

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

CAROLYNE FERREIRA DUMONT

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE COMPLEXOS DE COBRE EM
*Campylobacter jejuni***

**UBERLÂNDIA – MG
2021**

CAROLYNE FERREIRA DUMONT

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE COMPLEXOS DE COBRE EM
Campylobacter jejuni

Projeto de pesquisa apresentado à coordenação do curso graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Torres de Melo

UBERLÂNDIA – MG
2021

CAROLYNE FERREIRA DUMONT

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE COMPLEXOS DE COBRE EM *Campylobacter jejuni*

Projeto de pesquisa apresentado a coordenação do curso graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Uberlândia,

24 de Março de

2022

Banca Examinadora



Prof^ª. Dr^ª. Roberta Torres de Melo
Universidade Federal de Uberlândia/MG



Prof^ª. Dr^ª. Daise Aparecida Rossi
Universidade Federal de Uberlândia/MG



Msc. Micaela Guidotti Takeuchi
Universidade Federal de
Uberlândia/MG

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por toda a força que me proporcionou durante esses anos, fazendo com que eu não deixasse de tentar e continuar.

Agradeço eternamente aos meus pais, Alberto Santos e Argélia Maria, obrigada por terem acreditado em mim! Vocês me deram a base para que eu pudesse realizar meu sonho!

Agradeço a meu marido, Bruno Rodrigues, pelo apoio nas horas mais difíceis e por ter ajudado a trilhar meu caminho, pelas palavras de consolo, pelo suporte e pela torcida!

Ao meu filho Gabriel Rodrigues, pela paciência, pelas palavras que guardarei em meu coração: “Mamãe, vai pra UFU mas não demora.”. Minha eterna gratidão! Obrigada por ser tão iluminado!

À minha orientadora, pelo suporte para que este e muitos outros trabalhos pudessem ser realizados. Obrigada professora pelos ensinamentos. Sempre a levarei como exemplo.

A Micaela Guidotti por toda a persistência, ensinamentos laboratoriais e parceria. Jamais esquecerei a sua força de vontade. Continuaremos caminhando juntas para mais projetos.

Ao LABIO, em especial a professora Daise, professora Belchiolina, Fernanda, Mohana, obrigada pela paciência, pelo companheirismo, pela troca de experiência.

Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, em especial ao professor Wendell pelo fornecimento dos compostos utilizados neste estudo.

Ao Laboratório Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (LMIQ-UFU) pela parceria na visualização das amostras.

Agradeço ao CNPq que proporcionou a realização deste trabalho.

A todos que de alguma maneira colaboraram com a realização deste trabalho, minha mais sincera e eterna gratidão!

RESUMO

Campylobacter jejuni é o principal patógeno envolvido em gastroenterites de origem alimentar no mundo. Seu controle torna-se mais difícil com o aumento acentuado da resistência antimicrobiana e a aquisição da forma sésil. Sabe-se que a criação de novos agentes antibacterianos não tem acompanhado o desenvolvimento de mecanismos de resistência bacterianos, o que demanda a intensa pesquisa por produtos com novos mecanismos de ação, que não sejam reconhecidos pelas bactérias. Atualmente, estudos têm demonstrado a elevada eficácia de complexos de cobre (Cu) no tratamento de células cancerígenas e como nova estratégia antimicrobiana. Dessa forma, nosso estudo visou avaliar a eficácia de dois tipos de complexos de cobre ([Cu(BTA)(Phen)ClO₄] e [Cu(BTA)(Phen)NO₃]), genericamente denominados CBP-01 e CBP-02, como agente biocida das formas livre e sésil em *C. jejuni*, além de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do composto necessária para eliminação do patógeno. Foram testadas 14 cepas de *C. jejuni*, isoladas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2017), sob a ação de compostos de cobre nas formas livre e sésil pela técnica de CIM e visualizadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV) para análise ultraestrutural. Todas as cepas mostraram-se susceptíveis à ação dos compostos, sendo que a CIM determinada para a forma planctônica foi inferior quando comparado a forma sésil, com valores cepa dependentes. Para o composto CBP-01, a forma planctônica foi inibida com uma concentração média de 13,02 µM, enquanto a forma sésil necessitou de uma concentração média de 107,5 µM. Para o composto CBP-02, a CIM para a forma planctônica foi de 196,9 µM, significativamente maior que o necessário para o composto CBP-01 na mesma forma, e 259,4 µM para os biofilmes. Para CBP-01, 10/14 cepas foram controladas com valores inferiores a 200 µM e 6/14 foram inibidas em concentração maior que 400 µM com CBP-02. Na MEV, os biofilmes tratados com o composto CBP-01 nas concentrações 100 e 400 µM apresentaram sinais de apoptose celular ou desintegração, degeneração da matriz, ausência de poros e exposição bacteriana, mais evidentes na maior concentração testada. De maneira geral CBP-01 (perclorato) apresentou maior eficácia, mas ambos os complexos sintetizados demonstraram boa atividade antibacteriana e alta susceptibilidade para a forma planctônica e, portanto, são candidatos promissores para o uso no controle de *C. jejuni* nas áreas médica e veterinária.

Palavras-Chave: Avicultura. Biocida. Campilobacteriose. Compostos de cobre (Cu). Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Campylobacter jejuni is the most important pathogen involved in foodborne gastroenteritis worldwide. Their control becomes more difficult with the accentuated increase in antimicrobial resistance and acquisition of sessile form. It is known that development of new antibacterial agents has not kept up with the development of bacterial resistance mechanisms, which demands intense research for products with new action mechanisms that are not recognized by the bacteria. Currently, studies have demonstrated the high efficacy of copper (Cu) complexes in the treatment of cancer cells and as a new antimicrobial strategy. Thus, our study aimed to evaluate the efficacy of two types of copper complexes ([Cu(BTA)(Phen)ClO₄] and [Cu(BTA)(Phen)NO₃]), generically called CBP-01 and CBP-02, as a biocidal agent for free and sessile forms in *C. jejuni*, and to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the compound necessary to eliminate the pathogen. Fourteen strains of *C. jejuni*, isolated by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (2017), were tested under the action of copper compounds in free and sessile forms by the MIC technique and visualized in Scanning Electron Microscopy (SEM) for ultrastructural analysis. All strains were susceptible to the action of the compounds, and the MIC determined for the planktonic form was lower when compared to the sessile form, with strain dependent values. For the complex CBP-01, the planktonic form was inhibited with an average concentration of 13.02 μ M, while the sessile form required a higher concentration, average 107.5 μ M. For compound CBP-02, the inhibitory concentration required for the planktonic form was 196.9 μ M, significantly higher than that required for compound CBP-01 in the same form, and 259.4 μ M for the sessile form. For CBP-01, 10/14 were controlled at values lower than 200 μ M and 6/14 were inhibited at concentration equivalent to 400 μ M with CBP-02. On SEM, biofilms treated with the CBP-01 compound at concentrations 100 and 400 μ M showed signs of cell apoptosis or disintegration, matrix degeneration, absence of pores and bacterial exposure, most evident at the highest concentration tested. Overall, CBP-01 (perchlorate) showed higher efficacy, but both synthesized complexes showed good antibacterial activity and high susceptibility to the planktonic form and are therefore promising candidates for use in the control of *C. jejuni* in the medical and veterinary fields.

Key Words: Aviculture. Biocidal. Campylobacteriosis. Cooper (Cu) complexes. Antimicrobial Resistance.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	9
2.1. Objetivo Geral.....	10
2.2. Objetivos Específicos	10
3. JUSTIFICATIVA	10
4. REFERENCIAL TEÓRICO	11
4.1. <i>Campylobacter</i> e campilobacteriose	11
4.2. Resistência antimicrobiana e perfil apresentado por <i>Campylobacter jejuni</i>	13
4.3. Complexos metálicos e o controle da resistência.....	14
5. METODOLOGIA	16
5.1. Origem do composto	16
5.2. Origem dos patógenos.....	17
5.3. Reativação das linhagens bacterianas	17
5.4. Formação do biofilme	17
5.5. Concentração Inibitória e Bactericida Mínimas (CIM e CBM).....	17
5.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	18
5.7. Análise estatística	19
6. RESULTADOS	19
7. DISCUSSÃO.....	23
8. CONCLUSÕES.....	26
9. REFERÊNCIAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio é fundamental para a economia brasileira, respondendo por 27% do Produto Interno Bruto (PIB) e 48% do total de exportações nacionais. Tais valores colocam o Brasil como 4º maior exportador mundial de *commodities* agrícolas, movendo cifras bilionárias e gerando milhares de postos de trabalho no país (CNA, 2021). A avicultura, dentro desse contexto, é uma atividade de destaque do setor pecuário, com o Brasil ocupando a quarta colocação no ranking internacional de produtores da carne de frango e a primeira no de exportadores, além de ser a carne mais consumida pelo mercado interno (ABPA, 2020). Durante as diferentes etapas de processamento dos alimentos, desde a produção animal, o pré-abate, o abate e beneficiamento, até a manipulação para o consumo doméstico, os produtos são suscetíveis à contaminação cruzada, que representa o principal fator de risco para o aumento das taxas de infecção alimentar (GRANT; HASHEM; PARVEEN, 2016). Portanto, o controle sanitário é um parâmetro essencial para garantia de qualidade e inocuidade do produto e para a manutenção das relações de comércio internacional.

Bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) são responsáveis por gerar efeitos econômicos diretos na avicultura e no setor hospitalar (RO, 2020). Entre estas, *C. jejuni* destaca-se como o principal patógeno envolvido nas gastroenterites de origem alimentar no continente europeu e nos Estados Unidos, sendo a principal fonte de infecção relatada o consumo de carne de frango crua ou mal cozida (CDC, 2019; NATSOS et al., 2018). Nos humanos, a campilobacteriose pode causar doenças com diferentes níveis de gravidade, sendo mais comuns os casos que apresentam quadro de gastroenterite autolimitante, com sintomas associados a diarreia, dor abdominal, febre, dor de cabeça, vômitos e náusea, surgindo entre dois e cinco dias após a ingestão (CDC, 2019). No entanto, a doença torna-se mais complexa quando observada a Síndrome de Guillain-Barré, uma polineuropatia imunomediada que leva à desmielinização de nervos periféricos associados a uma paralisia flácida e, ocasionalmente, à morte (HEIKEMA et al., 2021).

Somado a toda essa problemática, temos a questão da aquisição da forma de vida sésil por esse micro-organismo, que garante ainda maior capacidade de sobrevivência a condições adversas. Essas formas de vida são chamadas de biofilmes e compreendem comunidades bacterianas que se agrupam e produzem uma matriz extracelular constituída principalmente por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, que fornecem estabilidade mecânica ao biofilme e medeiam sua adesão às superfícies, de maneira a manter a nutrição e hidratação das células e promove proteção contra agentes antimicrobianos

(ELGAMOUDI; KOROLIK, 2021a; FLEMMING; WINGENDER, 2010; SEVIOUR et al., 2019).

A resistência aos antimicrobianos é mundialmente reconhecida como um dos maiores problemas de saúde pública (CDC, 2021b; EFSA, 2021). Dados divulgados pelo Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) e pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) revelam que os antimicrobianos usados para tratar doenças zoonóticas, como campilobacteriose, tornam-se cada vez menos eficazes. *C. jejuni* já apresenta-se resistente à azitromicina (28%) (CDC, 2019) e ciprofloxacina (59,3%) (EFSA, 2020), antimicrobianos de escolha no tratamento de infecções causadas por essa bactéria (CDC, 2021a; EFSA, 2021).

C. jejuni apresenta elevada importância a nível zoonótico e na cadeia produtiva avícola, além de possuir caráter de multirresistência antimicrobiana e contribuir para a disseminação deste perfil no ambiente pela transferência horizontal de genes que conferem resistência às principais classes como quinolonas, penicilinas e/ou macrolídeos (CASAGRANDE PROIETTI et al., 2018, 2020; ELHADIDY et al., 2020; GARDNER; OLSON, 2012).

Frente a este cenário, a busca por agentes antimicrobianos mais potentes para o controle e tratamento deste micro-organismo é urgente. Os complexos de cobre recebem uma posição de destaque devido aos resultados promissores como agentes quimioterápicos (ALMEIDA et al., 2015). O cobre é um oligoelemento essencial, importante para o funcionamento de várias enzimas envolvidas no metabolismo energético, respiração e síntese de DNA na célula (POLLONI et al., 2019). Todos os complexos de cobre são coloridos, não higroscópicos, estáveis ao ar e à luz e solúvel em solventes orgânicos. Seus efeitos em células tumorais são exibidos por meio da capacidade de inibir o crescimento da linha celular de leucemia mielóide crônica além de reduzir significativamente a viabilidade celular de sarcoma (ALMEIDA et al., 2015; POLLONI et al., 2019). Estes compostos também já demonstraram atividade antagonista contra *Trypanosoma cruzi* (PAIXÃO et al., 2020). Ao considerar a eficácia já apresentada no uso dos complexos de cobre, testou-se nesse estudo a eficiência dos compostos [(1,10-phenanthroline)-(4,4,4-trifluoro-1-phenylbutane-1,3-dionato)(ClO⁻)], genericamente denominado CBP-01, e [(1,10-phenanthroline)-(4,4,4-trifluoro-1-phenylbutane-1,3-dionato)(NO₃)], denominado CBP-02, no controle de *C. jejuni* nas formas livre e séssil.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atuação de dois complexos de cobre no controle de *C. jejuni* nas formas livre e séssil, como alternativa ao desafio da multirresistência observada no panorama global atual.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Avaliar a capacidade de formação de biofilmes de 14 linhagens de *C. jejuni*;
- II. Testar o efeito dos compostos de Cu CBP-01 e CBP-02 no controle do patógeno na forma plactônica;
- III. Determinar a Concentração Inibitória Mínima necessária para o controle dos biofilmes produzidos;
- IV. Caracterizar a ultraestrutura formada do biofilme antes e após o tratamento com o complexo CBP-01 por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- V. Determinar estatisticamente a melhor concentração de ambos os agentes químicos para garantir o controle do patógeno testado.

3. JUSTIFICATIVA

Devido a posição de destaque do Brasil na avicultura, o país busca atender as normas sanitárias nacionais e internacionais a fim de se enquadrar aos padrões estabelecidos, buscando a segurança alimentar (FAGUNDES DE CASTRO et al., 2021). Para tanto, o controle e monitoramento de micro-organismos zoonóticos é fundamental, e compõe um dos desafios sanitários para a adequação do país no *status* sanitário internacional. *C. jejuni* é um patógeno emergente e principal responsável por casos de gastroenterite alimentar a nível mundial, atribuídos ao consumo ou manuseio de carne de aves crua ou mal cozida (GARDNER; OLSON, 2018). Apesar da escassez de dados completos, pesquisas demonstraram que é alta a incidência de *C. jejuni* em carcaças de frango no Brasil (BESSA et al., 2020; MELO et al., 2019; RODRIGUES et al., 2021). Há como agravante, a descrição de cepas com alto potencial patogênico devido a genes de resistência, de virulência e a capacidade de formar biofilmes e adquirir a forma viável mas não cultivável (VNC) (MELO et al., 2017). A troca de genes é o principal mecanismo de difusão da resistência na espécie

(MA; KONKEL; LU, 2021), intensificado pelo uso indevido e excessivo de antimicrobianos (ANDERSSON et al., 2020). Adicionalmente, ao adquirir a forma sésil, *C. jejuni* garante sua sobrevivência no ambiente e no hospedeiro, por ficar menos suscetível aos mecanismos de defesa antimicrobianos (TACCONELLI et al., 2017). Diante deste cenário, é urgente a melhoria dos produtos existentes e aceleração no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, que possam atuar não apenas nos patógenos, mas também na matriz extracelular de seus biofilmes. O potencial terapêutico e relacionado ao controle oncológico já apresentado no uso de complexos de Cu em diversas aplicações, nos incentivou a testar a suscetibilidade de *C. jejuni* na forma sésil a estes compostos, como possível medida de tratamento e de controle nas áreas médica e veterinária.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 *Campylobacter* e campilobacteriose

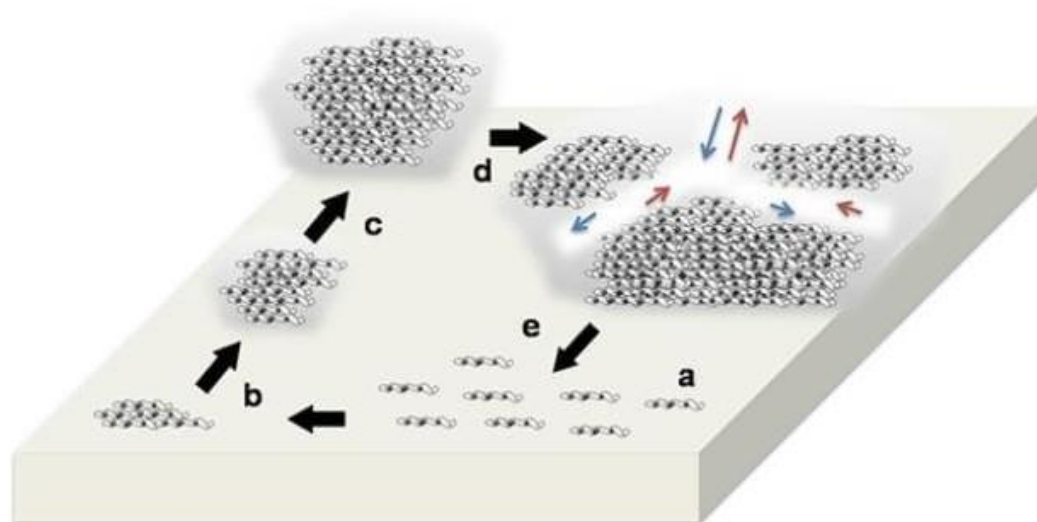
O gênero *Campylobacter* é composto por bacilos curtos de formato curvo espiralado, gram-negativos, medindo de 0,2-0,8 μm x 0,5- 5 μm , fastidiosos, não formadores de esporos, com um flagelo em uma ou ambas as extremidades, com exceção das espécies *C. gracilis* (imóvel) e *C. showae* (flagelos múltiplos), e microaerófilos. As espécies *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, são as principais causadoras de gastroenterite humana e são termófilas, catalase e oxidase positivas (VIANA DA SILVA, 2017).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero, *C. jejuni* destaca-se como principal causa de gastroenterite alimentar, por ser o patógeno mais reportado em países desenvolvidos (PARK et al., 2020). A campilobacteriose é associada principalmente a ingestão de carne de aves crua ou mal cozinhada, representando cerca de 20 a 40% dos casos em países onde existem dados disponíveis (CDC, 2021a; VIANA DA SILVA, 2017). Seu curso é geralmente autolimitado e a maioria das pessoas infectadas se recuperam sem tratamento específico. No entanto, a terapia antimicrobiana é necessária para pacientes considerados de alto risco com infecções graves ou de longa duração, como pacientes imunossuprimidos e idosos (CDC, 2019). A infecção por *C. jejuni* também é considerada um dos principais precedentes para o desenvolvimento da condição autoimune determinada pela Síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma grave neuropatia que acomete um a cada mil casos reportados de campylobacteriose (CDC, 2019; PARK et al., 2020). A Síndrome de Guillain-Barré (SGB) é uma polineuropatia desmielinizante aguda que acomete nervos periféricos e nervos cranianos, provocando parestesia simétrica e ascendente. É decorrente da semelhança entre

epítomos de micro-organismos com os nervos periféricos, capazes de desencadear o ataque autoimune e consequente desmielinização (SALVI, 2021).

