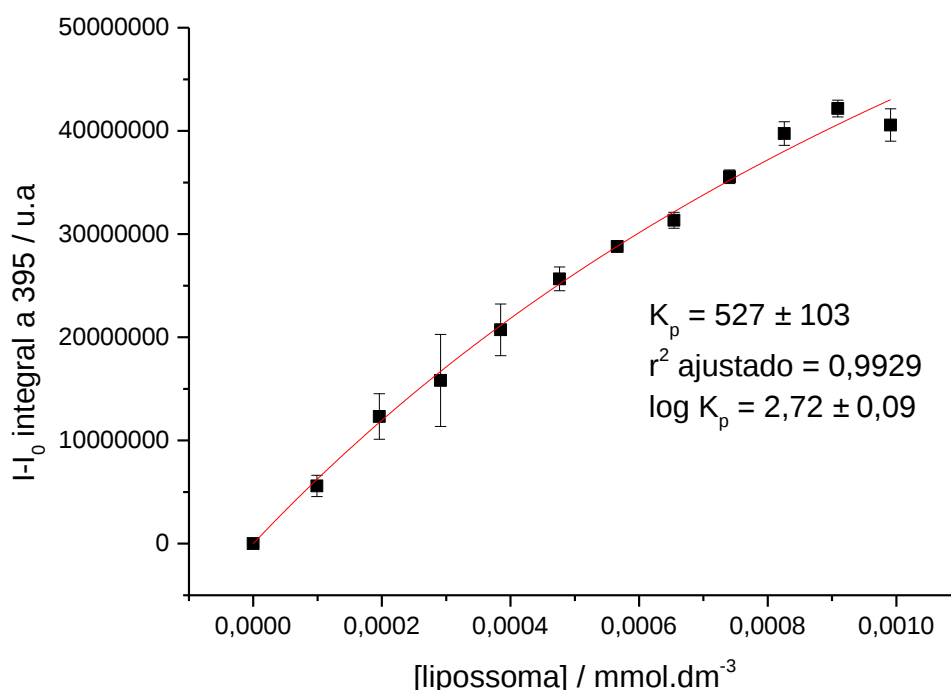


Figura 15 - Ajuste não linear da equação (2) aos valores experimentais da integração das intensidades a partir de 395 nm de fluorescência do metaloantibiótico Cucpxphen ($7 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), obtidos ao comprimento de onda máximo de emissão de 415 nm, na ausência e presença de concentrações crescentes de lipossomas de POPG. Os valores experimentais traduzem uma média de, pelo menos, três ensaios independentes, razão pela qual cada ponto representado graficamente apresenta um desvio padrão associado.

Tabela 3 - Constantes de partição ($\log K_p \pm s$) entre uma fase aquosa de tampão HEPES e uma fase lipídica membrana de POPG, POPG:CL (58:42) e POPG:CL:DG (11:5:4), determinados por espectrofluorimetria, por ajuste não linear (K_p). Os valores calculados e respetivos desvio-padrão representam uma média de, pelo menos, três ensaios independentes.

Log $K_p \pm s$				
Sem subtração de referências				
Modelo mimético	cpx	mxfx	Cucpxphen	Cumxfxphen
POPG	$3,54 \pm 0,07$	$3,46 \pm 0,07$	$2,72 \pm 0,09$	$5,20 \pm 0,3$
POPG:CL (58:42)	$3,73 \pm 0,07$	$3,7 \pm 0,1$	$2,75 \pm 0,08$	N.D.
POPG:CL:DG (11:5:4)	N.D.	N.D.	$2,69 \pm 0,11$	$3,89 \pm 0,04$
Com subtração de referências				
Modelo mimético	cpx	mxfx	Cucpxphen	Cumxfxphen
POPG	$3,70 \pm 0,06$	$3,65 \pm 0,08$	$2,60 \pm 0,09$	$5,1 \pm 0,2$
POPG:CL (58:42)	$4,21 \pm 0,05$	N.D.	N.D.	$4,41 \pm 0,07$
POPG:CL:DG (11:5:4)	N.D.	N.D.	$2,4 \pm 0,2$	$3,81 \pm 0,03$

N.D. – não determinável

Os valores de K_p calculados (Tabela 1) para cada composto, com e sem subtração de referências, são bastante semelhantes, o que demonstra que a dispersão de luz dos lipossomas não interfere significativamente nos ensaios experimentais.

Os espectros de emissão de fluorescência revelaram, para a maioria dos sistemas em estudo, um aumento da intensidade de fluorescência na presença de concentrações crescentes de lipossoma, acompanhado de um desvio batocrômico

Os valores de K_p determinados para a mxfx e o seu metaloantibiótico são significativamente diferentes, exibindo uma maior partição do metaloantibiótico comparativamente à FQ pura nos vários sistemas estudados. Esta tendência é geralmente reportada para vários sistemas miméticos bacterianos e deve-se às interações eletrostáticas privilegiadas entre a carga positiva dos metaloantibióticos e as cargas negativas características das membranas [90]. Contrariamente aos outros compostos testados, o Cumxfxphen é o único composto que apresenta uma extinção de fluorescência, acompanhado de uma ausência de um desvio batocrômico. Curiosamente, os resultados obtidos para a cpx apresentam um valor de K_p superior para a FQ pura, comparativamente ao seu complexo, no sistema binário e em POPG. Não foi possível calcular o K_p da mxfx e da cpx no sistema ternário.

Relativamente ao Cumxfxphen, os resultados obtidos apresentam valores semelhantes aos descritos na literatura para modelos miméticos de *E. coli*: $4,22 \pm 0,10$ em POPE:POPG(75:25) e $4,38 \pm 0,01$ em POPE:POPG:CL (67:23:10) [90]. Estes resultados sugerem que a interação deste composto com a membrana deverá ter um papel relevante na sua translocação, tal como tinha sido descrito para modelos de bactérias Gram-negativas. No que respeita ao Cucpxphen, este aparenta ter uma menor afinidade para os sistemas estudados, comparativamente à sua FQ pura e ao Cumxfxphen. Está descrito que este metaloantibiótico poderá utilizar porinas para o seu influxo em bactérias Gram-negativas [33, 91]. Apesar destas proteínas não estarem presentes em bactérias Gram-positivas, poderá haver um mecanismo de entrada alternativo deste complexo, assente, por exemplo, noutros componentes membranares.

