

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Vanessa Albertina Agertt

**ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE
SULFONAMIDAS COMPLEXADAS COM Au, Cu, Cd, Ag E Hg**

Santa Maria, RS
2016

Vanessa Albertina Agertt

**ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE SULFONAMIDAS
COMPLEXADAS COM Au, Cu, Cd, Ag E Hg**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas e Toxicológicas: Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores no Diagnóstico Laboratorial, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Marli Matiko Anraku de Campos

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Albertina Agertt, Vanessa
ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE
SULFONAMIDAS COMPLEXADAS COM Au, Cu, Cd, Ag E Hg /
Vanessa Albertina Agertt.- 2016.
93 p.; 30 cm

Orientadora: Marli Matiko Anraku de Campos
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

1. Sulfonamidas 2. Complexos metálicos 3. Trimetoprim
4. Micobactérias 5. Biofilme I. Matiko Anraku de Campos,
Marli II. Título.

Vanessa Albertina Agertt

**ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE SULFONAMIDAS
COMPLEXADAS COM Au, Cu, Cd, Ag E Hg**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 21 de julho de 2016:

**Marli Matiko Anraku de Campos, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)**

Daisy Nakamura Sato; Dra. (IAL)

Sônia de Avila Botton; Dra. (UFSM)

Rodrigo de Almeida Vaucher; Dr. (UNIFRA)

Roberto Christ Vianna Santos; Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, por iluminar meu caminho e nele colocar pessoas muito especiais e do bem, e permitir que chegasse até aqui.

Aos meus pais pelo apoio incondicional e por todo o suporte que sempre me forneceram, buscando sempre me oferecer condições para que eu aproveitasse as oportunidades que surgissem, buscando incansavelmente me proporcionar um futuro melhor.

À minha orientadora Prof.(a) Dr. (a) Marli M. A. de Campos, pelos anos de amizade e orientação. Agradecer é pouco, pois é responsável por hoje eu estar completando mais uma etapa da minha vida. Agradeço pela confiança, mesmo quando eu decidi por novos caminhos. Muito obrigada pela oportunidade e pelo aprendizado que me proporcionou. Minha admiração e gratidão.

Ao Erico, que entendeu e me apoiou nesta fase da minha vida, sempre me ajudando e me fazendo olhar para o lado bom das situações, meu muito obrigado pelo amor, carinho, incentivo e compreensão em todos os momentos.

Às minhas amigas Pauline e Grazielle que foram muito mais que colegas de laboratório ajudando em todas as etapas deste trabalho (inclusive fora do horário), muito obrigada pela amizade sincera, vocês foram essenciais e especiais. Muito sucesso vocês merecem.

Aos amigos do Laboratório de Mycobacteriologia: Caren, Vanessa F e Fallon, agradeço pelos momentos de discussão, trabalho, ajuda e confraternização.

Aos demais colegas e amigos do Laboratório de Mycobacteriologia, por toda a ajuda e companheirismo de sempre, e pelo ambiente de trabalho agradável que me foram proporcionados durante este período, muito obrigado.

Às minhas vizinhas de laboratório Bruna e Paula pelo apoio e horas de descontração.

Aos professores Dra. Daisy Nakamura Sato, Dra. Sônia de Avila Botton, Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher e Dr. Roberto Christ Vianna Santos por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta tese.

Aos professores do PPGCF, agradeço os ensinamentos e a partilha de grandes experiências e incentivos, meu muito obrigada por toda dedicação e por tudo o que fazem pelo programa.

Aos farmacêuticos e técnicos do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria pela paciência e disponibilização de infra-estrutura, sem isto meu trabalho não teria sido realizado

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pela oportunidade de me aprimorar intelectualmente e por todo aprendizado adquirido.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de suporte financeiro que viabilizarão a execução desta pesquisa.

Enfim a todos aqueles que fazem parte da minha vida e que são essências para eu ser, a cada dia, uma pessoa melhor, e não estão nominalmente citados.

RESUMO

ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE SULFONAMIDAS COMPLEXADAS COM Au, Cu, Cd, Ag E Hg

AUTORA: Vanessa Albertina Agertt
ORIENTADORA: Marli Matiko Anraku de Campos

Infecções por micobactérias, incluindo *Mycobacterium tuberculosis* têm vindo a aumentar globalmente. A prevalência de isolados adicionais (MDR-TB) multirresistentes e tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB) estimulam uma necessidade urgente para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de infecções micobacterianas. Micobactérias de crescimento rápido (MCR) são micro-organismos que podem causar tanto doenças de pele como doença disseminada. Amicacina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem e sulfametoxazol são antimicrobianos utilizados para o tratamento de micobacterioses ocasionadas por MCR, porém nem todos os pacientes tratados obtém a cura. Isso ocorre, pois muitos isolados clínicos são resistentes aos antimicrobianos existentes, e, além disso, estes micro-organismos são capazes de formar biofilmes. Biofilmes são estruturas capazes de resistir à ação de antimicrobianos e desinfetantes. A dificuldade de tratamento adequado para infecções persistentes, causadas a partir da formação de biofilmes, está diretamente relacionada à estrutura compacta dos mesmos, onde os antimicrobianos convencionais enfrentam dificuldades para penetrar no biofilme. Deste modo, é de extrema relevância a busca por novas opções terapêuticas. Neste contexto, a co-ordenação de antimicrobianos a metais representa uma alternativa promissora na tentativa de encontrar compostos efetivos contra biofilmes. Sulfonamidas complexadas com Au, Cd, Ag, Cu e Hg têm demonstrado ótima atividade frente a uma variedade de micro-organismos, tanto na forma plantônica quanto na forma de biofilme. Tendo em vista a importância em se combater infecções associadas à formação de biofilmes por micobactérias, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicobacteriana de complexos metálicos de sulfonamidas frente às micobacterias. Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos frente a *Mycobacterium tuberculosis* e MCR, bem como a interação destas com o trimetoprim, sendo determinado o Índice de Concentração Inibitória Fracional (ICIF) para cada associação. Também foi avaliada a ação das sulfonamidas frente a biofilmes formados por MCR. As sulfonamidas apresentaram atividade antimicrobiana aumentada quando comparadas ao sulfametoxazol tanto em células plânticas quanto em biofilmes, e apresentaram efeito sinérgico quando associadas ao trimetoprim.

Palavras-chave: Sulfonamidas. Complexos metálicos. Trimetoprim. Micobacterias. Suscetibilidade. Biofilme.

ABSTRACT

ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY AND ANTIBIOFILM OF SULFONAMIDES COMPLEXED WITH Au, Cu, Cd, Ag E Hg

AUTHOR: Vanessa Albertina Agertt
ADVISOR: Marli Matiko Anraku de Campos

Mycobacterial infections including *Mycobacterium tuberculosis* have been increasing globally. The additional prevalence of multidrug-resistant (MDR-TB) strains and extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) stimulate an urgent need for the development of new drugs for the treatment of mycobacterial infections. Mycobacteriosis is a type of infection caused by rapidly growing mycobacteria (RGM), which can vary from localized illness, such as skin disease, to disseminated disease. Amikacin, cefoxitin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, imipenem and sulfamethoxazole are antimicrobial drugs chosen to treat such illnesses; however, not all patients obtain the cure. The reason why the treatment does not work for those patients is related to the fact that some clinical strains present resistance to the existing antimicrobial drugs; thereby, the research of new therapeutic approaches is extremely relevant. The coordination of antimicrobial drugs to metals is a promising alternative in the development of effective compounds against resistant microorganisms. Sulfonamides complexed with Au, Cd, Ag, Cu, and Hg have shown excellent activity against a variety of microorganisms. Considering the importance of fighting against infections associated with RGM, the objective of this study is to evaluate the antimycobacterial activity of metal complexes of sulfonamides against mycobacterials. It determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of the compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and RGM, as well as their interactions with trimethoprim being determined Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) for each association. It also evaluated the action of sulfonamides against biofilms formed by RGM. Sulfonamides showed increased antimicrobial activity when compared to sulfamethoxazole both planktonic cells and biofilms, and showed synergistic effect when combined with trimethoprim.

Key words: Sulfonamides. Metal complexes. Trimethoprim. Mycobacterial. Susceptibility. Biofilms.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Processo de formação e regulação de biofilmes de micobactérias.	25
Figura 2 – Rota de síntese do folato e sítios de ação do trimetoprima e sulfonamidas.....	32
Figura 3 – Estrutura química da sulfadiazina de prata.....	33
Figura 4 – Estrutura química de complexos metálicos com sulfonamidas.....	34

ARTIGO CIENTÍFICO I

Figure 1 – Isobols of [Au (sulfatiazolato) (PPh ₃)] and trimethoprim against <i>Mycobacterium smegmatis</i>	47
--	----

ARTIGO CIENTÍFICO II

Figure 1 – Time kill curve of sulfamethoxazole, sulfadiazina $\text{S}_2\text{P-Au-Au-P}_{\text{S}_2}$ (compound 2), sulfamethoxazolato Au (compound 5) and sulfamethoxazole Ag (compound 6) on <i>M. abscessus</i>	61
Figure 2 – Time kill curve of sulfamethoxazole, sulfadiazina $\text{S}_2\text{P-Au-Au-P}_{\text{S}_2}$ (compound 2), sulfamethoxazolato Au (compound 5) and sulfamethoxazole Ag (compound 6) on <i>M. fortuitum</i>	61
Figure 3 – Time kill curve of sulfamethoxazole, sulfadiazina $\text{S}_2\text{P-Au-Au-P}_{\text{S}_2}$ (compound 2), sulfamethoxazolato Au (compound 5) and sulfamethoxazole Ag (compound 6) on <i>M. massiliense</i>	61
Figure 4 – Isobolograms of sulfonamides complexed with metals associated with trimethoprim (MIC = 16 $\mu\text{g/ml}$) in combination against <i>M. abscessus</i>	62
Figure 5 – Isobolograms of sulfonamides complexed with metals associated with trimethoprim (MIC = 256 $\mu\text{g/ml}$) in combination against <i>M. fortuitum</i>	63
Figure 6 – Isobolograms of sulfonamides complexed with metals associated with trimethoprim (MIC = 1 $\mu\text{g/ml}$) in combination against <i>M. massiliense</i>	64

MANUSCRITO I

Figure 1 – Biofilms formed by <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i> respectively. Viewed through the microscope Olympus Fluwil FV 10i without the use of dyes, only autofluorescence produced by mycobacteria.....	76
Figure 2 – OD of the strains of <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i> biofilm in relation to different concentrations of sulfadiazine Au-P _{S₃} and sulfadiazine $\text{S}_2\text{P-Au-Au-P}_{\text{S}_2}$ tested. (a) Statistically significant difference between the negative control and the positive control. (b) Statistically significant difference between the positive control and the corresponding concentration. (c) No statistically significant difference between the negative control and the corresponding concentration.....	76

Figure 3 – OD of the strains of <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i> biofilm in relation to different concentrations of sulfamethoxazole Au-P ₃ and sulfamethoxazole P ₂ -Au-Au-P ₂ tested. (a) Statistically significant difference between the negative control and the positive control. (b) Statistically significant difference between the positive control and the corresponding concentration. (c) No statistically significant difference between the negative control and the corresponding concentration.....	77
Figure 4 – OD of the strains of <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i> biofilm in relation to different concentrations of sulfamethoxazole Au and sulfamethoxazole Ag tested. (a) Statistically significant difference between the negative control and the positive control. (b) Statistically significant difference between the positive control and the corresponding concentration. (c) No statistically significant difference between the negative control and the corresponding concentration.....	78
Figure 5 – OD of the strains of <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i> biofilm in relation to different concentrations of sulfamethoxazole Cd and sulfamethoxazole Hg tested. (a) Statistically significant difference between the negative control and the positive control. (b) Statistically significant difference between the positive control and the corresponding concentration.....	79
Figure 6 – OD of the strains of <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i> biofilm in relation to different concentrations of sulfamethoxazole Cu and sulfamethoxazole free tested. (a) Statistically significant difference between the negative control and the positive control. (b) Statistically significant difference between the positive control and the corresponding concentration.....	80

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Classificação das micobactérias de importância clínica.	16
Tabela 2 – MCR: Espécie ou grupo taxonômico e síndromes e doenças clínicas mais frequentes.	19

ARTIGO CIENTÍFICO I

Table 1 – MIC values for compounds tested against <i>Mycobacterium smegmatis</i>	46
Table 2 – Values of FICI for the compounds tested against <i>Mycobacterium smegmatis</i>	46
Table 3 – Values of MIC, the FIC and of FICI for the compounds tested in order of increasing concentration of trimethoprim against <i>Mycobacterium smegmatis</i>	47
Table 4 – Values of MIC, the FIC and FICI for compounds tested in order of increasing concentration of trimethoprim against <i>Mycobacterium smegmatis</i>	48
Table 5 – Values of MIC, the FIC and of FICI for the compounds tested against <i>M. tuberculosis</i> H37Rv and <i>M. tuberculosis</i> isolates on a concentration 1:5.....	48

ARTIGO CIENTÍFICO II

Table 1 – Values of the minimum inhibitory concentration for the standard strains of rapidly growing mycobacteria.....	64
Table 2 – MIC, FIC, and FICI values ($\mu\text{g/ml}$) for optimal ratio of associated sulfonamide complexed/trimethoprim against <i>M. abscessus</i>	65
Table 3 – MIC, FIC, and FICI values ($\mu\text{g/ml}$) for optimal ratio of associated sulfonamide complexed/trimethoprim against <i>M. fortuitum</i>	65
Table 4 – MIC, FIC, and FICI values ($\mu\text{g/ml}$) for optimal ratio of associated sulfonamide complexed/trimethoprim against <i>M. massiliense</i>	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS	American Thoracic Society
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo álcool-ácido resistente
CIM/MIC	Concentração inibitória mínima/Minimum Inhibitory Concentration
CMTB	Complexo <i>M. Tuberculosis</i>
DHFR	Diidrofolato redutase
DHPS	Diidropteroato sintase FolP
GPL	Glicopeptidolipídio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
MAC	Complexo <i>M. Avium</i>
MCR/RGM	Micobactérias de crescimento rápido/rapidly Growing Mycobacteria
MDR-TB	Tuberculose resistente a múltiplas drogas/Multidrug-resistant tuberculosis
MNT/NTM	Micobactérias não tuberculosas/Nontuberculous Mycobacterial
OMS	Organização Mundial de Saúde
PABA	Ácido para-amino-benzóico
SMX	Sulfametoxazol
SPE	Substâncias poliméricas extracelulares
TB	Tuberculose
THFA	Ácido tetrafólico
TMP	Trimetoprim
TMP-SMX	Sulfametoxazol-trimetoprim
XDR-TB	Tuberculose extremamente resistente aos medicamentos/extensively drug-resistant tuberculosis
DNA	deoxyribonucleic acid
RNA	ribonucleic acid
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
RS	Rio Grande do Sul
LMI	Laboratório de Materiais Inorgânicos
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Index
FIC	Fractional Inhibitory Concentration

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	14
2 INTRODUÇÃO	15
2.1 MICOBACTÉRIAS	15
2.2 COMPLEXO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
2.3 MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS	17
2.4 MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO	18
2.5 BIOFILMES	22
2.6 ESTRUTURA CELULAR MICOBACTERIANA	23
2.7 FATORES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DOS BIOFILMES	24
2.8 ESTRATÉGIAS DE COMBATE DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E EM BIOFILME	27
2.9 SULFONAMIDAS E TRIMETOPRIM	30
2.10 SULFONAMIDAS COMPLEXADAS COM METAIS	33
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	37
4.1 ARTIGO CIENTÍFICO I	37
4.2 ARTIGO CIENTÍFICO II	49
4.3 MANUSCRITO I	67
5 DISCUSSÃO	81
6 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	85

1 APRESENTAÇÃO

As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se nos **ARTIGO CIENTÍFICO I e II** e no **MANUSCRITOS I** e representam a íntegra deste estudo. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÃO**, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais sobre as publicações científicas contidas neste trabalho. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** desta tese, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração dos artigos estão mencionadas nos respectivos manuscritos.

2 INTRODUÇÃO

2.1 MICOBACTÉRIAS

A denominação do gênero *Mycobacterium* originou-se do latim “*fungus bacterium*”, pelo fato de *Mycobacterium tuberculosis* apresentar algumas características semelhantes aos fungos quando cultivado em meio líquido. Estes bacilos tinham características morfológicas de bacilos e tintoriais de álcool-ácido resistência (COLLINS; GRANGE; YATES;, 1997). Posteriormente, foram isolados, tanto do homem como do meio ambiente, vários outros bacilos com as mesmas características tintoriais de *M. tuberculosis*; entretanto, com diversificações no tempo de crescimento *in vitro*, produção de pigmentos e patogenicidade para os seres humanos. A partir da década de 90, um número crescente de novas espécies tem sido descritas e, até o momento, 175 espécies e 13 subespécies são reconhecidas oficialmente (EUZÉBY, 2016).

A importância clínica da tuberculose e as características fenotípicas distingue o complexo *M. tuberculosis* (CMTB) de todas as outras micobactérias. Estas são referidas coletivamente como micobactérias não tuberculosas (MNT), excetuando o CMTB e *Mycobacterium leprae*. As denominações anteriores para este grupo de organismos incluem "micobactérias ambientais", “micobactérias atípicas”, ou "micobactérias outras que não tuberculose”. Ao contrário de *M. tuberculosis*, que é um patógeno humano obrigatório, sem reservatório ambiental, as MNT são comumente isoladas de fontes ambientais, como a água e solo. Até a segunda metade do século passado, os isolados ocasionais de MNT eram considerados, em grande parte, como contaminantes ou colonizadores (KOH; KWON; LEE, 2002).

Sendo assim, as espécies de micobactérias de importância clínica foram subdivididas em grupos. CMTB, composto por: *M. bovis*, *M. bovis*-BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii*; Complexo *M. avium* (MAC) que agrupa as espécies *M. avium*, *M. avium* subespécie *paratuberculosis*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum* e Complexo *M. terrae* as espécies *M. terrae*, *M. nonchromogenicum* e *M. triviale* (BRASIL., 2008). Algumas espécies de crescimento rápido foram reunidas em três grupos: grupo *M. fortuitum* composto pelas espécies *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. mageritense*, *M. septicum*, *M. houstonense* *M. bonickei*; grupo *M. chelonae* composto pelas espécies *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. immunogenum* e grupo *M. smegmatis* composto pelas espécies *M. smegmatis*, *M. wolinskyi*, *M. godii* (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002).

Outra classificação bem tradicional ainda muito utilizada é a classificação de Runyon que agrupa as MNTs em quatro grupos, com base no tempo de crescimento, morfologia da colônia, e pigmentação. Grupos I, II e III são considerados de crescimento lento, o que requer um tempo semelhante ao que é exigido por *M. tuberculosis* para crescer em cultura, enquanto que os organismos do grupo IV são de crescimento rápido, os quais crescem bem em meios bacteriológicos de rotina em menos de sete dias. Os grupos de crescimento lento são ainda diferenciados de acordo com sua capacidade de produzir pigmento amarelo (TORTOLI; TORTOLI, 2003). Na tabela 1 está demonstrada a união destas classificações.

Tabela 1 – Classificação das micobactérias de importância clínica.

Complexo <i>M. tuberculosis</i> (CMTB)	
<i>M. tuberculosis</i>	
<i>M. bovis</i>	
<i>M. africanum</i>	
<i>M. leprae</i>	
Micobactérias não tuberculosas (MNT)	
Micobactérias de crescimento lento	
<i>M. kansasii</i>	(Fotocromogênicas, grupo I de Runyon)
<i>M. marinum</i>	
<i>M. goodii</i>	
<i>M. scrofulaceum</i>	(Escotocromogênica, grupo II de Runyon)
Complexo <i>M. avium</i>	(Não cromogênica, grupo III de Runyon)
<i>M. avium</i>	
<i>M. intracellulare</i>	
Complexo <i>M. terrae</i>	
<i>M. ulcerans</i>	
<i>M. xenopi</i>	
Micobactérias de crescimento rápido (MCR)	(Grupo IV de Runyon)
<i>M. fortuitum</i>	
<i>M. chelonae</i>	
<i>M. abscessus</i>	

Fonte: adaptado de KOH; KWON; LEE, (2002)

2.2 COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis*

O bacilo da tuberculose foi descoberto por Robert Koch em 1882, sendo por isso designado bacilo de Koch. Três tipos de bacilos são patogênicos para o homem: o bacilo humano, responsável praticamente por toda a tuberculose pulmonar, o bacilo bovino (*M. bovis*), o qual é pouco incidente desde a pasteurização compulsória do leite, e *M. africanum* (FAIR; HOPEWELL; PAI, 2007). O bacilo humano é hoje denominado *Mycobacterium*

tuberculosis o qual empresta o nome a um complexo que abriga outras bactérias como *M. bovis*-BCG, usado na elaboração da Vacina BCG, e *M. microti*, um patógeno animal (TARANTINO, 2002).

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa bacteriana causada por *Mycobacterium tuberculosis*, a qual muito comumente afeta os pulmões. O bacilo é transmitido de pessoa a pessoa via aerossóis provenientes da garganta e dos pulmões dos pacientes com a doença respiratória ativa. Em indivíduos saudáveis, a infecção por *M. tuberculosis* frequentemente não causa sintomas, uma vez que o sistema imune age isolando o micro-organismo. Os sintomas da TB ativa nos pulmões são tosse, expectoração, às vezes com sangue, dores no peito, fraqueza, perda de peso, febre e sudorese noturna (TUBERCULOSIS, 2011).

A OMS estima que, em 2010, houve uma incidência de 8,8 milhões de novos casos de tuberculose e/ou recaídas da doença no mundo. Neste período em torno de 1,4 milhões de pessoas morreram de tuberculose, incluindo 0,35 milhões de pacientes com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

A incidência de TB vem decrescendo desde 2006. O número de casos novos notificados a cada 100 mil habitantes tem diminuído 1,3% a cada ano, desde 2002. O Brasil tem acompanhado índices semelhantes. Caso essa tendência se sustente, a meta da OMS para 2015 de reduzir a prevalência e mortalidade em 50%, em comparação com os níveis de 1990 será alcançada (OMS, 2011). Embora a prevalência da tuberculose esteja diminuindo, ainda há muito que melhorar principalmente no que se refere aos casos de resistência.

O quarto relatório global sobre a resistência a fármacos anti-TB fornece os dados mais recentes sobre a extensão do problema no mundo. A prevalência média de tuberculose resistente a múltiplas drogas (MDR-TB) em novos casos de tuberculose foi de 1,6%, e em casos de tuberculose tratados previamente 11,7% (CHIANG et al., 2010). No Brasil a incidência da tuberculose foi de 43,0 (36,0-51,0) indivíduos por 100.000 habitantes por ano em 2010; destes 2,6 (1,6-4,3) indivíduos por 100.000 habitantes morreram da doença. A prevalência média MDR-TB em novos casos de tuberculose foi de 0,9%, enquanto que em casos de tuberculose tratados previamente essa prevalência passa para 5,4% (OMS, 2011)

2.3 MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS (MNT)

MNT têm sido documentadas desde 1950 como organismos capazes de causar doença em humanos, recebendo maior reconhecimento clínico com a queda da incidência de tuberculose e o aumento dos casos de imunossupressão (MOORE et al., 2010). Quando

responsáveis por processos patológicos em humanos, as MNT podem acometer qualquer tecido ou disseminar-se por todo o organismo, principalmente em pacientes imunocomprometidos. A doença que ocasionam é denominada de micobacteriose, independentemente da espécie responsável pela patologia (BRASIL., 2008).

