

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

**AVALIAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS
ANTIMICROBIANOS NA INIBIÇÃO DA
FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *Escherichia coli***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caren Rigon Mizdal

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**AVALIAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS
ANTIMICROBIANOS NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO
BIOFILME DE *Escherichia coli***

Caren Rigon Mizdal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM – RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

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

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

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

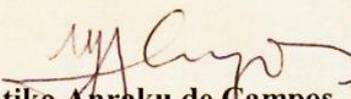
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

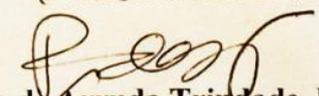
**AVALIAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS NA
INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME DE Escherichia coli**

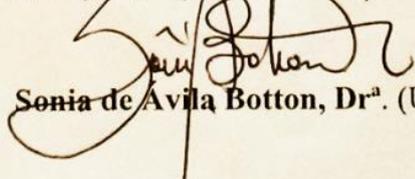
elaborada por
CAREN RIGON MIZDAL

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:


Marli Matiko Anraku de Campos, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)


Priscila de Arruda Trindade, Dr^a. (UFSM)


Sonia de Avila Botton, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 06 de agosto de 2014.

*À minha família, cujo amor,
compreensão e apoio foram essenciais
para essa conquista.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Agradeço aos meus pais, José Mario e Maria Heloisa, que mesmo distantes, estiveram sempre comigo, ensinando-me, apoiando-me, amando-me incondicionalmente e acreditando em meu potencial. A vocês todo o meu amor e admiração.

Aos meus queridos irmãos Cristiane e Vagner que sempre foram grandes amigos, e tenho certeza que sempre estarão ao meu lado. Eu amo vocês!

Ao meu namorado Sílvio, pelo seu companheirismo, amor, carinho, amizade, apoio, enfim, por estar ao meu lado sempre. E a sua família pela forma como me acolheram, acompanharam e me ajudaram para a conclusão de mais uma etapa da minha formação.

A toda minha família por sempre me apoiarem e dividirem comigo todas as alegrias e tristezas.

A minha orientadora, professora Marli pela oportunidade que me deste em estudar e trabalhar em seu laboratório, pela orientação, ajuda, aprendizagem, e por acreditar em mim. Muito obrigada.

Aos meus colegas e amigos de Laboratório, Vanessa A., Vanessa F., Pauline, Tanise, Jaciane, Grazielle, Bianca e Fallon, com quem tenho tido a oportunidade de unir uma convivência agradável, companheira, produtiva e divertida.

Aos professores, membros da banca, pela disposição e por avaliarem este trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT).

À CAPES e ao CNPq pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *Escherichia coli*

AUTORA: CAREN RIGON MIZDAL

ORIENTADORA: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 06 de Agosto de 2014.

A deposição de bactérias em uma superfície e a sucessiva formação de biofilmes são fenômenos que ocorrem naturalmente na natureza, servem como estratégia de proteção frente a fatores agressivos externos. Os micro-organismos, quando em biofilme, geram grande impacto à saúde pública, pois possuem maior resistência à ação de agentes antibacterianos e métodos de desinfecção quando comparados aos micro-organismos na forma planctônica. As bactérias são os agentes microbianos que mais comumente produzem biofilmes em condições favoráveis. Neste contexto, *Escherichia coli* inclui-se como uma das bactérias com maior participação nos processos de adesão. Pesquisas visando a descoberta de novos antibacterianos são escassas, uma vez que os esforços estão mais direcionados no aprimoramento das drogas já existentes. Dessa forma, o presente trabalho se propôs avaliar a capacidade antibiofilme do sulfametoxazol complexado com os metais mercúrio, cobre, cádmio e prata. Esses foram testados frente a bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25922). Para avaliar o grau de inibição da formação do biofilme foram utilizadas microplacas de poliestireno e a leitura da turvação bacteriana foi realizada em densidade óptica de 570nm em leitor de ELISA. Os resultados obtidos demonstram que os compostos de sulfametoxazol apresentaram uma excelente atividade antibiofilme, sendo que o complexo SMTZ-Ag foi o que exibiu melhor atividade contra a formação do biofilme de *E. coli*. Em vista disso torna-se válido investir em pesquisas no sentido de ampliar as atividades desses compostos.

Palavras-chave: Biofilme. Antibacterianos. Sulfametoxazol, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Master's Thesis
Graduate Program in Pharmaceutical Sciences
Universidade Federal de Santa Maria

EVALUATION OF NOVEL ANTIMICROBIAL COMPOUNDS IN THE INHIBITION OF *ESCHERICHIA COLI* BIOFILM FORMATION

AUTHOR: CAREN RIGON MIZDAL
ADVISER: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS
Date and Place of Defense: Santa Maria, August 06, 2014.

The bacterial deposition on surface and also the biofilm form occurring widely in the nature as a protection strategy developed for the bacteria against the harmful external factors. Microorganism, when was in biofilm form was able to generate several problems for the public health justly for showed a higher resistance from the action of antibacterial agents when compared with the planktonic form. Bacteria are the microorganism more involved with the biofilm production in the presence of beneficial environmental conditions. In this way, *Escherichia coli* were the strain more involved with the process of adhesion in the surfaces. Few studies were developed to found new antimicrobial drugs precisely because the researches presented more interest to improve the known drugs. Thus, the present study was evaluated the antibiofilm capability of sulfamethoxazole (SMTZ) alone and when complexed with metals as mercury, copper, cadmium and silver. The compounds were tested against *Escherichia coli* (ATCC 25922). For evaluated the inhibition of the biofilm formation we were used microplates of polystyrene to observe the turbidity through the 570 nm in an ELISA plate reader. The results presented that the sulfamethoxazole compounds had an excellent antibiofilm activity and also that the complex SMTZ-Ag showed the best inhibitory activity against *E. coli* biofilm formation. Therefore, we conclude that these sulfamethoxazole complexed compounds require more researches in order to expand their antimicrobial activity.

Keywords: Biofilm, Antibacterial, Sulfamethoxazole, *Escherichia coli*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema dos estágios de desenvolvimento do biofilme microbiano.....	20
Figura 2. Representação estrutural da sulfonamida e do ácido <i>p</i> -aminobenzóico (PABA).....	27
Figura 3. Representação estrutural do sulfametoxazol.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima dos compostos SMTZ.....	30
Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima dos sais de Hg, Cu, Cd e Ag.....	30
Tabela 3. Complexos SMTZ e metais e seus respectivos sais metálicos.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Prata
AgCl	Sal de Ag
Cd	Cadmio
Cd (CH₃COO)₂.2H₂O	Sal de Cd
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMIB	Concentração Mínima de Inibição de Biofilme
Cu	Cobre
Cu (CH₃COO)₂.H₂O	Sal de Cu
DMSO	Dimetilsulfóxido P.A. (CH ₃) ₂ SO
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
Hg	Mercurio
Hg (CH₃COO)₂	Sal de Hg
ITUs	Infecções no Trato Urinário
Ph	Potencial Hidrogênico
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RS	Rio Grande do Sul
SMTZ	Sulfametoxazol
SMTZ-Ag	[Ag(sulfametoxazolato)]
SMTZ-Cd	[Cd(sulfametoxazolato) ₂ (CH ₃ OH) ₂] _n .x(CH ₃ OH)
SMTZ-Cu	[Cu(μ-CH ₃ COO) ₄ (sulfametoxazolato) ₂]
SMTZ-Hg	[Hg(sulfametoxazolato) ₂].2DMSO
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – UFSM.....	54
--	----

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A. Resumos Publicados em Congressos.....	58
Apêndice B. Artigo.....	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Biofilmes.....	16
2.2 Estrutura e composição dos biofilmes.....	17
2.3 Fatores que influenciam o desenvolvimento de biofilmes.....	18
2.4 Etapas da formação do biofilme.....	20
2.5 Resistência bacteriana.....	21
2.6 Importância clínica.....	22
2.7 <i>Escherichia coli</i>	23
2.8 Estratégias de controle.....	25
2.9 Agentes antibacterianos.....	26
2.9.1 Sulfonamidas.....	27
2.9.2 Sulfametoxazol.....	28
2.10 Complexos metálicos.....	29
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4 METODOLOGIA.....	32
4.1 Compostos.....	32
4.2 Micro-organismo e Procedimento experimental.....	33
4.4 Análise estatística.....	33
5 RESULTADOS.....	34
6 DISCUSSÃO.....	38
7 CONCLUSÃO.....	41
9 REFERÊNCIAS.....	42
ANEXOS.....	53
APÊNDICES.....	57

1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são estruturas simples, presentes nos mais diversos habitats, entretanto são capazes de desenvolver comportamentos bastante complexos. Apresentam-se nos ambientes aquosos, tanto na forma planctônica com na forma sésil. Na forma planctônica os micro-organismos encontram-se em suspensão e dispersos no meio aquoso, enquanto que, na forma sésil encontram-se aderidos a superfícies sólidas sob a forma de biofilmes (COSTERTON, J W et al., 1995; DJERIBI, et al., 2012).

Os biofilmes podem ser definidos como estruturas funcionais complexas, que apresentam uma distribuição variável de células e agregados celulares, aos quais constituem um modo protegido de vida dos micro-organismos. O crescimento de micro-organismos em biofilme é predominante na natureza, sendo crucial no desenvolvimento de infecções e frequentemente associados a altos níveis de resistência a agentes antibacterianos (ARCIOLA et al., 2003; DAVIES et al., 1998; SUN et al., 2013).