3.2 Determinação das temperaturas de transição de fase por anisotropia de fluorescência

A fluidez da membrana, e consequentemente, a sua permeabilidade, está dependente da sua temperatura de transição, T_m . Como tinha sido anteriormente mencionado, sistemas mais complexos podem exibir mais de uma temperatura de transição. Adicionalmente, a interação de certos fármacos com a membrana pode contribuir para uma alteração da sua T_m . Neste trabalho determinaram-se as T_m dos vários sistemas lipídicos em estudo e avaliou-se a interferência dos vários compostos (cpx, mxfx e respetivos metaloantibióticos) na fluidez membranar. Os ensaios foram realizados recorrendo a uma sonda fluorescente, o DPH (Figura 16), frequentemente utilizada para averiguar características dinâmicas de bicamadas lipídicas [51]. Estudos recentes reportam a utilização desta técnica para caracterização da fluidez membranar na presença de lípidos como o colesterol e os seus análogos - colesterol hemossuccinato, [76] oxisterol [77] e ergosterol [78] – ou para estudar o efeito de pequenas moléculas, como agentes anticancerígenos [79] ou fungicidas [80], nas propriedades das bicamadas lipídicas.

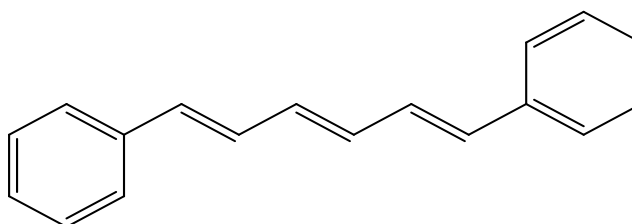


Figura 16 – Estrutura do 1,3,5-difenil-hexatrieno (DPH).

O DPH é um pequeno hidrocarboneto utilizado para estudar membranas celulares. Esta molécula não é fluorescente em água, mas é extremamente fluorescente quando incorporada numa membrana celular. A sua incorporação é realizada a cerca de 8 Å do centro da bicamada lipídica [51], permitindo obter informação sobre uma região mais central da bicamada lipídica (Figura 17). Uma vez que os lípidos não possuem fluorescência intrínseca, foi necessário incubar o DPH nos lipossomas.

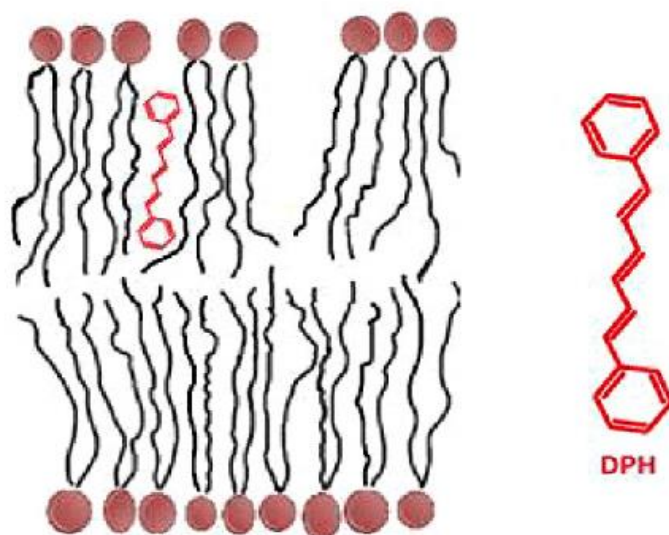


Figura 17– Incorporação do DPH (vermelho) na membrana fosfolipídica. Imagem adaptada de [81].

Os perfis anisotrópicos obtidos para a sonda de fluorescência DPH, incubada em lipossomas de POPG:CL (58:42) e POPG:CL:DG (11:5:4), revelaram um decréscimo dos valores de r_s resultante do aumento da temperatura (Figura 18), representativa da tendência obtida para os dois sistemas em estudo). Esta variação é mais acentuada na(s) zona(s) de transição de fase. A variação foi avaliada na ausência e presença de compostos (cpx, mxfx, Cucpxphen e Cumxfxphen) as T_m calculadas (Tabela 2) por ajuste da equação (8) aos dados experimentais (Figura 19), ilustrativa do cálculo de uma T_m).

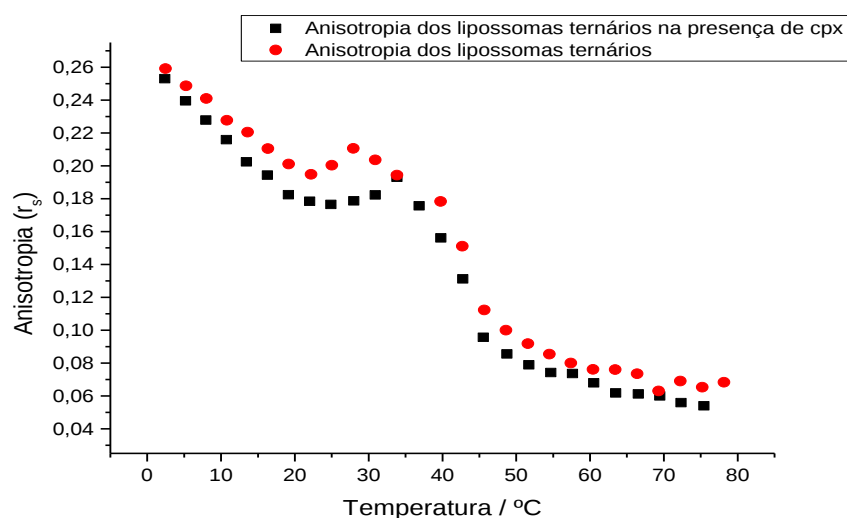


Figura 18 – Variação da anisotropia de fluorescência (r_s), com a temperatura, da sonda DPH incubada em lipossomas de POPG:CL:DG (11:5:4), na ausência (preto) e presença (vermelho) de cpx ($8 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Tabela 4 - Temperaturas de transição de fase (T_m) de lipossomas de POPG:CL (58:42) e de POPG:CL:DG (11:5:4) e valores de r_s em lipossomas de POPG, determinadas espectralmente, por incubação da sonda DPH, na ausência e presença de compostos. Os valores calculados e respetivos desvios-padrão (s) representam a média de, pelo menos, três ensaios independentes.