Aceita-se que a infecção humana seja maior devido às MNTs serem encontradas no meio ambiente e a veiculação pelo ar desempenhar um papel importante na doença respiratória ocasionada pelas MNTs (KOH; KWON; LEE, 2002). As micobactérias são ubíquas na natureza e podem ser encontradas no solo, em poeira, rochas, bioaerossóis, e água. Estes organismos têm sido cada vez mais identificados a partir de locais com condições adversas (ou seja, restrição de nutrientes, baixo pH e temperaturas extremas) (DE GROOTE; HUITT, 2006).

2.4 MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO (MCR)

As espécies de micobactérias de crescimento rápido capazes de produzir doenças em humanos são constituídas por: grupo *Mycobacterium fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus* e grupo *M. smegmatis*. As MCR continuam a emergir como importantes patógenos humanos que podem causar uma variedade de doenças cutâneas localizadas até doença disseminada (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002).

As espécies de MNTs que comumente causam infecções localizadas da pele e tecido subcutâneo são *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. marinum* e *M. ulcerans*. Estas espécies também provocam infecções de cateteres intravenosos ou peritoneal de longo prazo, abscessos pós-injeção, ou infecções de feridas cirúrgicas, tais como aqueles que ocorrem após a mamoplastia ou cirurgia cardíaca *by pass* (Tabela 2) (GRIFFITH et al., 2007).

Tabela 2 – MCR: Espécie ou grupo taxonômico e síndromes e doenças clínicas mais frequentes.

Espécies ou grupos	Hospedeiros hígido	Pessoas imunodeprimidas
Grupo <i>M. fortuitum</i>	Infecções localizadas pós-traumáticas Infecções associadas a cateteres Infecções de feridas pós-cirúrgicas (cirurgia cardíaca e mamoplastia)	Infecções associadas a cateteres
<i>M. chelonae</i>	Infecções de feridas localizadas pós-traumático Infecções córneas pós-traumáticas ou pós-cirúrgicas Infecções associadas a cateteres	Infecções de pele disseminada em pacientes recebendo corticosteróides e em receptores de transplante de órgãos Infecções associadas a cateteres
<i>M. abscessus</i>	Infecções pulmonares crônicas Infecções de feridas localizadas pós-traumático Infecções da ferida operatória A otite média crônica Infecções associadas a cateteres	Infecções de pele disseminada em pacientes recebendo corticosteróides e em receptores de transplante de órgãos Infecções associadas a cateteres
Grupo <i>M. smegmatis</i>	Infecções de feridas localizadas pós-traumático Infecções da ferida operatória Osteomielite após fraturas expostas A infecção pulmonar complicando pneumonia lipoídica ou acalasia	

Fonte: adaptado de BROWN-ELLIOTT & WALLACE, (2002)

MCR estão entre as espécies de MNT mais comumente isoladas em laboratórios clínicos, sendo *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* as espécies mais frequentemente isoladas nestas síndromes (ESTEBAN et al., 2008). *M. abscessus*, *M. fortuitum* ou *M. chelonae*, são conhecidos por serem patógenos humanos há muito tempo. Todas as espécies envolvidas neste grupo são organismos ambientais que se tornaram patógenos humanos sob circunstâncias especiais ou fatores de risco (ORTÍZ-PÉREZ et al., 2011).

As infecções por MCR relacionadas a cateteres de acesso venoso de longa permanência e *shunts* vasculares têm sido cada vez mais relatadas. Neste sentido *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. smegmatis* e *M. mucogenicum* têm sido as mais comuns, mas outras novas espécies de micobactérias de crescimento rápido vêm sendo relatadas. Os riscos incluem a imunossupressão, a duração da colocação do cateter e terapia antimicrobiana prévia (DE GROOTE; HUITT, 2006).

Por outro lado, pode estar associada com doença pulmonar estrutural e a dificuldade de eliminação dos organismos, como é visto em pacientes com fibrose cística. Clinicamente, infecções por MCR podem variar de uma doença assintomática, indolente, com sintomas clínicos mínimos, até uma bronquiectasia grave e doença pulmonar cavitária com significativa morbidade e mortalidade (DE GROOTE; HUITT, 2006).

Conaglen et al. (2013) reuniram 25 relatórios publicados que descreveram 142 casos de infecção causadas por MCR associados com tatuagem. Dos 71 casos confirmados de MCR, 48 eram ocasionados por *M. chelonae*. A causa mais frequente de infecção foi a diluição de tinta preta com água da torneira. A contaminação que leva a tais infecções associadas a tatuagem poderia, teoricamente, ocorrer em qualquer ponto, da fabricação da tinta, dos equipamentos utilizados para aplicação da tatuagem no estúdio, bem como durante cuidados posteriores da tatuagem pelo indivíduo.

Infecções humanas por MCR após procedimentos estéticos, cirurgias, injeções e colocação de *piercing* de mamilo, foram descritas em todo o mundo como, principalmente, associadas a *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* e grupo *M. smegmatis*. Estes micro-organismos são considerados espécies ambientalmente adaptadas e foram isolados do solo, estações de tratamento de água, água da torneira hospitalar e água destilada. Infecções relacionadas ao biofilme formado por alguns isolados de MCR representam mais de dois terços de todas as infecções causadas por estes organismos. Surto hospitalares, bem como casos isolados de infecções causadas por MCR têm sido relatados em diferentes cenários, os quais envolvem a doença pulmonar crônica, infecções cutâneas pós-cirúrgicas, feridas - geralmente relacionada aos equipamentos médicos contaminados - soluções e reagentes de laboratório (MONEGO et al., 2011).

Os reservatórios de abastecimento de água municipal e a água da torneira podem abrigar esses organismos e representam uma ameaça para pacientes que realizam diálise peritoneal (SONG et al., 2012). A água da torneira parece ser um meio de cultura melhor do que o PBS-glicose para o desenvolvimento de biofilmes. Esta diferença se deve, provavelmente, ao fato de que a água da torneira possui muitas moléculas químicas em quantidades mínimas, que podem ser de grande importância, atuando como nutrientes para muitos organismos, incluindo micobactérias (ESTEBAN et al., 2008).

Infecções envolvendo diálise devido à MCR têm sido relatadas em ambos os mecanismos, intravascular e peritoneal, de terapia de substituição renal. Soluções aquosas contaminadas usadas para esterilizar os filtros de diálise reutilizáveis têm sido envolvidas em muitos casos. A peritonite pode ocorrer em pacientes submetidos à diálise peritoneal de longo

prazo. Nesta situação, a infecção pode envolver o local de inserção do cateter, o aparelho de encapsulamento, e/ou o próprio peritônio (DE GROOTE; HUITT, 2006). Eles também têm sido encontrados colonizando equipamentos médicos, tais como os endoscópios e soluções cirúrgicas. A maioria dos casos de peritonite causada por micobactérias relatadas em pacientes que utilizam a diálise peritoneal é causada por *M. fortuitum* (38,6%), seguido pelo *M. chelonae* (14,0%) (SOTO, 2013).

Apesar de raras, infecções por MCR em pacientes que utilizam próteses articulares, quando ocorrem, são de difícil tratamento e a prótese geralmente tem que ser retirada para que ocorra a cura total do paciente. O fracasso na desinfecção sem a remoção da prótese infectada poderia estar associada com a capacidade de micobactérias formarem biofilmes maduros arquitetonicamente complexos (EID et al., 2007).

A cirurgia plástica tem constituído uma importante fonte de infecção por MCR. Procedimentos faciais, abdomenoplastia, lipoaspiração, redução ou aumento de mama, mamoplastia e *piercing* de mamilo têm sido associados com casos de infecção pós-procedimento. Os fatores que contribuem podem incluir aumento do uso de medicina alternativa e aumento do número de procedimentos cirúrgicos realizados em locais que não são rotineiramente monitorados pelos comitês de controle de infecção ou órgãos de controle equivalentes. Estes estabelecimentos normalmente utilizam água da torneira (não estéreis) para procedimentos médicos e limpeza de instrumentos o que não é recomendado (DE GROOTE; HUITT, 2006).

A capacidade de desenvolvimento de biofilme é uma propriedade relacionada com o envolvimento dessas bactérias na patogenicidade humana e na resistência aos antimicrobianos. MCR são capazes de formar biofilmes *in vitro*, com diferenças em relação à importância de biofilmes na patogênese de doenças humanas (MUÑOZ-EGEA et al., 2013). Um agente patogênico é bem sucedido quando se torna capaz de colonizar o hospedeiro durante um longo período de tempo agindo contra as defesas do sistema imunológico do hospedeiro e persistir contra a pressão dos antimicrobianos. Apesar de um grande número de bactérias e fungos, incluindo micobactérias, poderem facilmente qualificar-se para esta categoria, a questão de como eles estabelecem tais infecções permanece sem resposta para a maioria das espécies (OJHA; HATFULL, 2012).

A formação de biofilme é uma estratégia bem sucedida de sobrevivência para organismos muito hidrofóbicos como os do gênero *Mycobacterium*. Na verdade, a sua presença nos primeiros biofilmes em tubulações de água pode torná-los "pioneiros" na formação de biofilmes (DE GROOTE; HUITT, 2006). Um grande e crescente número de

evidências oferece um argumento convincente de que a persistência da maioria, se não de todas as espécies microbianas em geral, é alcançado através da formação de biofilme. (COSTERTON; STWART; GREENBERG, 1999).

A maioria das espécies de MCR é capaz de formar biofilme *in vitro*, porém, esta propriedade não é espécie-específica neste grupo de micobactérias. A composição química dos meios de cultivo influencia no tempo necessário para o desenvolvimento do biofilme de todas as espécies de MCR (ESTEBAN et al., 2008)

2.5 BIOFILMES

Muitas espécies microbianas evoluíram para sobreviver em ambientes estressantes através da aderência em superfícies, constituindo estruturas matriciais altamente organizadas, chamadas biofilmes (OJHA; HATFULL, 2012). O crescimento neste tipo de comunidade parece ser a estratégia de sobrevivência preferida dos micro-organismos e é conseguida por meio de componentes genéticos que regulam a sua motilidade, fixação a superfícies, comunicações intercelulares e síntese de substâncias poliméricas extracelulares (SPE). A tolerância ao estresse ambiental é provavelmente facilitada pela SPE e talvez pela adaptação a microambientes heterogêneos dentro da complexa arquitetura de biofilmes (KULKA; HATFULL; OJHA, 2012). Estima-se que mais de 90% dos micro-organismos vivem sob a forma de biofilmes (COSTERTON; STWART; GREENBERG, 1999). Os biofilmes bacterianos podem ser formados, tanto *in vivo* como *in vitro*, em superfícies bióticas ou abióticas, tais como superfícies da carcaça de organismos mortos, interfaces ar-água, plantas e sob outros micro-organismos e animais (XIANG et al., 2014). Biofilmes de bactérias associadas são em geral resistentes aos antimicrobianos e são inacessíveis às defesas celulares e humorais do hospedeiro (BASARABA, 2008).

A dificuldade de tratamento adequado para infecções persistentes, causadas a partir da formação de biofilmes, está diretamente relacionada à estrutura compacta dos mesmos, onde substâncias tóxicas às células microbianas têm dificuldades para penetrar no biofilme (VASCONCELLOS, 2009). Demonstrou-se que o biofilme maduro é capaz de resistir às concentrações de antimicrobianos até 1000 vezes superiores às tolerada pelas células planctônicas (HANLON, 2007). Micobactérias dentro de biofilmes podem suportar concentrações muito mais altas de antimicrobianos do que os seus homólogos planctônicos (XIANG et al., 2014). Em células planctônicas de *M. smegmatis* o antimicrobiano isoniazida foi capaz de inibir seu crescimento em uma concentração de 10 µg/mL enquanto que em

células em biofilme este antimicrobiano precisou de uma concentração oito vezes maior (80 µg/mL) para inibir o micro-organismo (TENG; DICK, 2003).

Os mecanismos propostos para o aumento da resistência podem ser atribuídos a alguns parâmetros que incluem: (i) a SPE produzida pelas células do biofilme que atua como uma barreira para a difusão de fármacos antimicrobianos; (ii) o modo de crescimento dentro da estrutura de biofilme, que conduz a alteração na atividade metabólica no interior da estrutura, juntamente com gradientes de concentração de micronutrientes, e (iii) o biofilme compreende uma subpopulação de células persistentes altamente resistentes na população geral (HANLON, 2007).

Os biofilmes de MCR mostram-se resistentes aos desinfetantes e aos antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções causadas por estes organismos (ORTÍZ-PÉREZ et al., 2011). Biofilmes formados por MCR foram tratados com amicacina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina e sulfametoxazol e nenhum dos antimicrobianos conseguiu erradicar totalmente as películas bacterianas. Além disso, *M. fortuitum*, em geral, foi o micro-organismo que mais apresentou resistência à ação inibitória dos antimicrobianos quando aplicados antes da formação do biofilme maduro (FLORES, 2014).

2.6 ESTRUTURA CELULAR MICOBACTERIANA

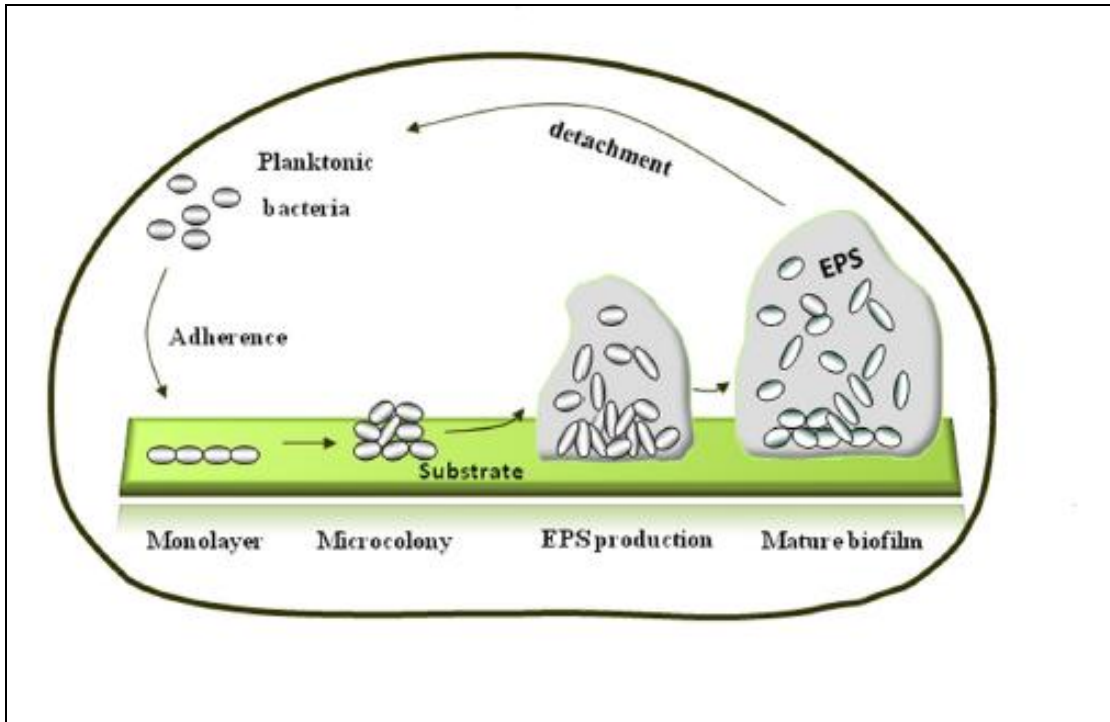
Uma das características mais marcantes de micobactérias é a enorme complexidade do seu parede celular. A membrana celular das micobactérias está rodeada por um invólucro espesso e seroso que contém diversos lipídeos. A organização exata dos diferentes lipídeos dentro da parede da célula ainda não foi completamente determinada. Extensivas análises químicas mostraram que a parede celular das micobactérias é constituída por três componentes. A camada exterior é composta de ácidos micólicos, uma mistura complexa de ácidos graxos de cadeia longa que são dispostos como uma monocamada densa. Os ácidos micólicos estão covalentemente ligados a arabinogalactano, o qual, por sua vez, está ligado à camada de peptidoglicano. Esta parede celular complexa está rodeada por uma cápsula de polissacáridos de forma não covalente, além de proteínas ligadas e uma pequena quantidade de lipídeos, que incluem os glicopeptidolipídios (GPLs) e glicolípídios fenólicos. Esta parede complexa fornece às micobactérias notável impermeabilidade às substâncias externas, um determinante de virulência crítica para estes organismos (BRENNAN; NIKAIDO, 1995).

2.7 FATORES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DOS BIOFILMES

Os biofilmes são constituídos, por água, micro-organismos, SPE, polissacarídeos, proteínas, lipídeos, DNA, RNA e íons, além de resíduos do ambiente colonizado, aderidos a uma superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada (OLIVEIRA, 2011). A matriz polimérica é a responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional dos biofilmes sendo que a sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes (FLEMMING; WINGENDER, 2001). A formação de biofilmes é iniciada por colonização bacteriana e formação de matrizes extracelulares derivadas de organismos patogênicos, no entanto, os componentes do hospedeiro derivados de células necróticas podem também contribuir para a formação de biofilmes (BASARABA, 2008).

O desenvolvimento do biofilme é altamente dinâmico e complexo. Bactérias planctônicas primeiramente ligam-se a uma superfície sólida, seguindo-se a formação de microcolônia e o desenvolvimento de SPE. A microcolônia envolta por SPE pode, posteriormente, amadurecer em biofilme. Agregação bacteriana e o desenvolvimento do biofilme e a maturação subsequente pode ser tanto reversível como irreversível. Por exemplo, a desintegração do biofilme pode liberar células microbianas, podendo estas, se fixarem em outros locais e iniciar o desenvolvimento de novos biofilmes (Figura 1) (XIANG et al., 2014).

Figura 1 – Processo de formação e regulação de biofilmes de micobactérias.



Fonte: adaptado de XIANG et al., 2014

Cada passo do desenvolvimento de biofilme bacteriano é distinto. A primeira fase é a iniciação de adesão sem a proteção do biofilme maduro; nesta fase, as bactérias são vulneráveis e a eficácia de antimicrobianos é ideal. A segunda etapa é o desenvolvimento, em que as bactérias aderem a uma superfície sólida e secretam SPE em abundância agrupando as bactérias individuais em um microcolônia, culminando em um biofilme maduro. E na terceira fase de maturação do biofilme as estruturas integradas tornam-se mais resistentes aos antimicrobianos (XIANG et al., 2014).

Diversos fatores contribuem para a adesão de um micro-organismo à determinada superfície e dependem não apenas da fisiologia do micro-organismo e seus fatores de crescimento, mas também da natureza do substrato. Dentre estes se destacam: a genética, a virulência e a resistência do micro-organismo; a nutrição; a área e o material da superfície e a velocidade do fluxo de líquidos (KASNOWSKI et al., 2010). A presença de flagelos, pili ou glicocálice podem impactar na taxa de adesão microbiana. Isto porque estes apêndices permitem que as células permaneçam presas mais permanentemente na superfície fazendo com que haja a superação das forças repulsivas comuns aos materiais (COSTERTON; STWART; GREENBERG, 1999).

Os GPLs são uma classe de peptidolipídeos glicosilados presentes na camada exterior do envelope celular e estão estreitamente relacionados à motilidade das micobactérias uma vez que estas não possuem flagelos para isto (RECHT et al., 2000). Os GPLs são moléculas anfifílicas, pois possuem uma porção hidrofóbica de cadeias de ácidos graxos e uma porção hidrofílica de carboidratos. A orientação destas porções na parede celular das micobactérias ainda é desconhecida (PANG et al., 2013).

Os GPLs estão entre os principais componentes de glicolipídeos livres no exterior da membrana de várias espécies de micobactérias saprófitas e clinicamente relevantes (TATHAM et al., 2012). A utilidade de GPLs como imunomoduladores fenólicos, nomeadamente GPL-1 de *M. leprae*, foram estabelecidas no sorodiagnóstico da hanseníase e tuberculose. Além disso, alguns destes glicolipídeos exibem atividades biológicas *in vitro* que podem ser relevantes para a patogênese de infecções micobacterianas (CONSTANT et al., 2002).

No ambiente natural as micobactérias podem deslizar e formar biofilmes. A formação de biofilmes e/ou motilidade favorece a invasão de células epiteliais e a tolerância aos fármacos (PANG et al., 2013). Existe uma correlação perfeita entre a presença de GPLs na parede celular das micobactérias de *M. smegmatis*, a morfologia das colônias, a motilidade de deslizamento e a formação de biofilme, sendo todos dependentes da expressão de GPL (RECHT; KOLTER, 2001).

A motilidade deslizante e a formação de biofilmes podem ser afetadas por modificações na estrutura de GPL (SCHOREY; SWEET, 2008). Mutantes defeituosos para a motilidade deslizante e/ou formação de biofilmes também eram defeituosos na biossíntese da cadeia de carboidratos do GPL (YAMAZAKI et al., 2006).

A relação entre a motilidade deslizante, a formação de biofilme e a morfologia das colônias, bem como hidrofobicidade ou defeitos na matriz extracelular têm sido atribuídos as alterações no perfil de GPL, mas ainda não é totalmente conhecido (BOURAI; JACOBS; NARAYANAN, 2012). A interação eletrostática entre a cauda de ácidos graxos dos GPL e a superfície hidrofílica do meio pode representar uma explicação (PANG et al., 2013).

A capacidade de desenvolvimento de biofilme é uma propriedade que não é uniformemente presente entre isolados clínicos de MCR; toda via, parece estar relacionada com a capacidade dos isolados em provocar doença humana (MARTÍN-DE-HIJAS et al., 2009). Verificou-se que *M. abscessus* cresce com morfologia rugosa ou lisa. A forma lisa expressa GPL e forma biofilmes, mas não é invasiva. A forma rugosa expressa quantidades mínimas de GPL e é incapaz de formar biofilmes, mas é capaz de invadir os macrófagos e

causar infecção persistente em camundongos. Cepas de *M. abscessus* podem mudar bidirecionalmente a partir da morfologia rugosa para o morfotipo liso. Esta capacidade permite o micro-organismo fazer a transição de um colonizador não invasivo residente em vias respiratórias humanas a um patógeno humano capaz de invadir o pulmão e se disseminar através do organismo. Especula-se que uma variante rugosa surgiria a partir de um isolado de característica morfológica lisa colonizadora das vias aéreas. Isso poderia ocorrer, pois variantes lisas formam biofilmes, mas produzem uma resposta imune inata mínima, em contraste com a resposta imune inata forte determinada por variantes rugosas (GREENDYKE; BYRD, 2008). Duas linhagens rugosas de *M. avium* testadas, que não produziam GPL perfeitos, exibiram fenótipos deficientes de motilidade deslizante. Portanto, existe uma forte correlação entre a ausência de GPL e a incapacidade de se mover sobre uma superfície (MARTÍNEZ; TORELLO; KOLTER, 1999).

Um nível elevado de ácidos micólicos também está intimamente associado com as fases finais de maturação de biofilmes de micobactérias (OJHA et al., 2008). Biofilmes de *M. smegmatis* contêm ácidos micólicos livres implicados em seu processo. Esses ácidos micólicos são sintetizados pelo sistema do FAS-II que possuem os genes *inhA* e *kasB*, assim como GroEL1 envolvidos (OJHA et al., 2005; OJHA et al., 2010).

2.8 ESTRATÉGIAS DE COMBATE DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E EM BIOFILME

A tuberculose (TB) geralmente pode ser tratada com um esquema padrão de quatro fármacos, isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, também chamado de primeira linha de medicamentos anti-TB. Levando-se em consideração o comportamento metabólico e localização do bacilo o esquema terapêutico anti-TB deve atender a três grandes objetivos: evidenciar atividade bactericida precoce, prevenir a emergência de bacilos resistentes e ter atividade esterilizante (CAMINERO, 2003). A atividade bactericida precoce é a capacidade de matar o maior número de bacilos o mais rapidamente possível, diminuindo a infectividade do caso-índice no início do tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004). Atividade esterilizante é a capacidade de eliminar todos os bacilos de uma lesão. A adequada esterilização de uma lesão é que impede a recidiva da tuberculose após o tratamento. Pacientes cujas lesões não estavam esterilizadas ao final do tratamento, manifestam recidiva da doença (BRASIL, 2010).