Como agravante, a aquisição da forma sésil aumenta significativamente a capacidade de *C. jejuni* de sobreviver em condições extremas (BROWN et al., 2014; JOSHUA et al., 2006). Biofilmes são conjuntos de células microbianas aderidas a superfícies bióticas ou abióticas envoltas por uma matriz extracelular, constituída principalmente por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos e lipídeos, que fornecem estabilidade mecânica às células bacterianas sésseis e medeiam sua adesão às superfícies, mantêm a nutrição e hidratação das células e promove proteção contra agentes antimicrobianos se comparada às células em estado planctônico (**Figura 1**) (FLEMMING; WINGENDER, 2010; SEVIOUR et al., 2019).

Figura 1: Estágios de formação do biofilme em *Campylobacter*.



(a) Fase planctônica, (b) Fixação à superfície, (c) Micro-colônia, (d) Macro-colônia e (e) Dispersão. As setas azuis indicam o caminho percorrido pelos nutrientes, e as vermelhas pelas excretas, dentro dos canaliculos formados no biofilme maduro. Fonte: ROSSI et al. (2017).

Os biofilmes representam provavelmente uma das principais estratégias de sobrevivência de *C. jejuni* (MA; KONKEL; LU, 2021). Células de *Campylobacter* em biofilme sobrevivem duas vezes mais em condições atmosféricas e demonstraram maior capacidade de sobrevivência em condições aeróbicas e em ambientes que simulam a condição industrial (BRONOWSKI; JAMES; WINSTANLEY, 2014; MELO et al., 2017; REUTER et al., 2010).

Quando em biofilmes, as terapias aplicadas são menos eficazes devido à baixa

interação dos fármacos com as bactérias, visto que a matriz do biofilme funciona como uma barreira, além de facilitar a troca de genes plasmidiais de resistência aos antibióticos (FLORES, 2018). Isto é particularmente pertinente no caso de *Campylobacter* spp., incluindo *C. jejuni* e *C. coli*, que apresentam resistência intrínseca a muitos agentes antimicrobianos e realizam troca gênica com facilidade, principalmente por meio da transformação (GOLZ; STINGL, 2021).

4.2 Resistência antimicrobiana e perfil apresentado por *Campylobacter jejuni*

De acordo com o Centro de Controle de Doenças dos EUA (CDC, 2021b), bactérias e fungos resistentes a antibióticos causam mais de 2,8 milhões de infecções e 35 mil mortes a cada ano. O Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) e Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) alerta sobre o perfil resistente e multirresistente encontrado em patógenos veiculados principalmente por alimentos, a antimicrobianos usados para tratar infecções por agentes zoonóticos, como *Campylobacter* spp. resistente a estreptomicina (65,7%), ácido nalidixico (80,6%), ciprofloxacina (80,6%), tetraciclina (94,0%); *Salmonella* sp. resistente a ampicilina (27,8%), tetraciclina (28,1%), sulfamethoxazol (32,4%); e *E. coli* resistente a ampicilina (48%), ácido nalidixico (48,4%), Ciprofloxacina (52,7%), tetraciclina (35,0%) (ECDC; EFSA, 2019; ECDC, 2020; ECDC; WHO, 2022).

Os dados de resistência variam em países, de acordo com a eficiência de programas de monitoramento. Especialmente na UE e EUA, os estudos indicam aumentos nos perfis de resistência. Cepas isolados em 2019 na UE, demonstraram alto percentual de resistência em diversos países: Croácia, Luxemburgo, Holanda, Portugal e Romênia mostraram maior resistência a ciprofloxacina (90%), ácido nalidixico (88,6%) e tetraciclina (42,9%) em amostras provenientes carcaças de frango (n = 70). Na Áustria, Bélgica, Dinamarca, Luxemburgo, Holanda, Portugal os isolados foram resistentes a ciprofloxacina (68,6%), ácido nalidixico (67,6%) e tetraciclina (44%) em carne fresca de frango (n = 398). Nos países da Bélgica, Luxemburgo e Holanda, amostras de *C. jejuni* mostraram-se resistentes a ciprofloxacina (64,2%), ácido nalidixico (64,2%) e tetraciclina (52,8%) em derivados de carne de frango (n = 53) (ECDC, 2020).

Nos EUA a resistência a ciprofloxacina sofreu redução de 29% desde 2017 e as taxas de susceptibilidade são altas para as demais classes, com exceção da tetraciclina e ácido nalidixico, cujos percentuais de resistência ainda alcançam valores de 39,4% e 24,2%,

respectivamente (CDC, 2022). Estes resultados são atribuídos ao rígido controle empregado pelo programa no uso, distribuição e descarte de antibióticos, implementado na medicina humana e veterinária (CABAN; STEPNOWSKI, 2021).

No Brasil, foi instituído em 2018, o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da Agropecuária, o PAN-BR AGRO, e o Plano Nacional de Prevenção e Controle de Resistência aos Antimicrobianos, voltado para a medicina humana, que segue a estratégia de vigência de cinco anos (2018-2022), e visam o controle da disseminação de perfis de resistência no ambiente (PAN; BR; AGRO, 2021). Apesar da implementação dos programas, há escassez de dados avaliando o uso de antibióticos na pecuária e no setor da saúde. No setor avícola, o correto rastreamento do uso de antimicrobianos não é executado de forma efetiva, tanto para aqueles utilizados para fins terapêuticos ou profiláticos, quanto no que diz respeito ao monitoramento do descarte dos resíduos de antibióticos (SARAIVA, 2018). No setor hospitalar, os quadros de gastroenterites são subnotificados, e o tratamento na maior parte dos casos implementado com base na sintomatologia clínica (DIDONET, 2019). Consequentemente, o rastreamento de agentes patogênicos é deficitário, o que acentua o desconhecimento e a propagação de micro-organismos resistentes em diferentes regiões do país (MARLY APARECIDA RANTHUM, 2018).

A resistência antimicrobiana ocorre por meio de uma variedade de mecanismos, como modificação do receptor antimicrobiano, hidrólise/degradação enzimática, bombas de efluxo e impermeabilidade, e pode ser regulada por diversos genes de resistência (FOUNOU; FOUNOU; ESSACK, 2017). Micro-organismos são considerados multiresistentes quando resistentes a três ou mais classes de antibióticos (MAGIORAKOS et al., 2012). LÓPEZ- PUEYO et al. (2011) acrescentaram nesta definição duas condições: que o micro-organismo apresente resistência a mais de uma família ou grupo de antimicrobianos comumente usados, e essa resistência tenha relevância clínica (implica na ineficiência do tratamento) e epidemiológica (possibilidade de surtos epidêmicos e transmissão do mecanismo de resistência, entre outros fatores).

Além da caracterização fenotípica, o perfil de resistência envolve a presença de genes como *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM}, *tet*(*O*) e *mcr-1*, em *C. jejuni*, que conferem resistência a cefalosporinas de espectro estendido, penicilinas (β - lactâmicos) e colistina respectivamente (EFSA, 2019; HAILU et al., 2021; NGUYEN et al., 2016).

4.2 Complexos metálicos e o controle da resistência

Os antimicrobianos orgânicos tradicionais atuam principalmente em processos bioquímicos específicos, como replicação, transcrição, tradução ou alterações na parede celular (CLAUDEL; SCHWARTE; FROMM, 2020). Antimicrobianos recém-aprovados apresentam limitados benefícios clínicos sobre os tratamentos existentes e muitos que estão em desenvolvimento clínico são derivados de substâncias já conhecidas e moléculas disponíveis no mercado, e para as quais múltiplos mecanismos de resistência estão estabelecidos (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). Diante deste cenário, há uma necessidade urgente por desenvolver novas medidas mais efetivas para o controle e tratamento desses micro-organismos resistentes (CLAUDEL; SCHWARTE; FROMM, 2020).

Nos últimos anos, a química bioinorgânica passou por impressionantes avanços, especialmente em relação à química medicinal (GASSER; METZLER-NOLTE, 2012). Esforços têm sido feitos visando desenvolver drogas que usam por base os metais para tratamento de diversas doenças, como AIDS (ROGOLINO et al., 2014), câncer (MAHENDIRAN et al., 2018), síndrome metabólica (YUTAKA et al., 2011), doenças tropicais negligenciadas (NAVARRO et al., 2011) e doenças bacterianas como a tuberculose e a campilobacteriose (BARBOSA et al., 2016; DUFFY et al., 2018). Neste contexto, destacam-se os complexos de cobre devido aos resultados promissores já apresentados no tratamento do câncer além de testes recentes que demonstram seu potencial efeito antimicrobiano (ALMEIDA et al., 2015).