Primeira temperatura de transição (T_1) / °C					
Modelo mimético	Ausência de composto	Presença de composto			
		cpx	mxfx	Cucpxphen	Cumxfxphen
POPG:CL (58:42)	10,4 ± 0,3	8,9 ± 0,9	8,0 ± 0,8	9,5 ± 0,1	9,1 ± 0,4
POPG:CL:DG (11:5:4)	10,7 ± 0,1	9,7 ± 0,2	9,8 ± 0,1	10,33 ± 0,04	10,6 ± 0,1
Segunda temperatura de transição (T_2) / °C					
Modelo mimético	Ausência de composto	Presença de composto			
		cpx	mxfx	Cucpxphen	Cumxfxphen
POPG:CL (58:42)	44,8 ± 0,4	46,4 ± 0,1	47,7 ± 0,5	47,4 ± 0,5	45,1 ± 0,4
POPG:CL:DG (11:5:4)	43,6 ± 0,2	42,5 ± 0,1	42,5 ± 0,2	41,13 ± 0,06	40,9 ± 0,3
r_s do DPH em POPG a 37°C					
Modelo mimético	Ausência de composto	Presença de composto			
		cpx	mxfx	Cucpxphen	Cumxfxphen
POPG	0,0592 ± 0,0008	0,0644 ± 0,0001	0,0620 ± 0,0011	0,07465 ± 0,00005	0,0801 ± 0,0004

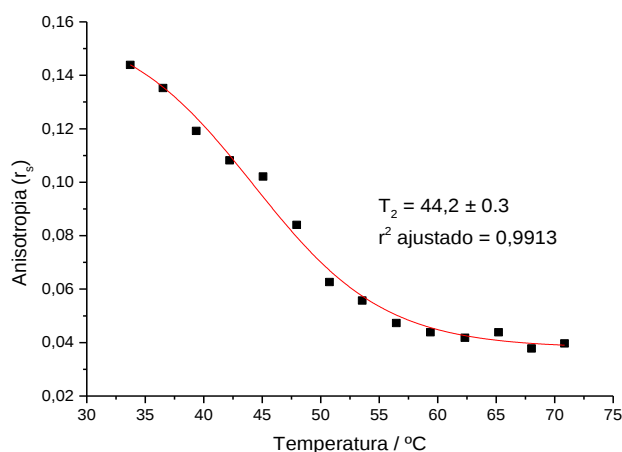


Figura 19 – Ajuste não linear da equação (8) aos dados experimentais da variação fluorescência (r_s), com a temperatura, da sonda DPH incubada em lipossomas de POPG:CL (58:42), para o cálculo da T_2 .

Analisando os resultados experimentais, foi possível calcular duas T_m para os sistemas binário e ternário (Figura 18 e Tabela 2), muito semelhantes para ambos os

sistemas ($T_1 \sim 10^\circ\text{C}$ e $T_2 \sim 44^\circ\text{C}$). Estes resultados mostram que a adição do DG ao POPG e à CL não produz grandes alterações na fluidez deste sistema. A T_1 determinada deverá traduzir regiões com maior teor de POPG e a T_2 de CL.

O perfil anisotrópico dos sistemas binário e ternário estudados mostra que a presença dos vários compostos antimicrobianos estudados (FQs puras e metaloantibióticos) interfere mais significativamente nas T_m do sistema binário. A presença das FQs puras resulta num decréscimo de ~ 1 a 2°C da T_1 do sistema binário. Esta descida é menos acentuada (decréscimo $\leq 1^\circ\text{C}$) na presença dos metaloantibióticos. No entanto, a T_1 do sistema ternário sofre um decréscimo $\sim 1^\circ\text{C}$ na presença das FQs puras e não sofre variação na presença dos metaloantibióticos.

Em contraste, a segunda temperatura de transição (T_2) é afetada na presença de praticamente todos os compostos estudados. No sistema binário, o valor da T_2 aumenta ~ 2 a 3°C na presença das FQs puras e $\sim 3^\circ\text{C}$ na presença de Cucpxphen. Curiosamente, a presença do Cumxfxphen não induz alteração da T_2 do sistema binário. No sistema ternário, a presença dos compostos reduz o valor da T_2 . As FQs puras induzem uma redução de $\sim 1^\circ\text{C}$ e os metaloantibióticos de ~ 2 a 3°C . O Cumxfxphen é composto que provoca a maior redução. É de salientar que o aumento da T_m só se verifica para o sistema binário, na presença de todos os compostos estudados, tal como previamente referido).

Relativamente ao sistema mimético constituído unicamente por POPG, vemos que o valor da r_s , medido a 37°C , sofre um aumento na presença dos quatro compostos estudados. Este aumento é mais significativo na presença dos metaloantibióticos, o que significa que a presença dos complexos o que sugere uma alteração na fluidez membranar do lipossoma.

De uma forma geral, observou-se uma maior interferência dos metaloantibióticos na determinação das T_2 dos dois sistemas membranares em estudo, com exceção do Cumxfxphen no sistema binário. Tal como referido anteriormente, a T_2 é representativa de domínios membranares mais ricos em CL, pelo que estes resultados sugerem que a incorporação dos metaloantibióticos na membrana deverá ocorrer preferencialmente nestes domínios.

3.3 Determinação da atividade contra lipopolissacarídeos, LPS, e ácidos lipoteicóicos, LTA

Os lipopolissacarídeos (LPS) e os ácidos lipoteicóicos (LTA) são componentes membranares das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respetivamente. Paralelamente aos ensaios de partição e de fluidez membranar, avaliou-se a capacidade de neutralização destes componentes por ação da cpx e de três metaloantibióticos (Cucpxphen, Cumxfphen e Cuspxphen). Adicionalmente, utilizou-se um péptido antimicrobiano, BP100, como controlo, uma vez que a sua atividade de neutralização contra LPS e LTA está reportada [88].

Os ensaios enzimáticos realizados não permitiram a obtenção de resultados experimentais reproduzíveis nem coerentes. Os valores de absorvância obtidos para todas as amostras e controlos, à exceção das soluções-padrão, exibiram valores extremamente altos e não seguiam qualquer tipo de tendência entre os compostos e as suas diversas concentrações analisadas. Inclusivamente, os valores de abs obtidos para o branco foram sempre superiores a 1, o que indicia a existência de interferências, provavelmente resultantes de contaminação por endotoxinas externas. Apesar de várias tentativas de redução de possíveis contaminações, há vários fatores de esterilidade que não conseguimos controlar, como, por exemplo, o próprio ar e os diversos recipientes onde os reagentes (FQs, sal de cobre, etc) são adquiridos.

Por outro lado, os resultados obtidos para as soluções-padrão não revelaram qualquer tipo de interferência. Na verdade, conseguiu-se construir uma reta padrão de endotoxina com $R^2 = 0,9977$ (Figura 20), a qual está de acordo com as recomendações das instruções do kit utilizado.

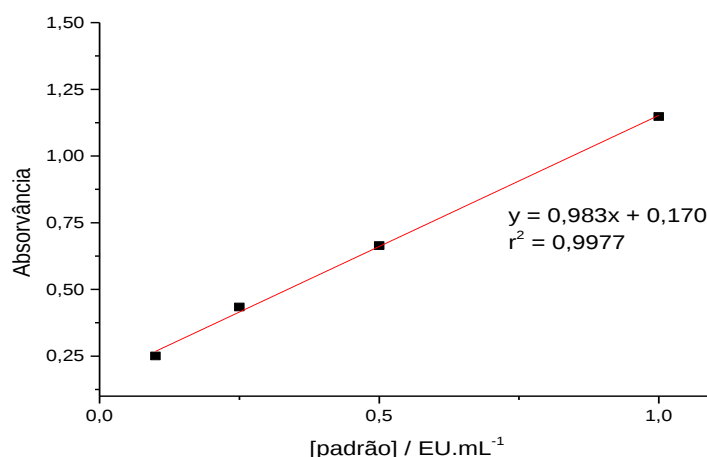


Figura 20– Reta padrão, obtida através de soluções-padrão de endotoxina fornecido no kit.