Cada população micobacteriana apresenta diferentes proporções de bacilos com resistência natural aos diferentes medicamentos anti-TB. Porém algumas cepas podem

desenvolver resistência a estes fármacos e os pacientes portadores destes micro-organismos irão desenvolver MDR-TB, quando o *M. Tuberculosis* apresenta resistência a pelo menos isoniazida e rifampicina juntas. Uma MDR-TB requer muito tempo para ser tratada, com medicamentos de segunda linha, que são mais caros e apresentam mais efeitos colaterais. A tuberculose extremamente resistente aos medicamentos (XDR-TB), quando o *M. tuberculosis* apresenta resistência à isoniazida, rifampicina, à qualquer das fluorquinolonas e a pelo menos um dos três fármacos injetáveis de segunda linha, amicacina, canamicina ou capreomicina, pode desenvolver-se quando os medicamentos de segunda linha também são mal utilizados ou mal administrados e, portanto, tornam-se ineficazes. Como XDR-TB são resistentes a fármacos de primeira e de segunda linha, as opções de tratamento ficam muito limitadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

A terapia antimicrobiana para MCR, ao contrário da quimioterapia utilizada para doenças causadas por micobactérias de crescimento lento, pode variar, dependendo da natureza da doença. Por exemplo, a monoterapia para a doença localizada ou leve devido a MCR muitas vezes é suficiente, com risco mínimo de desenvolvimento de resistência mutacional. Em contraste, a doença cutânea disseminada e doença pulmonar geralmente requerem vários antimicrobianos, incluindo medicamentos tanto por via intravenosa e oral (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002). Um painel principal de medicamentos para estas espécies poderiam incluir amicacina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem e uma sulfonamida (GRIFFITH et al., 2007).

Os mais antimicrobianos orais linezolid e gatifloxacina são candidatos promissores como alternativas para medicamentos injetáveis, mas a experiência clínica com eles é muito limitada. Os avanços na terapia antimicrobiana, incluindo os macrolídeos, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (linezolid), melhoraram as opções terapêuticas para o clínico e o prognóstico da doença devido a estes organismos. Isto é especialmente verdadeiro para *M. chelonae* e o grupo *M. fortuitum*. Há ainda, contudo, uma necessidade urgente e para o desenvolvimento de melhores, mais eficazes e seguros antimicrobianos orais para o tratamento de doença causada por MCR, especialmente *M. abscessus*. A doença pulmonar causada por este último, por exemplo, ainda é geralmente incurável com terapia com os medicamentos atualmente disponíveis (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002).

A suscetibilidade ao antimicrobiano varia entre as espécies isolados clínicos de micro-organismos. Desta forma, cefoxitina e amicacina são mais ativos contra *M. abscessus*, enquanto tobramicina pode ter atividade contra *M. chelonae*, mas tem pouca atividade contra *M. abscessus*. *M. fortuitum* é geralmente mais suscetível do que *M. chelonae* ou *M. abscessus*,

e muitas vezes, regimes orais podem ser introduzidos. A doença pulmonar por *M. fortuitum* tem um prognóstico mais favorável e, em muitos casos, pacientes portadores de infecções provocadas por este micro-organismo podem ser considerados curados após o tratamento durante 12-24 meses, com pelo menos, dois ou três antimicrobianos testados *in vitro*. Um regime habitualmente utilizado pode incluir sulfametoxazol, moxifloxacina, e minociclina. *M. abscessus* mostra, tipicamente, suscetibilidade à amicacina, cefoxitina, imipenem, claritromicina e azitromicina (DE GROOTE; HUITT, 2006).

A *American Thoracic Society* sugere que as suscetibilidades das MCR devem ser relatadas e usadas como um guia clínico para o tratamento, embora *M. fortuitum* provavelmente seja inibido por tetraciclina, sulfametoxazol e quinolonas e *M. chelonae* é frequentemente inibido por macrolídeos, linezolida e tobramicina (GRIFFITH et al., 2007). Por outro lado, as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) orientam a realização de testes de suscetibilidade para um painel de agentes antimicrobianos, incluindo macrolídeos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, cefoxitina, imipenem, linezolida, tigeciclina, doxiciclina, minociclina e trimethoprim-sulfamethoxazole, antes de definir a terapia (CLSI, 2011).

Não há relatos de estudos sobre tratamentos controlados de infecções provocadas por MCR. Ainda que a cura espontânea da infecção da pele tenha sido relatada, a maioria dos especialistas recomendam o uso de antimicrobianos, geralmente em combinação, a fim de evitar a emergência de resistência. Infecções graves, por vezes, requerem uma gestão cooperativa entre aqueles com experiência em doenças infecciosas e cirúrgicas para garantir adequado debridamento de tecidos necróticos, sinalizando para uma terapia individualizada (DE GROOTE; HUITT, 2006).

No momento em que a associação de dois fármacos evidencia sinergismo, nota-se que concentrações menores de cada fármaco possuem a mesma ação contra os micro-organismos que quando utilizadas sozinhas. Deste modo, os efeitos colaterais e tóxicos ao ser humano podem ser diminuídos (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009). Como exemplo de sinergismo relacionado às fármacos tuberculostáticos, podemos citar dois fármacos, o etambutol e o ácido para-aminosalicílico. O etambutol possui toxicidade ocular e o ácido para-aminosalicílico pode causar náusea, vômito, diarreia severa, hepatotoxicidade, erupções cutâneas (*rash*) e febre. No entanto, estes dois fármacos possuem seus efeitos colaterais dependentes da dose. Assim, uma redução das doses terapêuticas tanto do etambutol como do ácido para-aminosalicílico reduz os efeitos colaterais e a coadministração com isonicotinoilhidrazonas diminui ainda mais estes efeitos (DE LOGU et al., 2002).

2.9 SULFONAMIDAS E TRIMETOPRIM

Cofatores como o folato são componentes essenciais de várias reações enzimáticas que ocorrem em quase todas as células e são essenciais para a vida. Eles estão envolvidos na biossíntese de purinas e pirimidinas (timidilato), na biossíntese de aminoácidos tais como a glicina e a metionina, e na biossíntese de vitaminas, tais como o ácido pantotênico. Os microorganismos e as plantas são capazes de sintetizar os folatos e uma via que envolve seis enzimas, já os mamíferos não possuem estas enzimas e devem obter folatos a partir da dieta, em um processo envolvendo receptores específicos de absorção de folato. A ausência de uma via biossintética do folato em mamíferos torna as enzimas desta via alvos ideais para medicamentos antimicrobianos (FERNLEY; ILIADES; MACREADIE, 2007).

Um exemplo do exposto acima são as sulfonamidas. Elas foram descobertas em 1932 e colocadas em uso clínico em 1935, revolucionando a terapia antimicrobiana, causando uma drástica diminuição nas taxas de mortalidade (HOUVINEN, 2001). As sulfonamidas têm sido usadas ao longo de décadas no tratamento de uma variedade de doenças microbianas infecciosas, contudo, a pressão exercida pelo fármaco levou a resistência à sulfonamida e à sulfona, a qual está associada a mutações pontuais que mais tarde foram disseminadas através de plasmídeos (ILIADES et al., 2003).

As sulfonamidas competem com o ácido para-amino-benzóico (PABA) pelo sítio ativo da diidropteroato sintase FoIP (DHPS), uma enzima que catalisa uma reação essencial na via sintética do ácido tetrafólico (THFA). A toxicidade seletiva está relacionada ao fato das bactérias sintetizarem THFA, diferentemente das células humanas que não possuem esta capacidade e dependem de um suprimento exógeno de ácido fólico. As bactérias que podem utilizar ácido fólico pré-formado não são afetadas pelas sulfonamidas (VILCHÈZE; JACOBS, 2012).

Outro exemplo de antimicrobiano que inibe a biossíntese de folatos é o trimetoprim (TMP), um membro do grupo de estruturas semelhantes à pirimidina, análogo em estrutura à porção amino hidroxipirimidina da molécula do ácido fólico. O trimetoprim inibe a enzima diidrofolato redutase (DHFR) presente em células de mamíferos bem como em células de bactéria e protozoários, e a toxicidade seletiva depende da maior afinidade do trimetoprim pela enzima bacteriana (SULING et al., 2000).

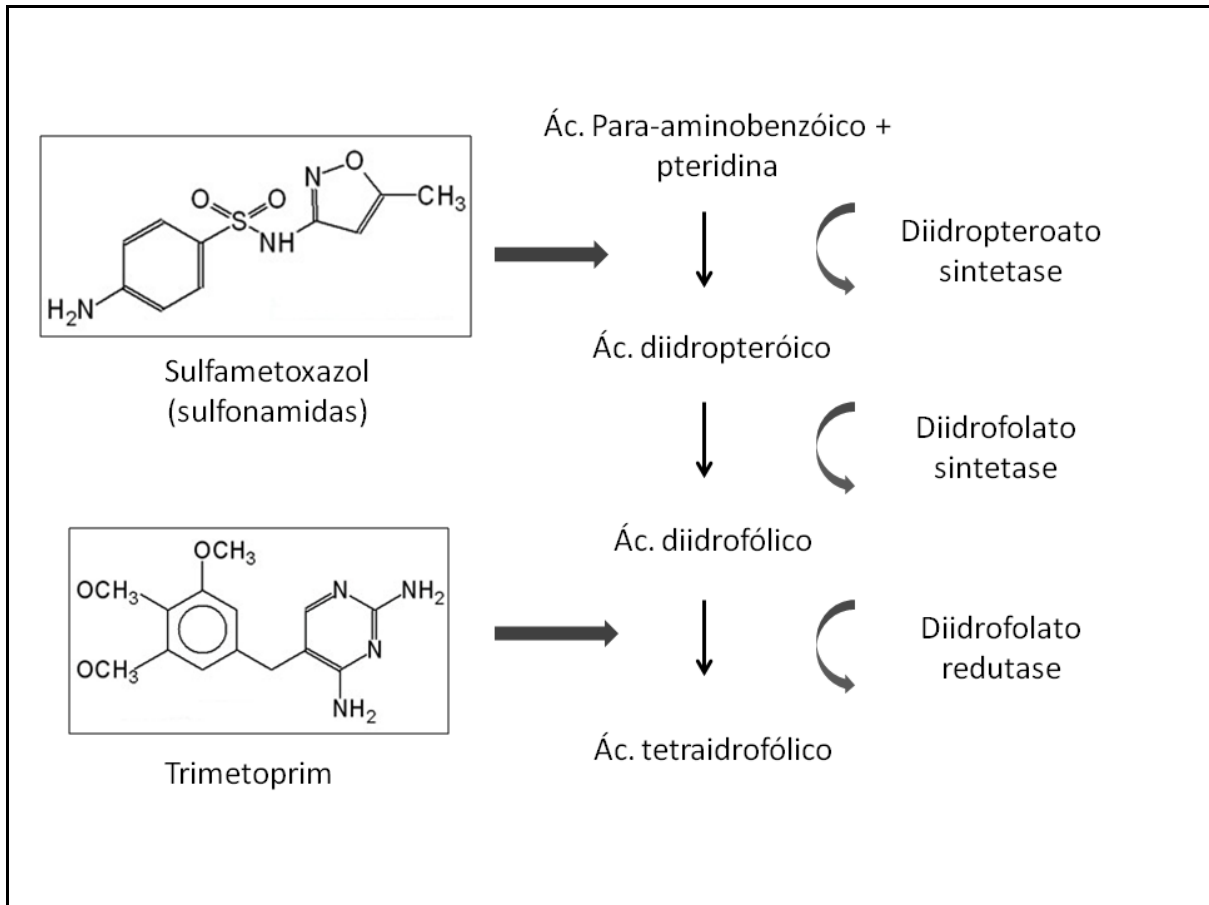
O trimetoprim é usado em associação com sulfonamidas (sulfaleno, sulfametoxazol – SMX, sulfametrol ou sulfamoxol). Introduzido em 1968, o sulfametoxazol-trimetoprim (TMP-SMX) continua a ser um antimicrobiano popular por causa de seu baixo custo, eficácia

e familiaridade entre os médicos. É o antimicrobiano mais frequentemente prescrito para infecções do trato urinário. Outras indicações incluem o tratamento de infecções causadas por *Pneumocystis jiroveci*, *Toxoplasma gondii*, *Stenotrophomonas maltophilia* e associado à *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Além disso, a associação também é utilizada entre os pacientes com vírus da HIV e o uso de baixas doses de sulfametoxazol-trimetoprim para a profilaxia contra *P. jiroveci* e *T. gondii* está associado à diminuição da mortalidade causada por infecções oportunistas (HO; JUURLINK, 2011).

Só existem dados fracionais relativos à utilização de agentes antimicrobianos em diferentes partes do mundo. Não há dúvida, porém, que sulfonamidas e TMP ainda são considerados entre os agentes antimicrobianos mais utilizados. Nos países do norte da Europa, 10% a 15% do número total de agentes antimicrobianos utilizados são a associação TMP-SMX. Na Finlândia, o TMP é usado quase exclusivamente para a gestão e profilaxia de infecções do trato urinário, todavia 70% do uso de TMP-SMX também envolve o tratamento de pacientes com otite média e sinusite (HOUVINEN, 2001).

As vantagens desta associação são muitas, entre elas está o fato de ambas terem a mesma meia-vida biológica, ou seja, são secretadas com a mesma velocidade. Com o seu emprego logra-se o “bloqueio sequencial”, isto é, a biossíntese do ácido tetraidrofólico é inibida em duas fases distintas: a formação de ácido diidropteróico (pela sulfonamida) e a conversão de ácido diidropteróico a tetraidrofólico (pelo trimetoprim) (VILCHÈZE; JACOBS, 2012) (Figura 2). A proporção ideal de concentração dos dois fármacos para um potencial sinergismo foi determinada como 20 partes de sulfametoxazol para 1 parte de trimetoprim. Assim, as preparações disponíveis são fabricadas em uma proporção de 1:5 fixa de TMP-SMX para que os resultados em períodos de pico de concentrações séricas de ambos os fármacos atinjam as proporção desejadas de sinergismo (MASTERS et al., 2003).

Figura 2 – Rota de síntese do folato e sítios de ação do trimetoprima e sulfonamidas



A importância clínica da TMP-SMX tem diminuído gradualmente ao longo das décadas mais recentes, principalmente como resultado do desenvolvimento e da rápida disseminação da resistência a estes agentes, entre os principais patógenos bacterianos. Além disso, os efeitos secundários graves limitam a utilização de sulfonamidas e a combinação TMP-SMX. Novos agentes antimicrobianos, mais eficazes e mais seguros têm substituído o TMP-SMX na maioria de suas indicações clínicas (HOUVINEN, 2001).

Porém, a combinação TMP-SMX tem sido sugerida na tuberculose incluindo isolados altamente resistentes aos medicamentos (ALSAAD et al., 2013; FORGACS et al., 2009). O sulfametoxazol (SMX) utilizado isoladamente também possui a mesma ação, porém no interior de macrófagos tem sua atividade diminuída. Como o sulfametoxazol é um fármaco acessível e bem tolerado, pode ser uma opção de tratamento em casos de tuberculose MDR e XDR-TB selecionados na fase inicial (DAVIES FORSMAN et al., 2014). A associação do TMP-SMX com antimicrobianos utilizados na terapia anti-tuberculose (isoniazida e rifampicina) também demonstrou eficácia frente a MDR e XDR-TB (VILCHÈZE; JACOBS, 2012).

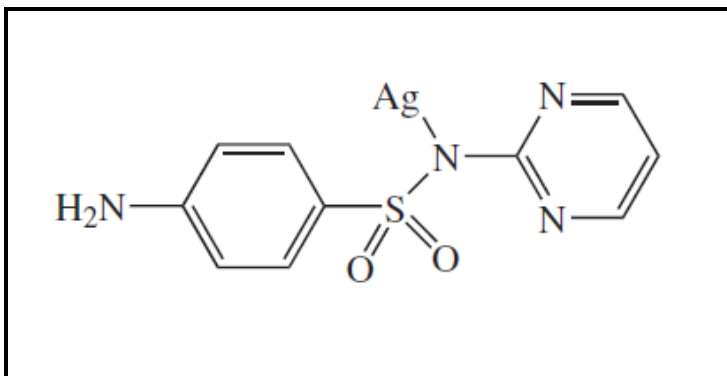
Estudos *in vitro* têm demonstrado resultados significativos no uso de novos derivados de sulfonamidas frente a *M. tuberculosis* (OWEN et al., 2007; WILKINSON et al., 2007). Suling et al. (2005) comprovaram a eficácia de um análogo do trimetoprim, um inibidor da dihidrofolato redutase, contra o complexo *M. avium*, assim como a atividade sinérgica com o SMX.

2.10 SULFONAMIDAS COMPLEXADAS COM METAIS

Nos últimos anos, tem sido observado um crescimento vertiginoso nos casos de resistência aos fármacos, em uma taxa em que o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos não tem acompanhado. É necessário renovar o arsenal antimicrobiano, de preferência com mecanismos de ação ainda inexplorados e que não sejam reconhecidos pelas bactérias. Considerando o sucesso de compostos de prata e de bismuto como fármacos, a síntese racional de complexos metálicos com antimicrobianos pode ser vislumbrada como ferramenta inovadora no controle da disseminação de bactérias resistentes (ROCHA et al., 2011).

Mais recentemente, compostos de co-ordenação contendo sulfonamidas como ligantes têm atraído a atenção, devido ao fato de que muitos deles têm demonstrado maior atividade antibacteriana do que os fármacos livres. Além disso, existe no mercado um complexo de prata contendo a sulfadiazina (Figura 3) que é muito utilizado em pacientes queimados para evitar e tratar infecções. Este fármaco de uso tópico combina em um só composto as propriedades antibacterianas do íon prata e da sulfadiazina (ROCHA et al., 2011).

Figura 3 – Estrutura química da sulfadiazina de prata.



Anacona & Osorio (2008) sintetizaram um complexo ternário de Cu(II) coordenado ao sulfatiazol e à cefepima, um antimicrobiano da classe das cefalosporinas. O composto obtido,

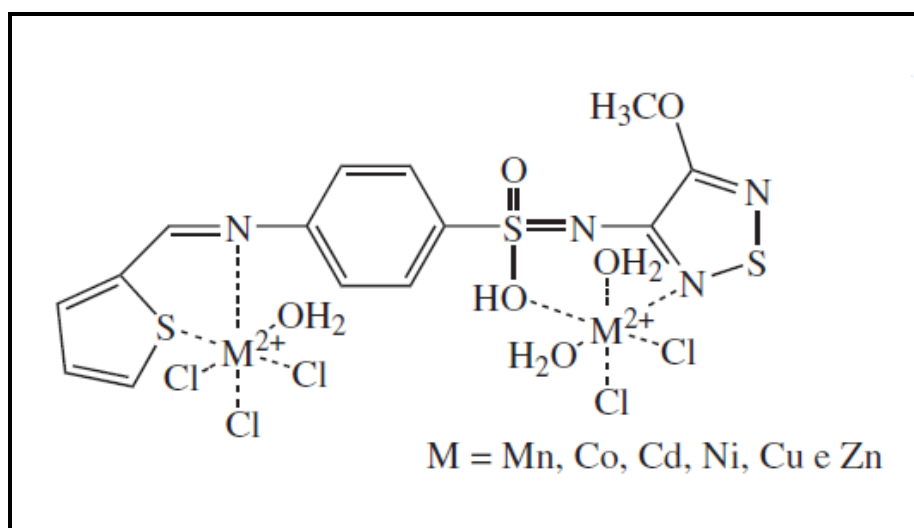
[Cu(cefepima)(sulfatiazol)Cl] foi mais ativo que o fármaco cefepima nas linhagens de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Complexos de Co(II), Cu(II), Ni(II) e Zn(II) contendo sulfonamidas foram sintetizados por Chohan et al, (2010) e avaliados contra diversas linhagens, incluindo *E. coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os compostos de coordenação exibiram atividade antibacteriana moderada se comparados aos ligantes, no entanto, apresentaram boa atividade antifúngica contra diversos micro-organismos incluindo *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Microsporium canis* e *Trichophyton mentagrophytes*.

Curativos contendo prata reduziram significativamente o número de células viáveis e ruptura da membrana de biofilme, durante tratamento prolongado, em biofilmes formados por cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa*. Em contraste com os biofilmes não tratados - altamente tolerantes a tobramicina, ciprofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim - bactérias do biofilme que sobreviveram ao tratamento de prata inicial foram altamente suscetíveis (KOSTENKO et al., 2010).

Complexos metálicos de ouro e prata contendo o sulfametoxazol (Figura 4) foram avaliados contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. O complexo de ouro foi no mínimo 256 vezes mais ativo do que uma mistura 5:1 contendo o SMX e o antimicrobiano TMP frente a bactéria *S. aureus* e 64 vezes mais ativo quando comparado ao SMX frente a *E. coli*. O complexo de prata é 4 vezes mais ativo do que o fármaco livre frente aos dois micro-organismos. Ambos os compostos metálicos foram mais ativos que o SMX frente a *P. aeruginosa*, sendo que o complexo de prata foi 32 vezes mais ativo (MARQUES et al., 2007).

Figura 4 – Estrutura química de complexos metálicos com sulfonamidas.



Complexos metálicos de prata, cobre, mercúrio e cádmio contendo sulfametoxazol sintetizados pelo mesmo grupo de pesquisa tiveram atividade inibitória em biofilmes de *E. coli* (MIZDAL, 2014). Portanto, essas novas sulfonamidas serão o alvo principal deste estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobacteriana e antibiofilme de sulfonamidas complexadas com Au, Cu, Cd, Ag e Hg.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar, as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) das sulfonamidas complexadas com metais frente a *Mycobacterium smegmatis*;

3.2.2 Determinar, as CIMs dos sais utilizados na síntese das sulfonamidas complexadas com metais frente a *M. smegmatis*;

3.2.3 Avaliar a interação entre as sulfonamidas e o trimetoprim frente as cepas padrão de *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* e isolados clínicos;

3.2.4 Determinar, as CIMs das sulfonamidas complexadas com metais frente a micobacterias de crescimento rápido (MCR);

3.2.5 Avaliar a ação dos compostos frente as MCR através de um estudo de cinética bacteriana;

3.2.6 Avaliar a interação entre as sulfonamidas e o trimetoprim frente MCR;

3.2.7 Avaliar a inibição da formação de biofilmes de MCR pelas sulfonamidas complexadas com metais;

3.2.8 Avaliar a destruição de biofilme de MCR pelas sulfonamidas complexadas com metais;

3.2.9 Avaliar a motilidade e a produção de *slime* das MCR cultivadas em meio com os compostos.

4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

4.1 ARTIGO CIENTÍFICO I

Evaluation of antimycobacterial activity of a sulphonamide derivative

Vanessa Albertina Agertt, Lenice Lorenço Marques, Pauline Cordenonsi Bonez, Tanise Vendruscolo Dalmolin, Gelson Noe Manzoni de Oliveira, Marli Matiko Anraku de Campos.