O cobre é um micronutriente essencial para o funcionamento de várias enzimas envolvidas no metabolismo da maior parte dos micro-organismos aeróbicos, mas é tóxico em altas concentrações, promovendo estresse oxidativo em *C. jejuni* (GARDNER; OLSON, 2018). Como um oligoelemento essencial, os sais de cobre [Cu²⁺] tendem a ser solúveis em solventes comuns, paramagnéticos e coloridos e sua geometria pode ser variada devido a sua configuração eletrônica, são fáceis de manusear, não higroscópicos, estáveis ao ar e à luz e muito reativos (ALMEIDA, 2019; POLLONI et al., 2019). As principais funções dos compostos de cobre biologicamente ativos envolvem reações redox em que o cobre reage diretamente com o oxigênio molecular ou peróxido de hidrogênio para produzir radicais livres (GALINDO- MURILLO et al., 2011).

O Cu é igualmente essencial em organismos eucarióticos, pois possui papel vital em vários processos biológicos no corpo e por isso é biocompatível, o que o torna potencialmente menos tóxico para as células de mamíferos (FESTA; THIELE, 2011;

MOLINARO et al., 2020). No organismo humano está envolvido na atividade antioxidante, síntese de colágeno, transporte de ferro e peroxidação lipídica (FESTA; THIELE, 2011). Estudos avaliando o uso de Cu em linhagens de células em paralelo a células cancerígenas demonstraram baixa citotoxicidade e boa seletividade para este micronutriente (ALMEIDA, 2019; BARBOSA et al., 2016; EASMON et al., 2001; GASSER; METZLER-NOLTE, 2012; MARIANI et al., 2021a; MOLINARO et al., 2020). O metal pode ser empregado na forma livre ou na formulação de complexados, com resultados positivos em ambas as formas. O tratamento com o Cu, sozinho ou combinado com cisplatina, reduziu o crescimento tumoral em modelos de xenoinxerto utilizando linhagens celulares humanas no tratamento de melanoma ($MIC_{50} = 77 \pm 6 \mu M$), (MARIANI et al., 2021b). Ensaios clonogênicos envolvendo células humanas de diferentes origens tumorais, compostos de cobre Cu(II) (Casiopéínas®) exibiram atividades citotóxicas notáveis com valores médios de CIM_{50} de 0,006, 0,0018, 0,001, e 0,0037 μM . Os compostos foram altamente eficazes contra o carcinoma do cólon humano e células de carcinoma do pulmão de células grandes e pequenas (EASMON et al., 2001).

Os complexos de cobre (CuII) conhecidos como Casiopéínas®, estão aceitos para testes como drogas antitumorais e outras aplicações clínicas que estão sendo desenvolvidas para estes produtos, como seu uso no tratamento da doença de Chagas, onde mostrou-se eficaz e reduziu em 64% a parasitemia no pico da infecção (PAIXÃO et al., 2020). Casiopéínas® são complexos de cobre com a fórmula geral $[Cu(N-N)(N-O)]NO_3$ e $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$ onde N–N denota uma bipyridina ou fenantrolina substituída, N–O indica α -aminoacido ou peptídeo e O–O representa acetilacetato ou salicilaldeído. Esta família de compostos apresenta atividade antiproliferativa, citotóxica, genotóxica, citostática e antitumoral (GALINDO-MURILLO et al., 2011). Os compostos $[Cu(BTA)(Phen)ClO_4]$ (CBP-01) e $[Cu(BTA)(Phen)NO_3]$ (CBP-02) foram avaliados *in vitro* e *in vivo* junto a outros complexos de Cu(II) por POLLONI et al (2019). Neste estudo é descrito a via de morte celular desencadeada pelo tratamento com CBP-01, a autofagia e apoptose, induzida de modo dependente à concentração nos testes conduzidos com células cancerígenas (Sarcoma 180) (POLLONI et al., 2019). ALMEIDA (2019) testou o potencial antimicrobiano de tais produtos e compara-os com o uso da Rifampicina, um dos fármacos de eleição no tratamento da tuberculose, e concluiu que os complexos de cobre (II) apresentaram-se como moléculas estáveis com atividade antimicrobiana promissora.

5. METODOLOGIA

5.1 Origem do composto

Os produtos testados utilizam como base o cobre e foram previamente isolados e produzidos pelo Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia de acordo com (PAIXÃO et al., 2020) até a obtenção das seguintes formulações: (1,10-phenanthroline) - (4,4,4-trifluoro-1-phenylbutane 1,3-dionato)ClO₄ e (1,10-phenanthroline)-(4,4,4- trifluoro-1-phenylbutane-1,3-dionato)NO₃, genericamente denominados [Cu(BTA)(Phen)ClO₄] e [Cu(BTA)(Phen)NO₃], que utilizam como agente estabilizante o perclorato e o nitrato, respectivamente (ALMEIDA et al., 2015). No presente estudo ambos os complexos foram identificados por CBP-01 e CBP-02, respectivamente.

5.2 Origem dos patógenos

O estudo foi realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (LEPIMOL-UFU). Foram utilizadas 14 cepas de *C. jejuni* isoladas em 2017 em estudo exploratório e gentilmente cedidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

5.3 Reativação das linhagens bacterianas

As linhagens de *C. jejuni*, foram reativadas em caldo de pré-enriquecimento seletivo Bolton (Oxoid®) com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Laborclin®) em condições de microaerofilia (Probac®), a 37°C por 44 horas $\pm$ 4 horas. Em seguida foi realizado o repique em ágar CCDA (Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base) (Oxoid®) e as placas incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente (ISO, 2006). As cepas foram avaliadas quanto a morfologia das colônias e caracterização morfotintorial pela técnica de coloração de gram.

5.4 Formação do biofilme

Para a formação do biofilme das 14 cepas de *C. jejuni*, as colônias crescidas em placas de CCDA foram utilizadas para obtenção de uma suspensão bacteriana em solução de NaCl 0,9% (Êxodo®) que foi padronizada para D.O₆₀₀ = 0,22 a 0,28. Após sucessivas lavagens a amostra foi diluída a fim de obter um inóculo com contagem final de 10⁴ UFC/ML e a suspensão bacteriana mantida em caldo Muller Hinton (Oxoid®) suplementado com 5% de *chicken juice* (CJ) para garantir a formação de biofilmes de forte intensidade. A suspensão

(200 µL) foi adicionada em placas de 96 poços e incubadas por 48 horas a 37°C em condições de microaerofilia. Posteriormente, foi feita a lavagem para a retirada das bactérias em suspensão com solução de NaCl estéril a 0,9% e manteve-se o biofilme formado na placa para tratamento com os complexos de cobre por 48 horas a 37°C em condições de microaerofilia (MELO et al., 2017).

Após a formação do biofilme, os poços foram lavados com uma solução NaCl 0,9% e a biomassa foi retirada por meio de raspagem dos poços durante 90 segundos. A suspensão celular obtida foi submetida a diluições seriadas e semeada em placas de agar CCDA para obtenção do número de UFC das células sésseis. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em três ocasiões independentes.

5.5 Concentração Inibitória e Bactericida Mínimas (CIM e CBM)

O teste de susceptibilidade antimicrobiana das cepas após a obtenção da forma séssil foi feito por meio do método de microdiluição em caldo, conforme descrito no EUCAST (2022). Resumidamente, o teste na forma planctônica baseou-se no preparo de uma suspensão bacteriana padronizada na concentração correspondente a 0,5 na escala MacFarland, e utilizou-se oito concentrações dos compostos de cobre, que compreenderam a 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, e 3,125 µM. As concentrações de CBP-01 e CBP-02 testadas foram determinadas de acordo com os resultados obtidos em teste-piloto. Após, a suspensão bacteriana foi inoculada e as microplacas contendo caldo Muller Hinton – MH (Oxoid®) suplementado com Ca^{+2} , Mg^{+2} e 5% de sangue equino hemolisado, em seguida incubados a 37°C por 48 horas em microaerofilia.

Para os biofilmes, foram utilizadas as microplacas contendo a estrutura séssil conforme descrito no item 5.4. Nelas foram acrescentados o caldo MH ajustado e enriquecido contendo as mesmas concentrações de CBP-01 e CBP-02 descritas para a forma séssil seguido da incubação a 37°C por 48 horas em microaerofilia.

A leitura foi realizada visualmente com a determinação da CIM como correspondente à menor concentração onde não foi observada turvação. Além disso, uma alíquota de 10µL de cada poço foi plaqueada em CCDA para verificar o crescimento bacteriano referente a cada concentração dos produtos (CBM).

Todos os ensaios foram feitos em três réplicas e três repetições e para controle negativo utilizou-se o meio de cultura sem adição de bactérias.

5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A visualização da morfologia dos biofilmes formados foi realizada no Laboratório Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (LMIQ-UFU). A preparação do material para análise no MEV foi realizada de acordo com BROWN et al., (2014), com modificações. Os biofilmes foram formados em pérolas de vidro de 5mm de diâmetro, respeitando-se as condições de crescimento já descritas anteriormente. Foram utilizadas duas cepas de *C. jejuni*, o grupo controle foi composto pelo meio MH (Oxoid®) suplementado com CJ acrescido da bactéria sem tratamento, e dois grupos testes compostos pelas bactérias tratadas por CBP-01 nas concentrações de 100 e 400 µM. Após a formação da biomassa, as amostras foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 2,5% de paraformaldeído em tampão PBS 0,1 M (pH7,4) durante a noite a 4°C. O fixador foi removido e as amostras lavadas três vezes com tampão PBS. As esferas foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% por duas horas e lavadas três vezes com tampão PBS. As esferas foram desidratadas em uma série de soluções de etanol (30,40, 50, 60, 70, 80 e 90% e, em seguida, três vezes a 100%) por 15 minutos para cada etapa. As amostras foram secas em CDP (Critical Drying Point) (CDP 030, Baltec, Alemanha) e como fluido de transição utilizou-se dióxido de carbono líquido, seguido de revestimento com 20nm de camada de ouro (SCD 050, Baltec, Alemanha) e visualizadas no equipamento VPZeiss Supra55 FEG SEM a 20 kV.