Estas observações não permitiram identificar e isolar as interferências presentes. Por esta razão, e devido aos elevados custos associados à determinação destes ensaios enzimáticos, não foi possível obter dados experimentais relacionados com o estudo de neutralização de LPS e LTA por parte dos metaloantibióticos.

3.4 Ensaios microbiológicos

A atividade antimicrobiana dos metaloantibióticos está bem descrita contra estirpes controlo de *S. aureus* e MRSA está bem descrita [90]. Estes compostos revelaram-se bastante mais ativos do que as respetivas FQ puras, especialmente contra isolados multiresistentes (MRSA), evidenciando diferenças no valor da concentração inibitória mínima (CIM) de 386,3-772,6 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ (cpx) para 90,3 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ (CuCpxphen) e de 292,3 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ (mxfx) para 10,2 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ (Cumxafxphen), por exemplo [90].

Como previamente referido, a falta de estudos debruçados sobre a atividade antibiofilme destes compostos motivou a última parte do presente trabalho. O presente estudo termina com a determinação da atividade antibiofilme de metaloantibióticos contra biofilmes de um estirpe controlo de *S. aureus* (ATCC 25923). Para tal, quantificou-se a biomassa dos biofilmes formados bem como a sua viabilidade celular, na presença de Cucpxphen e Cumxafxphen, utilizando uma FQ pura como controlo, a cpx. Os ensaios foram determinados para concentrações equivalentes à CIM, 2x CIM, 4x CIM, 8x CIM, 16x CIM e 32x CIM de cada composto (CIM cpx = 0,36 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$; CIM Cucpxphen = 0,35 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$; e CIM Cumxafxphen = 0,08 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$) [90].

3.4.1 Quantificação da biomassa total pelo método do cristal violeta

O método do cristal violeta permite a quantificação da biomassa dos biofilmes. Estes ensaios avaliaram a influência dos metaloantibióticos e da cpx na biomassa da estrutura do biofilme pré-formado. Os resultados experimentais revelaram uma diminuição da biomassa total na presença dos vários compostos estudados (Figura 21), o que demonstra atividade antibiofilme. Observou-se uma tendência generalizada de redução da biomassa total com o aumento da concentração dos compostos. No

entanto, há uma inversão desta tendência na presença das duas concentrações mais elevadas (16x e 32x CIM). Uma possível explicação para este fenómeno poderá ser o desenvolvimento de algum tipo de resistência por parte das bactérias, o qual permite manter a estrutura do biofilme.

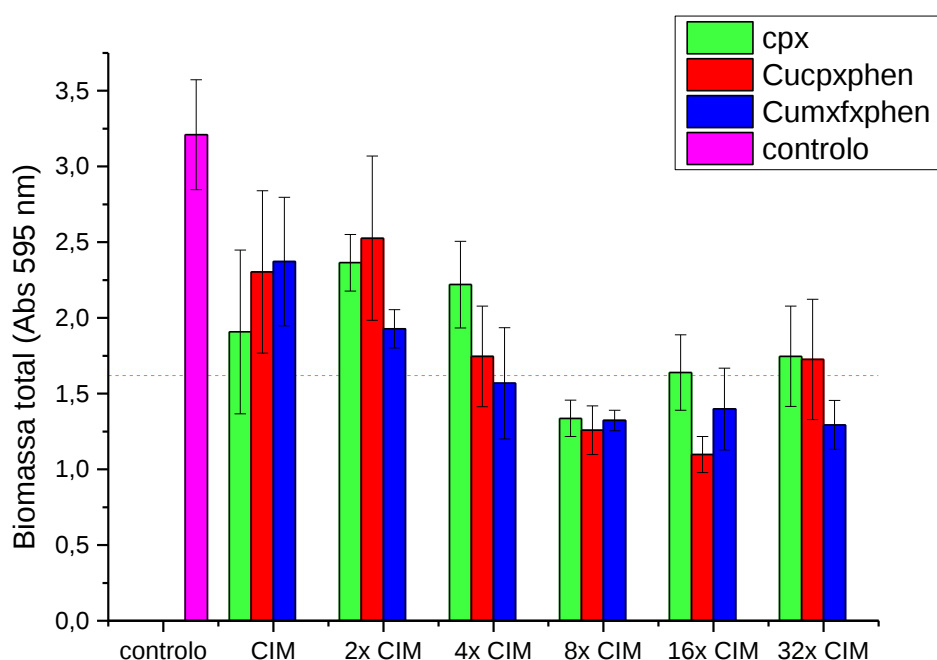


Figura 21 – Quantificação da biomassa total de biofilmes de *S. aureus* (ATCC 25923), após 24h de incubação de compostos (cpx, Cucpxphen e Cumxfphen). O tracejado laranja corresponde à biomassa total do biofilme pré-formado, determinada previamente à incubação dos compostos. Dados experimentais representativos de 1 ensaio.

Os resultados obtidos mostram que os complexos possuem atividade antibiofilme semelhante ao perfil da FQ pura no que diz respeito à diminuição da biomassa total. Esta capacidade aumenta com o aumento da concentração.

3.4.2 Estudo da viabilidade celular pelo método do MTT

Em paralelo, realizou-se ensaios de viabilidade celular dos biofilmes, pelo método do MTT. A presença dos vários compostos não teve um impacto significativo na viabilidade celular de biofilmes de pré-formados. Observando a Figura 22, é possível concluir que a viabilidade celular da estrutura se mantém praticamente

inalterada na presença das diferentes concentrações estudadas, o que demonstra que as bactérias se encontram metabolicamente ativas. Isto aparenta estar de acordo com a literatura previamente descrita, uma vez que as FQs são fármacos bacteriostáticos com atividade bactericida, dependente da concentração – um estudo reportou uma concentração bactericida mínima, CBM de $3,01 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (cerca de 10x a MIC) para a estirpe utilizada [86, 93].