Os biofilmes bacterianos podem ser encontrados colonizando dentes, lentes de contato, cateteres e válvulas cardíacas artificiais podendo originar, além de infecções graves, a rejeição do material de próteses (DAVEY; O'TOOLE G, 2000; KHALID, 2014). Infecções hospitalares em pacientes com cateteres urinários ou venosos são geralmente precedidas pela formação de biofilmes nas paredes internas dos cateteres, onde os fragmentos liberados do biofilme podem penetrar na bexiga ou na corrente sanguínea (MORALES et al., 2004). Os antibacterianos normalmente revertem os sintomas causados pelas células planctônicas, mas não têm a capacidade de destruir o biofilme. Por esta razão infecções por micro-organismos formadores de biofilmes mostram tipicamente sintomas recorrentes após ciclos de terapia antibacteriana (COSTERTON, J. W.; STEWART; GREENBERG, 1999).

Dentre as bactérias que mais provocam mortes no mundo incluem-se *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, sendo estes, resistentes a múltiplas drogas. Os processos infecciosos causados por estas bactérias geralmente estão associados com alta letalidade e altos custos de tratamento (DEMAIN; SANCHEZ, 2009).

E. coli uropatogênica é o agente etiológico mais frequente de infecções no trato urinário (ITU), além de ser uma das fontes mais comuns de bacteremia em indivíduos

hospitalizados (BIEDENBACH; MOET; JONES, 2004). Devido a sua capacidade em formar biofilmes espessos *E. coli* tem sido muito utilizada como modelo experimental em estudos. Sua habilidade em formar biofilmes estaria diretamente relacionada com a disponibilidade de nutrientes no meio, sendo mais evidente a formação de biofilme quanto maior essa disponibilidade (PETERSON; PITT, 2000).

As altas taxas de resistência microbiana, especialmente em ambientes hospitalares, o decréscimo constante de novos agentes antibacterianos e a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes dos fármacos em uso justificam e instigam a pesquisa de novos fármacos antibacterianos. Estes fatores associados aos riscos causados por infecções bacterianas persistentes relacionadas à formação de biofilmes tornam pertinente a avaliação da efetividade antibiofilme de diferentes compostos promissores. Deste modo, o presente trabalho utilizou como alternativa a coordenação de íons de cobre, cádmio, mercúrio, e prata ao sulfametoxazol na tentativa de promover a inibição da formação do biofilme de *E. coli* (ATCC 25922), na intenção de prevenir a adesão bacteriana, retardar a formação dos biofilmes e eliminar ou pelo menos reduzir a sua acumulação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biofilmes

Os micro-organismos evoluíram e desenvolveram estratégias de crescimento através da formação de biofilmes. Tal fenômeno é impulsionado pelo princípio da sobrevivência, como mecanismo de adaptação ao stresse ambiental. Sua estrutura evoluiu ao longo do tempo e permite a construção de uma coesa e robusta comunidade de células com forte comunicação intercelular (APARNA; YADAV, 2008; DONLAN; COSTERTON, 2002; FUX et al., 2005).

Os biofilmes podem ser definidos como sistemas biológicos formados por comunidades de células agregadas, organizadas e funcionais, incorporadas em uma matriz extracelular; sendo esta, composta por substâncias poliméricas que possibilitam a aderência a superfícies bióticas ou abióticas. Supõe-se que o biofilme foi a primeira forma de vida comunitária registrada no planeta e estima-se que a maioria dos micro-organismos na Terra estejam organizados em biofilmes. Estes podem ser formados por populações desenvolvidas a partir de uma única, ou de múltiplas espécies (DONLAN; COSTERTON, 2002; RHOADS; WOLCOTT; PERCIVAL, 2008; KHALID, 2014).

A formação do biofilme é uma vantagem às espécies colonizadoras, pois confere proteção contra micro-organismos competidores e fatores do meio, através de mecanismos de defesa do hospedeiro e substâncias potencialmente tóxicas (agentes químicos e antibacterianos). Assim o sistema de defesa do hospedeiro não consegue neutralizar o biofilme, e as infecções tendem a persistir por longos períodos de tempo (BURT et al., 2014; COSTERTON, J W et al., 1995; MEYER, 2003).

Estima-se que mais de 90% dos micro-organismos vivem sob a forma de biofilmes e praticamente não existe nenhuma superfície que não possa ser ou vir a ser colonizada por bactérias. Devido ao desenvolvimento de métodos científicos mais avançados nas duas últimas décadas foi possível aumentar o conhecimento a respeito da natureza dos biofilmes e dos micro-organismos presentes nessas comunidades (CHARACKLIS E MARSHALL, 1990; CAPELLETTI, 2006; BASAK et al., 2013).

2.2 Estrutura e composição dos biofilmes

Os biofilmes constituem um modo de crescimento protegido, que permite a sua sobrevivência em ambientes hostis, podendo consistir em células de várias ou de uma única espécie bacteriana interagindo cooperativamente (BEHLAU; GILMORE, 2008). Os biofilmes são constituídos por micro-organismos, material polimérico extracelular (polissacarídeos, proteínas, lipídeos) e resíduos do ambiente colonizado, embebidos numa matriz polimérica e aderidos a uma superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada contendo exopolissacarídeos e pequenos canais abertos por entre as microcolônias (LAWRENCE et al., 1991; CAPELLETTI, 2006).

Os biofilmes são considerados estruturas porosas e adsorventes constituídos por cerca de 80 a 95% de água. Os micro-organismos representam somente uma parte da massa de biofilme que, frequentemente, é menor que 20%. As substâncias poliméricas extracelulares (EPS) envolvem todas as células microbianas, partículas retidas e substâncias dissolvidas a adsorvidas, representando 70 a 95% da massa total do biofilme (RHOADS et al., 2008; COOPER, 2010).

A estrutura do biofilme evoluiu ao longo do tempo e permite a construção de uma comunidade de células coesa e robusta, com forte comunicação intercelular. O biofilme maduro constitui um ecossistema organizado, onde há canais de água que permitem a passagem de nutrientes metabólicos e resíduos, os quais podem proteger os micro-organismos presentes (SHI; ZHU, 2009).

A matriz extracelular é formada pelas próprias células e por componentes do ambiente, sendo de composição heterogênea e complexa. Embora prevaleçam os polissacarídeos, a estrutura de EPS pode também ser constituída por proteínas, ácidos nucléicos, glicoproteínas e fosfolipídios (CAPELLETTI, 2006; MORYL, 2014).

Os exopolissacarídeos são considerados componentes essenciais da matriz. Eles determinam a estrutura e a integridade funcional do biofilme, sendo responsável pela estrutura tridimensional do biofilme assim como pela presença de canais de água, caracterizando-o como uma estrutura altamente hidratada. Além disso, os exopolissacarídeos agem como adesivo e barreira defensiva, protegendo as células e auxiliando a resistir a condições adversas (CAIXETA, 2008; MORYL, 2014).

A matriz exopolissacarídica também é responsável por manter as células próximas dentro da estrutura do biofilme, permitindo, interações intercelulares. Este modo de organização é denominado de “*quorum sensing*” (QS), o qual caracteriza-se por um sistema de comunicação intra e interespécies de micro-organismos, baseado na emissão de estímulos e respostas dependentes da densidade populacional (BHARDWAJ; VINOOTHKUMAR; RAJPARA, 2013; FLEMMING; WINGENDER, 2010).

O QS pode ser definido como um mecanismo de comunicação entre bactérias, que ocorre por meio da produção e difusão de pequenas moléculas químicas ou sinalizadoras, através das membranas bacterianas. Este sistema de linguagem permite a coordenação do comportamento bacteriano em relação ao meio ambiente, regulando a expressão de genes especializados, em resposta à densidade populacional (AMMOR; MICHAELIDIS; NYCHAS, 2008; BAI; RAI, 2011). A compreensão deste sistema de comunicação é de grande importância para o desenvolvimento de substâncias que degradam moléculas auto-indutoras com a finalidade de regular e inibir processos fisiológicos dos micro-organismos (JIANG; LI, 2013).

2.3 Fatores que influenciam o desenvolvimento de biofilmes

A adesão e a formação de biofilmes são limitadas pela escassez e difusão de nutrientes no meio ambiente, bem como pelas características do micro-organismo, as quais incluem a expressão dos fatores de virulência e a capacidade de produção da matriz exopolissacarídica (DEWANTI; WONG, 1995; HÄNSCH, 2012). Além disso, o desenvolvimento dos biofilmes é dependente das condições do meio, como por exemplo, do Potencial Hidrogênico (pH), uma vez que grande parte dos biofilmes formam-se em valores próximos à neutralidade. O pH tem um efeito preponderante no metabolismo dos micro-organismos, pois desvios de pH para valores inferiores ou superiores a 7 influenciam no desenvolvimento e na atividade da comunidade microbiana (PEREIRA, 2001; ZHOU et al., 2013).

A concentração de partículas sólidas suspensa em corrente líquida é mais um fator que possui influência na formação do biofilme, podendo englobar partículas

sólidas provenientes do meio aquoso onde está imerso (WEISSBRODT, 2013; WIMPENNY et al., 1993).