Publicado no periódico: **Tuberculosis**

Tuberculosis 93 (2013) 318e321 doi: 10.1016/j.tube.2013.02.003

Evaluation of antimycobacterial activity of a sulphonamide derivative

Vanessa Albertina Agertt ^{a,*}, Lenice Lorenço Marques ^b, Pauline Cordenonsi Bonez ^a,
Tanise Vendruscolo Dalmolin ^a, Gelson Noe Manzoni de Oliveira ^b, Marli Matiko Anraku de
Campos ^a

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e Universidade Federal de Santa
Maria, Avenida Roraima 1000, 97105900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de química e 1000 Roraima Av.,
9710597 Santa Maria, RS, Brazil

SUMMARY

Mycobacterial infections including *Mycobacterium tuberculosis* have been increasing globally. The additional prevalence of multidrug-resistant (MDR-TB) strains and extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) stimulate an urgent need for the development of new drugs for the treatment of mycobacterial infections. It is very important to test the antimicrobial activity of novel compounds because they can be used in new with antimycobacterial drug formulation. Studies have shown that *Mycobacterium smegmatis* can be used in Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assays with the advantage of rapidly and safely screen anti-tubercular compounds. This paper presents an evaluation of potential mycobacteriological compounds derived from inorganic synthesis and their microbiological performance along and in conjunction with Trimethoprim. Antimicrobial activity experiments were carried out by using the microdilution technique in broth to evaluate the sensibility against *M. smegmatis*. MIC values were between 0.153 and 4.88 µg/ml for the compounds tested. Tests of interaction between drugs were made by the method of Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI). The compound [Au (sulfatiazolato)(PPh₃)] showed synergism FICI = 0.037 and was evaluated by isobols.

Keywords: Sulfonamides, *Mycobacterium smegmatis*, Trimethoprim, Antimycobacterial actives.

1. Introduction

Mycobacterial infections have been increasing globally and there has been an increased incidence of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB). In addition, the increase in AIDS-associated infections and other diseases that cause immunodeficiency has contributed to the increase in the number of cases and severity of diseases caused by the bacillus.^{1,2} Thus, it is necessary to develop new drugs and combinations of drugs to combat resistant strains. An alternative to this idea is to test new drugs with potential antimycobacterial and new combinations that increase the effectiveness of drugs even when their concentrations decrease.^{3e5}

If two drugs are associated and synergism occurs between them, we note that lower concentrations of the drugs are associated with the same effect against microorganisms, when compared with the effect of both drugs separately. Thus, the side effects, which are often toxic to humans, can be reduced since lower concentrations generally diminish such effects.⁶

As an example of synergism related to anti-tuberculosis drugs we can cite two drugs: ethambutol, which possesses ocular toxicity, and the para-aminosalicylic acid, which may cause nausea, vomiting, severe diarrhea, hepatotoxicity, rash and fever; however, these two drugs have dose dependent side effects. Ethambutol and para-aminosalicylic acid co-administered with isocotinoil hydrazones allows the use of a reduced dose, which in turn reduces these side effects.⁷

Sulphonamides and Trimetoprim have been widely used to treat bacterial infections. These two drugs act synergically inhibiting serial steps in the synthesis of tetra-acid hydrofolic interacting with key enzymes in this pathway.⁸ Forgacs et al.⁹ reported that the combination of Trimethoprim/Sulfamethoxazole could be used in the treatment of tuberculosis cases, including the type caused by MDR-TB and extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) strains.

Several studies have reported significant results regarding the use of new sulphonamide derivative compounds against *M. tuberculosis*.^{10,11} Suling et al.^{12,13} proved the effectiveness of an analogue Trimethoprim, a dihydrofolate reductase inhibitor, against the *Mycobacterium avium* complex, as well as synergistic activity with sulphamethoxazole. Given these facts, it is believed that new complexes of sulphonamide with metals may have a potential antimycobacterial as well as synergism with Trimethoprim.

2. Material and methods

Mycobacterium smegmatis mc2155 (ATCC 700084) was used in a preliminary study. After this we used the standard strain of *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618) and nine *M. tuberculosis* isolates susceptible to rifampicin and isoniazid. Both standard strains were maintained on Löwenstein-Jensen (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, India) agar until needed.

The inoculum was prepared in base medium Middlebrook 7H9 supplemented with 10% OADC (oleic acid-albumin-dextrose catalase) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) and 0.2% glycerol (MD7H9) and homogenized in ultrasound for one minute. The concentration of bacteria in this medium was determined by optical density on spectrophotometer (0.08 e 0.1 of absorbance at 625 nm) of 0.5 McFarland scale and then diluted with MD7H9 up to 105 CFU/mL for *M. smegmatis*, to reach the inoculum. The *M. tuberculosis* was used in a concentration of 0.5 McFarland (not diluted) because they are slow growing.

The compounds used in this study [Au (sulfatiazolato)(PPh₃)], [Au (sulfametoxazolato)(PPh₃)], [AuCl(PPh₃)], [Cu₂(m-CH₃COO)₄(sulfametoxazolato)₂], Cu(ac)₂.H₂O, [Cd (sulfametoxazolato)₂(CH₃OH)₂] n.x(CH₃OH), Cd(ac)₂.H₂O, [Hg (sulfametoxazolato)₂].2DMSO, Hg(ac)₂, [Ag (sulfametoxazolato)], and AgCl were synthesized at the Laboratory of Inorganic Materials (LMI), Department of Chemistry e Universidade Federal de Santa Maria as reported previously.¹⁵ These compounds, isoniazid, rifampicin and Trimethoprim (Sigma[®], USA) were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma[®], USA), from which further dilutions were made in MD7H9. To avoid interference by the solvent, the highest DMSO concentration was 0.5%.

The antimycobacterial activity was evaluated with a colorimetric broth microdilution assay as reported previously,^{16e18} with some modifications, as a result we obtained a minimum inhibitory concentrations (MICs) of each compound alone and in combinations was carried out as Checkboard dilution.¹⁴ Triplicate wells were used for each experimental condition. One hundred microliters of the standardized bacterial suspension was placed in each test well of a microtiter plate of 96 wells and an equal volume of compound to be tested in different concentrations. Each compound in the proper dilution was tested in triplicate. We performed a broth control, a growth control and a compound control for each compound concentration, which was used later to compare the results. The plates were incubated for 48 h for *M. smegmatis* and 7 days for *M. tuberculosis* at 37 °C. To check the growth or no colonies of microorganisms Tetrazolium bromide [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] (MTT) (Sigma[®], USA) dye was used to read the plates.¹⁹

The in vitro synergic activity was evaluated by using the fractional inhibitory concentration index (FICI). FICI was calculated using the following formula: $FICI = FIC_A + FIC_B$, where $FIC_A = (MIC_{Drug\ A\ in\ combination} / MIC_{Drug\ A\ alone})$ and $FIC_B = (MIC_{Drug\ B\ in\ combination} / MIC_{Drug\ B\ alone})$. $FICI < 0.5$, $0.5 \leq FICI \leq 1$, $1 < FICI \leq 4$, and $FICI > 4$ were defined as synergy, additive effect, indifference, and antagonism, respectively.^{12,20e23}

3. Results

The MIC of the complexes and salts were determined for a colorimetric broth microdilution assay (Table 1). The MIC of the complexes and salts associated with trimethoprim at a ratio of 5:1 was determined (Table 2).

From the results cited above, the MIC, the fractional inhibitory concentrations (FIC) and the FICI of the compound that showed synergism at the concentration of 5:1, in varying concentrations (Table 3) were determined. From these values, we developed an isobologram (Figure 1) to better visualize the results. To better assess the profile of synergism between [Au (sulfatiazolato)(PPh₃)] and Trimethoprim, we determined the MIC and FICI for the salt, [AuCl (PPh₃)] (Table 4).

As the compound [Au (sulfatiazolato) (PPh₃)] had its best activity associated with Trimethoprim in the ratio 1:5 were tested against this standard strain of *M. tuberculosis* and nine clinical isolates (Table 5).

4. Discussion

We observed that the MIC values of the compounds [Cu(m-CH₃COO)₄(sulfametoxazolato)₂], [Cd (sulfametoxazolato)₂ (CH₃OH)₂]_{n.x}(CH₃OH), [Hg (sulfametoxazolato)₂].2DMSO, [Ag (sulfametoxazolato)] and [Au (sulfametoxazolato)(PPh₃)] were similar to those found for the drugs mentioned in the literature against *M. smegmatis*: 0.153 µg/ml, 0.153 µg/ml, 0.305 µg/ml, 0.305 µg /ml, 2.44 µg/ml, respectively for the compounds named above (Table 1), as well as 0.78 µg /ml for isoniazid.

The MICs obtained by the salt that originated each complexed compound had higher values than their complex. [AuCl(PPh₃)] (9.76 µg/ml) had an MIC greater than its complexes, [Au (sulfatiazolato)(PPh₃)] (4.88 µg/ml) and [Au (sulfametoxazolato)(PPh₃)] (2.44 µg/ml); Cu(ac)₂.H₂O (2.44 µg/ml) greater than [Cu(m-CH₃COO)₄(sulfametoxazolato)₂] (0.153 µg/ml), Cd (ac)₂H₂O (2.44 µg/ml) greater than [Cd (sulfametoxazolato)₂(CH₃OH)₂]

n.x(CH₃OH) (0.153 µg/ml); Hg(ac)₂ (19.53 µg/ml) greater than [Hg (sulfametoxazolato)₂].2DMSO (0.305 µg/ml) and AgCl (9.76 µg/ml) greater than [Ag (sulfametoxazolato)] (0.305 µg/ml). This leads us to believe that the mechanism of inhibition of compounds is related to the same mechanism of sulphonamides.

Available preparations of Trimethoprim/Sulphamethoxazole are manufactured in a fixed ratio of 1:5 that results in a desired peak serum ratio of approximately 1:20. Our preliminary tests for the screening were based on a concentration of 1:5 as the commercial preparation.⁸ Three out of eleven compounds tested showed antagonism, four showed indifference, three showed additive effect and one showed synergy (Table 2). [Au (sulfatiazolato)(PPh₃)] was the best assessed through other proportions used for the preparation of isobols.

The diagonal line of the isobols represents the additive effect. A point below this line represents synergism and a point above this line represents antagonism. Thus, the [Au (sulfatiazolato)(PPh₃)] showed isobols (Figure 1) typical of synergism, presenting all points below the diagonal line. Yet the salt [AuCl(PPh₃)], used for the synthesis of [Au (sulfatiazolato)(PPh₃)], showed only additive effect when combined with Trimethoprim (Table 4). This fact leads us to believe that the activity, still unknown to [Au (sulfatiazolato)(PPh₃)], is related to the activities of sulphonamides.

The result obtained for the combination of [Au (sulfatiazolato)(PPh₃)] and Trimethoprim showed significant improvement in the antimycobacterial activity than when tested alone. Based on calculations of FICI, the combination of [Au (sulfatiazolato)(PPh₃)] with Trimethoprim exhibited synergism showing a mean value of 0.044, quite below the threshold used to determine synergism, FICI = 0.5. This may be explained on the assumption that the Trimethoprim may inhibit bacterial dihydrofolate reductase (DHFR). In succession, [Au (sulfatiazolato)(PPh₃)] may exert its antibacterial activity by inhibiting probably another enzyme in the folate pathway, dihydropteroate synthase (DHPS), as well as other sulphonamides previously studied.⁸

Leonard et al.²⁴ reported that the test Trimethoprim/sulfamethoxazole against commercial methicillin resistant *Staphylococcus aureus* community-acquired (CA-MRSA) had an MIC of 0.25 µg/ml. This value is similar to that found for the association [Au (sulfatiazolato) (PPh₃)]/Trimethoprim in the best ratio (0.152 µg/ml). Our result is optimistic taking into consideration that our study was conducted with mycobacteria.

The tested as trimethoprim alone opposite the typical strain of *M. tuberculosis* had an MIC of 4.88 µg/ml, well above the MIC found Isoniazid and Rifampicin for that were ≤ 0.25

µg/ml. But when combined with [Au (sulfatiazolato) (PPh₃)] its MIC decreased to 0.24 µg/ml. Therefore, our results showed that the synergistic activity can be extended to *M. tuberculosis*, once that almost half the clinical isolates demonstrated synergistic activity between compound sulphamethoxazole with gold associated with trimethoprim.

The FICI proved to be a simple and easily performed method to assess the relationship *in vitro* between the two drugs through a profile dilution expressed in isobols. We believe that *in vitro* methods used to predict the *in vivo* activity (for example, the FICI method for instance) are not highly reliable without some knowledge of pharmacological parameters of the drug. However, our results are preliminary and of sufficient interest to warrant further studies.

As a conclusion, the compounds analyzed showed that the MICs were important in their preliminary antimycobacterial evaluation. A synergism between the compound of lower MIC and Trimethoprim was observed.

Ethical approval: None.

Funding: None.

Conflict of interest: None.

References

1. World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010.
2. World Health Organization. WHO report 2009: global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009.
3. Mitnik CD, McGee B, Peloquin CA. Tuberculosis pharmacotherapy: strategies to optimize patient care. *Expert Opin Pharmacother* 2009;10(3):381e401.
4. Resch SC, Salomon JA, Murray M, Weinstein MC. Cost-effectiveness of treating multidrug-resistant tuberculosis. *PLoS Med* 2006;3(7):1048e57.
5. Salomon JA, Lloyd-Smith JO, Getz WM, Resch S, Sánchez MS, Porco TC, Borgdorff MW. Prospects for advancing tuberculosis control efforts through novel therapies. *PLoS Med* 2006;3(8):1302e9.
6. Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy: approaching a new generation of phitopharmaceuticals. *Phytomedicine* 2009;16:97e110.

7. De Logu A, Onnis V, Saddi B, Congiu C, Schivo ML, Cocco MT. Activity of a new class of isonicotinoylhydrazones used alone and in combination with isoniazid, rifampicin, ethambutol, para-aminosalicylic acid and clofazimine against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:275e82.
8. Masters PA, O'Bryan TA, Zurlo J, Miller DQ, Joshi N. Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. *Arch Intern Med* 2003;163:402e10.
9. Forgacs P, Wengenack NL, Hall L, Zimmerman SK, Silverman ML, Roberts GD. Tuberculosis and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(11):4789e93.
10. Wilkinson BL, Bornaghi LF, Wright AD, Houston TA, Poulsen SA. Anti-mycobacterial activity of a bis-sulfonamide. *Bioorg Med Chem* 2007;17:1355e7.
11. Owen DJ, Davis CB, Hartnell RD, Madge PD, Thomson RJ, Chong AKJ, Coppel RL, von Itzstein M. Synthesis and evaluation of galactofuranosyl N, N-dialkylsulfenamides and sulfonamides as antimycobacterial agents. *Bioorg Med Chem* 2007;17:2274e7.
12. Suling WJ, Seitz LE, Reynolds RC, Barrow WW. New mycobacterium aviumantifolate shows synergistic effect when used in combination with dihydropteroate synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(11): 4801e3.
13. Suling WJ, Seitz LE, Pathak V, Westbrook L, Barrow EW, Zywno-Van-Ginkel S, Reynolds RC, Piper JB, Barrow WW. Antimycobacterial activities of 2,4- Diamino-5-Ddeazapteridine derivatives and effects on mycobacterial dihydrofolate reductase. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(10):2784e93.
14. Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy: what value are they. *J Antimicrob Chemother* 2004;54(5):854e69.
15. Marques LL, Oliveira GM, Lang ES, Campos MMA, Gris LRS. New gold(I) and silver(I) complexes of sulfamethoxazole: synthesis, X-ray structural characterization and microbiological activities of triphenylphosphine (sulfamethoxazolato- N₂) gold(I) and (sulfamethoxazolato) silver(I). *Inorg Chem Commun* 2007;10:1083e7.
16. Sankar MM, Gopinath K, Singla R, Singh S. In-vitro antimycobacterial drug susceptibility testing of non-tubercular mycobacteria by tetrazolium microplate assay. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008;7(15):1e9.
17. Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, Degnan MT, Cook MB, Quenzer VK, Ferguson RM, Gilman RH. Rapid lowtechnology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplatealamar blue assay. *J Antimicrob Chemother* 1998;36(2):362e6.

18. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In: NCCLS/CLSI document M7-A6. Wayne, PA: NCCLS; 2003.
19. Mshana RN, Tadesse G, Abate G, Miörner H. Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifanpin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1998;36(5):1214e9.
20. Lechner D, Gibbons S, Bucar F. Plant phenolic compounds as ethidium bromide efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother* 2008;62: 345e8.
21. Boucher AN, Tam VH. Mathematical formulation of additivity for antimicrobial agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;55:319e25.
22. vanVuuren SF, Viljoen AM. In vitro evidence of phyto-synergy for plant part combinations of *Croton gratissimus* (Euphorbiaceae) used in African traditional healing. *J Ethnopharmacology* 2008;119:700e4.
23. Elion GB, Singer S, Hitchings GH. Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. *J Biol Chem* 1954;208:477e88.
24. Leonard SN, Kaatz GW, Rucker RL, Rybac MJ. Synergy between gemifloxacin and trimetoprim/sulfamethoxazole against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:1305e10.

TABLE 1.

MIC values for compounds tested against *Mycobacterium smegmatis*.

Compounds	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
[Au (sulfatiazolato)(PPh ₃)]	4.88
[Au(sulfametoxazolato)(PPh ₃)]	2.44
[AuCl(PPh ₃)]	9.76
[Cu ₂ (μ -CH ₃ COO) ₄ (sulfametoxazolato) ₂]	0.153
Cu(ac) ₂ .H ₂ O	2.44
[Cd(sulfametoxazolato) ₂ (CH ₃ OH) ₂] _n .x(CH ₃ OH)	0.153
Cd(ac) ₂ H ₂ O	2.44
[Hg(sulfametoxazolato) ₂].2DMSO	0.305
Hg(ac) ₂	19.53
[Ag(sulfametoxazolato)]	0.305
AgCl	9.76
Trimethoprim	4.88

TABLE 2.

Values of FICI for the compounds tested against *Mycobacterium smegmatis*.

Compounds in combination with Trimethoprim	FICI
[Au(sulfatiazolato)(PPh ₃)]	0.037 synergism
[Au(sulfametoxazolato)(PPh ₃)]	0.550 additive effect
[AuCl(PPh ₃)]	0.700 additive effect
[Cu ₂ (μ -CH ₃ COO) ₄ (sulfametoxazolato) ₂]	1.024 indifference
Cu(ac) ₂ .H ₂ O	8.312 antagonism
[Cd(sulfametoxazolato) ₂ (CH ₃ OH) ₂] _n .x(CH ₃ OH)	0.512 additive effect
Cd(ac) ₂ H ₂ O	2.976 indifference
[Hg(sulfametoxazolato) ₂].2DMSO	1.061 indifference
Hg(ac) ₂	9.812 antagonism
[Ag(sulfametoxazolato)]	1.061 indifference
AgCl	5.907 antagonism

TABLE 3.

Values of MIC, the FIC and of FICI for the compounds tested in order of increasing concentration of Trimethoprim against *Mycobacterium smegmatis*.

	MIC	FIC	MIC	FIC	FICI
Trimethoprim/[Au(sulfatiazolato) (PPh ₃)] rate	(µg/ml)	Trimethoprim	[Au(sulfatiazolato) (PPh ₃)] in associate	[Au(sulfatiazolato) (PPh ₃)]	
1:0	4.88	1	N/A	0	1
1:3	0.076	0.01557	0.152	0.03115	0.0467
1:4	0.05067	0.01038	0.152	0.03115	0.0415
1:5	0.07625	0.01563	0.305	0.0625	0.0781
1:6	0.0304	0.00623	0.152	0.03115	0.0374
1:7	0.02533	0.00519	0.152	0.03115	0.0363
1:8	0.02171	0.00445	0.152	0.03115	0.0356
1:9	0.019	0.00389	0.152	0.03115	0.035
0:1	N/A	0	4.88	1	1

Trimethoprim's MIC = 4.88 µg/ml; [Au(sulfatiazolato) (PPh₃)]'s MIC = 4.88 µg/ml.

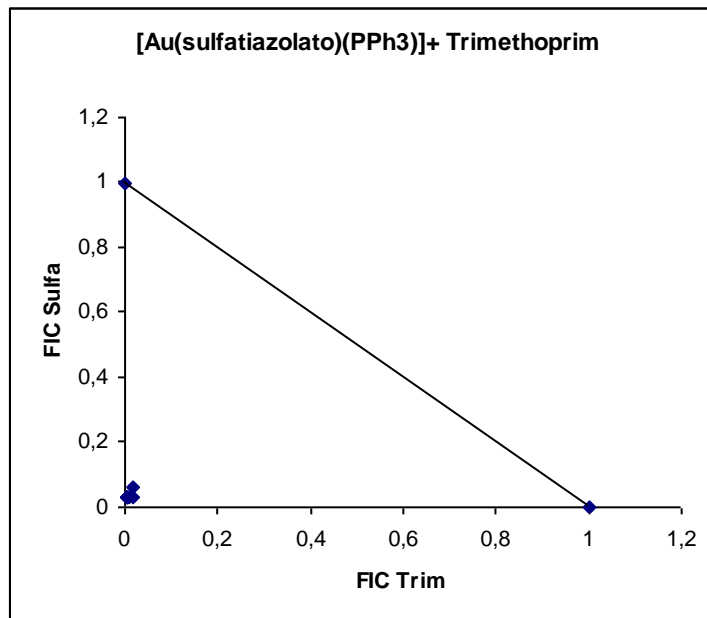


Fig. 1: isobols of [Au (sulfatiazolato) (PPh₃)] and Trimethoprim against *Mycobacterium smegmatis*.

TABLE 4. Values of MIC, the FIC and FICI for compounds tested in order of increasing concentration of Trimethoprim against *Mycobacterium smegmatis*

Trimethoprim/ [AuCl(PPh ₃)] rate	MIC Trimethoprim in the (µg/ml)	FIC Trimethopri the associatem	MIC [AuCl(PPh ₃)] the associate (µg/ml)	inFIC [AuCl(PPh ₃)]	FICI
1:0	4.88	1	N/A	0	1
1:3	2.44	0.5	4.88	0.5	1
1:4	1.62667	0.3333	4.88	0.5	0.8333
1:5	1.22	0.25	4.88	0.5	0.75
1:6	0.976	0.2000	4.88	0.5	0.7
1:7	0.81333	0.16667	4.88	0.5	0.6667
1:8	0.69714	0.14286	4.88	0.5	0.6429
1:9	0.61	0.125	4.88	0.5	0.625
0:1	N/A	0	9.76	1	1

Trimethoprim's MIC = 4.88 µg/ml; [AuCl(PPh₃)]'s MIC = 4.88 µg/ml.

TABLE 5. Values of MIC, the FIC and of FICI for the compounds tested against H37Rv and *M. tuberculosis* isolates on a concentration 1:5.

	MIC A (µg/ml)	MIC T (µg/ml)	MIC A in the associate (µg/ml)	FIC A	MIC T in the associate (µg/ml)	FIC T	FICI
H37Rv	4.88	>39.06	1.22	0,25	0.244	0.006	0.256
1	>39.06	>39.06	1.22	0,031	0.244	0.006	0.037
2	0.976	>39.06	0.152	0,155	0.0304	0.0007	0.1557
3	2.44	>39.06	2.44	1	0.488	0.012	1.0012
4	4.88	>39.06	2.44	0,5	0.488	0.012	0.512
5	2.44	>39.06	1.22	0,5	0.244	0.006	0.506
6	4.88	>39.06	1.22	0,25	0.244	0.006	0.256
7	4.88	>39.06	0.61	0,082	0.122	0.003	0.085
8	1.22	>39.06	2.44	2	0.488	0.012	2.012
9	0.61	>39.06	0.61	1	0.122	0.003	1.003

A: [Au(sulfatiazolato) (PPh₃)], T: Trimethoprim

4.2 ARTIGO CIENTÍFICO II

Identification of antimicrobial activity among new sulfonamide metal complexes for combating rapidly growing mycobacteria.

Vanessa Albertina Agertt, Pauline Cordenonsi Bonez, Grazielle Guidolin Rossi, Vanessa da Costa Flores, Fallon Siqueira, Caren Rigon Mizdal, Lenice Lorenço Marques, Gelson Noe Manzoni de Oliveira, Marli Matiko Anraku de Campos

Publicado no periódico: **BioMetals**

Biomaterials 2016 Oct; 29(5):807-16. doi: 10.1007/s10534-016-9951-3. Epub 2016 Aug 27.