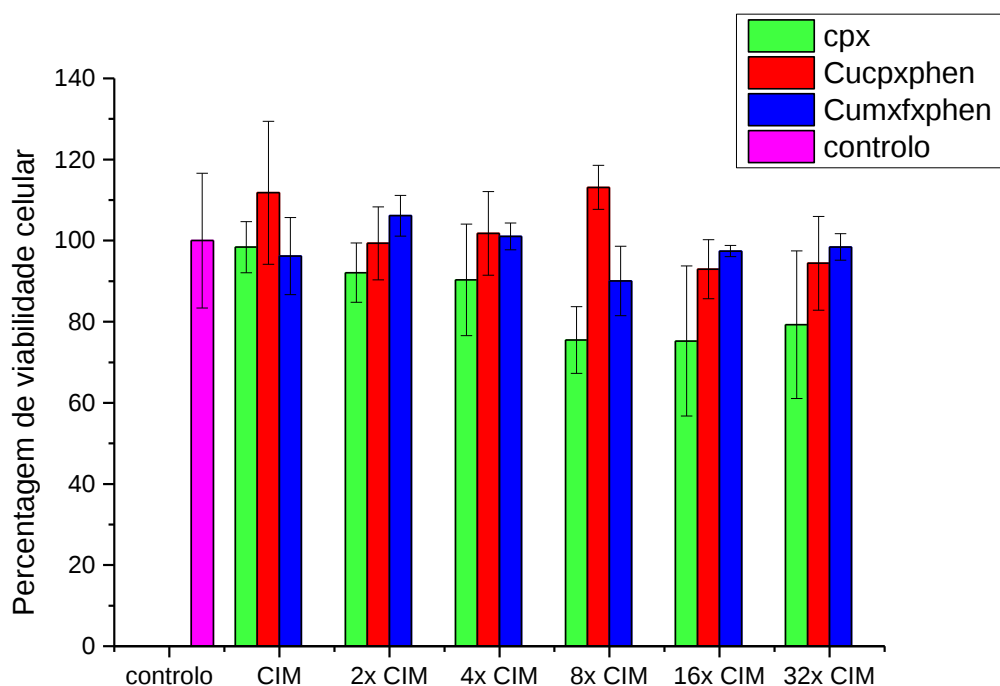


Figura 22 - Quantificação da viabilidade celular de biofilmes de *S. aureus* (ATCC 25923), após 24h de incubação de compostos (cpx, Cucpxphen e Cumxfxphen). Dados experimentais representativos de 1 ensaio.

Apesar do biofilme ter sofrido alguma redução da biomassa (Figura 20), a complexidade da estrutura poderá dificultar a penetração e consequente ação dos fármacos, mantendo a viabilidade celular, mesmo perante concentrações elevadas de composto.

4. Conclusão

A resistência bacteriana a antibióticos é, atualmente, um dos grandes desafios de saúde pública. Neste sentido, a procura de soluções de melhoramento e/ou desenvolvimento de compostos antimicrobianos capazes de combater infeções causadas por bactérias resistentes é premente.

As fluoroquinolonas (FQs) são uma família de antibióticos vastamente prescrita na prática clínica. No entanto, não são antibióticos de primeira linha de tratamento e muitos dos mecanismos que conferem resistência bacteriana contra outras famílias de antibióticos também afetam as FQs. Uma das possíveis estratégias para combater a resistência bacteriana a FQs consiste na complexação destes antibióticos com iões divalentes, especialmente de Cu(II), e fenantrolina. Estes complexos, designados por metaloantibióticos, constituem uma estratégia promissora, dada a sua estabilidade e atividade melhorada, reportada contra estirpes resistentes.

Com este trabalho pretendeu-se explorar a utilização de metaloantibióticos de Cu(II)/FQ/phen contra estirpes Gram-positivas, nomeadamente *Staphylococcus aureus*, através da combinação de ensaios biofísicos, bioquímicos e microbiológicos. Utilizaram-se duas FQs puras - ciprofloxacina (cpx) e moxifloxacina (mxfx) - e os respetivos metaloantibióticos.

A componente biofísica do trabalho englobou o estudo de interação dos compostos com a componente membrana bacteriana, através da determinação de constantes de partição, K_p , por espectrofluorimetria, em três sistemas miméticos de *S. aureus*. Estes sistemas foram, ainda, caracterizados por anisotropia de fluorescência em modo estacionário, através da determinação de temperaturas de transição de fase, T_m . A possível interferência dos compostos na fluidez membrana foi também avaliada. Relativamente ao K_p , a interação do metaloantibiótico da moxifloxacina (Cumxfxphen) com a componente membrana revelou-se mais forte do que determinada para a mxfx pura, nos três modelos miméticos estudados. No entanto, o mesmo não se verificou para o metaloantibiótico da ciprofloxacina (Cucpxphen). Os espectros de emissão de fluorescência revelaram, para a maioria dos sistemas em estudo, um aumento da intensidade de fluorescência na presença de concentrações crescentes de lipossoma, acompanhado de um desvio batocrómico. Contrariamente à sua FQ pura e restantes compostos, o Cumxfxphen não evidenciou nenhum desvio do comprimento de onda máximo de emissão nem um aumento da sua intensidade de fluorescência na presença de concentrações de lipossoma. Pelo contrário, foi observado um fenómeno de extinção de fluorescência do Cumxfxphen na

presença de lipossomas dos três sistemas miméticos em estudo. Estes resultados sugerem que estes dois metaloantibióticos poderão ter um mecanismo de entrada diferente na membrana bacteriana, ou assente em diferentes interações. Os ensaios de caracterização dos sistemas miméticos membranares revelaram a existência de duas T_m ($T_1 \sim 10^\circ\text{C}$ e $T_2 \sim 44^\circ\text{C}$) para os sistemas sistema binário e ternário. Concluiu-se, ainda, que a presença dos vários compostos estudados afeta a fluidez membranar. A presença das FQs puras afetou de forma mais significativa o valor da T_1 nos modelos miméticos binário e ternário. Por sua vez, a presença dos metaloantibióticos alterou de forma mais significativa o valor determinado para a T_2 . Aliado à pouca alteração dos perfis anisotrópicos na presença dos vários compostos estudados, estes resultados poderão indicar uma localização preferencial dos metaloantibióticos por domínios membranares mais ricos em cardiolipina. O sistema mimético composto apenas por POPG revelou também alteração da fluidez membranar na presença dos vários compostos, com maior impacto observado na presença dos metaloantibióticos.

A segunda grande componente do presente trabalho focou-se na determinação da atividade antibiofilme dos metaloantibióticos contra biofilmes de *S. aureus* (estirpe controlo), através da realização de ensaios microbiológicos com vista à determinação da quantificação da biomassa e da viabilidade celular de biofilmes pré-formados. Os metaloantibióticos e a cpx (utilizada como FQ controlo) revelaram-se capazes de reduzir a biomassa de um biofilme pré-formado, após 24h de incubação dos compostos, o que revela uma redução da matriz extracelular do biofilme. Por sua vez, a viabilidade celular da estrutura bacteriana não revelou alterações significativas na presença dos vários compostos. Estes resultados poderão ser explicados pela complexidade da estrutura do biofilme. Apesar de se ter observado uma redução da biomassa total, a estrutura deverá apresentar-se ainda bastante robusta, o que poderá dificultar a entrada e consequentemente, a ação dos compostos, não sendo estes capazes de reduzir a viabilidade celular do biofilme. Estes resultados são, ainda, bastante preliminares, pelo que será necessário realizar estudos complementares. No entanto, os resultados dos ensaios microbiológicos sugerem que estes compostos poderão ser incorporados em terapias que envolvam a combinação destes compostos com outros que possuam atividade bactericida.