A temperatura também é um fator determinante no desenvolvimento microbiano, e como tal, pode afetar a formação e a atividade de qualquer biofilme, bem como o tipo de micro-organismo que o compõe (FLACH et al., 2005; MARINHO et al., 2013)

A concentração de nutrientes tem influência na formação de biofilmes, sendo requeridas quantidades mínimas de nutrientes pelos micro-organismos para que ocorra o seu crescimento. Quanto maior for a quantidade de nutrientes disponíveis, maior será o crescimento e maior será a diversidade de organismos que podem ser mantidos (BEHLAU; GILMORE, 2008). O ferro é um dos nutrientes necessários para o desenvolvimento celular bacteriano, apresentando-se como um fator relevante na formação de biofilme por alguns micro-organismos, como por exemplo, para *Mycobacterium tuberculosis* (CHAVES 2004; OJHA et al., 2008).

A superfície inerte em que formam-se os biofilmes desempenha um papel importante na forma e no desenvolvimento do biofilme, sendo o tipo de material influenciável nesse desenvolvimento. A rugosidade e a porosidade da superfície também propiciam a adesão celular (KOUIDHI et al., 2010).

Características de superfície da bactéria, incluindo hidrofobicidade da superfície celular e carga relativa da superfície, bem como a presença de estruturas celulares superficiais, flagelo, fímbria, exopolissacarídeos e ácidos nucleicos têm sido apontados por afetarem a adesão das bactérias (FLACH; KARNOPP; CORÇÃO, 2005). Projeções como fímbria e pili superariam a força de repulsão eletrostática entre célula e substrato, podendo auxiliar tanto na adesão da célula, quanto na busca por regiões de maior estabilidade, onde a microcolônia possa se formar e iniciar o desenvolvimento do biofilme (STEINBERG, 2011). Bactérias flageladas têm melhor predisposição para se aderir em ambientes com acúmulo de nutrientes e possuem vantagem sobre competidores não móveis, chegando mais rapidamente ao local de adesão (ZARANZA, 2013; WIDGEROW, 2008).

2.4 Etapas da formação do biofilme

A formação do biofilme ocorre por uma série de processos sucessivos. Trata-se de uma formação espontânea e indesejável de depósitos de micro-organismos, envolvendo interações físico-químicas que ocorrem através do transporte de células livres do meio líquido para a superfície sólida. Nesse momento ocorre a adesão inicial de bactérias planctônicas à superfície, sua subsequente fixação, crescimento e divisão de células fixas à custa de nutrientes provenientes do líquido circundante. A produção e a excreção de substâncias poliméricas extracelulares são seguidas por proliferação e acúmulo de camadas de células, formando microcolônias, as quais produzem grande quantidade de exopolissacarídeos (EPS) (AL-AHMAD et al., 2000; CARPENTIER; CERF, 1993).

Após a adesão à superfície, dá-se início o processo de maturação do biofilme, onde ocorre liberação de material celular por vários tipos de mecanismos: erosão superficial, descolamento, abrasão e perda de agregados maiores (Figura1) (BESTER et al., 2013).

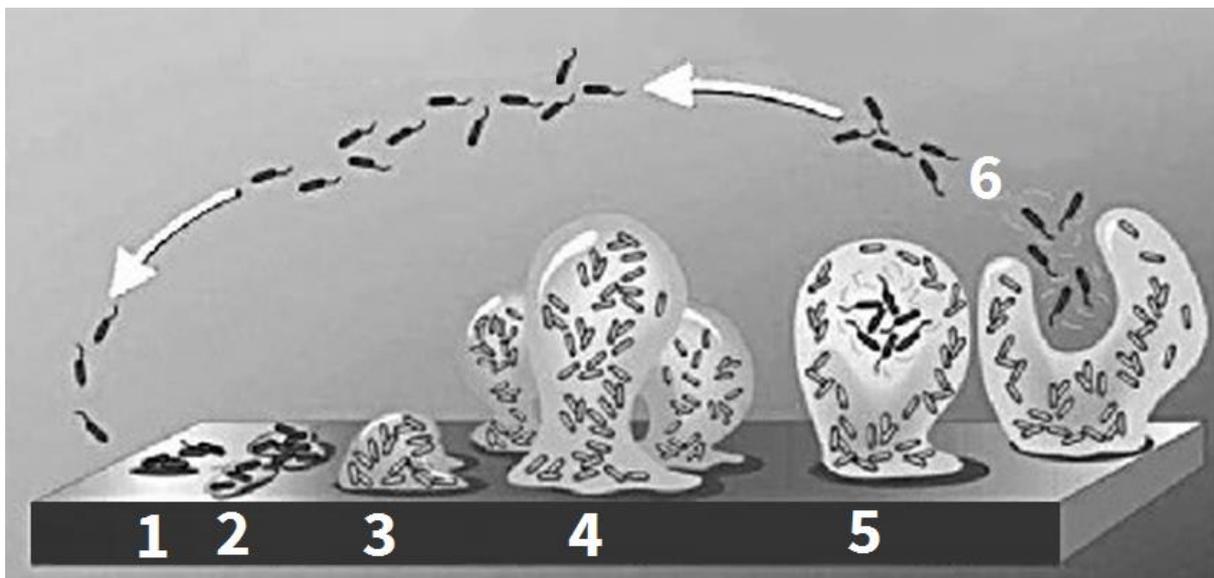


Figura 1 - Esquema dos estágios de desenvolvimento do biofilme microbiano. (1) Micro-organismos planctônicos. (2) Adesão a superfície. (3) Divisão e formação de microcolônias. (4) Crescimento das colônias e secreção de hidratos de carbono, proteínas e lipídios. (5) Biofilme maduro. (6) Desestruturação do biofilme e dispersão das células que darão início a novos biofilmes (Adaptado de (STOODLEY et al., 2002).

2.5 Resistência bacteriana

Um dos grandes problemas da saúde pública no Brasil e no mundo é a resistência de bactérias a antibacterianos. Bactérias que eram reconhecidamente sensíveis às drogas rotineiramente utilizadas na clínica, se apresentam agora resistentes aos fármacos disponíveis no mercado (GUILLEMOT, 1999; ROCHA et al., 2011).

A resistência aos antibacterianos é um fenômeno relacionado ao surgimento de linhagens bacterianas não sensíveis, capazes de se multiplicar na presença de concentrações de antibacterianos mais elevadas do que aquelas utilizadas na clínica. As infecções causadas por bactérias resistentes apresentam maior preocupação devido ao reduzido arsenal terapêutico disponível para tratamento nestes casos (ALANIS, 2005; WELLINGTON et al., 2013)

A seleção natural de linhagens resistentes promovida pelo uso descontrolado dos antibacterianos originou uma competição entre a tecnologia da indústria farmacêutica e a evolução microbiana. A cada novo antibacteriano introduzido na prática clínica ocorre o desenvolvimento da resistência bacteriana ao mesmo (ARAJ et al., 2012; TAVARES, 2002).

Durante as décadas iniciais da era antibiótica, a taxa de desenvolvimento de novas drogas e os padrões de uso foi de tal ordem que, quando a resistência a determinado agente antibacteriano era detectada, este era prontamente substituído por um novo composto para tratar o patógeno resistente. Entretanto, nos últimos anos, ocorreu uma aceleração no surgimento de bactérias multirresistentes, que não foi acompanhada pela indústria farmacêutica, com um declínio na produção destes compostos, devido a falta de inovação no que se refere à introdução de novas classes de antibacterianos. Desta forma, o controle e o tratamento de diversas infecções, especialmente as de origem hospitalar, ficaram prejudicados (BUTLER; BUSS, 2006; FERNANDES, 2006; SHEA, 2003; YUN, 2012). Devido a essas dificuldades os produtos vêm se tornando cada vez mais escassos e mais caros (FERRONATTO et al., 2007).

Os biofilmes por serem estruturas altamente hidratadas que contém canais que permitem a difusão interna de nutrientes e oxigênio, conferem proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e a entrada de antibacterianos, o que dificulta a

difusão de fármacos nos tecidos conferindo maior resistência (DONLAN; COSTERTON, 2002; VAN ACKER; VAN DIJCK; COENYE, 2014).

Após a formação de biofilme e o estabelecimento de uma infecção, terapias com antibacterianos tornam-se menos eficazes. A concentração de antibacterianos necessária para eliminar bactérias produtoras de biofilme é de 10 a 1000 vezes maior que a necessária para eliminar as mesmas espécies em estado planctônico (FRANK; PATEL, 2007; RÖMLING; BALSALOBRE, 2012). Com isso, a formação de biofilmes bacterianos geralmente dificulta o tratamento de infecções relacionadas a dispositivos médicos (MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2014).

2.6 Importância clínica

Os biofilmes desempenham papel fundamental no desenvolvimento de doenças infecciosas e representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza. São cruciais no desenvolvimento de infecções e frequentemente associados a altos níveis de resistência a agentes antibacterianos. Desenvolvem-se preferencialmente em superfícies inertes ou tecidos mortos, e ocorrem comumente em dispositivos médicos (BJARNSHOLT, 2013; COSTERTON, J. W. et al., 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002; MAH; O'TOOLE, 2001).