5.7 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à estatística descritiva com o cálculo percentual das cepas que apresentaram as diferentes CIMs para ambos os complexos em ambas as formas de vida. Nas avaliações quantitativas aplicou-se ANOVA. Todas as avaliações foram feitas com o programa Graph Pad Prism 8.0.

6. RESULTADOS

A análise visual da avaliação da capacidade formadora de biofilmes das cepas demonstrou alta intensidade de biomassa produzida, aliada ao elevado número de células sésseis (média = $1,78 \times 10^8$ UFC/mL).

Após o tratamento com os complexos I (CBP-01) e II (CBP-02) foi observado estagnação da taxa de multiplicação e do número de bactérias, determinado no teste de concentração bactericida mínima para ambas as formas de vida. De maneira geral a forma livre de *C. jejuni* foi controlada em concentrações inferiores ao compararmos à forma séssil, para ambos os compostos.

A suscetibilidade das cepas plântônicas de *C. jejuni* ao composto CBP-01 foi identificada na concentração média de $13,02 \pm 6,23 \mu\text{M}$. Já o valor médio para inibição da forma séssil foi de $107,5 \pm 39,7 \mu\text{M}$, sendo que 10/14 (71,42%) apresentaram valores de CIM iguais ou inferiores a $200 \mu\text{M}$ (Tabela 1).

Tabela 1: Frequência de CIM das formas planctônica e séssil de *C. jejuni* para CBP-01

CIM (μM)	Frequência de cepas de <i>C. jejuni</i> – n (%)	
	Forma planctônica	Forma séssil
6,25	3 (21,43)	-
12,5	7 (50)	-
25	2 (14,28)	1 (7,14)
50	1 (7,14)	3 (21,43)
100	-	3 (21,43)
200	1 (7,14)	3 (21,43)
400	-	4 (28,57)
Total	14 (100)	14 (100)
CIM ₅₀	12,5	100

Para o composto CBP-02, o valor médio de CIM para controle da forma planctônica de *C. jejuni* foi de $196,9 \pm 143,0 \mu\text{M}$, de maneira que 8/14 cepas (57,14%) foram inibidas em concentrações menores ou iguais a $50 \mu\text{M}$. Na forma séssil necessitamos de uma concentração média de $259,4 \pm 44,7 \mu\text{M}$ para garantir a remoção das bactérias, e 6/14 (41,86%) dessas cepas só foram controladas na concentração de $400 \mu\text{M}$ do composto (Tabela 2).

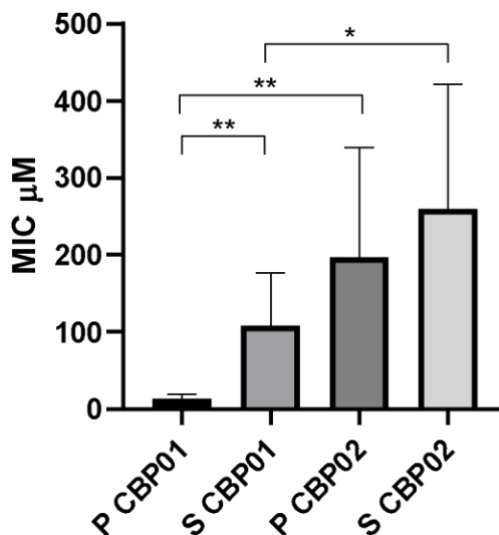
A avaliação dos valores de CIM₅₀ mostram que a concentração de CBP-02 para o controle das formas livres e sésseis de *C. jejuni* foram quatro e duas vezes maior que de CBP- 01, respectivamente (Tabelas 1 e 2).

Tabela 2: Frequência de CIM das formas planctônica e séssil de *C. jejuni* para CBP-02

CIM (μM)	Frequência de cepas de <i>C. jejuni</i> – n (%)	
	Forma planctônica	Forma séssil
25	4 (28,57)	1 (7,14)
50	4 (28,57)	4 (28,57)
100	1 (7,14)	1 (7,14)
200	5 (35,72)	2 (14,28)
400	-	6 (42,85)
Total	14 (100)	14 (100)
CIM ₅₀	50	200

Dessa forma, os resultados encontrados mostram que o composto CBP-01 (perclorato) apresenta eficiência significativamente maior quando comparado ao composto CBP-02 (nitrato). Além disso, não identificamos diferença significativa na concentração média de CBP-02 necessária para o controle tanto das formas livre e séssil (Figura 1).

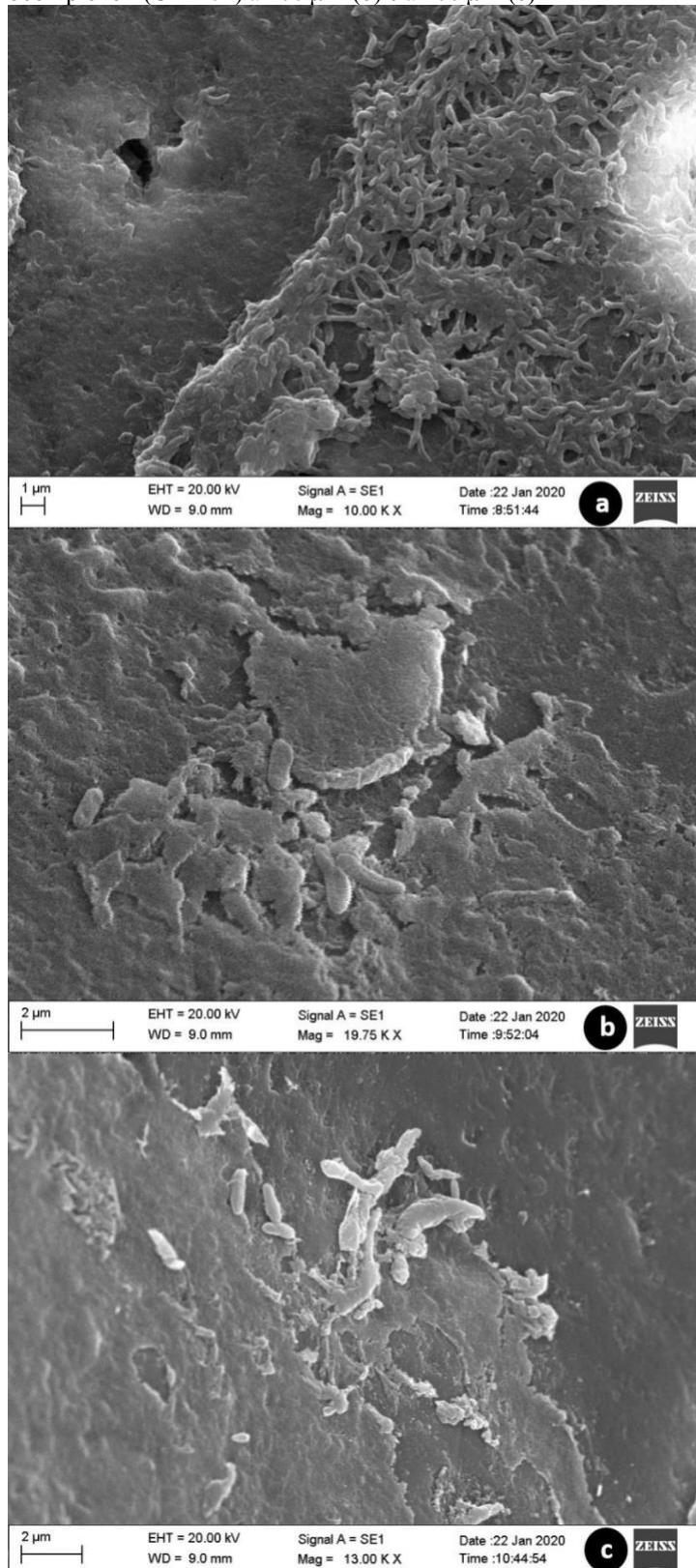
Figura 2. Concentração inibitória mínima dos complexos I e II necessária para inibição de 14 cepas de *C. jejuni* nas formas planctônica (P) e séssil (S)



P – planctônica; S – séssil; * - $p < 0,05$ pelo teste *one way Anova*; ** - $p < 0,005$ pelo teste *one way Anova*.

Os resultados das análises de MEV permitiram identificar as diferenças na estrutura da biomassa após aplicação do complexo CBP-01. Nos grupos controles de *C. jejuni* observou-se a formação de biofilmes maduros com estrutura tridimensional de matriz evidente, poros amplos, arquitetura expandida e bactérias expostas na porção superficial (Figura 2). Para a forma séssil de *C. jejuni* tratados com CBP-01 em ambas as concentrações, foi possível observar o biofilme em fase de morte celular ou desintegração, degeneração e arrasamento da matriz, ausência de poros e exposição bacteriana (Figura 3 – b, c).

Figura 3: Imagens de MEV de biofilmes suplementados com *chicken juice* de *C. jejuni* (a), tratados com o complexo I (CBP-01) a 100 μ M (b) e a 400 μ M (c)



7. DISCUSSÃO

Nossos resultados denotam a possibilidade de uso desses compostos no controle de *C. jejuni* na forma plânctônica e séssil, uma vez que as concentrações necessárias para o controle dessa bactéria são bastante inferiores aos recomendados na literatura, que indica que a Ingestão Dietética Recomendada (IDR) para cobre é de 0,9 mg para adultos (19- 50 anos), enquanto o limite superior de ingestão para este metal é de 10 mg para a mesma população (FAÚNDEZ et al., 2004).