Como trabalho futuro, seria importante alargar os estudos realizados a outros metaloantibióticos. Paralelamente, a atividade antibiofilme dos metaloantibióticos deveria ser estudada contra biofilmes formados por outras estirpes (controlo e multirresistentes). O efeito destes compostos na inibição de formação de biofilmes também está por determinar, sendo importante avaliar a sua capacidade de

erradicação de biofilmes pré-formados (avaliado no presente trabalho) vs. a de inibição de formação de um biofilme. O desenvolvimento/melhoramento de metodologias com vista à determinação da localização de compostos em modelos bacterianos vivos também seria bastante útil. Por último, a citotoxicidade dos metaloantibióticos está ainda pouco descrita. Desta forma, seria importante realizar estudos mais alargados de avaliação da citotoxicidade dos compostos contra várias linhas celulares, de modo a averiguar a segurança deste tipo de terapia.

Em suma, os metaloantibióticos constituir boas alternativas às FQs puras contra infeções causadas por *S. aureus*, tal como previamente sugerido. Porém, serão necessários mais estudos de modo a expandir os conhecimentos sobre o mecanismo de entrada, biosegurança e combinação com outras famílias de fármacos. Estes estudos poderão viabilizar possíveis futuras terapias capazes de combater infeções resistentes a FQs.

5. Bibliografia

- 1- Antibiotic resistance. Who.int. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. Published 2021. Accessed June 21, 2021.
- 2- Spellberg B, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clin Infect Dis*. 2014;59 Suppl 2(Suppl 2):S71-S75. doi:10.1093/cid/ciu392
- 3- At UN, global leaders commit to act on antimicrobial resistance. Who.int. <https://www.who.int/news/item/21-09-2016-at-un-global-leaders-commit-to-act-on-antimicrobial-resistance>. Published 2021. Accessed June 21, 2021.
- 4- New York Times; 1945. Penicillin's future assays its future; p. 21. 26 June.2021.
- 5- CDC Press Releases. CDC. <https://www.cdc.gov/media/releases/2016/p0503-unnecessary-prescriptions.html>. Published 2021. Accessed June 22, 2021.
- 6- Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395(10223):507-513. doi:10.1016/S0140-6736(20)30211-7
- 7- Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study [published correction appears in *Lancet*. 2020 Mar 28;395(10229):1038] [published correction appears in *Lancet*. 2020 Mar 28;395(10229):1038]. *Lancet*. 2020;395(10229):1054-1062. doi:10.1016/S0140-6736(20)30566-3
- 8- Morgan DJ, Okeke IN, Laxminarayan R, Perencevich EN, Weisenberg S. Non-prescription antimicrobial use worldwide: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(9):692-701. doi:10.1016/S1473-3099(11)70054-8
- 9- Väänänen MH, Pietilä K, Airaksinen M. Self-medication with antibiotics--does it really happen in Europe?. *Health Policy*. 2006;77(2):166-171. doi:10.1016/j.healthpol.2005.07.001
- 10- Butler CC, Rollnick S, Pill R, Maggs-Rapport F, Stott N. Understanding the culture of prescribing: qualitative study of general practitioners' and patients' perceptions of antibiotics for sore throats. *BMJ*. 1998;317(7159):637-642. doi:10.1136/bmj.317.7159.637
- 11- Moore M, McNulty C. European Antibiotic Awareness Day 2012: TARGET antibiotics through guidance, education, and tools. *Br J Gen Pract*. 2012;62(605):621-622. doi:10.3399/bjgp12X659132
- 12- Manyi-Loh C, Mamphweli S, Meyer E, Okoh A. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules*. 2018;23(4):795. Published 2018 Mar 30. doi:10.3390/molecules23040795

- 13- Van den Honert M, Gouws P, Hoffman L. Importance and implications of antibiotic resistance development in livestock and wildlife farming in South Africa: A Review. *South African Journal of Animal Science*. 2018;48(3):401. doi:10.4314/sajas.v48i3.1
- 14- Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(18):5649-5654. doi:10.1073/pnas.1503141112
- 15- Who.int.<https://www.who.int/antimicrobial-resistance/policy-package-july2016.pdf?ua=1>. Published 2021. Accessed June 22, 2021.
- 16- *The Evolving Threat of Antimicrobial Resistance: Options for Action*. Geneva: World Health Organization; 2012.
- 17- Shlaes DM, Sahm D, Opiela C, Spellberg B. The FDA reboot of antibiotic development. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(10):4605-4607. doi:10.1128/AAC.01277-13
- 18- Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*. 2014;53(10):1565-1574. doi:10.1021/bi5000564
- 19- Pham T, Ziora Z, Blaskovich M. Quinolone antibiotics. *Medchemcomm*. 2019;10(10):1719-1739. doi:10.1039/c9md00120d
- 20- WARD-MCQUAID JF, JICHLINSKI D, MACIS R. NALIDIXIC ACID IN URINARY INFECTIONS. *Br Med J*. 1963;2(5368):1311-1314. doi:10.1136/bmj.2.5368.1311
- 21- Bisacchi G. Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded “Discovery Story”. *J Med Chem*. 2015;58(12):4874-4882. doi:10.1021/jm501881c
- 22- King DE, Malone R, Lilley SH. New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am Fam Physician*. 2000;61(9):2741-2748.
- 23- Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*. 2014 Aug;22(8):438-445. DOI: 10.1016/j.tim.2014.04.007.
- 24- Bush N, Diez-Santos I, Abbott L, Maxwell A. Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Molecules*. 2020;25(23):5662. doi:10.3390/molecules25235662
- 25- Hopkins K, Davies R, Threlfall E. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents*. 2005;25(5):358-373. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.02.006
- 26- Yan J, Wu J, Ko W, Tsai S. O207 plasmid-mediated quinolone Resistance Determinants, QnrA, QnrB, and Qnrs, among clinical isolates Of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007;29. doi:10.1016/s0924-8579(07)70140-1
- 27- Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(8):5638-5642. doi:10.1073/pnas.082092899