Relatou-se que biofilmes podem se formar após 3 dias da inserção de um cateter e que predominam na superfície externa do dispositivo após 10 dias. Contudo, com o aumento da duração da permanência para mais de 30 dias, a formação é predominante no lúmen do cateter (COSTERTON, J. W. et al., 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002). Desse modo, cerca de 70% de todas as infecções nosocomiais estão relacionadas à presença de biofilmes em dispositivos médicos, o que contribui para o aumento significativo da morbimortalidade dos pacientes (PERCIVAL et al., 2012; SIMOES, 2011).

Biofilmes constituem um mecanismo de colonização de superfícies de dentes, que originam a cárie dentária e outras doenças da boca. Podem colonizar lentes de contato, originando infecções graves. Cateteres e implantes plásticos como válvulas

cardíacas artificiais podem ser acometidos por biofilmes, podendo causar doenças graves e rejeições do material de próteses (HORCH, et al., 2013). Quando biofilmes se formam sobre ou dentro de aparatos médico-hospitalares, podem disseminar infecções nosocomiais, constituindo uma séria ameaça à saúde pública. Tem-se observado também a formação de biofilmes em micrografias eletrônicas do trato vaginal, bucal e intestinal o que é considerado indesejável e extremamente prejudicial à saúde (ARCIOLA et al., 2003).

Pelo menos metade de todos os casos de infecções hospitalares estão associados com dispositivos médicos, e esses geralmente são precedidos pela formação de biofilmes. Em dispositivos como cateteres o biofilme pode se localizar nas paredes internas, sendo capaz de ocorrer liberação de fragmentos do biofilme, os quais tendem penetrar na bexiga ou na corrente sanguínea, causando graves infecções (GUGGENBICHLER et al., 2011; MORALES et al., 2004).

Alguns micro-organismos representam extrema preocupação para a saúde pública por apresentarem resistência a antibacterianos devido à formação de biofilmes. Dentre elas estão *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os processos infecciosos causados por esses micro-organismos geralmente estão associados com alta letalidade e altos custos de tratamento (CHEN; YU; SUN, 2013; DEMAIN; SANCHEZ, 2009; ROCHA et al., 2011).

2.7 *Escherichia coli*

E. coli é um dos micro-organismos mais versáteis encontrados na natureza, pertence à família *Enterobacteriaceae*, e está presente no trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente, fazendo parte da microbiota normal. São bastonetes Gram negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, crescem bem em meio de cultura sintético contendo nutrientes simples e são fermentadores de açúcar (ANANIAS; YANO, 2008; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Algumas linhagens de *E. coli* adquiriram fatores de virulência que lhes conferem adaptação a novos nichos e a capacidade de causar um amplo espectro de doenças. Em

condições de imunossupressão pode ocorrer a disseminação e colonização deste micorganismo para o sistema nervoso central, o trato urinário e o sangue (JOHNSON; RUSSO, 2005; WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

E. coli uropatogênica é o agente etiológico que mais frequentemente ocasiona infecções no trato urinário (ITU). A cistite aguda é a forma mais comum de ITU, todavia podem ocorrer complicações como a pielonefrite aguda. A frequência de cistite aguda entre as mulheres jovens é de 0,5-0,7 episódios por pessoa por ano. Aproximadamente 25% das mulheres que tiveram um episódio de cistite aguda desenvolvem ITU recorrente (RAZ, 2014).

E. coli é também uma das fontes mais comuns de bacteremia em indivíduos hospitalizados. O relato de *E. coli* produtora de Betalactamase de Espectro Estendido (ESBL) em ambiente hospitalar e na comunidade, com perfil de resistência a betalactâmicos, ciprofloxacino, e sulfametoxazol-trimetoprim sinaliza a preocupante dimensão do problema (BIEDENBACH et al., 2004; MAYER 2011).

E. coli é responsável por 80% das ITUs, sendo que, 95% de todas estas infecções desenvolvem-se em uma rota ascendente e está frequentemente relacionada com a implantação de dispositivos médicos. A produção de biofilme por *E. coli* está associada à virulência da bactéria, podendo esta causar infecções intestinais ou extra-intestinais (JOHNSON; RUSSO, 2005; MULVEY, 2002; SHARMA; BEARSON, 2013).

A formação eficiente de biofilme por *E. coli* ocorre devido à produção aumentada de curli, esse são apêndices adesivos proteicos, de natureza amilóide, que permitem às células aderir umas às outras e a várias superfícies. Os genes necessários para a produção de curli estão agrupados nos operons *csgBA* e *csgDEFG*, que codificam as subunidades curli e regulam a sua transcrição e transporte, esses operons *csgBA* e *csgDEFG* são expressos em isolados ambientais e clínicos de *E. coli* e *Salmonella* spp. (BARNHART; CHAPMAN, 2006; PERRIN et al., 2009; SHARMA; BEARSON, 2013).

Devido a sua capacidade em formar biofilmes espessos *E. coli* tem sido muito utilizada em modelos para estudos. Sua habilidade em formar biofilmes também está relacionada com a disponibilidade de nutrientes no meio, onde: quanto maior a disponibilidade, mais evidente a formação do biofilme (AMATO; BRYNILDSEN, 2014; PETERSON; PITT, 2000).

2.8 Estratégias de controle

Várias abordagens têm sido empregadas para contornar os mecanismos de resistência das bactérias, uma delas é a terapia combinada, que consiste na administração conjunta de dois fármacos que atuam sobre alvos biológicos distintos. A associação de compostos antibacterianos é realizada com base na suscetibilidade microbiana, pois a potencialização do efeito antibacteriano é usualmente obtida quando o micro-organismo é suscetível a cada uma das drogas adotadas (MITSUGUI et al., 2011; NIGHTINGALE; MURAKAWA; AMBROSE, 2001). A maior vantagem dessa estratégia reside em uma esperada ampliação dos espectros de ação dos antibacterianos e na prevenção da emergência de organismos resistentes (DRAGO et al., 2007).

Outra alternativa usada pelas indústrias farmacêuticas para solucionar o problema da resistência bacteriana têm sido a modificação da estrutura de fármacos já existentes, na tentativa de torná-los mais eficientes ou de recuperar a atividade prejudicada pelos mecanismos bacterianos de resistência (SAKAGAMI; KAJAMURA, 2006).

A utilização de uma abordagem híbrida, têm sido considerada para solucionar o problema da resistência bacteriana, esta utiliza a combinação de dois fármacos diferentes a uma única molécula a qual tem a finalidade de criar um modelo com caráter farmacológico superior (BARREIRO; FRAGA, 2008). O composto resultante pode interagir e modular independentemente dois alvos biológicos distintos e, simultaneamente, se acumular em ambos os sítios de atuação (POKROVSKAYA et al., 2009). Este composto híbrido, por apresentar requisitos químicos que o permitem interagir com o sítio ativo de diferentes biomacromoléculas, oferece a possibilidade de tratamento de micro-organismos resistentes aos antibacterianos mais utilizados e a redução do risco de desenvolvimento de novas cepas resistentes (WANG et al., 2012; MAIA, 2014).

A combinação de substâncias já existentes e a modificação na estrutura química de antibacterianos são métodos que podem ser empregados no combate a micro-organismos resistentes. Estudos na literatura demonstraram que a associação de metais a antibacterianos também pode ser eficaz na reversão da resistência microbiana,

originando assim uma promissora estratégia no que se refere à produção de novos fármacos (DRAGO et al., 2007; WRIGHT; SUTHERLAND, 2007).

Devido ao papel significativo na ciência os metais foram atraindo um interesse contínuo como agentes antibacterianos (KHALID, 2014). Dado o sucesso dos compostos de platina no tratamento do câncer, muitos pesquisadores direcionaram esforços no sentido de desenvolver novas drogas à base de metais e, como consequência, atualmente há vários compostos inorgânicos sendo utilizados na clínica médica, dentre os quais podemos citar os complexos de ouro, empregados no tratamento da artrite reumatoide; o nitroprussiato de sódio, um complexo de ferro (III) eficaz no tratamento da hipertensão; o carbonato de lítio, que tem ação antidepressiva; a sulfadiazina de prata, que previne e trata infecções em pacientes queimados e os compostos de bismuto utilizados na erradicação da bactéria *Helicobacter pylori* (COHEN, 2007; ROCHA et al., 2011).

A modulação simultânea de mais de um alvo molecular essencial ao funcionamento e manutenção da vida do micro-organismo, tem sido considerada uma das alternativas mais promissoras para solucionar o problema associado ao desenvolvimento de resistência (MAIA, 2014).

2.9 Agentes antibacterianos

2.9.1 Sulfonamidas

A descoberta dos antibacterianos representa um dos marcos mais importantes da medicina moderna (PASQUALE; TAN, 2005). A introdução das sulfonamidas em 1930 e da penicilina na década posterior provocaram um grande avanço no tratamento de doenças infecciosas, causando uma diminuição drástica nas taxas de mortalidade e uma enorme sensação de bem-estar (BUTLER; BUSS, 2006; HEVENER et al., 2009). As sulfonamidas constituem um dos grupos utilizados na prática clínica, em razão do baixo custo e da relativa eficácia em algumas doenças bacterianas comuns. Apresentam ação

bacteriostática, possuem espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e negativas e alguns protozoários (PORTA, 2006).

As sulfonamidas são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido *p*-aminobenzóico (PABA) (Figura 2) impedindo a sua utilização pelas bactérias na síntese do ácido fólico. Os micro-organismos sensíveis são aqueles que exigem a presença do PABA para sintetizar seu próprio ácido fólico. O efeito bacteriostático (ação de uma substância ao inibir o crescimento bacteriano ou interromper a sua reprodução) induzido pelas sulfonamidas é anulado competitivamente pelo PABA (GILMAN, 2006).