Identification of antimicrobial activity among new sulfonamide metal complexes for combating rapidly growing mycobacteria.

Vanessa Albertina Agertt¹, Pauline Cordenonsi Bonez¹, Grazielle Guidolin Rossi¹, Vanessa da Costa Flores¹, Fallon Siqueira¹, Caren Rigon Mizdal¹, Lenice Lorenço Marques², Gelson Noe Manzoni de Oliveira², Marli Matiko Anraku de Campos¹

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Santa Maria, 1000 Avenida Roraima, 97105900 Santa Maria, RS, Brazil

² Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Maria, 1000 Avenida Roraima, 9710597 Santa Maria, RS, Brazil

Abstract

Mycobacteriosis is a type of infection caused by rapidly growing mycobacteria (RGM), which can vary from localized illness, such as skin disease, to disseminated disease. Amikacin, cefoxitin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, imipenem and sulfamethoxazole are antimicrobial drugs chosen to treat such illnesses; however, not all patients obtain the cure. The reason why the treatment does not work for those patients is related to the fact that some clinical strains present resistance to the existing antimicrobial drugs; thereby, the research of new therapeutic approaches is extremely relevant. The coordination of antimicrobial drugs to metals is a promising alternative in the development of effective compounds against resistant microorganisms. Sulfonamides complexed with Au, Cd, Ag, Cu, and Hg have shown excellent activity against a variety of microorganisms. Considering the importance of fighting against infections associated with RGM, the objective of this study is to evaluate the antimycobacterial activity of metal complexes of sulfonamides against RGM. Complexed sulfonamides activity were individually tested and in association with trimethoprim. The minimum inhibitory concentration (MIC) and time-kill curve of compounds against the standard strains of RGM (*Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841) and *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898)) was determined. The interaction of sulfonamides with trimethoprim was defined by Inhibitory Concentration Index Fractional (ICIF) for each association. The results showed that sulfonamides complexed

whit metals have outstanding antimicrobial activity when compared to free sulfamethoxazole, bactericidal activity and synergistic effect when combined with trimethoprim.

Keywords: Sulfamethoxazole, metal complexes, Trimethoprim, Rapidly growing mycobacteria, susceptibility.

1. Introduction

Rapidly growing mycobacteria (RGM) are species of nontuberculous mycobacterial (NTM) isolated commonly from opportunistic infections, and *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* are the most frequently found species in syndrome tails by this group of bacterial (Esteban et al. 2008). *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. chelonae* are known to be human pathogens for a long time. All species involved in this group are environmental organisms that became human pathogens under special circumstances or risk factors (Ortíz-Pérez et al. 2011).

The treatment for infections caused by RGM vary according to the nature of the disease, unlike chemotherapy used for diseases caused by slowly growing mycobacteria (Brown-Elliott & Wallace, 2002). A main panel of antimicrobial agents for these species includes amikacin, cefoxitin, ciprofloxacin, clarithromycin, Doxycyclin, imipenem and sulfonamides - sulfamethoxazole trimethoprim, which may be associated with trimethoprim or not (Griffith et al. 2007). However, there is still an urgent need to develop better, safer, and more effective oral antimicrobials to combat RGM, especially *M. abscessus*. Lung disease caused by this latter, for example, is complicated to be treated despite the availability of drugs (Brown-Elliott & Wallace 2002).

Trimethoprim (TMP) is used in combination with sulfonamides. Introduced in 1968, sulfamethoxazole-trimethoprim (TMP-SMX) remains a popular antimicrobial because of its low cost, effectiveness and familiarity among physicians. The clinical importance of TMP-SMX has declined gradually over the decades, mainly due to the development of resistance to these agents and the fast spread among the major bacterial pathogens. New safer and more effective antimicrobial agents have replaced the TMP-SMX in most of its clinical indications (Houvinen 2001).

However, TMP-SMX combination has been suggested to treat tuberculosis including isolated highly drug-resistant (Alsaad et al. 2013; Forgacs et al. 2009). The SMX used alone is also effective in patients with tuberculosis, but within macrophages it presents a decreased activity. SMX is an available and well tolerated drug thus a therapeutic alternative for cases of multidrug and extensively resistant tuberculosis (MDR and XDR-TB) in an initial phase (Davies Forsman et al., 2014). The association of TMP-SMX with antimicrobial drugs used in anti-TB therapy (isoniazid and rifampicin) has shown effectiveness against the MDR and XDR-TB (Vilchèze & Jacobs 2012).

In vitro studies have presented significant results in the use of novel derivatives of the sulfonamides against *Mycobacterium tuberculosis* (Owen et al. 2007; Wilkinson et al 2007).

In this context, it has been demonstrated the effectiveness of trimethoprim analogous against the *M. avium* complex, which is an inhibitor of dihydrofolate reductase with synergistic activity when in combination with SMX (Suling et al. 2005).

Anacona & Osorio (2008) synthesized a ternary complex Cu (II) coordinated to sulfathiazol and cefepime, an antimicrobial cephalosporin class. The compound obtained, [Cu(cefepime)(sulfathiazole)Cl] was more active than the drug cefepime in strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*.

Co (II), Cu (II), Ni (II) and Zn (II) complexes containing sulfonamides were synthesized by Chohan et al (2010), and assessed against a variety of strains, including *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Coordination compounds exhibit moderate antibacterial activity when compared to binders; however, they present good antifungal activity against diverse microorganisms, including *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Microsporium canis* and *Trichophyton mentagrophytes*.

Metal complexes of gold and silver containing SMX were evaluated against *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. The gold complex was at least 256 times more active than a 5:1 mixture containing SMX and TMP against *S. aureus* and 64 times more active when compared to SMX against *E. coli*. The silver complex is 4 times more active than the drug free against the two microorganisms. Both metal compounds were more active against *P. aeruginosa* than SMX, wherein the silver complex was 32 times more active (Lenice et al. 2007).

Metal complex of silver, copper, mercury and cadmium containing SMX synthesized by the same research group, and the same complexed sulfonamides they present action against clinical isolates of *M. tuberculosis* and one gold complex containing sulfadiazine showed synergistic effect with trimethoprim (Agertt et al. 2013). Therefore, these new sulfonamides were the main target of this study.

2. Materials and Methods

2.1 Compounds

Compounds sulfadiazine de Au-P₃, sulfadiazina α 2P-Au- Au-P₂, sulfamethoxazole Au-P₃, sulfamethoxazole α 2 P-Au- Au-P₂, sulfamethoxazolato Au, sulfamethoxazole Ag, sulfamethoxazole Hg, sulfamethoxazole Cd and sulfamethoxazole Cu were synthesized in Laboratório de Materiais Inorgânicos (LMI) of Departamento de Química of Universidade Federal de Santa Maria (Lenice Lorenço Marques, 2007). Sulfamethoxazole and trimethoprim were purchased from Sigma Chemical Company. Initial stock solutions of

these drugs and sulfonamide compounds were made in dimethyl sulphoxide (DMSO) at 50mg/ml from which further dilutions were made in Mueller Hinton (Merck) broth (156.25 – 1.22 µg/ml for sulfonamides e 128 – 2 µg/ml for sulfamethoxazole and trimethoprim).

2.2 *Mycobacterium strains*

MCR strains consisted of three ATCC strains, including *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841) and *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898). Standard strains were maintained on Löwenstein-Jensen (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, India) agar until needed.

2.3 *Antimicrobial susceptibility testing*

The standard broth microdilution method of CLSI M24-A2 (Woods et al. 2011) was used for the performance of susceptibility testing of compounds with antimicrobial potential, replacing the antimicrobial compounds in question. The standardization of the inoculum density for susceptibility testing was performed according to Mac Farland 0.5 scale. Reading of the plates was done after incubation for 72 hours at 35 ° C and the minimum inhibitory concentration (MIC) determined.

2.4 *Time-kill kinetics*

The culture was suspended and adjusted in Muller Hinton (MH) broth to obtain a bacterial suspension with 10^5 CFU/ml. Then, the inoculums was treated with various concentrations of sulfonamides in MH and incubated at 35°C. Culture aliquots were removed at days 1, 2, 3 and 4 for viable plate counts. The aliquots were plated on MH agar plates, and incubated at 35°C for 3 to 4 days. Cell viability was determined by enumerating colonies growing on the plates. (Aung et al. 2016).

2.5 *Association assessment between the compounds and trimethoprim*

The antimycobacterial activity of sulfonamides associated with trimethoprim was performed using the checkerboard method, considering the same parameters used in broth microdilution assay. The compounds tested were added to the wells of the plates. The concentrations used were determined from their respective MICs. Each test compound in serial dilution was arranged in an orderly manner on the plate: the first in the horizontal direction from right to left, and the second vertically, with decrease in MIC for both. Effects of the combination of the synthesized compounds with TMP were assessed by the fractional inhibitory concentration index (FICI) and made isobolograms. FICI was calculated using the following formula: $FICI = FIC_A + FIC_B$, where $FIC_A = (MIC_{Drug A \text{ in combination}}/MIC_{Drug A \text{ alone}})$ and $FIC_B = (MIC_{Drug B \text{ in combination}}/MIC_{Drug B \text{ alone}})$. $FICI < 0.5$, $0.5 \leq FICI \leq 1$, $1 < FICI \leq$

4, and FICI > 4 were defined as synergy, additive effect, indifference, and antagonism, respectively (Cuenca-Estrella 2004; Suling et al. 2005).

3. Results and Discussion

Increasing antimicrobial resistance, boosted by the extensive use of anti-infective drugs, represents a threat to public health, since it limits the therapeutic options. Thus, the continuous search for new drugs and the development of new antimicrobial is needed in order to replenish therapeutic arsenal lost over the years (Rocha et al. 2011).

Metal complexes with sulfamethoxazole have represented a satisfactory and viable alternative antimicrobial agents, presenting good results against Gram positive and Gram negative bacteria and fungi (Anaconda & Osorio 2008; Chohan et al. 2010; Lenice et al. 2007). Likely, new sulfonamides complexed with metals showed *in vitro* activity against *M. tuberculosis* and their effects were potentiated by the combination TMP (Agertt et al. 2013).

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the metal complexed with sulfonamides and the antimicrobial agents, trimethoprim and sulfamethoxazole are identified in Table 1. Most sulfonamides complexed with metals assessed in this study showed inhibitory action superior to SMX front of RGM strains. In previous studies we determined the MIC of metal salts that were used in the complexation of sulfonamides and we concluded that the antimicrobial activity is due to the complexing metal and not just to the metal (Agertt et al. 2013). Clearly, the metal complexing action of potentiated sulfonamides leads to possible alternative antimicrobial agents. This coordination is especially well exploited for the development of topical drugs, as in the case of the silver ion coordinated to the sulfadiazine, which combines in one compound, the antibacterial properties of silver ion and sulfadiazine (Rocha et al. 2011).

The time kill curve for those compounds had bactericidal activity are shown in figures 1, 2 and 3, other compounds obtained only bacteriostatic activity dose-dependent (data not shown). Time-kill studies revealed that sulfadiazina $\text{Ag} \cdot 2\text{P-Au-Au-P} \cdot 2$, sulfamethoxazolato Au and sulfamethoxazole Ag acted much more rapidly than the sulfamethoxazole free. sulfadiazina $\text{Ag} \cdot 2\text{P-Au-Au-P} \cdot 2$, sulfamethoxazolato Au and sulfamethoxazole Ag essentially sterilized the *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense* infection even when used at 1X MIC and 2X MIC after 24 h of treatment while the sulfamethoxazole free was not able to sterilize the infection within the time used in the study.

It is suggested that the increase in antimicrobial activity coordination compounds with metal ions occurs, probably, due to the presence of a system of electron donor present in

coordinated compounds. These donor groups and the relocation of electrons within the chelate reduce the polarity of the complexed metal. The chelation process increases the lipophilic character of the central metal atom, and then the lipophilic character favors the penetration of the complex through the lipid layer of the cell membrane of the microorganism (Chohan et al. 2010).

In the cases studied and presented in this paper, the oxidation states and densities of metallic ions are different (Marques et al. 2007). These factors, along with their ionic radii, may also represent significant influence on the penetration of metal ions across the bacterial membrane and therefore in their ability to act as antibacterianos agents.

Sulfonamides competing with p-aminobenzoic acid (PABA) active site of the FdIP dihydropteroate synthase (DHPS), an enzyme that catalyzes a key reaction in the synthetic route tetrafollic acid (TFA). The selective toxicity is related to the fact the bacteria to synthesise TFA, unlike human cells that do not have this capability and depend on an exogenous supply of folic acid. Bacteria that use preformed folic acid are not affected by sulfonamides (Vilchèze & Jacobs 2012).

TMP is another example of antimicrobial that inhibits folate biosynthesis; it is a member of the group of structures similar to pyrimidine, analogous in structure to the amino hydroxypyrimidine portion of folic acid molecule. TMP inhibits the enzyme dihydrofolate reductase (DHFR) present in mammalian cells as well as bacteria and protozoa cells, and the selective toxicity depends on the greater affinity of TMP by bacterial enzyme (Suling et al. 2000).

TMP-SMX association presents many advantages, among which is the fact that both have the same biological half-life and are secreted at the same speed. With its use occurs the "locking sequence", i.e. tetrahydrofolic acid biosynthesis is inhibited in two distinct phases: (1) inhibits the formation of dihydropteroic acid (by sulfonamide) and (2) inhibits the conversion of dihydrofolic acid to tetrahydrofolic acid (by trimethoprim) (Vilchèze & Jacobs 2012).

Each sulfonamide complexed with metal was tested in combination with trimethoprim by the checkerboard method against standard strains *M. fortuitum*, *M. abscessus* and *M. massiliense*. The MIC, FIC and FICI values from optimal proportions of the associated complexed sulfonamide with the trimethoprim are listed in Tables 2, 3 and 4 and the isobolograms made with MIC values are shown in Figures 4, 5 and 6.

When a diagonal line in the isobologram between MIC values for both antimicrobial acting separately the following interpretation is obtained: the diagonal line on the isobologram

represents an additive effect, a point below this line represents synergism and a point above this line represents antagonism (Suling et al. 2005). Therefore, the compounds analyzed, against the standard strains, showed a typical isobologram of synergism, as they presented all points below this diagonal line.

Results for the combination of new sulfonamides and TMP showed significant improvement in antibacterial activity compared when tested alone. This is probably because the inhibition of dihydrofolate reductase bacterial by TMP, in succession, the new complex of sulfonamides with metals could exercise their activity by inhibiting another enzyme in the pathway of folate, the dihydropteroate synthase (DHPS), target of sulfonamides.

The fractional inhibitory concentration index (FICI) proved to be a simple and easy to perform method of assessing the relative *in vitro* between the two drugs, through a profile dilutions expressed in an isobologram. We understand that *in vitro* methods used to predict the *in vivo* activity (eg FICI method) are not very reliable without some knowledge of the pharmacological parameters of the drug. However, these results are very important and suggest that the coordination of metals to sulfonamides appear to be a new strategy to the discovery of new antimicrobial agents. The coordination of the metal to sulfonamides should be well exploited, since there is the possibility of drug development, especially for topical use, such as in the case of the silver ion coordinated to sulfadiazine (Rocha et al. 2011). Our work represents preliminary results; however, it is attentive to narrow the search down for promising new approaches to combat persistent infections caused by RGM.

4. References

- Agertt, V. A., Marques, L. L., Bonez, P. C., Dalmolin, T. V., Manzoni De Oliveira, G. N., & De Campos, M. M. A. (2013). Evaluation of antimycobacterial activity of a sulphoamide derivative. *Tuberculosis*, 93(3), 318–321. <http://doi.org/10.1016/j.tube.2013.02.003>
- Alsaad, N., van der Laan, T., van Altena, R., Wilting, K. R., van der Werf, T. S., Stienstra, Y., ... Alffenaar, J. W. C. (2013). Trimethoprim/sulfamethoxazole susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(5), 472–474. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.07.011>
- Anacona, J. R., & Osorio, I. (2008). Synthesis and antibacterial activity of copper(II) complexes with sulphathiazole and cephalosporin ligands. *Transition Metal Chemistry*, 33(4), 517–521. <http://doi.org/10.1007/s11243-008-9074-y>

- Aung, T. T., Yam, J. K. H., Lin, S., Salleh, S. M., Givskov, M., Liu, S., ... Beuerman, R. W. (2016). Biofilms of Pathogenic Nontuberculous Mycobacteria Targeted by *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, 60(1), 24–35. <http://doi.org/10.1128/AAC.01509-15>
- Brown-Elliott, B. a., & Wallace, R. J. (2002). Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 716–746. <http://doi.org/10.1128/CMR.15.4.716-746.2002>
- Chohan, Z. H., Shad, H. a., Youssoufi, M. H., & Ben Hadda, T. (2010). Some new biologically active metal-based sulfonamide. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(7), 2893–2901. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.03.014>
- Cuenca-Estrella, M. (2004). Combinations of antifungal agents in therapy - What value are they? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(5), 854–869. <http://doi.org/10.1093/jac/dkh434>
- Davies Forsman, L., Schon, T., Simonsson, U. S. H., Bruchfeld, J., Larsson, M., Jureen, P., ... Angeby, K. (2014). Intra- and Extracellular Activities of Trimethoprim-Sulfamethoxazole against Susceptible and Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12), 7557–7559. <http://doi.org/10.1128/AAC.02995-14>
- Esteban, J., Martín-de-Hijas, N. Z., Kinnari, T. J., Ayala, G., Fernández-Roblas, R., & Gadea, I. (2008). Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *BMC Microbiology*, 8, 184. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-8-184>
- Forgacs, P., Wengenack, N. L., Hall, L., Zimmerman, S. K., Silverman, M. L., & Roberts, G. D. (2009). Tuberculosis and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(11), 4789–4793. <http://doi.org/10.1128/AAC.01658-08>
- Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. a., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., ... Winthrop, K. (2007). An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(4), 367–416. <http://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>
- Houvinen, P. (2001). Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Antimicrobial Resistance*, 32, 1608–1614. <http://doi.org/1058-4838/2001/3211-0014>

- Marques, L. L. (2007). *Síntese, estrutura e avaliação da atividade antimicrobiana de complexos metálicos com sulfametoxazol*.
- Marques, L. L., Manzoni de Oliveira, G., Schulz Lang, E., Anraku de Campos, M. M., & Soccol Gris, L. R. (2007). New gold(I) and silver(I) complexes of sulfamethoxazole: Synthesis, X-ray structural characterization and microbiological activities of triphenylphosphine(sulfamethoxazolato-N₂)gold(I) and (sulfamethoxazolato)silver(I). *Inorganic Chemistry Communications*, 10(9), 1083–1087. <http://doi.org/10.1016/j.inoche.2007.06.005>
- Ortíz-Pérez, A., Martín-De-Hijas, N., Alonso-Rodríguez, N., Molina-Manso, D., Fernández-Roblas, R., & Esteban, J. (2011). Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(2), 79–84. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.08.016>
- Owen, D. J., Davis, C. B., Hartnell, R. D., Madge, P. D., Thomson, R. J., Chong, A. K. J., ... Itzstein, M. von. (2007). Synthesis and evaluation of galactofuranosyl N,N-dialkyl sulfenamides and sulfonamides as antimycobacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(8), 2274–2277. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.01.068>
- Rocha, D. P., Pinto, G. F., Ruggiero, R., Oliveira, C. A. de, Guerra, W., Fontes, A. P. S., ... Pereira-Maia, E. C. (2011). Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. *Química Nova*, 34(1), 111–118. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422011000100022>
- Suling, W. J., Seitz, L. E., Pathak, V., Westbrook, L., Barrow, E. W., Zywno-Van-Ginkel, S., ... Barrow, W. W. (2000). Antimycobacterial activities of 2,4-diamino-5-deazapteridine derivatives and effects on mycobacterial dihydrofolate reductase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(10), 2784–2793. <http://doi.org/10.1128/AAC.44.10.2784-2793.2000>
- Suling, W. J., Seitz, L. E., Reynolds, R. C., & Barrow, W. W. (2005). New Mycobacterium avium antifolate shows synergistic effect when used in combination with dihydropteroate synthase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(11), 4801–4803. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4801-4803.2005>
- Vilchêze, C., & Jacobs, W. R. (2012). The combination of sulfamethoxazole, trimethoprim,

and isoniazid or rifampin is bactericidal and prevents the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(10), 5142–5148. <http://doi.org/10.1128/AAC.00832-12>

Wilkinson, B. L., Bornaghi, L. F., Wright, A. D., Houston, T. A., & Poulsen, S.-A. (2007). Anti-mycobacterial activity of a bis-sulfonamide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(5), 1355–1357. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.11.079>

Woods, G. L., Brown-Elliott, B. a, Conville, P. S., Desmond, E. P., Hall, G. S., Lin, G., ... Witebsky, F. G. (2011). *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard — Second Edition*. *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Vol. 31).

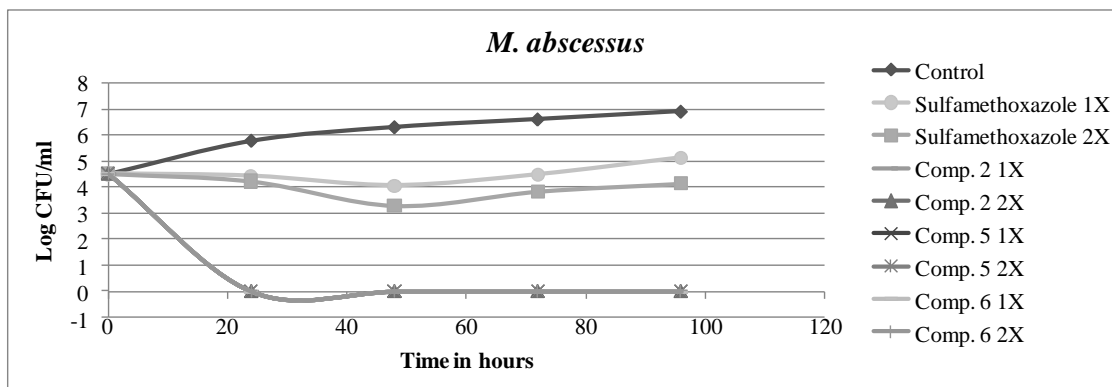


Fig. 1. Time kill curve of sulfamethoxazole, sulfadiazina α 2P-Au-Au- $P\alpha_2$ (compound 2), sulfamethoxazolato Au (compound 5) and sulfamethoxazole Ag (compound 6) on *M. abscessus*.

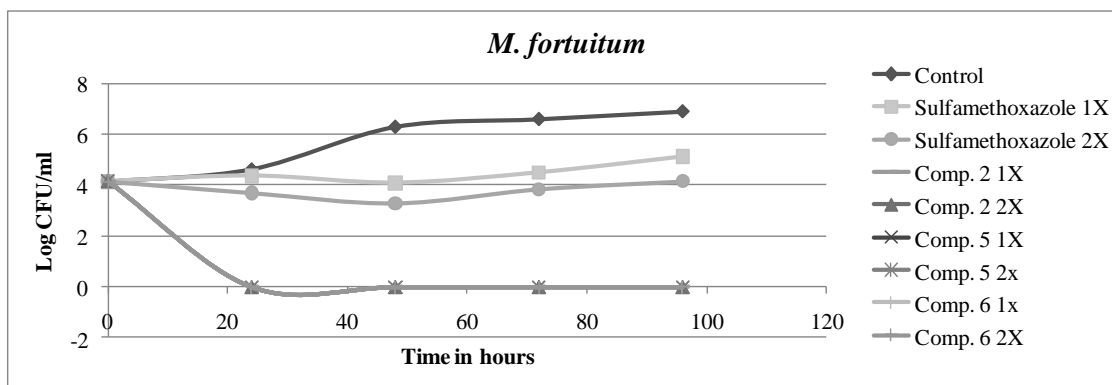


Fig. 2. Time kill curve of sulfamethoxazole, sulfadiazina α 2P-Au-Au- $P\alpha_2$ (compound 2), sulfamethoxazolato Au (compound 5) and sulfamethoxazole Ag (compound 6) on *M. fortuitum*.