Estudos anteriores também encontraram resultados promissores no controle de *Flavobacterium psychrophilum* e *Vibrio harveyi* BB170, em ambas as formas (livre e séssil), pela aplicação de complexos a base de cobre e ligantes clorato. A CIM obtida para *F. psychrophilum* foi de $16,1 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ para o composto na formulação $[\text{Cu}(\text{NN1})_2]\text{ClO}_4$ e $10,4 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$ para $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{ClO}_4$. Para *Vibrio harveyi* BB170 a CIM foi de $25,19 \pm 0,04$ de $[\text{Cu}(\text{NN1})_2]\text{ClO}_4$ (ALDABALDETRECU et al., 2020; SOTO-AGUILERA et al., 2021). Apesar disso, o valor encontrado em nosso estudo é comparativamente superior ao encontrado em estudo conduzido com *Trypanosoma cruzi* na forma mastigota ($\text{CIM}_{50} = 6,3 \mu\text{M}$) e amastigota ($\text{CIM}_{50} = 9,7 \mu\text{M}$) (PAIXÃO et al., 2020), uma vez que tivemos CIM_{50} equivalentes a 12,5 e 50 μM , para CBP-01 e CBP-02 respectivamente, na forma planctônica.

Estudo realizado por WOJCIECHOWSKA et al. (2020) testou dez micro-organismos na forma plânctônica. Os autores observaram que todas as cepas foram sensíveis aos complexos de Cu em $\text{CIM} \leq 15 \mu\text{M}$, de maneira que a maior atividade antibacteriana ($\text{CIM} < 5 \mu\text{M}$) foi identificada em cepas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* PCM2054, *Bacillus subtilis* PCM 2021, *Streptococcus mutans* PCM 2502, *Enterococcus hirae* PCM 2559). Já as bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* PCM 2058, *Escherichia coli* PCM 1144, *Salmonella enterica Typhimurium* PCM 2565, *Shigella flexneri* PCM 179) foram mais resistentes aos complexos (WOJCIECHOWSKA et al., 2020). É importante ressaltar que bactérias Gram negativas apresentam maior resistência aos complexos de Cu, por meio de diferentes mecanismos, como a expressão de genes (BONDARCZUK, 2013); redução do aporte; aumento do efluxo com exportação de Cu-ATPases e envolvimento de metalotioneínas para quelar os íons livres (VICENT, 2018).

Para a forma séssil identificamos a necessidade de utilização de maiores concentrações dos agentes químicos (CBP-01 = 107,5 μM e CBP-02 = 259,4 μM). Contudo estas concentrações são consideradas de baixa toxicidade a mamíferos (ZALEVSKAYA;

GUR'EVA, 2021), e equivalentes a 0,71048 mg/mL para CBP-01 e 1,513728 mg/mL para CBP-02 = 259,4 μ M.

BRAHMA et al. (2018), em um estudo conduzido na Índia, constatou a eficácia do Cu na destruição de biofilme pré-formado de 24 horas e matar as células bacterianas em comparação com a vancomicina ($p < 0,05$), o que foi revelado por uma redução na percentagem de biomassa, testado em *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli* e isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de infecção humana ($n=20$) e oriundas de ambiente hospitalar ($n=20$). O ensaio de viabilidade mostrou 50% de inibição de biofilmes produzidos em 24 e 72 horas de incubação, com concentrações equivalentes a $9,18 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$ e $8,51 \pm 0,68 \mu\text{g/mL}$ de complexo de Cu, respectivamente para cada período. Paralelamente, o tempo de ação de produtos a base de cobre demonstraram valores reduzidos, o que facilita sua aplicação para fins industriais. Além destas aplicações, o cobre pode integrar em superfícies para o controle da formação e adesão de biofilmes de *Acinetobacter calcoaceticus* e *Stenotrophomonas maltophilia* (VINCENT; HARTEMANN; ENGELS-DEUTSCH, 2016).

A concentração necessária para atingir a atividade antimicrobiana de outro complexo de Cu contra *E. coli* (CIM = 10 mg/mL) foi maior do que a atividade do antibiótico estreptomicina (CIM = 14 mg/mL) testado na forma plânctônica, sob as mesmas condições de crescimento. Concentração identificada para a atividade antifúngica deste composto contra *C. albicans* mostrou-se mais eficiente (CIM = 10 mg/mL), que é comparável à atividade da nistatina como padrão (CIM = 12 mg/mL). Além disso, esse complexo apresentou maior atividade contra *B. subtilis* e *E. coli* em comparação com outros a base de níquel, cobalto, manganês e zinco (ZALEVSKAYA; GUR'EVA, 2021). Comparativamente este valor é importante ao avaliarmos as doses necessárias para o controle de *C. jejuni* na forma livre, considerando o alto nível de resistência reportado em estudo conduzido em Minas Gerais – Brasil, onde dezoito cepas de *C. jejuni* e duas cepas de *C. coli* na forma plânctônica foram resistentes a: sulfametoxole (100%), cefalosporinas (75-100%), ciprofloxacina (95%), ácido nalidixico (95%), trimetoprim- tetraciclina (50%) e ampicilina (45%) (HUNGARO et al., 2015).

O complexo CBP-02 apresentou CIM superior à encontrada para CBP-01 tanto na forma planctônica quanto nos biofilmes de *C. jejuni*. Contudo, o composto CPB-02 mostra-se mais eficaz no tratamento do câncer quando comparado a CBP-01, com maior capacidade de inibir o crescimento da linha celular de leucemia mielóide crônica e mais potente do que

o correspondente ligante livre ($CBP02 = CIM_{50} = 2,9 \mu M$). Fato justificado pela afinidade do composto às células com intensa atividade nuclear (ALMEIDA, 2019). O mecanismo de ação do cobre nas células bacterianas inclui sua capacidade de potencializar o efeito citotóxico de ions ligantes que aumentam a permeabilidade celular deixando a bactéria vulnerável aos efeitos do meio (ALDABALDETRECU et al., 2020). Dentre os mecanismos que envolvem a citotoxicidade celular, sabe-se que o Cl_2 livre causa danos severos às bactérias, atua na parede celular, altera sua permeabilidade por reações de oxidação (WEI et al., 2021), reduz a síntese proteica (LI et al., 2022a) e corrompe o DNA (WU et al., 2021), o que pode ter potencializado o efeito observado em nosso estudo. Os ligantes à base de NO_3 conferem estabilidade ao complexado, e interagem por meio da ligação por força de Van der Waals e pontes de hidrogênio (ALMEIDA, 2019; LI et al., 2022b). No entanto, a interação entre o ligante Cl_2 e a membrana bacteriana está associada a formação de quelatos, pois este é o formato menos polar, e por consequência, há um aumento do caráter lipofílico do elemento que favorece seu contato com a parede, aumenta o contato com os constituintes celulares e altera a permeabilidade celular e outros processos (SOTO-AGUILERA et al., 2021).

LIU et al (2013) avaliaram a interação dos compostos $[Cu(L1)_2]$, $[Cu(L2)_2]$ e $[Cu_2(L3)_4(DMF)_2]$ (DMF: N,N-dimethylformamide) e seu efeito sobre diferentes bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Shewanella* sp. Ficou comprovada a maior bioatividade desses compostos complexados em comparação ao Cu^+ livre aos seus ligantes, sendo uma estratégia para diminuição da dose (LIU et al., 2013). A atividade citotóxica está relacionada a sua capacidade de gerar reações redox com produção de radicais livres (ROS) que clivam o núcleo celular e estabelecem ligações covalentes ou não covalentes que se associam com os pares de bases do DNA (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). Este mecanismo é explicado em um ensaio cromatográfico que avalia o comportamento do espectro pelo efeito hipercrômico, resultado da desestruturação da dupla hélice que causa desnaturação da estrutura e que é atribuída à ligação eletrostática entre compostos catiônicos e grupos fosfato das desoxirriboses do DNA, que causam a exposição das bases nitrogenadas (BARRA et al., 2016; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

Os biofilmes formados por bactérias patogênicas constituem um grande desafio uma vez que o controle baseado no uso de antimicrobianos tradicionais tem se mostrado deficiente (ELGAMOUDI; KOROLIK, 2021b). Em nosso estudo, observamos que houve alteração da integridade dos biofilmes de *C. jejuni* após a aplicação do composto, de maneira mais intensa

quando utilizada a concentração de 400 μ M, sendo esta concentração uma proposta para utilização na forma sanitizante. A desestruturação e morte do biofilme é associada à perturbação da base de estabelecimento do biofilme bacteriano em algumas espécies em seus estágios iniciais de desenvolvimento, afetando a aderência eficiente à superfície pela bactéria, um passo fundamental no estabelecimento do biofilme, pelo bloqueio da expressão de proteínas específicas na fixação bacteriana (ADNAN et al., 2020; SOTO-AGUILERA et al., 2021). Tais fatores podem esclarecer a ação do composto sobre a matriz do biofilme de *C. jejuni* visto que a composição da matriz dessa espécie apresenta elevados níveis de proteínas (MELO et al., 2017)

Paralelamente, o efeito citotóxico dos compostos fica evidente pela identificação de processo apoptótico (bactérias eclodidas, perda de citoplasma, restos celulares) e pode ser explicado pelos relatos descritos em espécies Gram negativas como *E. coli* e *C. jejuni*. Em relação a outros metais presentes no metabolismo bacteriano de importância fisiológica, o cobre liga-se especialmente bem aos ligantes amina, tiolato e carboxila presentes nas proteínas, inativando efetivamente estes compostos e prejudicando suas funções (SOTO-AGUILERA et al., 2021). Outra ação dos elementos metálicos consiste na despolarização rápida da membrana externa das células, seguida de um lento processo de destruição do DNA, já observados em outros micro-organismos da família *Enterobacteriaceae*, como *Salmonella* spp. e *E. coli* (VINCENT et al., 2018).