As sulfonamidas não afetam as células de mamíferos através deste mecanismo, visto que necessitam de ácido fólico pré-formado por serem incapazes de sintetizá-lo. Apesar de alguns efeitos adversos, as sulfas constituem-se em uma classe relativamente segura de antibacterianos e representam, ainda, as melhores opções para determinados patógenos. As sulfas distribuem-se por todo o organismo, incluindo o líquido e o fluido sinovial. Dentre os exemplos de sulfonamidas destacam-se a sulfadiazina, sulfadimidina, sulfametopirazina e sulfametoxazol (RANG et al., 1998; ‘



Figura 2 - Representação estrutural da sulfonamida e do ácido *p*-aminobenzóico (PABA)

2.9.2 Sulfametoxazol

Dentro da classe das sulfonamidas, muitos compostos são bastante conhecidos e populares. Neste trabalho dar-se-á ênfase ao composto 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazolil)benzeno sulfonamida, conhecido comercialmente como sulfametoxazol (Figura 3).

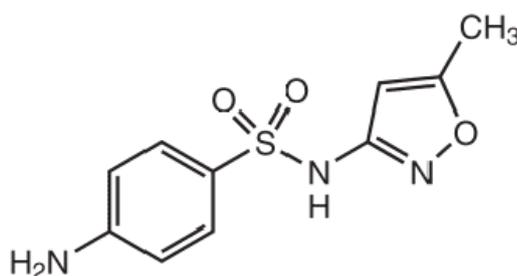


Figura 3 - Representação estrutural da sulfametoxazol.

O sulfametoxazol destaca-se pelas características de estabilidade, fácil solubilidade, baixo custo e o seu potencial farmacológico. É um inibidor competitivo do ácido *p*-aminobenzóico, sendo uma droga essencialmente bacteriostática, usada no tratamento de infecções do trato urinário e como antisséptico (SALTER, 1982). Comumente, encontra-se associado ao trimetoprim, esta apresentação, é composta por dois componentes ativos que agem sinergicamente pelo bloqueio sequencial de duas enzimas que catalisam estágios sucessivos da biossíntese do ácido fólico no micro-organismo. Este mecanismo habitualmente resulta em atividade bactericida *in vitro* em concentrações nas quais as substâncias individualmente são apenas bacteriostáticas (ANVISA, Bulário eletrônico).

A associação de sulfametoxazol e trimetoprim tem apresentado atividade sinérgica contra uma ampla variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, demonstrando ação inclusive em *Mycobacterium tuberculosis* (HUANG et al., 2012). Essa associação tem sido utilizada no tratamento da pneumonia, infecções do trato urinário, toxoplasmose e pneumocistose em pacientes infectados pelo HIV (SHAH; RIVERA; ASHFAQ, 2013) sendo também o tratamento de escolha para algumas

bactérias oportunistas não fermentadoras (LIVERMORE et al., 2014), como *Burkholderia cepacia*, *Alcaligenes* spp, *Pseudomonas pseudomallei*, *Stenotrophomonas* spp, *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) spp, *Moraxella* spp (ANVISA, 2004).

2.10 Complexos metálicos

As atividades exercidas por íons metálicos nos meios biológicos têm estimulado a pesquisa e o desenvolvimento de compostos inorgânicos como agentes terapêuticos. Estudos recentes indicam que diferentes tipos de metais podem causar diferentes tipos de lesões em células bacterianas, ocorrendo devido ao estresse oxidativo, disfunção de proteínas ou também causando danos a membrana. Metais não essenciais como a prata e o mercúrio são extremamente tóxicos para a maioria das bactérias, apresentando atividade antibacteriana em concentrações muito baixas (COHEN, 2007; LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013).

Embora alguns complexos metálicos estão entre os antibacterianos mais amplamente utilizados, a avaliação de novos complexos com essa atividade se torna necessária e de grande importância. A coordenação de metais a fármacos representa um potencial considerável para aumentar o arsenal de drogas disponíveis para tratamento de uma série de enfermidades (COHEN, 2007; LEMIRE et al., 2013; SABOUNCHEI et al., 2014).

Considerando a importância do estudo de medicamentos à base de metais o presente estudo utilizou compostos obtidos a partir da interação da sulfametoxazol com acetatos de cobre, cádmio, mercúrio, e cloreto de prata.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos compostos foram previamente determinadas por MARQUES (2007), sendo essas representadas nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima dos compostos SMTZ frente à bactéria *E. coli*. Valores determinados em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Composto	<i>E. coli</i>
SMTZ	512
[Hg(sulfametoxazolato) ₂].2DMSO	2
[Cu(μ -CH ₃ COO) ₄ (sulfametoxazolato) ₂]	512
[Cd(sulfametoxazolato) ₂ (CH ₃ OH) ₂] _n .x(CH ₃ OH)	16
[Ag(sulfametoxazolato)]	64

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima dos respectivos sais metálicos de mercúrio, cobre, cádmio e prata frente à bactéria *E. coli*. Valores determinados em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Composto	<i>E. coli</i>
Hg(CH ₃ COO) ₂	32
Cu(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O	512
Cd(CH ₃ COO) ₂ .2H ₂ O	512
AgCl	256

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibiofilme do Sulfametoxazol complexado com metais sobre biofilme de *Escherichia coli*.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar a capacidade de formação do biofilme pela bactéria *E. coli*;

3.2.2 Verificar a capacidade dos compostos testados quanto à inibição da formação de biofilme bacteriano;

3.2.3 Comparar os resultados da sulfametoxazol livre com os compostos coordenados aos metais;

3.2.4 Avaliar se os compostos que combinam sulfametoxazol e metais são mais efetivos do que estes elementos isoladamente (sais);

3.2.5 Determinar a Concentração Mínima de Inibição de Biofilme (CMIB).

4 METODOLOGIA

4.1 Compostos

Para a realização dos métodos experimentais frente à fragilidade da matriz polimérica dos biofilmes foram utilizados compostos químicos a base de sulfa e metais e seus respectivos sais, sintetizados no laboratório de materiais inorgânicos (LMI) do departamento de química UFSM conforme MARQUES (2007).

Tabela 3: Complexos SMTZ e metais e seus respectivos sais metálicos

Sulfametoxazol livre	—
[Hg(sulfametoxazolato) ₂].2DMSO	Hg(CH ₃ COO) ₂
[Cu(μ-CH ₃ COO) ₄ (sulfametoxazolato) ₂	Cu(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O
[Cd(sulfametoxazolato) ₂ (CH ₃ OH) ₂] _n .x(CH ₃ OH)	Cd(CH ₃ COO) ₂ .2H ₂ O
[Ag(sulfametoxazolato)]	AgCl

4.2 Micro-organismo e Procedimento experimental

A cepa utilizada nos experimentos foi *E. coli* ATCC 25922, a qual possui capacidade de formar biofilme como previamente relatado na literatura (CRÉMET et al., 2013). Como controle negativo utilizou-se apenas o meio de cultura e como controle positivo utilizou-se meio de cultura e bactéria.

A capacidade de inibição da formação do biofilme foi testada conforme LAZZAROTO, 2010, com algumas modificações. Efetuada em placas de microtitulação onde os orifícios da microplaca foram preenchidos com 180 μL de caldo Müller Hinton e 100 μL dos compostos. Realizaram-se diluições em série e foram adicionados 20 μL de suspensão bacteriana 0,5 na escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de

colônias (UFC)/mL). Posteriormente ao tempo de incubação (24 horas), o conteúdo dos poços foi aspirado e a placa foi lavada três vezes consecutivas com 200 μ L de salina estéril, de modo a excluir quaisquer células fracamente aderidas na superfície. A fixação do biofilme foi realizada adicionando-se 150 μ L de metanol (P.A.) por 20 minutos, e após foi corado com 150 μ L de solução 0,5% de cristal violeta por 15 minutos. A placa foi então lavada com água corrente para retirar o excesso de corante e deixada a temperatura ambiente até estar totalmente seca.

Decorrido esse período foram adicionados 150 μ L de etanol 95% ao botão corado, e deixado em repouso por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas em um leitor de placas (ELISA), no $\lambda = 570$ nm, de acordo com (WAKIMOTO et al., 2004).

4.4 Análise estatística

As leituras de densidade óptica obtidas no ensaio de formação de biofilme foram expressas em média \pm erro padrão. Utilizou-se ANOVA de uma via seguido pelo Bonferroni's Multiple Comparison Test, considerando-se diferença estatística quando $p < 0,05$. Para a realização dos gráficos, utilizou-se o software GraphPad Prism versão 5.01.

5 RESULTADOS

De acordo com a figura 4 o SMTZ livre foi capaz de inibir o crescimento do biofilme a partir da concentração de 256 $\mu\text{g/mL}$, não apresentando grande significância sobre o biofilme de *E. coli*.