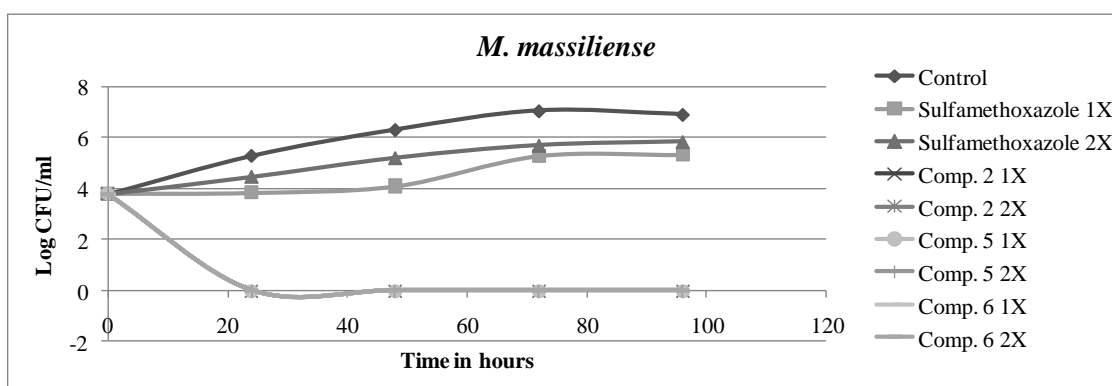


Fig. 3. Time kill curve of sulfamethoxazole, sulfadiazina α 2P-Au-Au- $P\alpha_2$ (compound 2), sulfamethoxazolato Au (compound 5) and sulfamethoxazole Ag (compound 6) on *M. massiliense*.

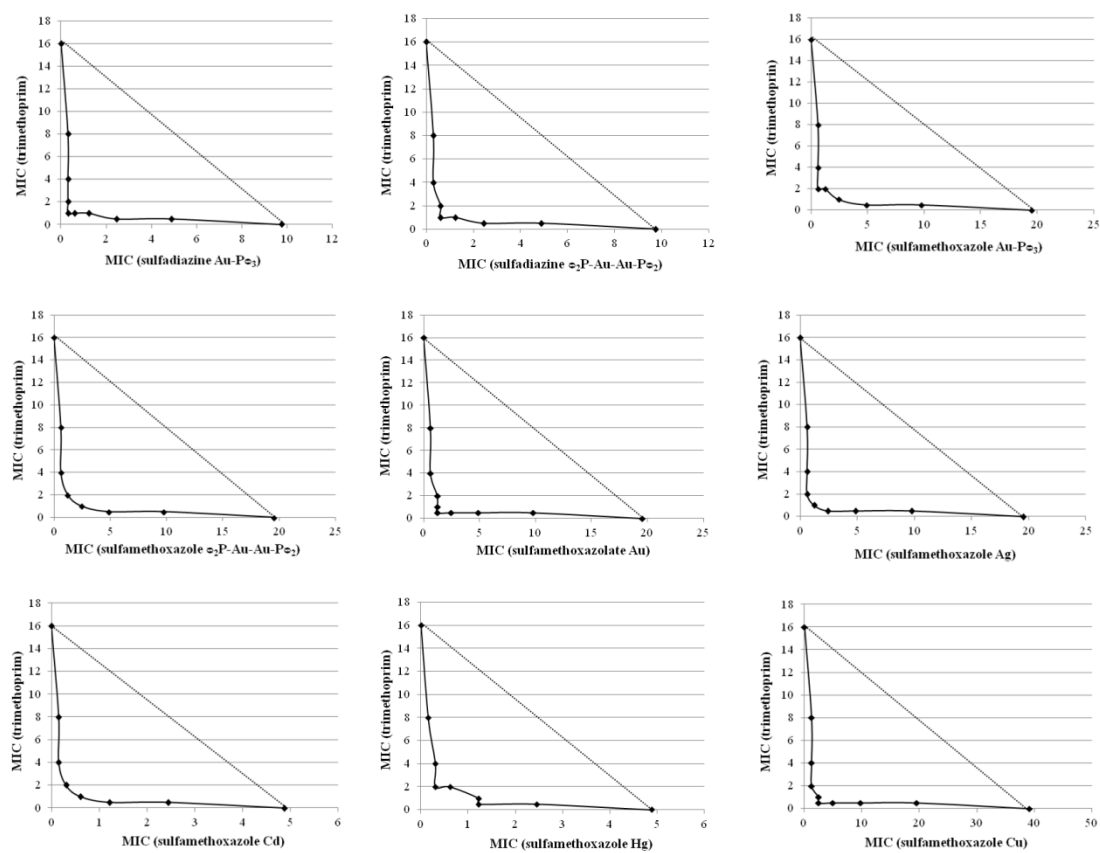
M. abscessus

Fig. 4. Isobolograms of sulfonamides complexed with metals associated with trimethoprim (MIC = 16 μ g/ml) in combination against *M. abscessus*.

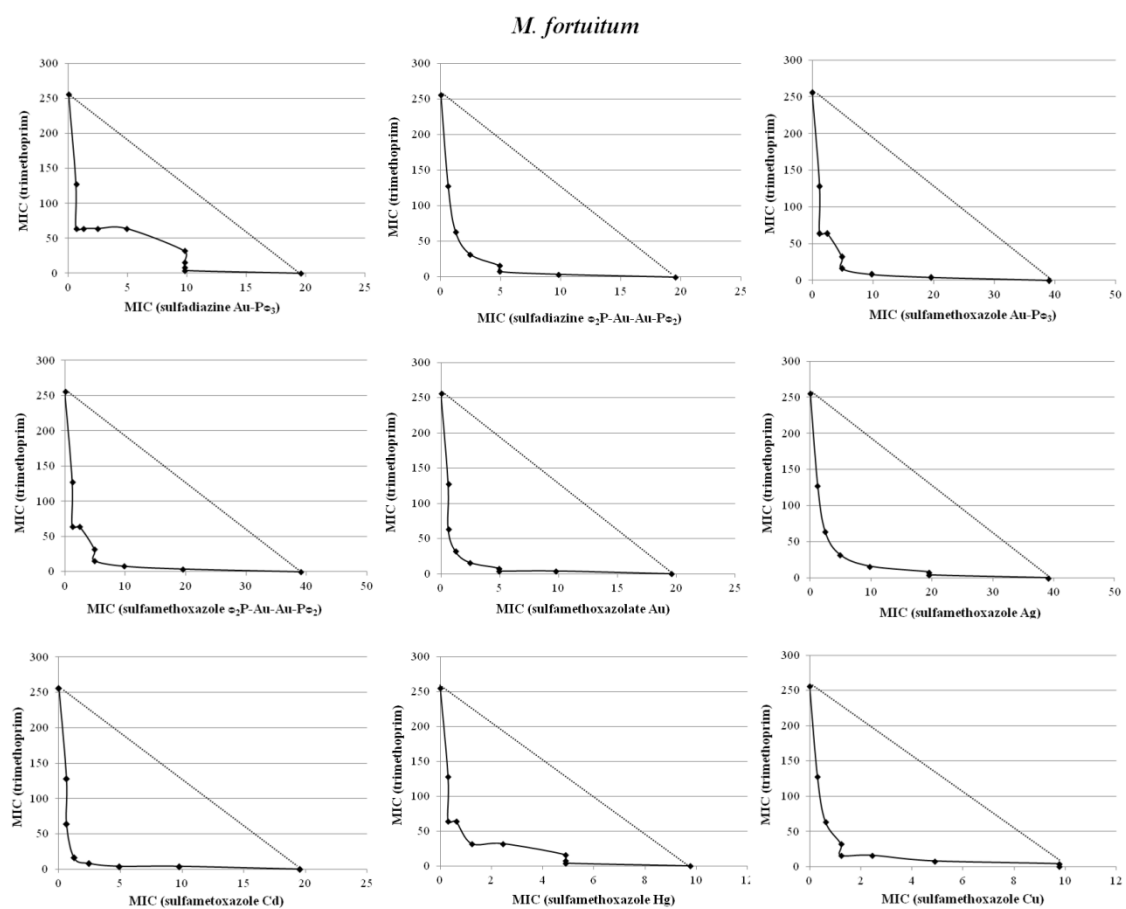


Fig. 5. Isobolograms of sulfonamides complexed with metals associated with trimethoprim (MIC = 256 μg/ml) in combination against *M. fortuitum*.

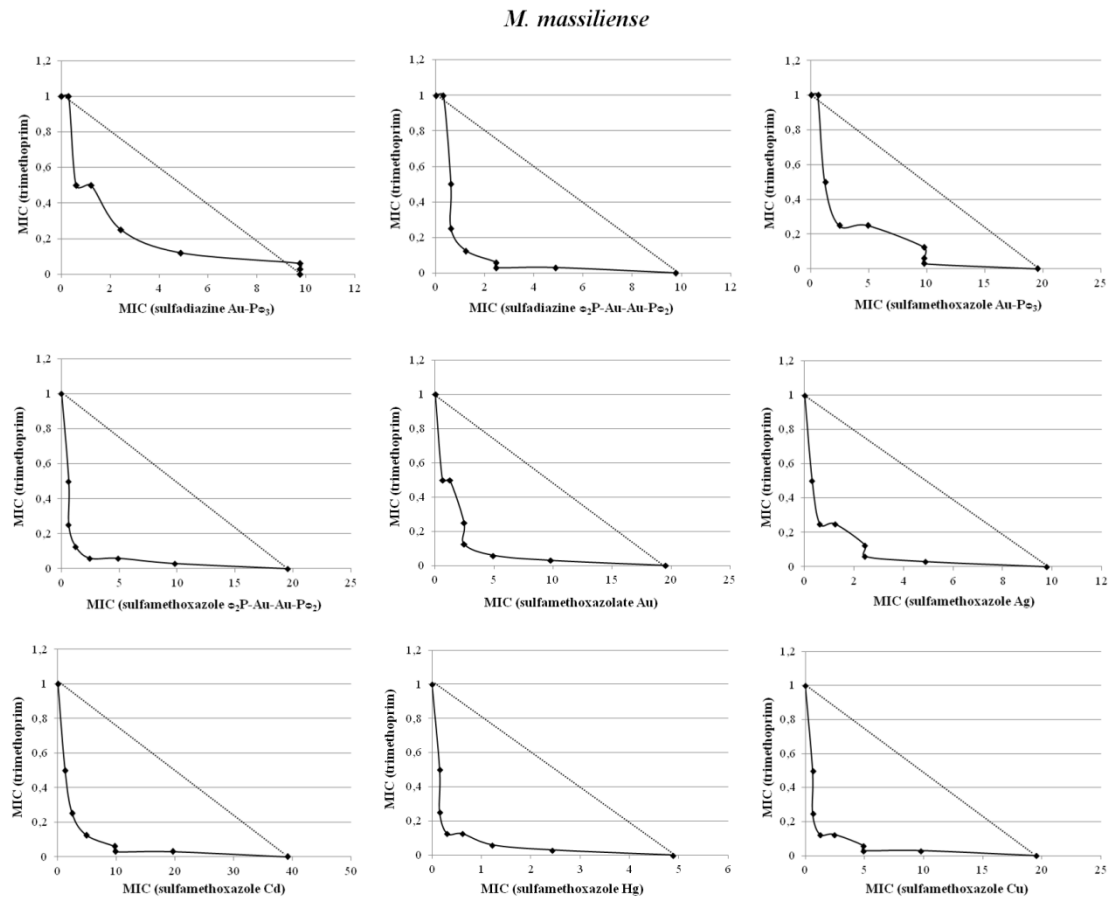


Fig. 6. Isobolograms of sulfonamides complexed with metals associated with trimethoprim (MIC = 1 µg/ml) in combination against *M. massiliense*.

Table 1

Values of the minimum inhibitory concentration for the standard strains of rapidly growing mycobacteria.

Compound	<i>M. fortuitum</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. massiliense</i>		
	MIC (µg/ml)		
sulfadiazina Au-P ₃	19.53	9.76	9.76
sulfadiazina 2P-Au-Au-P ₂	19.53	9.76	9.76
sulfamethoxazole Au-P ₃	39.06	19.53	19.53
sulfamethoxazole 2P-Au-Au-P ₂	39.06	19.53	19.53
sulfamethoxazolato Au	19.53	19.53	9.76
sulfamethoxazole Ag	39.06	19.53	9.76
sulfamethoxazole Cd	19.53	4.88	4.88
sulfamethoxazole Hg	9.76	4.88	4.88
sulfamethoxazole Cu	9.76	39.06	19.53
sulfamethoxazole	32	8	64
trimethoprim	256	16	1

MIC, minimum inhibitory concentration

Table 2

MIC, FIC, and FICI values ($\mu\text{g/ml}$) for optimal ratio of associated sulfonamide complexed/trimethoprim against *M. abscessus*.

Sulfonamides	MIC Sulf.	MIC TMP	FIC Sulf.	FIC TMP	FICI	Effect
sulfadiazina Au-P \varnothing_3	0.305	1	0.031	0.062	0.09	Synergy
sulfadiazina $\varnothing_2\text{P-Au-Au-P}\varnothing_2$	0.61	1	0.062	0.062	0.12	Synergy
sulfamethoxazole Au-P \varnothing_3	0.61	2	0.031	0.125	0.15	Synergy
sulfamethoxazole $\varnothing_2\text{P-Au-Au-P}\varnothing_2$	1.22	2	0.062	0.125	0.18	Synergy
sulfamethoxazolato Au	1.22	0.5	0.062	0.031	0.09	Synergy
sulfamethoxazole Ag	1.22	1	0.062	0.062	0.12	Synergy
sulfamethoxazole Cd	0.305	2	0.062	0.125	0.18	Synergy
sulfamethoxazole Hg	0.305	2	0.062	0.125	0.18	Synergy
sulfamethoxazole Cu	2.44	0.5	0.062	0.031	0.09	Synergy

MIC, minimum inhibitory concentration; FIC, fractional inhibitory concentration; FICI, fractional inhibitory concentration index; TMP, trimethoprim.

Table 3

MIC, FIC, and FICI values ($\mu\text{g/ml}$) for optimal ratio of associated sulfonamide complexed/trimethoprim against *M. fortuitum*.

Sulfonamides	MIC Sulf.	MIC TMP	FIC Sulf.	FIC TMP	FICI	Effect
sulfadiazina Au-P \varnothing_3	0.61	64	0.031	0.25	0.28	Synergy
sulfadiazina $\varnothing_2\text{P-Au-Au-P}\varnothing_2$	2.44	32	0.124	0.125	0.24	Synergy
sulfamethoxazole Au-P \varnothing_3	9.76	8	0.249	0.031	0.28	Synergy
sulfamethoxazole $\varnothing_2\text{P-Au-Au-P}\varnothing_2$	4.88	16	0.124	0.062	0.18	Synergy
sulfamethoxazolato Au	1.22	32	0.062	0.125	0.18	Synergy
sulfamethoxazole Ag	4.88	32	0.124	0.125	0.24	Synergy
sulfamethoxazole Cd	1.22	16	0.062	0.062	0.12	Synergy
sulfamethoxazole Hg	1.22	32	0.125	0.125	0.25	Synergy
sulfamethoxazole Cu	1.22	16	0.125	0.062	0.18	Synergy

MIC, minimum inhibitory concentration; FIC, fractional inhibitory concentration; FICI, fractional inhibitory concentration index; TMP, trimethoprim.

Table 4

MIC, FIC, and FICI values ($\mu\text{g/ml}$) for optimal ratio of associated sulfonamide complexed/trimethoprim against *M. massiliense*

Sulfonamides	MIC	MIC	FIC	FIC	FICI	Effect
	Sulf.	TMP	Sulf.	TMP		
sulfadiazina Au-P \varnothing_3	2.44	0.25	0.25	0.25	0.5	Additive efecct
sulfadiazina $\varnothing_2\text{P-Au-Au-P}\varnothing_2$	1.22	0.125	0.125	0.125	0.25	Synergy
sulfamethoxazole Au-P \varnothing_3	2.44	0.25	0.124	0.25	0.37	Synergy
sulfamethoxazole $\varnothing_2\text{P-Au-Au-P}\varnothing_2$	1.22	0.125	0.062	0.125	0.18	Synergy
sulfamethoxazolato Au	2.44	0.125	0.124	0.125	0.24	Synergy
sulfamethoxazole Ag	0.61	0.25	0.062	0.25	0.31	Synergy
sulfamethoxazole Cd	4.88	0.125	0.124	0.125	0.25	Synergy
sulfamethoxazole Hg	0.305	0.125	0.062	0.125	0.18	Synergy
sulfamethoxazole Cu	1.22	0.125	0.062	0.125	0.18	Synergy

MIC, minimum inhibitory concentration; FIC, fractional inhibitory concentration; FICI, fractional inhibitory concentration index; TMP, trimethoprim.

4.3 MANUSCRITO I

Sulfonamides complexed with metals like mycobacterial biofilms inhibitors.

Abstract

In recent years, there have been an increasing number of reports on nontuberculous mycobacterial in skin infections. The ability of rapidly growing mycobacteria (RGM) to evade the host immune response and the ability to adhere and to form biofilms on biological and synthetic substrates contribute to the issue. Therefore, there is an urgent need for new antimicrobial compounds that can overcome these problems. Sulfonamides complexed with Au, Cd, Ag, Cu, and Hg have shown excellent activity against a variety of microorganisms. Considering the importance of combat against infections associated with RGM, in this study, we evaluated the activity of metal complexes of sulfonamides against biofilms of RGM. The sulfonamides were tested individually for their ability to inhibit biofilm formation and biofilm dispersal against the standard strains of RGM (*Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841) and *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898)). The complexes of sulfonamides with metals prevent biofilm formation, probably by inhibiting c-di-GMP synthesis.

Keywords: rapidly growing mycobacteria, sulfonamides, biofilm, quorum sensing, c-di-GMP

Introduction

Atypical mycobacteria were classified in 1950 by Runyan, based on growth rates and pigmentation patterns. Nontuberculous mycobacteria (NTM) have been grouped into 4 broad categories according to the Runyon system. Groups I to III are slow-growing NTM, and group IV are fast growers. Among these organisms, rapidly growing mycobacteria (RGM) can produce a positive culture within 7 days (e.g., the *Mycobacterium fortuitum* group, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium abscessus*)¹ and have emerged as important human pathogens that cause a variety of diseases ranging from localized cutaneous infections to disseminated infections².

NTM and RGM are the two most prevalent *Mycobacterium* spp. that are associated with skin infections. Some surveys have reported that 75 % of patients who present disseminated infections involving the skin have been colonized by *M. fortuitum* and *M. chelonae*. The most common cutaneous or subcutaneous manifestations that are caused by the (RGM) are disseminated infections in immunocompromised patients, skin and soft tissue and post-surgical infections³.

Similar to other NTM, including slow-growing NTM species, RGM-associated skin and soft tissue infections are deep and can result in progressive tenosynovitis. Traumatic injuries, surgical wounds, and environmental exposures (e.g., water) are reported to be the major causes of NTM/RGM infections³. Although RGM infection is common in immunocompromised patients or in patients with antecedent chronic disease, recent studies have shown that RGM infection can occur in previously healthy patients with a history of surgical procedures such as liposuction or fat grafts⁴.

Contributing factors may include increased use of alternative medicine and increased numbers of procedures performed in freestanding surgical centers that are not routinely monitored by infection-control committees or equivalent oversight bodies. These establishments typically use tap water (non-sterile) for medical procedures and instruments cleaning not recommended⁵.

Detection of mycobacteria in biofilm samples from different water systems have been reported. Rapidly growing species, such as *M. fortuitum* and *M. chelonae*, have been described as part of these polymicrobial biofilms, as slowly growing mycobacteria⁶.

Biofilm development capacity is related to pathogenicity of these bacteria and antimicrobial resistance. The RGM are able to form biofilms *in vitro*, with differences regarding the importance of biofilms in the pathogenesis of human diseases⁷.

Most bacteria are able to switch between two different “lifestyles”: single cells (planktonic mode) and biofilm, a sessile microbial community. Biofilm and planktonic cells

differ significantly in their physiology, in genes expression and morphology. Biofilm cells are characterized by increased production of adhesion factors and extracellular polysaccharides (EPS), lower sensitivity to antibiotics and increased resistance to environmental stresses⁸.

Mycobacteria in biofilms resist high concentrations of antibiotics, unlike their planktonic counterparts.⁹ Biofilms formed by RGM were treated with amikacin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline and sulfamethoxazole and none of antimicrobials could completely eradicate the bacterial films. Furthermore, *M. fortuitum* was the microorganism that showed resistance to the antimicrobial inhibitory action when applied before the formation of mature biofilms¹⁰.

Metal complexes with sulfamethoxazole have shown good results against Gram positive and Gram negative bacteria and fungi¹¹⁻¹³. New sulfonamides complexed with metals showed *in vitro* activity against *Mycobacterium tuberculosis* and its effects were potentiated with the combination trimethoprim¹⁴. They also showed inhibitory activity against biofilms of *Escherichia coli*¹⁵. These results are very important and clearly demonstrate that coordination of metals to sulfonamides antimicrobials can prove to be a new strategy to the discovery of new anti-infective agents. Thus, these new sulfonamides were the main target of this study.

Materials and Methods

Compounds

Compounds sulfadiazine Au-P₃, sulfadiazine ₂P-Au-Au-P₂, sulfamethoxazole Au-P₃, sulfamethoxazole ₂P-Au-Au-P₂, sulfamethoxazolato Au, sulfamethoxazole Ag, sulfamethoxazole Hg, sulfamethoxazole Cd and sulfamethoxazole Cu were synthesized in Laboratório de Materiais Inorgânicos (LMI) of Departamento de Química of Universidade Federal de Santa Maria¹⁶. Sulfamethoxazole and trimethoprim were purchased from Sigma Chemical Company. Initial stock solutions of these drugs and sulfonamide compounds were dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) at 50mg/ml. Dilutions were made in Mueller Hinton (Merck) broth (39.06 – 0.153 µg/ml for sulfonamides e 64 – 0,125 µg/ml for sulfamethoxazole).

Strains and growth media.

Three ATCC strains of MCR were used, including *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841) and *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898). Standard strains were maintained on Löwenstein-Jensen (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, India) agar until needed.

Biofilm inhibition test

The sulfonamides were tested individually for their ability to inhibit biofilm formation of a mycobacterial species. The concentrations of the sulfonamides used were equal and lower than the MICs. The biofilm formation was adapted to macro-technique¹⁷, maintaining the proportions of medium, antibacterial and inoculum. In polystyrene test tubes with a 5 mL capacity were added 1 mL of Middlebrook 7H9 medium containing 1×10^7 CFU /mL of each bacterial species to be tested and 1 mL of the dilution of the sulfonamides to be evaluated. The tubes were covered with parafilm® and incubated at 30°C for 7 days.

Biofilm destruction test

Using the adapted technique¹⁷, in polystyrene tubes were added 1 mL of Middlebrook 7H9 medium containing 1×10^7 CFU/mL of the bacterial species, which were covered with parafilm ® and incubated at 30°C for 7 days. After biofilm formation, 1mL of sulfonamides was added to each tube in concentrations equal or higher than the MICs. The tube was covered with parafilm® and it was incubated at 30°C for 24 hours.

Quantification of biofilms

The biofilm was quantified as described¹⁸, adapted to macro-technique. The cells that were weakly adhered to the biofilm were removed by the rinsing with saline and the remainder was dried at room temperature for a few minutes. After this, it was added 2 mL of a suspension of 0.1% crystal violet and the tubes were kept at rest for 10 minutes to further rinsing with saline to remove remaining planktonic cells and the excess dye. 2 mL of 95% ethanol were added to each test tube, kept for 15 minutes, and transferred to disposable cuvettes for a later reading in optical density (OD) of 570nm. The biofilm formation was determined by the significant difference between the averages of absorbance obtained in the positive control (culture medium and bacteria) and the average obtained by the negative control (culture medium only). The experiment was performed in triplicate.