- 28- Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(9):2233-2241. doi:10.1128/aac.44.9.2233-2241.2000
- 29- Ferreira M, Bessa LJ, Sousa CF, et al. Fluoroquinolone Metalloantibiotics: A Promising Approach against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(9):3127. Published 2020 Apr 30. doi:10.3390/ijerph17093127
- 30- Sousa I, Claro V, Pereira J et al. Synthesis, characterization and antibacterial studies of a copper(II) levofloxacin ternary complex. *J Inorg Biochem.* 2012;110:64-71. doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.02.003
- 31- Saraiva R, Lopes S, Ferreira M et al. Solution and biological behaviour of enrofloxacin metalloantibiotics: A route to counteract bacterial resistance?. *J Inorg Biochem.* 2010;104(8):843-850. doi:10.1016/j.jinorgbio.2010.03.017
- 32- GAMEIRO P, RODRIGUES C, BAPTISTA T, SOUSA I, DECASTRO B. Solution studies on binary and ternary complexes of copper(II) with some fluoroquinolones and 1,10-phenanthroline: Antimicrobial activity of ternary metalloantibiotics. *Int J Pharm.* 2007;334(1-2):129-136. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.10.035
- 33- Feio M, Sousa I, Ferreira M et al. Fluoroquinolone–metal complexes: A route to counteract bacterial resistance?. *J Inorg Biochem.* 2014;138:129-143. doi:10.1016/j.jinorgbio.2014.05.007
- 34- Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(5):a000414. doi:10.1101/cshperspect.a000414
- 35- Epand RM, Walker C, Epand RF, Magarvey NA. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858(5):980-987. doi:10.1016/j.bbamem.2015.10.018
- 36- Gram Positive vs Gram Negative. from Technology Networks. <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/gram-positive-vs-gram-negative-323007>. Published 2021. Accessed June 22, 2021.
- 37- Epand R, Epand R. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2009;1788(1):289-294. doi:10.1016/j.bbamem.2008.08.023
- 38- Brown S, Santa Maria JP Jr, Walker S. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2013;67:313-336. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155620
- 39- Shiraishi T, Yokota S, Fukiya S, Yokota A. Structural diversity and biological significance of lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria: focusing on beneficial probiotic lactic acid bacteria. *Biosci Microbiota Food Health.* 2016;35(4):147-161. doi:10.12938/bmfh.2016-006
- 40- Kusecek B, Wloch H, Mercer A, et al. Lipopolysaccharide, capsule, and fimbriae as virulence factors among O1, O7, O16, O18, or O75 and K1, K5, or K100

- Escherichia coli. *Infect Immun*. 1984;43(1):368-379. doi:10.1128/iai.43.1.368-379.1984
- 41- Slusky JS. Outer membrane protein design. *Curr Opin Struct Biol*. 2017;45:45-52. doi:10.1016/j.sbi.2016.11.003
- 42- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. The Lipid Bilayer. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/>
- 43- Li J, Wang X, Zhang T et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J Pharm Sci*. 2015;10(2):81-98. doi:10.1016/j.ajps.2014.09.004
- 44- Aktas M, Danne L, MÃ¶ller P, Narberhaus F. Membrane lipids in Agrobacterium tumefaciens: biosynthetic pathways and importance for pathogenesis. *Front Plant Sci*. 2014;5. doi:10.3389/fpls.2014.00109
- 45- Vamparys L, Gautier R, Vanni S, et al. Conical lipids in flat bilayers induce packing defects similar to that induced by positive curvature. *Biophys J*. 2013;104(3):585-593. doi:10.1016/j.bpj.2012.11.3836
- 46- Alwarawrah M, Dai J, Huang J. Modification of Lipid Bilayer Structure by Diacylglycerol: A Comparative Study of Diacylglycerol and Cholesterol. *J Chem Theory Comput*. 2012;8(2):749-758. doi:10.1021/ct200790q
- 47- Filippov A, Orädd G, Lindblom G. Lipid lateral diffusion in ordered and disordered phases in raft mixtures. *Biophys J*. 2004;86(2):891-896. doi:10.1016/S0006-3495(04)74164-8
- 48- Ge M, Gidwani A, Brown HA, Holowka D, Baird B, Freed JH. Ordered and disordered phases coexist in plasma membrane vesicles of RBL-2H3 mast cells. An ESR study. *Biophys J*. 2003;85(2):1278-1288. doi:10.1016/S0006-3495(03)74563-9
- 49- Sodt AJ, Sandar ML, Gawrisch K, Pastor RW, Lyman E. The molecular structure of the liquid-ordered phase of lipid bilayers. *J Am Chem Soc*. 2014;136(2):725-732. doi:10.1021/ja4105667
- 50- Phase Transition Temperatures for Glycerophospholipids | Avanti Polar Lipids. Avanti Polar Lipids. <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps>. Published 2021. Accessed June 22, 2021.
- 51- Lopes S, Neves C, Eaton P, Gameiro P. Cardiolipin, a Key Component to Mimic the E. coli Bacterial Membrane in Model System Membranes. *Biophys J*. 2011;100(3):626a. doi:10.1016/j.bpj.2010.12.3600
- 52- Österlund N, Luo J, Wärmländer SKTS, Gräslund A. Membrane-mimetic systems for biophysical studies of the amyloid- β peptide. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2019;1867(5):492-501. doi:10.1016/j.bbapap.2018.11.005
- 53- Kalappurakkal JM, Sil P, Mayor S. Toward a new picture of the living plasma membrane. *Protein Sci*. 2020;29(6):1355-1365. doi:10.1002/pro.3874

- 54- Bernardino de la Serna J, Schütz GJ, Eggeling C, Cebecauer M. There Is No Simple Model of the Plasma Membrane Organization. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:106. Published 2016 Sep 29. doi:10.3389/fcell.2016.00106
- 55- Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013;8(1). doi:10.1186/1556-276x-8-102
- 56- Chinnagounder Periyasamy P, Leijten J, Dijkstra P, Karperien M, Post J. Nanomaterials for the Local and Targeted Delivery of Osteoarthritis Drugs. *Journal of Nanomaterials.* 2012;2012:1-13. doi:10.1155/2012/673968
- 57- Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013;8(1):102. Published 2013 Feb 22. doi:10.1186/1556-276X-8-102
- 58- Czogalla A, Grzybek M, Jones W, Coskun Ü. Validity and applicability of membrane model systems for studying interactions of peripheral membrane proteins with lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2014;1841(8):1049-1059. doi:10.1016/j.bbalip.2013.12.012
- 59- Sávia Caldeira de Araújo Lopes, Cristiane dos Santos Giuberti, Talita Guieiro Ribeiro Rocha, Diêgo dos Santos Ferreira, Elaine Amaral Leite and Mônica Cristina Oliveira (May 9th 2013). Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs, Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches, Letícia Rangel, IntechOpen, DOI: 10.5772/55290. Available from: <https://www.intechopen.com/books/cancer-treatment-conventional-and-innovative-approaches/liposomes-as-carriers-of-anticancer-drugs>
- 60- Tunuguntla R, Bangar M, Kim K, Stroeve P, Ajo-Franklin CM, Noy A. Lipid bilayer composition can influence the orientation of proteorhodopsin in artificial membranes. *Biophys J.* 2013;105(6):1388-1396. doi:10.1016/j.bpj.2013.07.043
- 61- López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(7):a000398. doi:10.1101/cshperspect.a000398
- 62- Hannah Simmons, M., 2021. *Biofilm Analysis: Tools and Techniques.* [online] News-Medical.net. Available at: <<https://www.news-medical.net/life-sciences/Biofilm-Analysis-Tools-and-Techniques.aspx>> [Accessed 23 June 2021].
- 63- Muhammad, M., Idris, A., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X. and Huang, T., 2020. Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- 64- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):95-108. doi:10.1038/nrmicro821
- 65- Donlan RM. Biofilms on central venous catheters: is eradication possible?. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;322:133-161. doi:10.1007/978-3-540-75418-3_7