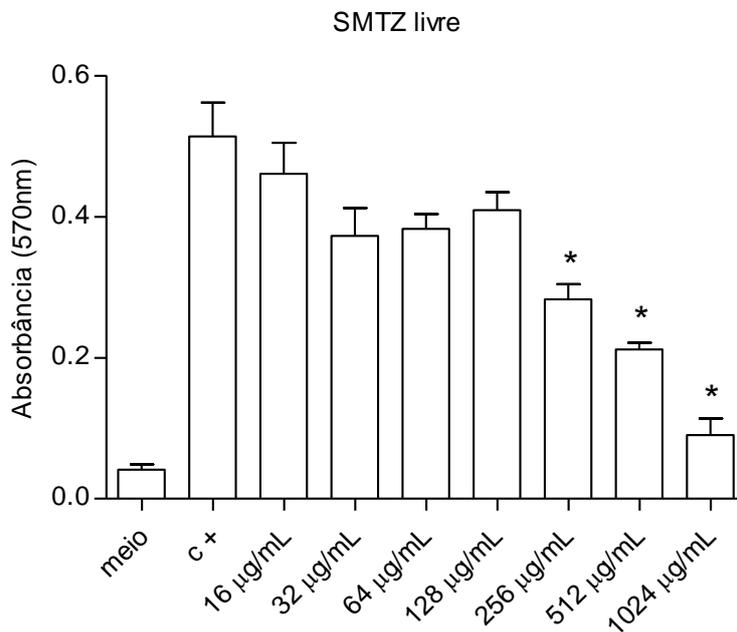


Figura 4: Efeito de diferentes concentrações de sulfametoxazol (SMTZ) livre, na inibição da formação do biofilme bacteriano de *E. coli*. Sendo * significativamente diferente quando comparado com o grupo controle positivo (+) para $p < 0.05$ via Bonferroni's Multiple Comparison Test.

Na figura 5 pode ser observado que o complexo $[\text{Hg}(\text{sulfametoxazolato})_2] \cdot 2\text{DMSO}$ (SMTZ+Hg) (figura 5A) e o sal de mercúrio $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (figura 5B) foram capazes de inibir a formação do biofilme de *E. coli* em todas as concentrações testadas. Pode-se observar que a CIM da SMTZ complexada com mercúrio é inferior a CIM do sal de mercúrio isolado.

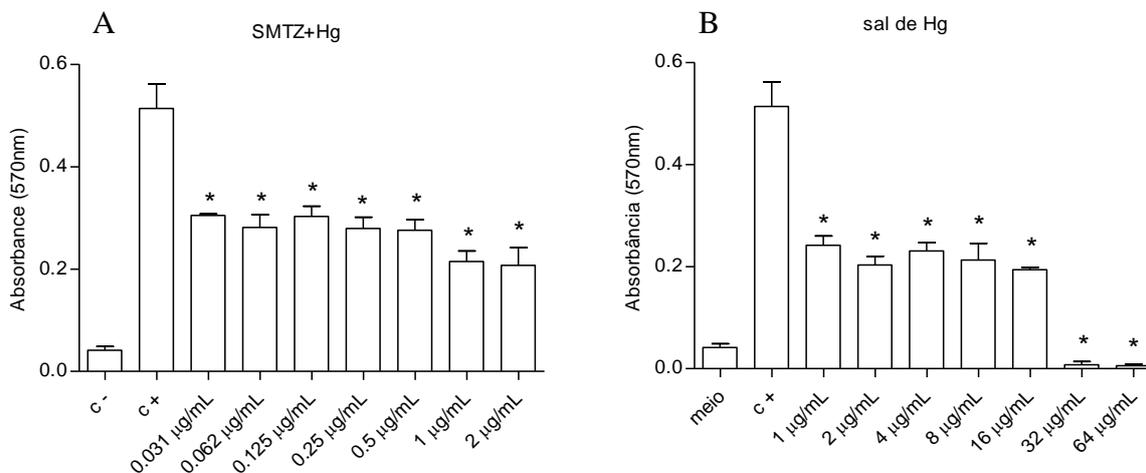


Figura 5: Efeito dos compostos de mercúrio frente à inibição da formação do biofilme da bactéria *E. coli*.

Conforme a figura 6, pôde-se observar que todas as concentrações testadas de $[\text{Cu}(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_4(\text{sulfametoxazolato})_2]$ (SMTZ+Cu) e do sal de cobre $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ mostraram-se capazes de inibir a formação do biofilme. Os dois testes apresentaram resultados semelhantes.

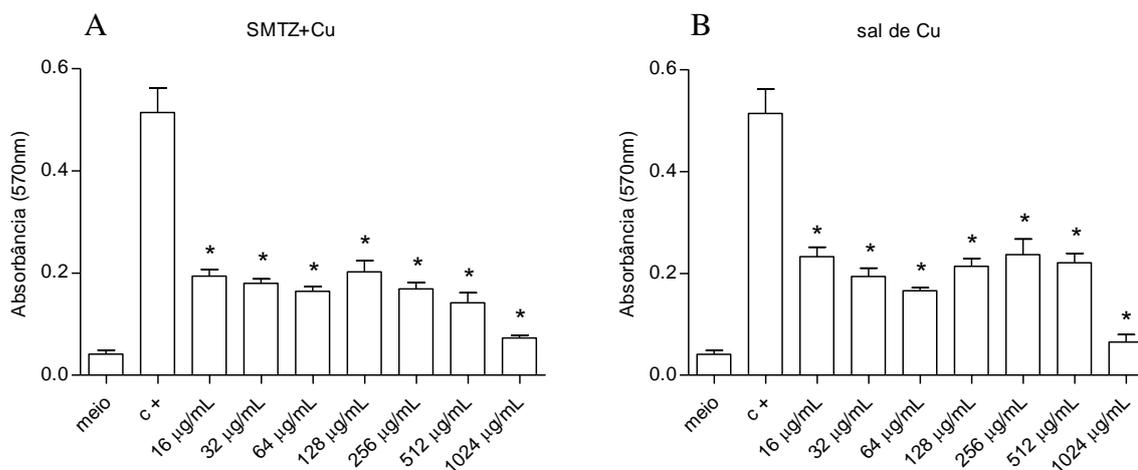


Figura 6: Efeito dos compostos de cobre frente à inibição da formação do biofilme da bactéria *E. coli*.

Os resultados demonstrados na figura 7B) expressam que o sal de cádmio $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi capaz de inibir a formação do biofilme em todas as concentrações testadas, já o complexo $[\text{Cd}(\text{sulfametoxazolato})_2(\text{CH}_3\text{OH})_2]_n \cdot x(\text{CH}_3\text{OH})$ (SMTZ+Cd) (figura 7A) inibiu a formação do biofilme até a concentração de $2 \mu\text{g/mL}$. Pode-se observar que a CIM do complexo SMTZ+Cd é expressivamente menor que a CIM do sal de Cd.

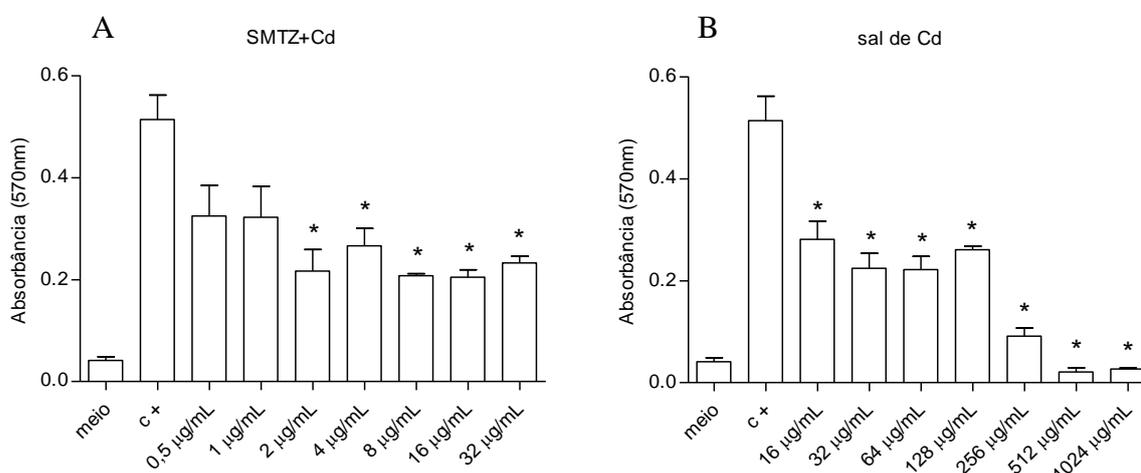


Figura 7: Efeito dos compostos de cádmio frente à inibição da formação do biofilme da bactéria *E. coli*.

O sal de prata (AgCl) não foi capaz de inibir a formação do biofilme, em contrapartida o composto $[\text{Ag}(\text{sulfametoxazolato})]$ (SMTZ+Ag) inibiu o crescimento do biofilme em todas as concentrações testadas. Os resultados podem ser visualizados na figura 8.