Portanto, os mecanismos que determinam a morte bacteriana em consequência da exposição à compostos de cobre são dependentes da ação das espécies reativas de oxigênio (ROS), da destruição da membrana e/ou DNA e da competição entre íons de cobre por receptores para outros íons de importância metabólica (ADNAN et al., 2020; ALDABALDETRECU et al., 2020; ASKOURA; YOUNS; HALIM HEGAZY, 2020; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; SOTO-AGUILERA et al., 2021).

8. CONCLUSÕES

Nossos resultados confirmam a capacidade promissora das novas drogas a base de cobre como uma alternativa aos casos de resistência aos antibióticos e/ou agentes químicos de uso convencional em *Campylobacter jejuni*, com potencial efeito para utilização no ambiente industrial e/ou hospitalar. A citotoxicidade do cobre é rara em humanos sem problemas hereditários relacionados à homeostase do cobre, sendo este outro fator que respalda o uso clínico dos compostos respeitando o limite máximo recomendado. Os

tratamentos com ambos os compostos apresentaram eficácia no controle das formas livre e sésil. O efeito maior foi identificado para o composto CBP-01, em que foi evidente a destruição da matriz dos biofilmes das bactérias.

REFERÊNCIAS

- ABPA. **ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal**. Disponível em: <<https://abpa-br.org/mercados/>>. Acesso em: 26 fev. 2022.
- ADNAN, M. et al. Effect of Adiantum philippense Extract on Biofilm Formation, Adhesion With Its Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens, and Characterization of Bioactive Metabolites: An in vitro-in silico Approach. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p.823, 13 maio 2020.
- ALDABALDETRECU, M. et al. New Copper(I) Complex with a Coumarin as Ligand with Antibacterial Activity against Flavobacterium psychrophilum. **Molecules** **2020**, Vol. **25**, Page**3183**, v. 25, n. 14, p. 3183, 13 jul. 2020.
- ALMEIDA, J. C. **Síntese, Caracterização e Estudos Biológicos de Complexos de Cobre(II) Contendo Derivados dos Ácidos Picolínico e Nicotínico**. Uberlândia MG: [s.n.].
- ALMEIDA, J. D. C. et al. Copper(II) complexes with β -diketones and N-donor heterocyclic ligands: Crystal structure, spectral properties, and cytotoxic activity. **Polyhedron**, v. 89, p. 1–8, 29 mar. 2015.
- ANDERSSON, D. I. et al. Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 44, n. 2, p. 171–188, 1 mar. 2020.
- ASKOURA, M.; YOUNS, M.; HALIM HEGAZY, W. A. Investigating the influence of iron on Campylobacter jejuni transcriptome in response to acid stress. **Microbial pathogenesis**, v.138, 1 jan. 2020.
- BARBOSA, A. R. et al. Potential of Casiopeínas® Copper Complexes and Antituberculosis Drug Combination against Mycobacterium tuberculosis. **Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 249–255, 25 fev. 2016.
- BARRA, C. V. et al. DNA binding, topoisomerase inhibition and cytotoxicity of palladium(II) complexes with 1,10-phenanthroline and thioureas. **Inorganica Chimica Acta**, v. 446, p. 54–60, 1 maio 2016.
- BESSA, M. C. et al. Survey of Campylobacter in foods implicated in foodborne diseases in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 62, p. e90, 2020.
- BONDARCZUK, K., PIOTROWSKA-SEGET, Z. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. **Cell biology and toxicology**, v. 29, n. 6, p. 397-405, 2013.
- BRAHMA, U. et al. Antimicrobial and anti-biofilm activity of hexadentated macrocyclic complex of copper (II) derived from thiosemicarbazide against Staphylococcus aureus. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

BRONOWSKI, C.; JAMES, C. E.; WINSTANLEY, C. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 356, n. 1, p. 8–19, 1jul. 2014.

BROWN, H. L. et al. Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 22, p. 7053–7060, 2014.

CABAN, M.; STEPNOWSKI, P. How to decrease pharmaceuticals in the environment? A review. **Environmental Chemistry Letters** **2021 19:4**, v. 19, n. 4, p. 3115–3138, 30 mar. 2021.

CASAGRANDE PROIETTI, P. et al. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* spp. on fresh and refrigerated chicken meat products in Central Italy. **Poultry Science**, v. 97, n. 8, p. 2895–2901, 1 ago. 2018.

CASAGRANDE PROIETTI, P. et al. Beta-lactam resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* chicken isolates and the association between blaOXA-61 gene expression and the action of β -lactamase inhibitors. **Veterinary Microbiology**, v. 241, p. 108553, 1 fev. 2020.

CDC. **Campylobacter | Guillain-Barré syndrome (GBS)** CDC, 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/campylobacter/guillain-barre.html>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

CDC. **Symptoms | Campylobacter | CDC**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/campylobacter/symptoms.html>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

CDC. **Campylobacter (Campylobacteriosis) | Campylobacter | CDC**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/campylobacter/index.html>>. Acesso em: 19 fev. 2022a.

CDC. **About Antibiotic Resistance | CDC**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>>. Acesso em: 19 fev. 2022b.

CDC. **NARMS Now**. Disponível em: <<https://wwwn.cdc.gov/narmsnow/>>. Acesso em: 7mar. 2022.

CLAUDEL, M.; SCHWARTE, J. V.; FROMM, K. M. New Antimicrobial Strategies Based on Metal Complexes. **Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 849–899, 16 out. 2020.

CNA. **Panorama do Agro | Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA)**. Disponível em: <<https://cnabrasil.org.br/cna/panorama-do-agro>>. Acesso em: 20 fev. 2022.

DIAS, D. J. A. **Estudo dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias patogênicas de gram negativo**. 2009. Tese de Doutorado. FCT-UNL.

DIDONET, F. P. **Estudo sobre a utilização de saneantes na indústria alimentícia para controle de *Listeria Monocytogenes***. IJUI: 2017 [tese].

DUFFY, L. L. et al. Investigation into the antibacterial activity of silver, zinc oxide and copper oxide nanoparticles against poultry-relevant isolates of *Salmonella* and *Campylobacter*. **Food Control**, v. 92, p. 293–300, 1 out. 2018.

EASMON, J. et al. Synthesis, cytotoxicity, and antitumor activity of copper(II) and iron(II) complexes of (4)N-azabicyclo[3.2.2]nonane thiosemicarbazones derived from acyl diazines. **Journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 13, p. 2164–2171, 21 jun. 2001.

ECDC. **Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2019**. Disponível em:

<<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2019>>. Acesso em: 20 fev. 2022.

ECDC; EFSA. **The European Union One Health 2018 Zoonoses Report**. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5926>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

ECDC; WHO. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 - 2020 data**.

Disponível em: <<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2022-2020-data>>. Acesso em: 5 mar. 2022.

EFSA. **Antimicrobial resistance shows no signs of slowing down | EFSA**. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/190226>>. Acesso em: 20 fev. 2022.

EFSA. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. **EFSA Journal**, v. 18, n. 3, 1 mar. 2020.

EFSA. **Antimicrobial resistance in the EU: infections with foodborne bacteria becoming harder to treat | EFSA**. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/news/antimicrobial-resistance-eu-infections-foodborne-bacteria-becoming-harder-treat>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

ELGAMOUDI, B. A.; KOROLIK, V. *Campylobacter* Biofilms: Potential of Natural Compounds to Disrupt *Campylobacter jejuni* Transmission. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12159, 10 nov. 2021a.

ELGAMOUDI, B. A.; KOROLIK, V. *Campylobacter* Biofilms: Potential of Natural Compounds to Disrupt *Campylobacter jejuni* Transmission. **International Journal of Molecular Sciences** **2021, Vol. 22, Page 12159**, v. 22, n. 22, p. 12159, 10 nov. 2021b.

ELHADIDY, M. et al. Antimicrobial resistance patterns and molecular resistance markers of *Campylobacter jejuni* isolates from human diarrheal cases. **PLOS ONE**, v. 15, n. 1, p. e0227833, 1 jan. 2020.

EUCAST. EUCAST reading guide for broth microdilution. 2022.

FAGUNDES DE CASTRO, A. K. et al. ELABORAÇÃO Gerência-Geral de Alimentos(GGALI) Thalita Antony de Souza Lima. **ANVISA**, p. 1–77, ago. 2021.

FAÚNDEZ, G. et al. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. **BMC Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 30 abr.2004.

FESTA, R. A.; THIELE, D. J. Copper: An essential metal in biology. **Current Biology**, v. 21,n. 21, 8 nov. 2011.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews Microbiology**,v. 8, n. 9, p. 623–633, set. 2010.

FLORES, V. DA C. **Resistência de Biofilmes Formados por Micobactérias de Crescimento Rápido Frente a Antimicrobianos**. Santa Maria, RS: UFSM [tese dedoutorado].

FOUNOU, R. C.; FOUNOU, L. L.; ESSACK, S. Y. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. **PLoSONE**, v. 12, n. 12, 1 dez. 2017.