- 66- Hatt JK, Rather PN. Role of bacterial biofilms in urinary tract infections. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:163-192. doi:10.1007/978-3-540-75418-3_8
- 67- Lopez, D., Vlamakis, H. and Kolter, R., 2010. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(7), pp.a000398-a000398.
- 68- Saini R, Saini S, Sharma S. Biofilm: A dental microbial infection. *J Nat Sci Biol Med*. 2011;2(1):71-75. doi:10.4103/0976-9668.82317
- 69- Chapter 11 - Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges. In: *Nanomaterials for Food Applications*.
- 70- Ferreira M, Gameiro P. Ciprofloxacin metalloantibiotic: An effective antibiotic with an Influx Route strongly dependent on LIPID INTERACTION? *The Journal of Membrane Biology*. 2014;248(1):125-136. doi:10.1007/s00232-014-9749-6
- 71- Thermofisher. 2021. *Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit*. [online] Available at: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88282#/88282>> [Accessed 28 August 2021].
- 72- Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria - A review. *Acta Histochem*. 2018;120(4):303-311. doi:10.1016/j.acthis.2018.03.007
- 73- Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. Edn, New York: Springer Science+Business Media; 2010.
- 74- Sigman, D. S., Graham, D. R., D'Aurora, V. & Stern, A. M. Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline . cuprous complex. Inhibition of Escherichia coli DNA polymerase I. *Journal of Biological Chemistry* 254, 12269-12272 (1979)
- 75- Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria - A review. *Acta Histochem*. 2018;120(4):303-311. doi:10.1016/j.acthis.2018.03.007
- 76- Kulig W, Jurkiewicz P, Olżyńska A et al. Experimental determination and computational interpretation of biophysical properties of lipid bilayers enriched by cholesteryl hemisuccinate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2015;1848(2):422-432. doi:10.1016/j.bbamem.2014.10.032
- 77- Kulig W, Olżyńska A, Jurkiewicz P et al. Cholesterol under oxidative stress—How lipid membranes sense oxidation as cholesterol is being replaced by oxysterols. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015;84:30-41. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.006
- 78- Bui T, Suga K, Umakoshi H. Roles of Sterol Derivatives in Regulating the Properties of Phospholipid Bilayer Systems. *Langmuir*. 2016;32(24):6176-6184. doi:10.1021/acs.langmuir.5b04343
- 79- Ives A, Ribeiro D, Horta M, Lima J, Nunes C, Reis S. The daunorubicin interplay with mimetic model membranes of cancer cells: A biophysical interpretation.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2017;1859(5):941-948. doi:10.1016/j.bbamem.2017.01.034
- 80- Yun J, Lee H, Ko H, Woo E, Lee D. Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2015;1848(2):695-701. doi:10.1016/j.bbamem.2014.11.019
- 81- Keksel N, Bussmann H, Unger M et al. St John's wort extract influences membrane fluidity and composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in rat C6 glioblastoma cells. *Phytomedicine*. 2019;54:66-76. doi:10.1016/j.phymed.2018.06.013
- 82- Pávez P, Herrera B, Toro-Labbé A, Encinas MV. Structure and medium effects on the photochemical behavior of nonfluorinated quinolone antibiotics†. *Photochemistry and Photobiology*. 2007;83(3):511-519. doi:10.1562/2006-08-21-ra-1009
- 83- Lopes SC, Ribeiro C, Gameiro P. A new approach to COUNTERACT Bacteria resistance: A comparative study Between moxifloxacin and a new moxifloxacin derivative in different model systems of bacterial membrane. *Chemical Biology & Drug Design*. 2012;81(2):265-274. doi:10.1111/cbdd.12071
- 84- Ribeiro C, Lopes SC, Gameiro P. New insights into the Translocation route of Enrofloxacin and Its Metalloantibiotics. *The Journal of Membrane Biology*. 2011;241(3):117-125. doi:10.1007/s00232-011-9368-4
- 85- Pham TDM, Ziora ZM, Blaskovich MAT. Quinolone antibiotics. *Medchemcomm*. 2019;10(10):1719-1739. Published 2019 Jun 28. doi:10.1039/c9md00120d
- 86- Overview of Antibacterial Drugs By Brian J. Werth, By, Werth BJ, Last full review/revision May 2020| Content last modified May 2020. Overview of antibacterial drugs - infectious diseases. MSD Manual Professional Edition. <https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/bacteria-and-antibacterial-drugs/overview-of-antibacterial-drugs#v39350938>. Accessed September 19, 2021.
- 87- Who publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. World Health Organization. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Accessed September 23, 2021.
- 88- Torcato IM, Huang Y-H, Franquelim HG, et al. Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 AND RW-BP100, with activity Against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2013;1828(3):944-955. doi:10.1016/j.bbamem.2012.12.002
- 89- Brown JS, Mohamed ZJ, Artim CM, et al. Antibacterial isoamphipathic oligomers highlight the importance of multimeric lipid aggregation for antibacterial potency. *Communications Biology*. 2018;1(1). doi:10.1038/s42003-018-0230-4

- 90- Ferreira M, Gameiro P. Fluoroquinolone-Transition metal COMPLEXES: A strategy to Overcome bacterial resistance. *Microorganisms*. 2021;9(7):1506. doi:10.3390/microorganisms9071506
- 91- Ferreira M, Sousa CF, Gameiro P. Fluoroquinolone Metalloantibiotics to Bypass antimicrobial Resistance MECHANISMS: DECREASED Permeation Through Porins. *Membranes*. 2020;11(1):3. doi:10.3390/membranes11010003
- 92- Torcato IM, Huang Y-H, Franquelim HG, et al. Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 AND RW-BP100, with activity Against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2013;1828(3):944-955. doi:10.1016/j.bbamem.2012.12.002
- 93- Jameson D, Croney J. Fluorescence polarization: Past, present and future. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2003;6(3):167-176. doi:10.2174/138620703106298347