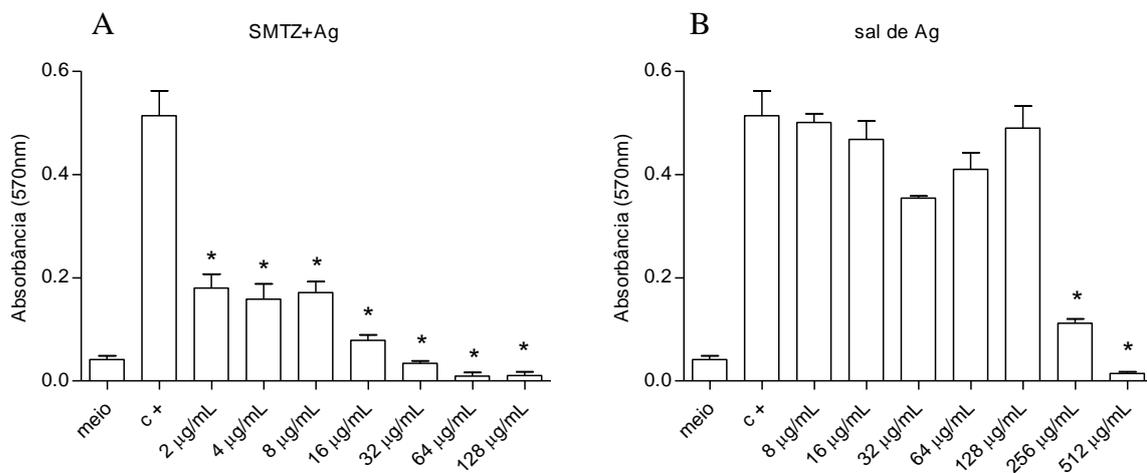


Figura 8: Efeito dos compostos de prata frente à inibição da formação do biofilme da bactéria *E. coli*.

6 DISCUSSÃO

A sulfonamidas têm atraído cada vez mais atenção na química supramolecular, uma vez que combinam os recursos necessários para várias atividades biológicas e a coordenação de metais por meio de grupos fenilamino e sulfonil-ácido (SHAH et al., 2013). A associação de vários componentes em biomoléculas permite que eles atuem de forma cooperativa ou sinérgica (TOMA, 2005).

Células crescidas em biofilme expressam propriedades distintas das células planctônicas e a principal diferença é o aumento da resistência microbiana frente a agentes antibacterianos frequentemente utilizados na prática clínica (CHUA et al., 2014). O SMTZ, apesar de ser um fármaco utilizado para o tratamento de infecções bacterianas não exibiu ação relevante contra o biofilme bacteriano, este foi capaz de inibir o crescimento do biofilme a partir da concentração de 256 µg/mL (figura 4), apenas uma diluição abaixo de sua CIM. Em concentrações abaixo da CIM não apresentou resultados significativos. Corroborando com nossos resultados, estudos revelam que SMTZ (livre), apresentou-se pouco eficiente, não apresentando efeito contra o biofilme bacteriano (KOSTENKO et al., 2010).

Alguns metais desempenham funções celulares que não podem ser cumpridas por moléculas orgânicas, tem a capacidade de interromper o crescimento de biofilmes resistentes e aliados a outros antibacterianos exercem um efeito sinérgico com atividade bactericida, podendo inibir as vias metabólicas de forma seletiva eliminando bactérias multirresistentes (LEMIRE et al., 2013). Sais metálicos de Hg, Cu, Cd e Ag quando entram em contato com o meio de cultura, se dissociam ocasionando uma diminuição na atividade formadora de biofilme, ao passo que, quando coordenados ao SMTZ, possuem maior atividade frente ao biofilme bacteriano. Provavelmente isso ocorra, pelo fato dos os metais coordenados com o SMTZ não se dissociarem ou se dissociarem lentamente (MAH; O'TOOLE, 2001).

O complexo de SMTZ+Hg se comparado ao SMTZ livre e ao seu sal Hg (CH₃COO)₂ exibiu excelente atividade antibiofilme, inibindo o mesmo a partir da concentração 0.31 µg/mL, reduzindo significativamente a formação do biofilme *E. coli*, como pode ser visualizado na figura 5. Segundo SABOUNCHEI et al., (2014) a atividade frente ao biofilme estaria relacionada com facilidade do complexo em

atravessar a camada de lipídeos da membrana celular bacteriana e assim afetar os mecanismos de crescimento e desenvolvimento das bactérias.

O composto de coordenação SMTZ+Cu apresentou atividade semelhante ao seu sal $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, porém, quando comparados a SMTZ livre, os compostos de coordenação exibiram atividade considerável na inibição da formação do biofilme. Além de apresentar atividade antibacteriana o complexo de SMTZ+Cu apresenta boa atividade antifúngica contra diversas linhagens (ROCHA et al., 2011).

Estudos realizados para avaliar o efeito de metais sobre o crescimento de *E. coli* demonstraram que a bactéria se apresentou sensível quando incubada junto ao sal de Cd $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, vindo ao encontro de nosso estudo, onde os compostos de cádmio também mostraram-se efetivos (RENSING; MITRA; ROSEN, 1997). Biofilmes como o de *E. coli* possuem capacidade de bissorção, com uma alta afinidade para captação de metais como Cd, Cr e Ni, (QUINTELAS et al., 2008). Essa propensão pode estar diretamente relacionada com a eficácia do complexo SMTX+Cd. Devido a maior capacidade de o Cd penetrar no biofilme da bactéria, o SMTX pode agir nos microorganismos envolvidos pelo biofilme.

Segundo KOSTENKO et al., (2010) biofilmes tratados com prata e sulfametoxazol demonstraram-se sensíveis, da mesma forma, em nosso estudo, onde complexo SMTZ+Ag mostrou-se bastante efetivo na inibição da formação do biofilme. A inibição da formação do biofilme pelo complexo SMTZ+Ag apresentou-se de acordo com o grau da sua concentração, havendo um aumento proporcional na formação do biofilme à medida que a concentração de SMTZ+Ag foi diminuída.

A eficácia do complexo estaria diretamente relacionada com a liberação constante de cátions de Ag meio, esses agiriam causando danos à membrana celular e ao DNA bacteriano provocando a morte das células alvo dentro do biofilme (KOSTENKO et al., 2010). Como a tolerância dos biofilmes aos cátions metálicos é tempo dependente, acredita-se que o SMTX-Ag teve uma melhor atividade antibiofilme que seu sal AgCl, devido a este composto coordenado liberar mais lentamente estes íons de Ag (HARRISON; TURNER; CERI, 2005).

Comparando-se os valores da CIM e as concentrações capazes de inibir o biofilme para os compostos coordenados de Hg, Cd, Cu e Ag, observou-se que todos foram capazes de inibir a formação do biofilme em concentrações menores que sua respectiva CIM. Deste modo, comprovou-se que houve uma inibição do biofilme e não

a apenas a inibição do crescimento bacteriano, já que em concentrações acima da CIM os micro-organismos não estariam viáveis para a formação das películas.

Segundo ROCHA et al., (2011) um dos motivos seria o fato de o condicionamento superficial estar prejudicado pelos complexos, pois a adsorção de substâncias que incluem nutrientes, moléculas orgânicas e inorgânicas, são importantes para o crescimento das células, sendo que a falta desses elementos prejudica adesão das células. O tratamento com complexos de sulfametoxazol com metais também pode ter produzido um biofilme desfavorável o qual promoveria um descolamento, reduzindo assim a aderência à superfície.

O aumento da atividade antibacteriana de compostos em coordenação com os íons metálicos pode ocorrer devido à presença de um sistema de doadores 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 lipóide da membrana celular do micro-organismo (CHOHAN et al., 2010).

A eficácia dos compostos coordenados na inibição da formação do biofilme é uma ferramenta promissora para a redução da colonização microbiana em superfícies que posteriormente ocasionam infecções. Se uma nova substância terapêutica consegue suprimir o aparecimento de cepas resistentes, esta substância provavelmente apresentará maior eficácia e longevidade no emprego terapêutico, ganhando mais aceitação para uso como terapia de escolha.

7 CONCLUSÃO

Os recentes avanços na química inorgânica medicinal demonstram perspectivas significativas para a utilização de complexos metálicos como drogas. A coordenação de metais a sulfonamidas representa um potencial considerável para aumentar o arsenal de medicamentos disponíveis para o tratamento de doenças, pois as sulfonamidas constituem uma classe de antibacterianos relativamente segura e representam as melhores opções para combater determinados patógenos.

Os resultados obtidos neste estudo revelam que os complexos metálicos com SMTZ apresentaram efeitos significativos na inibição da formação do biofilme da bactéria *E. coli*, dessa forma é possível afirmar que essa associação potencializou o efeito antibacteriano desses compostos, tendo em vista que houve diferença entre os complexos de metais com SMTZ e os seus respectivos sais e o SMTZ livre. Essa combinação resultou em uma ação sinérgica e mais efetiva, demonstrando que a coordenação de metais aos antibacterianos sulfonamidas pode levar à descoberta de novos agentes. Portanto, torna-se válido investir em pesquisas no sentido de melhorar as atividades desses complexos, investigando aspectos farmacológicos e fisiológicos que comprovem a eficácia e segurança dos compostos.

Este trabalho vem, portanto, encorajar novas pesquisas no sentido de demonstrar e melhorar a atividade destes complexos assim como torná-los aplicáveis e seguros para prática clínica.

9 REFERÊNCIAS

AL-AHMAD, M. et al. Biofouling in RO membrane systems Part 1: Fundamentals and control. **Desalination**, v. 132, n. 1-3, p. 173-179, 2000.

ALANIS, A. J. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 697-705, 2005.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Bulário eletrônico da Anvisa, <http://bulario.bvs.br>. Agência Nacional De Vigilância Sanitária, (ANVISA). Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_6_2004.pdf>

Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Bulário eletrônico da Anvisa, <http://bulario.bvs.br>.

AMATO, S. M.; BRYNILDSEN, M. P. Nutrient Transitions Are a Source of Persisters in *Escherichia coli* Biofilms. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e93110, 2014.