Statistical Analysis

The optical density readings obtained in the biofilm formation assay were recorded as mean \pm SE and were submitted to the t test (compared with the positive control). A P value $>$ 0.05 was considered to indicate statistical significance. Graphs were prepared using GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Results and Discussion

Bacterial biofilms can be formed *in vivo* and *in vitro* on a biotic or abiotic surface, such as minerals, surface of dead organisms, or air–water interfaces of medium, plants, other

microbes, and animals. The cell walls of mycobacteria are abundant with hydrophobic lipids such as mycolic acid, lipooligosaccharides, phthioceroldimycocerosates, phenolic glycolipids, lipoarabinomannan (LAM), and glycopeptidolipids (GPLs) which are intimately related to the morphology of the colony, biofilm formation, antibiotic resistance and virulence of mycobacteria.⁹

Genes responsible for the formation of biofilms, metabolic and signal transduction pathways are potential targets for new drugs. These inhibitors can be used alone or in combination with conventional antimicrobial agents ineffective.¹⁹

In this study, the RGM were able to form biofilm in the air-liquid interface (Figure 1) and the surface of polystyrene tubes. The sulfonamides complexed with metals were able to inhibit the formation of these biofilms, when used in subinhibitory concentrations. Thus, there was no inhibition of growth of colonies, but the inhibition of biofilm formation.

All sulfonamides complexed with metals showed activity, were able to inhibit biofilm formation in some degree. However, free sulfamethoxazole did not inhibit biofilm formation. Besides, the sulfadiazine $\text{S}2\text{P-Au-Au-P}32$ and sulfamethoxazole $\text{Au-P}33$ were able to inhibit completely *M. fortuitum* biofilm formation in some concentrations (Figure 2 to 6).

The biofilm formation is often regulated by coordinated process called quorum sensing (QS). QS is a cell to cell communication and it is involved in modulating the social behavior of bacteria. It is mediated by a variety of small molecules, an example is cyclic-di-GMP (c-di-GMP)²⁰.

c-di-GMP was discovered in 1987 by Benziman and coworkers as an activator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinus*. Since then, it has been discovered in several other bacterial species including mycobacteria. The cellular level of c-di-GMP in *M. smegmatis* may also be involved in biofilm formation under specific growth conditions²⁰.

Intracellular levels of c-di-GMP are determined by two classes of enzymes with opposite activities: diguanylatecyclases (DGCs), that synthesize c-di-GMP, and c-di-GMP phosphodiesterases (PDEs) that hydrolyze it into the inactive diguanylate phosphate (pGpG) form²⁰. Genes involved in c-di-GMP biosynthesis and amount of molecules are conserved in all Eubacteria, while absent in animal species. Thus suggesting that enzymes involved in c-di-GMP biosynthesis might be an interesting target for anti-biofilm agents.¹⁹

Study screening of compounds able to interfering with the synthesis of c-di-GMP demonstrated that sulfathiazole can inhibit c-di-GMP biosynthesis and prevent biofilm formation at subinhibitory concentrations in *E. coli*²¹.

The complexes of sulfonamides with metals prevent biofilm formation at concentrations not affecting planktonic cell growth. These sulfonamides could exercise their activity by inhibiting of the dihydropteroate synthase (DHPS), target of sulfonamides. It is suggested that increasing the antimicrobial activity of the compounds coordinated with metal ions occurs, probably, due to the presence of an electron donor present in the system in coordination compounds. These donor groups and the relocation of electrons within the chelate reduce the polarity of the complexed metal. The chelation process increases the lipophilic character of the central metal atom, favoring the penetration of the complex through the lipid layer of the cell membrane of the microorganism¹²

Sulfathiazole belongs to the sulfonamide class and is an inhibitor of di and tetrahydrofolate biosynthesis via interaction with the DHPS²². The depletion of intracellular tetrahydrofolate, in turn, affects various metabolic pathways, including biosynthesis of purine nucleotides. Antimicrobial activity of sulfonamides can be overcome by growing bacteria in complex media, thus providing products of tetrahydrofolate metabolism. Sulfathiazole affects tetrahydrofolate biosynthesis and nucleotide metabolism. It is probably that inhibition of c-di-GMP biosynthesis by sulfathiazole does not take place through direct inhibition of DGC activity, but through indirect effects, such as alteration of nucleotide pools, affecting the availability of the DGC substrate.²¹

The inhibition of nucleotide biosynthesis can block the production of modified nucleotides that act as signaling molecules for the biofilm formation, as c-di-GMP. This fact stimulates the degradation of nucleotide and recycling triphosphate for the production of DNA and RNA. Another possibility is partial inhibition of nucleotide biosynthesis, as seen in subinhibitory concentrations of sulfathiazole and fluorouracil, may result in failure to deoxyribonucleotides for DNA replication. The bacterial cell may react by abolishing “non-essential” DNA synthesis, such as production of extracellular DNA¹⁹. Extracellular DNA is an essential component of the matrix in RGM biofilm, thus, the DNase treatment can prevent the biofilm formation, a fact which must be explored²³.

Signal molecules, which inhibit biofilm formation, can also stimulate biofilm dispersal. This is the case for c-di-GMP, which not only influences biofilm formation but also affects the extent of biofilm detachment¹⁹. However our compounds were not able to destroy the biofilm already formed, at the concentrations tested (data not shown).

The resistance of bacterial biofilms to antibiotics difficult the therapeutic choice, thus making the biofilm inhibition and dispersing an attractive therapeutic target. Application

methods which exploit the biosynthesis and biofilm dispersion mediated by c-di-GMP should result in a greater number of promising biofilm inhibitors that can be used directly or provide the starting material for the development of new drugs.¹⁹. The complexes of sulfonamides with metals prevent biofilm formation, probably by inhibiting c-di-GMP synthesis. These results are very important and suggest that the coordination of metals to sulfonamides appear to be a new strategy to discovery of new antimicrobial agents. The coordination of the metal to sulfonamides should be well exploited, since there is the possibility of drug development, especially for topical use, such as in the case of the silver ion coordinated to sulfadiazine (Rocha et al. 2011). Our study provides preliminary results, however, in future research we aim to address more deeply new strategies to combat persistent infections caused by RGM.

References

1. Tortoli E, Tortoli E. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy : the New Mycobacteria of the 1990s Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy : the New Mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(2):319-354. doi:10.1128/CMR.16.2.319.
2. Brown-Elliott B a., Wallace RJ. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(4):716-746. doi:10.1128/CMR.15.4.716-746.2002.
3. Kothavade RJ, Dhurat RS, Mishra SN, Kothavade UR. Clinical and laboratory aspects of the diagnosis and management of cutaneous and subcutaneous infections caused by rapidly growing mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32(2):161-188. doi:10.1007/s10096-012-1766-8.
4. Lim JM, Kim JH, Yang HJ. Management of Infections with rapidly growing mycobacteria after unexpected complications of skin and subcutaneous surgical procedures. *Arch Plast Surg.* 2012;39(1):18-24. doi:10.5999/aps.2012.39.1.18.
5. De Groote M a, Huitt G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis.* 2006;42(12):1756-1763. doi:10.1086/504381.
6. Esteban J, Martín-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Ayala G, Fernández-Roblas R, Gadea I. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *BMC Microbiol.* 2008;8:184. doi:10.1186/1471-2180-8-184.
7. Muñoz-Egea MC, García-Pedrazuela M, Mahillo I, García MJ, Estebana J. Autofluorescence as a tool for structural analysis of biofilms formed by nonpigmented

- rapidly growing mycobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(3):1065-1067. doi:10.1128/AEM.03149-12.
8. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis.* 2001;33(8):1387-1392. doi:10.1086/322972.
 9. Xiang X, Deng W, Liu M, Xie J. Mycobacterium Biofilms: Factors Involved in Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies Against Biofilm-Relevant Pathogens. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2014;24(3):269-279.
 10. Flores VDC. PERFIL DE SUSCETIBILIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE BIOFILMES DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO. 2014.
 11. Anacona JR, Osorio I. Synthesis and antibacterial activity of copper(II) complexes with sulphathiazole and cephalosporin ligands. *Transit Met Chem.* 2008;33(4):517-521. doi:10.1007/s11243-008-9074-y.
 12. Chohan ZH, Shad H a., Yousoufi MH, Ben Hadda T. Some new biologically active metal-based sulfonamide. *Eur J Med Chem.* 2010;45(7):2893-2901. doi:10.1016/j.ejmech.2010.03.014.
 13. Marques LL, Manzoni de Oliveira G, Schulz Lang E, Anraku de Campos MM, Soccol Gris LR. New gold(I) and silver(I) complexes of sulfamethoxazole: Synthesis, X-ray structural characterization and microbiological activities of triphenylphosphine(sulfamethoxazolato-N₂)gold(I) and (sulfamethoxazolato)silver(I). *Inorg Chem Commun.* 2007;10(9):1083-1087. doi:10.1016/j.inoche.2007.06.005.
 14. Agertt VA, Marques LL, Bonez PC, Dalmolin TV, Manzoni De Oliveira GN, De Campos MMA. Evaluation of antimycobacterial activity of a sulphonamide derivative. *Tuberculosis.* 2013;93(3):318-321. doi:10.1016/j.tube.2013.02.003.
 15. Mizdal CR. AVALIAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *Escherichia coli*. 2014.
 16. Marques LL. Síntese, estrutura e avaliação da atividade antimicrobiana de complexos metálicos com sulfametoxazol. 2007.
 17. Carter G, Wu M, Drummond DC, Bermudez LE. Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *J Med Microbiol.* 2003;52(9):747-752. doi:10.1099/jmm.0.05224-0.
 18. Bonez PC, Dos Santos Alves CF, Dalmolin TV, et al. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. *Am J Infect Control.* 2013;41(12):4-7. doi:10.1016/j.ajic.2013.05.002.

19. Landini P, Antoniani D, Burgess JG, Nijland R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;86(3):813-823. doi:10.1007/s00253-010-2468-8.
20. Sharma IM, Petchiappan A, Chatterji D. Quorum sensing and biofilm formation in mycobacteria: Role of c-di-GMP and methods to study this second messenger. *IUBMB Life.* 2014;66(12):823-834. doi:10.1002/iub.1339.
21. Antoniani D, Bocci P, MacIąg A, Raffaelli N, Landini P. Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;85(4):1095-1104. doi:10.1007/s00253-009-2199-x.
22. Vilchèze C, Jacobs WR. The combination of sulfamethoxazole, trimethoprim, and isoniazid or rifampin is bactericidal and prevents the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(10):5142-5148. doi:10.1128/AAC.00832-12.
23. Aung TT, Yam JKH, Lin S, et al. Biofilms of Pathogenic Nontuberculous Mycobacteria Targeted by. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(1):24-35. doi:10.1128/AAC.01509-15.
24. Rocha DP, Pinto GF, Ruggiero R, et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. *Quim Nova.* 2011;34(1):111-118. doi:10.1590/S0100-40422011000100022.

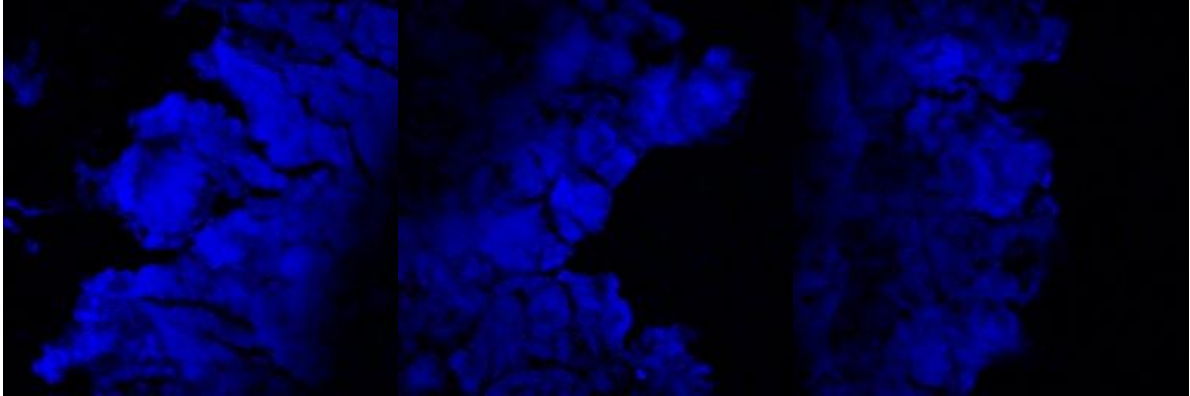


Fig. 1. Biofilms formed by *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense* respectively. Viewed through the microscope Olympus Fluwil FV 10i without the use of dyes, only autofluorescence produced by mycobacteria.

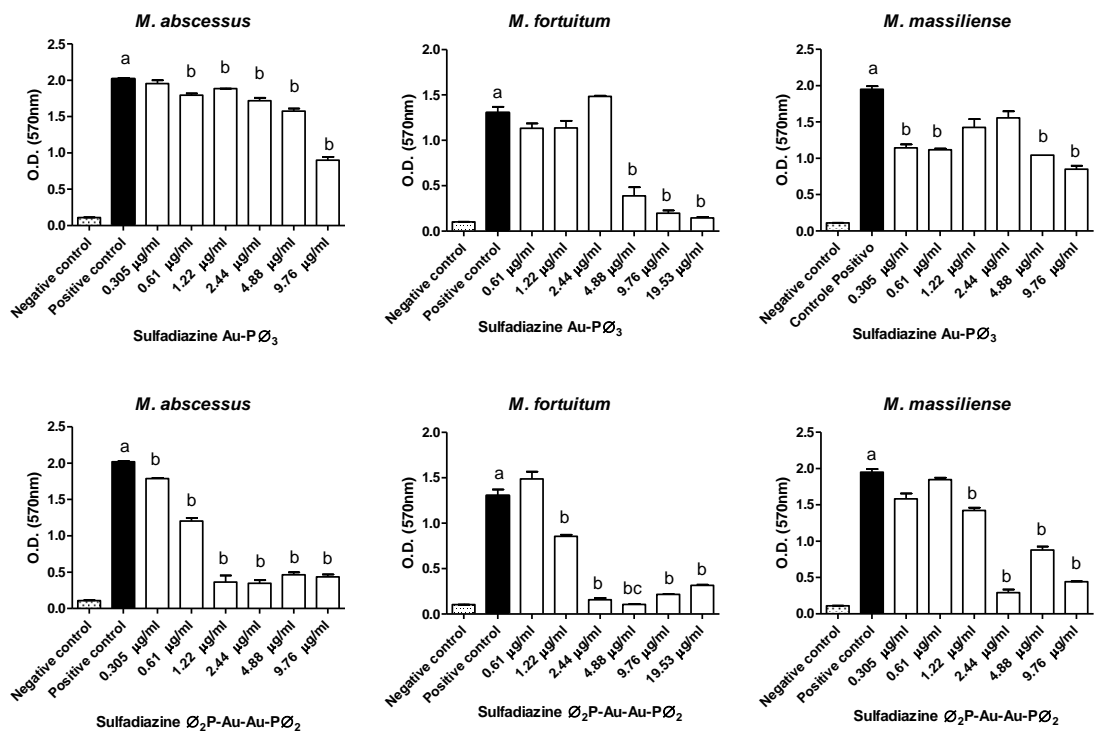


Fig 2. OD of the strains of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense* biofilm in relation to different concentrations of sulfadiazine Au-PØ₃ and sulfadiazine Ø₂P-Au-Au-PØ₂ tested. (a) Statistically significant difference between the negative control and the positive control. (b) Statistically significant difference between the positive control and the corresponding concentration. (c) No statistically significant difference between the negative control and the corresponding concentration.

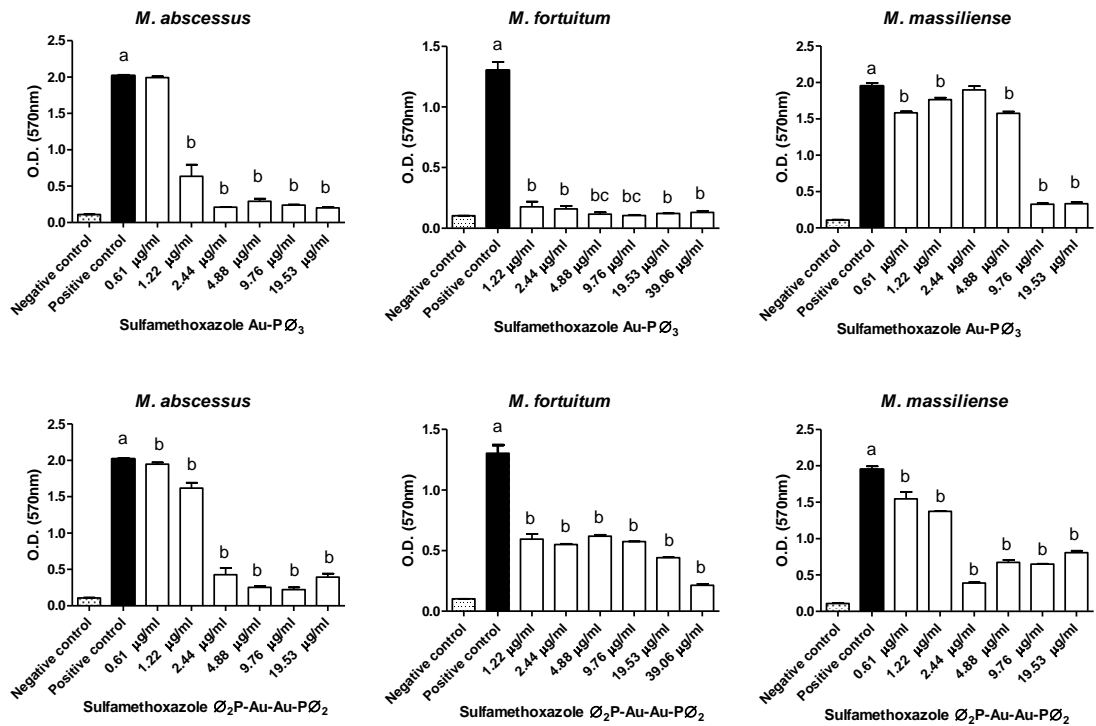


Fig 3. OD of the strains of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense* biofilm in relation to different concentrations of sulfamethoxazole Au-PØ₃ and sulfamethoxazole Ø₂P-Au-Au-PØ₂ tested. (a) Statistically significant difference between the negative control and the positive control. (b) Statistically significant difference between the positive control and the corresponding concentration. (c) No statistically significant difference between the negative control and the corresponding concentration.

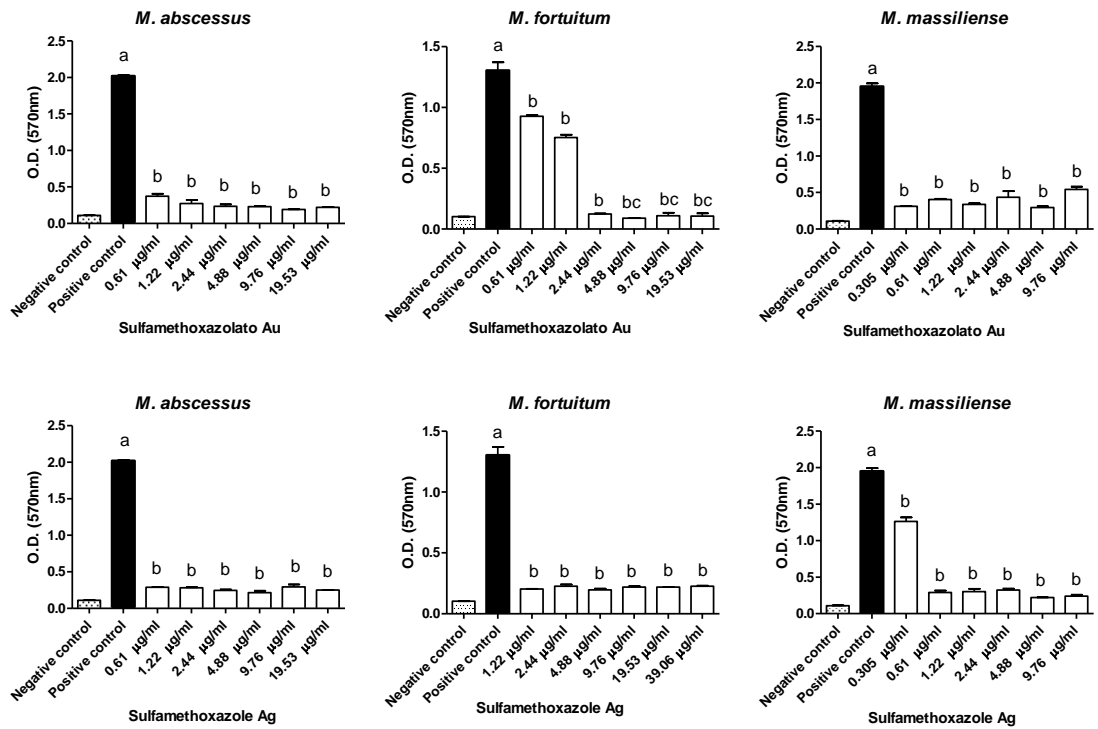


Fig 4. OD of the strains of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense* biofilm in relation to different concentrations of sulfamethoxazolato Au and sulfamethoxazoleAg tested. (a) Statistically significant difference between the negative control and the positive control. (b) Statistically significant difference between the positive control and the corresponding concentration. (c) No statistically significant difference between the negative control and the corresponding concentration.

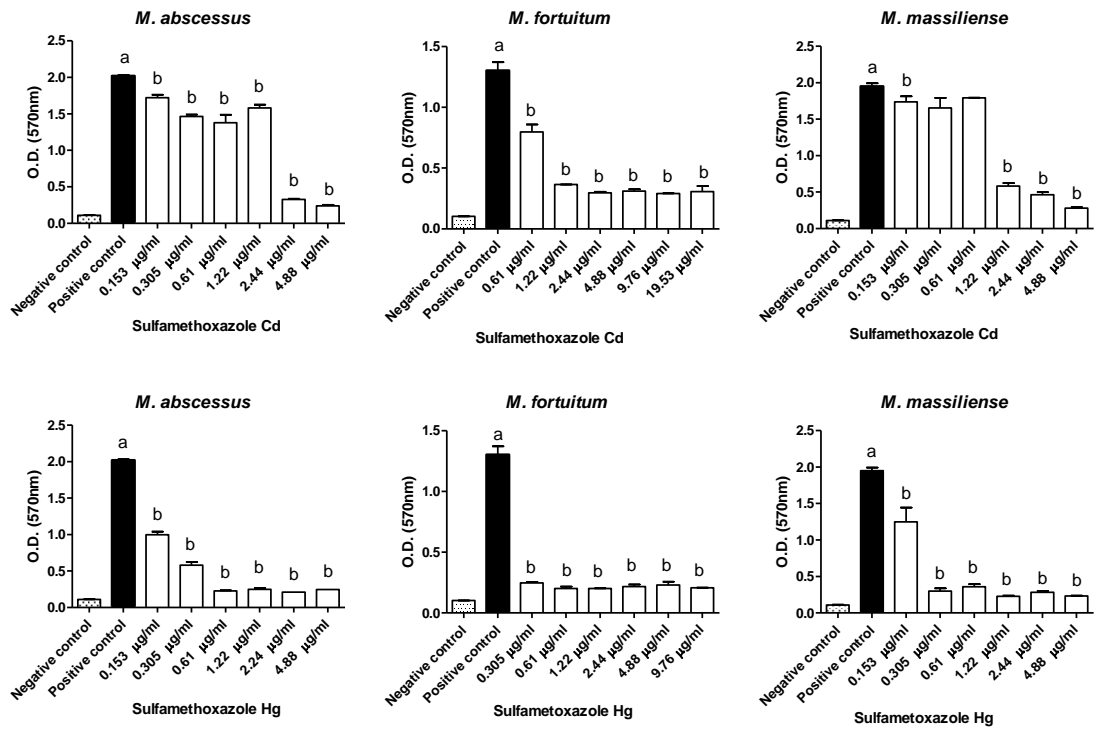


Fig 5. OD of the strains of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense* biofilm in relation to different concentrations of sulfamethoxazole Cd and sulfamethoxazoleHg tested. (a) Statistically significant difference between the negative control and the positive control. (b) Statistically significant difference between the positive control and the corresponding concentration.