GALINDO-MURILLO, R. et al. π -Stacking between Casiopeinas® and DNA bases. **PhysicalChemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 32, p. 14510–14515, 4 ago. 2011.

GARDNER, S. P.; OLSON, J. W. Barriers to Horizontal Gene Transfer in *Campylobacter* *jejuni*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 79, p. 19–42, 2012.

GARDNER, S. P.; OLSON, J. W. Interaction of Copper Toxicity and Oxidative Stress in *Campylobacter jejuni*. **Journal of Bacteriology** v.10, p. 200(21):e00208-18. 2018.

GASSER, G.; METZLER-NOLTE, N. The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. **Current opinion in chemical biology**, v. 16, n. 1–2, p. 84–91, abr.2012.

GOLZ, J. C.; STINGL, K. Natural Competence and Horizontal Gene Transfer in *Campylobacter*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 431, p. 265–292, 2021.

GRANT, A.; HASHEM, F.; PARVEEN, S. *Salmonella* and *Campylobacter*: Antimicrobial resistance and bacteriophage control in poultry. **Food Microbiology**, v. 53, p. 104–109, 1 fev.2016.

HAILU, W. et al. Prevalence and Antimicrobial Resistance Profiles of Foodborne Pathogens Isolated from Dairy Cattle and Poultry Manure Amended Farms in Northeastern Ohio, the United States. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1450, 25 nov. 2021.

HEIKEMA, A. P. et al. Biomolecule sulphation and novel methylations related to Guillain-Barré syndrome-associated *Campylobacter jejuni* serotype HS:19. **Microbial Genomics**, v. 7,n. 11, 2021.

HUNGARO, H. M. et al. Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. **Food Control**, v. 51, p. 15–22, 1 maio 2015.

HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72–80, 1 out. 2019.

ISO - ISO 10272-1:2006 - Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method. Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/37091.html>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

JOSHUA, G. W. P. et al. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 152, n. Pt 2, p. 387–396, fev. 2006.

LI, W. et al. The electrochemical oxidation of chloride on Pt-Ni-Co-G electrodes and its application in in-situ disinfection of water. **Chemical Engineering Journal**, v. 428, p. 132069, 15 jan. 2022.

LIU, H. et al. Crystal structures and antimicrobial activities of copper(II) complexes of fluorine-containing thioureido ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 405, p. 387–394, 24 ago. 2013.

LÓPEZ-PUEYO, M. J. et al. Multirresistencia antibiótica en unidades de cuidados críticos. **PALABRAS CLAVE. Med Intensiva**, v. 35, n. 1, p. 41–53, 2011.

MA, L.; KONKEL, M. E.; LU, X. Antimicrobial Resistance Gene Transfer from *Campylobacter jejuni* in Mono- and Dual-Species Biofilms. **Applied and environmental microbiology**, v. 87, n. 15, p. 1–17, 1 jul. 2021.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MAHENDIRAN, D. et al. Copper complexes as prospective anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation, selective targeting of cancer cells by DNA damage and S phase arrest. **RSC Advances**, v. 30, 2018.

MARIANI, D. et al. Antitumoral synergism between a copper(II) complex and cisplatin improves in vitro and in vivo anticancer activity against melanoma, lung and breast cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1865, n. 10, p. 129963, 1 out. 2021a.

MARIANI, D. et al. Antitumoral synergism between a copper(II) complex and cisplatin improves in vitro and in vivo anticancer activity against melanoma, lung and breast cancer cells. **Biochimica et biophysica acta. General subjects**, v. 1865, n. 10, 1 out. 2021b.

MARLY APARECIDA RANTHUM. Subnotificação e Alta Incidência de Doenças Veiculadas por Alimentos e de seus Fatores de Risco: causas e consequências no município de Ponta Grossa-PR. **FIOCRUZ**, Ponta Grossa - Parana: [2018].

MELO, R. T. et al. Intrinsic and Extrinsic Aspects on *Campylobacter jejuni* Biofilms. **Frontiers in microbiology**, v. 8, n. JUL, 18 jul. 2017.

MELO, R. T. et al. Evolution of *Campylobacter jejuni* of poultry origin in Brazil. **Food Microbiology**, v. 82, p. 489–496, 1 set. 2019.

MOLINARO, C. et al. Copper Complexes as Anticancer Agents Targeting Topoisomerases I and II. **Cancers** **2020**, Vol. 12, Page 2863, v. 12, n. 10, p. 2863, 5 out. 2020.

NATSOS, G. et al. *Campylobacter* spp. infection in humans and poultry. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 67, n. 2, p. 65–82, 29 jan. 2018.

NAVARRO, M. et al. The mechanism of antimalarial action of [Au(CQ)(PPh₃)]PF₆: Structural effects and increased drug lipophilicity enhance heme aggregation inhibition at lipid/water interfaces. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 2, p. 276–282, 1 fev. 2011.

NGUYEN, T. N. M. et al. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from smallscale and backyard chicken in Kenya. **Gut Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 27 ago. 2016.

PAIXÃO, D. A. et al. Crystal structure, anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of Cu(II) complexes bearing β -diketone and α -diimine ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 499, p. 119164, 1 jan. 2020.

PAN; BR; AGRO. **PAN-BR AGRO — Português (Brasil)**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/pan-br-agro>>. Acesso em: 20 fev. 2022.

PARK, C. J. et al. Genomic epidemiology and evolution of diverse lineages of clinical *Campylobacter jejuni* cocirculating in New Hampshire, USA, 2017. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 6, 1 jun. 2020.

POLLONI, L. et al. Action of copper(II) complex with β -diketone and 1,10-phenanthroline (CBP-01) on sarcoma cells and biological effects under cell death. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108586, 1 abr. 2019.

REUTER, M. et al. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2122–2128, abr. 2010.

RO. **Bacterial biofilms: A persisting public health challenge**. Disponível em: <<https://researchoutreach.org/articles/bacterial-biofilms-persisting-public-health-challenge/>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

RODRIGUES, C. S. et al. Prevalence of *Campylobacter* spp. in Chicken Carcasses in Slaughterhouses from South of Brazil. **Current microbiology**, v. 78, n. 6, p. 2242–

2250, 1jun. 2021.

ROGOLINO, D. et al. Diketoacid chelating ligands as dual inhibitors of HIV-1 integration process. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 78, p. 425–430, 25 mar. 2014.

ROSSI, D. A. et al. Biofilms of Salmonella and Campylobacter in the Poultry Industry. **Poultry Science**, 15 fev. 2017.

SALVI, A. S. **Perfil clínico-epidemiológico de pacientes diagnosticados com síndrome de Guillain-Barré**. Passo Fundo - PR: [Tese].

SARAIVA, M. D. M. S. **Resistência Antimicrobiana na Avicultura: Efeitos do Uso Profilático de Ceftiofur e do Tratamento Químico da Cama na Disseminação De Betalactamases**. Areia - Paraíba: [Tese] 2018.

SEVIOUR, T. et al. Extracellular polymeric substances of biofilms: Suffering from an identity crisis. **Water Research**, v. 151, p. 1–7, 15 mar. 2019.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug–DNA interactions and their study by UV– Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 124, p. 1–19, 5 jul. 2013.

SOTO-AGUILERA, S. et al. In Vitro Effect of Copper (I) Complex [Cu(NN1)2](ClO4) on *Vibrio harveyi* BB170 Biofilm Formation. **Microorganisms**, v. 9, n. 11, p. 2273, 31 out. 2021.

TACCONELLI, E. et al. **Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of new Antibiotics**. WHO, 2017.

Disponível em:

<https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1>. Acesso em: 4 mar. 2022

VIANA DA SILVA, G. UFRRJ INSTITUTO DE TECNOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS TESE

Controle de

Campylobacter sp. em Frangos de Corte pelo Uso de Probióticos e Simbióticos como Alternativa aos Antibióticos. 2017.

VINCENT, M. et al. Contact killing and antimicrobial properties of copper. **Journal of applied microbiology**, v. 124, n. 5, p. 1032–1046, 1 maio 2018.

VINCENT, M.; HARTEMANN, P.; ENGELS-DEUTSCH, M. Antimicrobial applications of copper. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 219, n. 7, p. 585–591, 1 out. 2016.

VINCENT, M. et al. Contact killing and antimicrobial properties of copper. **Journal of applied microbiology**, v. 124, n. 5, p. 1032–1046, 2018.

WEI, X. et al. Gaseous chlorine dioxide technology for improving microbial safety of spices.

Innovative Food Science & Emerging Technologies, v. 73, p. 102783, 1 out. 2021.

WOJCIECHOWSKA, A. et al. L-argininato copper(II) complexes in solution exert significantselective anticancer and antimicrobial activities. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 34, n. 8, 1 ago. 2020.

WU, J. et al. Kinetics and efficacy of membrane/DNA damage to *Bacillus subtilis* and autochthonous bacteria during UV/chlorine treatment under different pH and irradiationwavelengths. **Chemical Engineering Journal**, v. 422, p. 129885, 15 out. 2021.

YUTAKA, Y. et al. Oral Administration of Bis(aspirinato)zinc(II) Complex Ameliorates Hyperglycemia and Metabolic Syndrome-Like Disorders in Spontaneously Diabetic KK-AyMice: Structure–Activity Relationship on Zinc–Salicylate Complexes. **Chem. Pharm. Bull.**,v. 59, n. 8, p. 972–977, 2011.

ZALEVSKAYA, O. A.; GUR'EVA, Y. A. Recent Studies on the Antimicrobial Activity of Copper Complexes. **Russian Journal of Coordination Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 861–880,2021.