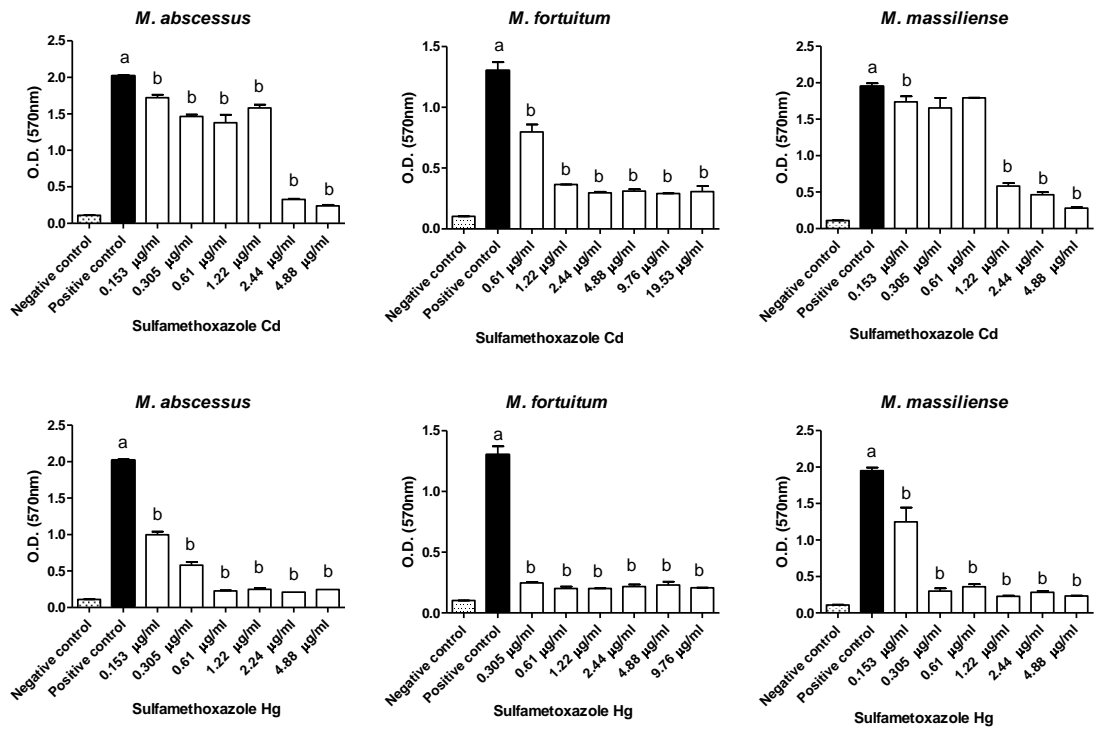


Fig 6. OD of the strains of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense* biofilm in relation to different concentrations of sulfamethoxazole Cu and sulfamethoxazolefree tested. (a) Statistically significant difference between the negative control and the positive control. (b) Statistically significant difference between the positive control and the corresponding concentration.

5 DISCUSSÃO

A extraordinária capacidade de sobrevivência em ambientes extremos e também na presença de antimicrobianos faz das micobactérias micro-organismos de difícil combate em um processo infeccioso (CONNOLLY et al., 2007). Muitas espécies microbianas evoluíram para sobreviver em ambientes estressantes por auto-montagem em superfície altamente organizada, em estruturas matriciais chamadas biofilmes (OJHA & GRAHAM, 2012). O crescimento neste tipo de comunidade parece ser uma estratégia de sobrevivência preferida de micro-organismos, e é conseguida por meio de componentes genéticos que regulam a sua motilidade, fixação a superfícies, comunicações intercelulares e síntese de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). A tolerância ao estresse ambiental é provavelmente facilitada pela EPS e talvez pela adaptação a microambientes heterogêneos dentro da complexa arquitetura de biofilmes (KULKA et al., 2012).

Quando um antimicrobiano é descoberto e introduzido no mercado, sua utilidade clínica começa a diminuir até um ponto em que há um aumento na restrição de seu uso. Esta restrição é provocada pelo surgimento de isolados resistentes (ROCHA et al., 2011). Concomitantemente, a presença de biofilmes de MCR amplia a resistência aos desinfetantes e aos antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções causadas por estes organismos (ORTÍZ-PÉREZ et al., 2011; FLORES, 2014). Portanto, uma busca contínua por novos fármacos tem de ser realizada para repor o arsenal que foi perdido (ROCHA et al., 2011).

No primeiro artigo científico demonstramos a atividade de algumas sulfonamidas complexadas com metais frente a *M. smegmatis*, uma espécie de micobactéria pouco patogênica e de crescimento rápido que tornou a técnica utilizada mais segura e rápida que um screening com a *M. tuberculosis*. Verificamos que o composto Au(sulfatiazolato)(PPh₃) apresentou efeito sinérgico quando associado ao Trimetoprim. A partir disto, foi confeccionado um isoblograma para entender a interação entre os compostos e definir a melhor concentração e proporção capaz de inibir a bactéria. Com estes dados em mãos demonstramos então o efeito das sulfonamidas frente a outra bactéria de grande importância à saúde pública, *M. tuberculosis*.

A partir do primeiro artigo também constatamos que a ação das sulfonamidas complexadas com metais devia-se ao complexo e não somente aos metais envolvidos. Isto ocorreu, pois verificamos que todos os sais utilizados na síntese apresentaram CIMs maiores se comparadas as sulfonamidas que eles deram origem.

No segundo artigo, que ainda encontra-se como manuscrito, comprovamos a ação de algumas das sulfonamidas testadas anteriormente e de outras que foram sintetizadas mais recentemente frente a MCR em sua forma plantônica. A terapêutica para infecções causadas por MCR pode variar, dependendo da natureza da doença (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002). Um painel principal de antimicrobianos para estas espécies incluem amicacina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem e uma sulfonamida (GRIFFITH et al., 2007). Há ainda, contudo, uma necessidade urgente de desenvolvimento de melhores, mais eficazes e seguros antimicrobianos orais para o combate às MCR, especialmente *Mycobacterium abscessus*. A doença pulmonar causada por este último, por exemplo, ainda é complicada apesar da disponibilidade de medicamentos (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002).

A maioria destas sulfas complexadas com metais tiveram sua ação inibitória frente a MCR, melhores do que a ação do sulfametoxazol livre. Os resultados demonstraram claramente que a complexação a metais das sulfonamidas tiveram sua ação potencializada, conduzindo para um possível uso como potenciais fármacos anti-infecciosos..

Sugere-se, que o aumento da atividade antimicrobiana de compostos em coordenação com os íons metálicos ocorre, provavelmente, devido à presença de um sistema de doadores de elétrons presente nos compostos não coordenados. Estes grupos doadores e a deslocalização de elétrons dentro do quelato, reduzem a polaridade do metal complexado. O processo de quelação aumenta, portanto, o caráter lipofílico do átomo de metal central, que por sua vez favorece a penetração do complexo através da camada lipídica da membrana celular do micro-organismo (CHOHAN et al., 2010).

Mostrou-se também, que a combinação das sulfonamidas complexadas com metais e o trimetoprim melhoraram significativamente a atividade antibacteriana em comparação quando testados isoladamente. Isso ocorreu provavelmente pela inibição da diidrofolato redutase bacteriana pelo trimetoprim, em sucessão, as sulfonamidas exerceriam sua atividade inibindo a outra enzima na via do folato, a dihidropteroato sintetase (DHPS), alvo das sulfonamidas comerciais.

MCR constituem um grupo de infecções muito importantes relacionadas com biomateriais, que podem variar desde síndromes extremamente graves, como endocardite de prótese, até infecções relativamente suaves, tais como infecções de feridas cirúrgicas. Em adição, as síndromes crônicas provocadas por essas micobactérias foram correlacionadas com a formação de biofilmes, tais como infecções do trato respiratório de pacientes com fibrose cística. Este fato é de grande importância, pois os biofilmes são uma forma bem conhecida de

resistência bacteriana aos antimicrobianos. Deste modo, a capacidade de desenvolver essas estruturas pode explicar falhas no tratamento de algumas dessas infecções (MARTÍN-DE-HIJAS et al., 2009).

Portanto o terceiro artigo, que também se encontra como manuscrito, teve como foco a ação das sulfonamidas complexadas com metais frente a células em biofilme. Através deste manuscrito sugerimos que a ação de inibição dos biofilmes formados por MCR, estaria relacionada a inibição da síntese de c-di-GMP. c-di-GMP é uma molécula que desempenha um papel fundamental em diversos processos associados para a formação de biofilme e de manutenção, tais como a produção de EPS e fatores de adesão (ANTONIANE et al.,2010).

Não conseguimos comprovar por métodos experimentais a nossa suposição. Alguns autores correlacionam níveis de c-di-GMP a produção de curli e celulose (ANTONIANE et al.,2010). Tentamos avaliar a produção de curli nas MCR através de técnica utilizando meio de cultura com Congo Red, porém as MCR não tiveram alteração de cor neste meio e não encontramos explicações para isso na literatura. Também tentamos explicar avaliando a motilidade dos micro-organismos, mas as sulfonamidas não foram capazes de alterar a motilidade das MCR. Mais estudos devem ser realizados para tentar elucidar o mecanismo de ação destas novas sulfonamidas complexadas com metais.

Entendemos que métodos utilizados para prever a atividade *in vivo* não são altamente confiáveis sem algum conhecimento dos parâmetros farmacológicos das sulfonamidas complexadas com metais. No entanto, nossos resultados são de interesse suficiente para justificar um estudo mais aprofundado. Comprovamos a eficácia *in vitro* destas sulfonamidas frente a *M. tuberculosis*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. massiliense*, quatro micobacterias de importância clínica. Assim, o presente estudo que pretendia avaliar a atividade de sulfonamidas complexadas com metais frente a micobactérias alcançou seus principais objetivos propostos.

6 CONCLUSÕES

Em função dos objetivos propostos neste trabalho e considerando os resultados experimentais obtidos, pode-se concluir que:

- Todas as sulfonamidas complexadas com metais testadas frente a *Mycobacterium smegmatis* apresentaram atividade, obtendo valores de Concentrações Inibitórias Mínicas (CIMs) bem baixos se comparados a de outros antimicrobianos;

- Todos os sais utilizados na síntese das sulfonamidas complexadas com metais apresentaram CIMs maiores que as sulfonamidas geradas por estes, indicando que a atividade frente a *M. smegmatis* refere-se as sulfonamidas;

- O composto [Au(sulfatiazolato)(PPh₃)] apresentou efeito sinérgico quando associado ao Trimetoprim frente as cepas padrão de *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* e isolados clínicos.

- Todas as sulfonamidas complexadas com metais testadas frente as micobacterias de crescimento rápido (MCR) apresentaram atividade, obtendo valores de CIMs baixos se comparados a de outros antimicrobianos;

- Os compostos sulfadiazina Au-P^2 , sulfamethoxazolato Au e sulfamethoxazole Ag tiveram ação bactericida dependente da dose em um curto período de tempo frente as MCR. Os demais compostos apresentaram apenas atividade bacteriostática;

- Todas as sulfonamidas complexadas com metais apresentaram efeito sinérgico quando associadas ao Trimetoprim frente as MCR;

- Todas as sulfonamidas complexadas com metais foram capazes de inibir em algum grau a formação de biofilmes formados por MCR em concentrações abaixo dos valores das CIMs;

- Nenhuma das sulfonamidas complexadas com metais foi capaz de destruir biofilmes formados por MCR em concentrações acima dos valores de CIMs;

- As sulfonamidas complexadas com metais não alteraram a motilidade das MCR

- Na pesquisa realizada, não foi possível encontrar uma técnica, das empregadas, que fosse capaz de avaliar a produção de *slime* pelas MCR.

REFERÊNCIAS

- ALSAAD, N. et al. Trimethoprim/sulfamethoxazole susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 5, p. 472–474, 2013.
- ANACONA, J. R.; OSORIO, I. Synthesis and antibacterial activity of copper(II) complexes with sulphathiazole and cephalosporin ligands. **Transition Metal Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 517–521, maio 2008.
- ANTONIANI, D. et al. Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 1095–1104, 2010.
- BASARABA, R. J. Experimental tuberculosis: the role of comparative pathology in the discovery of improved tuberculosis treatment strategies. **Tuberculosis**, v. 88, n. SUPPL. 1, p. S35–S47, 2008.
- BOURAI, N.; JACOBS, W. R.; NARAYANAN, S. Deletion and overexpression studies on DacB2, a putative low molecular mass penicillin binding protein from *Mycobacterium tuberculosis* H 37Rv. **Microbial Pathogenesis**, v. 52, n. 2, p. 109–116, 2012.
- BRASIL. **Manual Nacional de VIGILÂNCIA LABORATORIAL da TUBERCULOSE e outras MICOBACTÉRIAS**. [s.l: s.n.] 2008.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe técnico de tuberculose**, julho 2010.
- BRENNAN, P. J.; NIKAIDO, H. The envelope of mycobacteria. **Annual review of biochemistry**, v. 64, p. 29–63, 1995.
- BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 716–746, 2002.

CAMINERO L. J. A. **Guía de la tuberculosis para Médicos Especialistas**. Paris: Union Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias; 2003.

CHIANG, C. Y.; CENTIS, R.; MIGLIORI, G. B. Drug-resistant tuberculosis: Past, present, future. **Respirology**. v. 15 p. 413–432, 2010.

CHOHAN, Z. H. et al. Some new biologically active metal-based sulfonamide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2893–2901, 2010.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes. Approved standard**. CLSI document M24-A2. CLSI, Wayne, PA. 2011.

COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M.; YATES, M.D. Tuberculosis Bacteriology: Organization and Practice. Butter Worth-Heinemann, Oxford, 2 ed. 139 p, 1997.

CONAGLEN, P. D. et al. Systematic review of tattoo-associated skin infection with rapidly growing mycobacteria and public health investigation of a cluster in Scotland , 2010. **Euro Surveill**, v. 18, n. 32, p. 1–13, 2013.

CONNOLLY, L. E.; EDELSTEIN, P. H.; RAMAKRISHNAN, L. Why Is Long-Term Therapy Required to Cure Tuberculosis? **Plos med**. v. 4 n. 3 p. 432-445, 2007.

CONSTANT, P. et al. Role of the pks15/1 gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the Mycobacterium tuberculosis complex: Evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, p. 38148–38158, 2002.

COSTERTON J. W., STEWART P. S., GREENBERG E. P., Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**. v. 284 p. 1318–1322, 1999.

DAVIES FORSMAN, L. et al. Intra- and Extracellular Activities of Trimethoprim-Sulfamethoxazole against Susceptible and Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7557–7559, 1 dez. 2014.

DE GROOTE, M. A; HUITT, G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 42, n. 12, p. 1756–1763, 2006.

DE LOGU, A. et al. Activity of a new class of isonicotinoylhydrazones used alone and in combination with isoniazid, rifampicin, ethambutol, para-aminosalicylic acid and clofazimine against *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 275–282, 2002.

EID, A. J. et al. Prosthetic joint infection due to rapidly growing mycobacteria: report of 8 cases and review of the literature. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 45, n. 6, p. 687–694, 2007.

ESTEBAN, J. et al. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. **BMC microbiology**, v. 8, p. 184, 2008.

EUZÉBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/mycobacterium.htm> Acesso em 06 jul 2016.

FAIR, E.; HOPEWELL, P. C.; PAI, M. International standards for tuberculosis care; revisiting the cornerstone of tuberculosis care and control. **Expert Rev. Anti. Infect. Ther.** v. 5 p. 61-65, 2007.

FERNLEY, R. T.; ILIADES, P.; MACREADIE, I. A rapid assay for dihydropteroate synthase activity suitable for identification of inhibitors. **Analytical Biochemistry**, v. 360, n. 2, p. 227–234, 2007.

FLEMMING, H-C.; WINGENDER, J. Extracellular polymeric substances (EPS): the biofilme construction material. **Water Sci Technol.**, v. 43 n. 6 p. 1-8, 2001.

FLORES, V. D. C. **PERFIL DE SUSCETIBILIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE BIOFILMES DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2014.

FORGACS, P. et al. Tuberculosis and trimethoprim-sulfamethoxazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 11, p. 4789–4793, 2009.

GREENDYKE, R.; BYRD, T. F. Differential antibiotic susceptibility of Mycobacterium abscessus variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2019–2026, 2008.

GRIFFITH, D. E. et al. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 4, p. 367–416, 2007.

HANLON, G. W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 2, p. 118–128, 2007.

HO, J. M. W.; JUURLINK, D. N. Considerations when prescribing trimethoprim-sulfamethoxazole. **CMAJ**, v. 183, n. 16, p. 1851–1858, 2011.

HOUVINEN, P. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. **Antimicrobial Resistance**, v. 32, p. 1608–1614, 2001.

ILIADES, P. et al. Promoter strength of folic acid synthesis genes affects sulfa drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 9, n. 3, p. 249–255, 2003.

KASNOWSKI, M. C.; et al., Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, nº 15, ano VIII, 2010

KOH, W.-J.; KWON, O. J.; LEE, K. S. Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Diseases in Immunocompetent Patients. **Korean J Radiol**, v. 3, p. 145–157, 2002.

KOSTENKO, V. et al. Impact of silver-containing wound dressings on bacterial biofilm viability and susceptibility to antibiotics during prolonged treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5120–5131, 2010.

- KULKA, K.; HATFULL, G.; OJHA, A. K. Growth of Mycobacterium tuberculosis bio films. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 60, p. 1–6, 2012.
- MASTERS, P. A.; et al. Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited. **Arch Intern Med.** v. 163, p. 402-410, 2003.
- MARQUES, L. L. et al. New gold(I) and silver(I) complexes of sulfamethoxazole: Synthesis, X-ray structural characterization and microbiological activities of triphenylphosphine(sulfamethoxazolato-N2)gold(I) and (sulfamethoxazolato)silver(I). **Inorganic Chemistry Communications**, v. 10, n. 9, p. 1083–1087, set. 2007.
- MARTÍN-DE-HIJAS, N. Z. et al. Biofilm development by clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria. **Clinical microbiology and infection**, v. 15, n. 10, p. 931–936, 2009.
- MARTÍNEZ, A.; TORELLO, S.; KOLTER, R. Sliding motility in mycobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 23, p. 7331–7338, 1999.
- MIZDAL, C. R. **AVALIAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME DE Escherichia coli.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2014.
- MONEGO, F. et al. Molecular identification and typing of Mycobacterium massiliense isolated from postsurgical infections in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 436–441, 2011.
- MOORE, J.E.; et al. Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. **BMC Public Health.** v. 10 p. 612-621, 2010.
- MUÑOZ-EGEA, M. C. et al. Autofluorescence as a tool for structural analysis of biofilms formed by nonpigmented rapidly growing mycobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 1065–1067, 2013.
- OJHA, A. et al. GroEL1: A dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during

biofilm formation in mycobacteria. **Cell**, v. 123, n. 5, p. 861–873, 2005.

OJHA, A.; HATFULL, G. Biofilms of *Mycobacterium tuberculosis*: New Perspectives of an Old Pathogen. In: **Understanding Tuberculosis - Deciphering the Secret Life of the Bacill**. [s.l: s.n.]. p. 182 – 192, 2012.

OJHA, A. K. et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 164–174, 2008.

OJHA, A. K. et al. Enzymatic hydrolysis of trehalose dimycolate releases free mycolic acids during mycobacterial growth in biofilms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 23, p. 17380–17389, 2010.

OLIVEIRA K. R. Análise da formação de biofilmes em cateteres: métodos de identificação e controle. Monografia. (Pós-graduação em Análises Clínicas e Gestão de Laboratório) – Universidade Vale do Rio Doce, 2011.

ORTÍZ-PÉREZ, A. et al. Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clínica**, v. 29, n. 2, p. 79–84, 2011.

OWEN, D. J. et al. Synthesis and evaluation of galactofuranosyl N,N-dialkyl sulfenamides and sulfonamides as antimycobacterial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 8, p. 2274–2277, abr. 2007.

PANG, L. et al. Structure and function of mycobacterium glycopeptidolipids from comparative genomics perspective. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 8, p. 1705–1713, 2013.

RECHT, J. et al. Genetic Analysis of Sliding Motility in *Mycobacterium smegmatis* Genetic Analysis of Sliding Motility in *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 15, p. 4348–4351, 2000.

RECHT, J.; KOLTER, R. Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 19, p. 5718–5724, 2001.

ROCHA, D. P. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111–118, 2011.

SCHOREY, J. S.; SWEET, L. The mycobacterial glycopeptidolipids: Structure, function, and their role in pathogenesis. **Glycobiology**, v. 18, n. 11, p. 832–841, 2008.

SONG, Y. et al. Peritoneal dialysis-associated nontuberculous mycobacterium peritonitis: A systematic review of reported cases. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 4, p. 1639–1644, 2012.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 223–9, 2013.

SULING, W. J. et al. Antimycobacterial activities of 2,4-diamino-5-deazapteridine derivatives and effects on mycobacterial dihydrofolate reductase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2784–2793, 2000.

SULING, W. J. et al. New *Mycobacterium avium* antifolate shows synergistic effect when used in combination with dihydropteroate synthase inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4801–4803, 2005.

TARANTINO, A. B. **Doenças Pulmonares** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5ª ed. p. 294–380, 2002.

TATHAM, E. et al. Production of mycobacterial cell wall glycopeptidolipids requires a member of the MbtH-like protein family. **BMC microbiology**, v. 12, p. 118, 2012.

TORTOLI, E.; TORTOLI, E. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy : the New Mycobacteria of the 1990s Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy :

the New Mycobacteria of the 1990s. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 319–354, 2003.

TENG, R.; DICK, T. Isoniazid resistance of exponentially growing *Mycobacterium smegmatis* biofilm culture. **FEMS Microbiology Letters**. v. 227, p. 171-174, 2003.

TUBERCULOSIS. Disponível em: <http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/>, acesso em: 30 mai. 2011.

VASCONCELLOS M. F. Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em *Escherichia coli* enteroagregativa típica e atípica: papel da proteína Shf. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, 2009.

VILCHÈZE, C.; JACOBS, W. R. The combination of sulfamethoxazole, trimethoprim, and isoniazid or rifampin is bactericidal and prevents the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 10, p. 5142–5148, 2012.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy: Approaching a new generation of phitopharmaceuticals. **Phytomedicine**. V. 16, p. 97-110, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION **Report 2009: Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing**, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: WHO report 2011**. Geneva: World Health Organization; 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Toman's Tuberculosis case detection, treatment and monitoring: questions and answers**. Geneva: World Health Organization; 2004.

WILKINSON, B. L. et al. Anti-mycobacterial activity of a bis-sulfonamide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 5, p. 1355–1357, mar. 2007.

XIANG, X. et al. *Mycobacterium* Biofilms : Factors Involved in Development , Dispersal ,

and Therapeutic Strategies Against Biofilm-Relevant Pathogens. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 24, n. 3, p. 269–279, 2014.

YAMAZAKI, Y. et al. Mycobacterium avium genes associated with the ability to form a biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 819–825, 2006.