AMMOR, M. S.; MICHAELIDIS, C.; NYCHAS, G. J. Insights into the role of quorum sensing in food spoilage. **J Food Prot**, v. 71, n. 7, p. 1510-25, 2008.

ANANIAS, M.; YANO, T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 10, p. 877-83, 2008.

APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. **Braz J of Infectious Diseases**, v. 12, p. 526-530, 2008.

ARAJ, G. F. et al. A reflection on bacterial resistance to antimicrobial agents at a major tertiary care center in Lebanon over a decade. **J Med Liban**, v. 60, n. 3, p. 125-35, 2012.

ARCIOLA, C. R. et al. Occurrence of ica genes for slime synthesis in a collection of *Staphylococcus epidermidis* strains from orthopedic prosthesis infections. **Acta Orthop Scand**, v. 74, n. 5, p. 617-21, Oct 2003.

BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial Quorum Sensing and Food Industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 3, p. 183-193, 2011.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. New insights for multifactorial disease therapy: The challenge of the symbiotic drugs. **Curr. Drug Ther**, v. 3, n. 13, p. 1-13, 2008.

BARNHART, M. M.; CHAPMAN, M. R. Curli Biogenesis and Function. **Annual Review of Microbiol**, v. 60, n. 1, p. 131-147, 2006.

BASAK, S. et al. **Biofilms: A Challenge to Medical Fraternity in Infection Control**. 2013.

BEHLAU, I.; GILMORE, M. S. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. **Arch Ophthalmol**, v. 126, n. 11, p. 1572-81, 2008.

BESTER, E.; WOLFAARDT, G. M.; AZNAVEH, N. B.; GREENER, J. Biofilms' role in planktonic cell proliferation. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 11, p. 21965-82, 2013.

BHARDWAJ, A. K.; VINOTHKUMAR, K.; RAJPARA, N. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 8, n. 1, p. 68-83, 2013.

BIEDENBACH, D. J.; MOET, G. J.; JONES, R. N. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 50, n. 1, p. 59-69, Sep 2004.

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS**, v. 121, p. 1-58, 2013.

BURT, S. A. et al. The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum* and Reduces Bacterial Biofilm Formation at Sub-Lethal Concentrations. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93414, 2014.

BUTLER, M. S.; BUSS, A. D. Natural products — The future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 919-929, 2006.

CAPELLETTI RV, Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais. 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **J Appl Bacteriol**, v. 75, n. 6, p. 499-511, 1993.

CHAVES, L. C. D. Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável. 2004. 156 f. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga.**

CHEN, M.; YU, Q.; SUN, H. Novel Strategies for the Prevention and Treatment of Biofilm Related Infections. **International J of Mol Sciences**, v. 14, n. 9, p. 18488-18501, 2013.

CHOHAN, Z. H. et al. Some new biologically active metal-based sulfonamide. **European J of Med Chem**, v. 45, n. 7, p. 2893-2901, 2010.

CHUA, S. L. et al. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. **Nat Commun**, v. 5, 2014.

COHEN, S. M. New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry. **Curr Opin Chem Biol**, v. 11, n. 2, p. 115-20, Apr 2007.

CAIXETA, D. S. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. 2008. 75 f. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.**

COOPER, R.; Biofilms and wounds: much ado about nothing? **Wounds UK**, v. 6, n. 4, p. 84-90. 2010

COSTERTON, J. W. et al. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 711-745, 1995.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, May 21, 1999 1999.

CRÉMET, L. et al. Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. **Diagnostic Microbiol and Infectious Disease**, v. 75, n. 3, p. 252-255, 2013.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE G, A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, n. 4, p. 847-67, Dec 2000.

DAVIES, D. G. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, n. 5361, p. 295-8, Apr 10 1998.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **J Antibiot**, v. 62, n. 1, p. 5-16, 2009.

DEWANTI, R.; WONG, A. C. L. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. **International J of Food Microbiol**, v. 26, n. 2, p. 147-164, 1995.

DJERIBI, R.; BOUCHLOUKH, W.; JOUENNE, T.; MENAA, B. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. **American J of Infection Control**, v. 40, n. 9, p. 854-859, 2012.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 167-93, 2002.

DRAGO, L. et al. In vitro evaluation of antibiotics' combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. **BMC Infect Dis**, v. 7, p. 111, 2007.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development[mdash]the failure of success? **Nat Biotech**, v. 24, n. 12, p. 1497-1503, 2006.

FERRONATTO, R. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 224-230, 2007.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORCAO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite : fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p. 291-296, 2005.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Micro**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FRANK, K. L.; PATEL, R. Activity of sodium metabisulfite against planktonic and biofilm *Staphylococcus* species. **Diagnostic Microbiol and Infectious Disease**, v. 57, n. 4, p. 355-359, 2007.

FUX, C. A. et al. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends Microbiol**, v. 13, n. 1, p. 34-40, 2005.

GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. McGraw-Hill, 2006. ISBN 9788577260010.

GUGGENBICHLER, J. P. et al. Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials - catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections. **GMS Krankenhhyg Interdiszip**, v. 6, n. 1, p. 15, 2011.

GUILLEMOT, D. Antibiotic use in humans and bacterial resistance. **Current Opinion in Microbiol**, v. 2, n. 5, p. 494-498, 1999.

HÄNSCH, G. M. Host Defence against Bacterial Biofilms: "Mission Impossible"? **ISRN Immunology**, v. 2012, p. 17, 2012.

HARRISON, J. J.; TURNER, R. J.; CERI, H. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. **BMC Microbiol**, v. 5, p. 53, 2005.

HEVENER, K. E. et al. Structural Studies of Pterin-Based Inhibitors of Dihydropteroate Synthase. **J of Med Chem**, v. 53, n. 1, p. 166-177, 2010/01/14 2009.

HORCH, R. E.; SCHULTZ, G.; SCHUBERT, D. W.; SCHMITZ, M. Infectious complications in implant based breast surgery and implications for plastic surgeons. **GMS Ger Plast Reconstr Aesthet Surg**, v. 3, p. 1-9, 2013.

HUANG, T.-S. et al. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to sulfamethoxazole, trimethoprim and their combination over a 12 year period in Taiwan. **J of Antimicrobial Chem**, v. 67, n. 3, p. 633-637, March 1, 2012 2012.

JIANG, T.; LI, M. Quorum sensing inhibitors: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 23, n. 7, p. 867-894, 2013.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International J of Med Microbiol**, v. 295, n. 6–7, p. 383-404, 2005.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Micro**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KHALID, A. Q.; ALJOHNY, B. O.; WAINWRIGHT, M. Antibacterial effects of pure metals on clinically important bacteria growing in planktonic cultures and biofilms. **African J of Microbiol Research**, v. 8, n. 10, p. 1080-1088, 2014.

KOSTENKO, V. et al. Impact of silver-containing wound dressings on bacterial biofilm viability and susceptibility to antibiotics during prolonged treatment. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 12, p. 5120-31, Dec 2010.

KOUIDHI, B. et al. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. **Microbial Pathogenesis**, v. 49, n. 1–2, p. 14-22, 2010.

LAZZAROTTO, C. Formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* isolado de cateter venoso central através de métodos fenotípicos e genotípicos. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto alegre, 2010.

LAWRENCE, J. R. et al. Optical sectioning of microbial biofilms. **J of Bacteriology**, v. 173, n. 20, p. 6558-6567, October 1, 1991 1991.

LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nat Rev Micro**, v. 11, n. 6, p. 371-384, 2013.

LIVERMORE, D. M. et al. Comparative in vitro activity of sulfametrole/trimethoprim and sulfamethoxazole/trimethoprim and other agents against multiresistant Gram-negative bacteria. **J of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. 1050-1056, April 1, 2014 2014.

MAH, T.-F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiol**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MAIA, J. Quimioterápicos com ação dual: novas abordagens para o grave problema de resistência microbiana na saúde pública. 2014. 38 f. **Monografia (Pós-Graduação**

Lato Sensu em Análises Clínicas) Faculdade Internacional Signorelli, Rio de Janeiro, 2014.

MARINHO, A. R. et al. Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. **Braz J Microbiol**, v. 44, n. 2, p. 423-6, 2013.

MARQUES, L. L. Síntese, estrutura e avaliação da atividade antimicrobiana de complexos metálicos com sulfametoxazol. 2007. **Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.**

MAYER, C. Bacterial Cell Wall Recycling. In: **eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.2012.**

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 249-253, 2003.

MITSUGUI, C. S. et al. In vitro activity of polymyxins in combination with β -lactams against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **International J of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 5, p. 447-450, 2011.

MORALES, M. et al. Biofilm: the microbial "bunker" for intravascular catheter-related infection. **Support Care Cancer**, v. 12, n. 10, p. 701-7, Oct 2004.

MORYL, M.; KALETA, A.; STRZELECKI, K.; RÓŻALSKA, S.; RÓŻALSKI, A. Effect of nutrient and stress factors on polysaccharides synthesis in *Proteus mirabilis* biofilm. **Acta Biochim Pol**, v. 61, n. 1, p. 133-139, 2014.

MULCAHY, L. R.; ISABELLA, V. M.; LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 1, p. 1-12, 2014.

MULVEY, M. A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol**, v. 4, n. 5, p. 257-71, 2002.

NIGHTINGALE, C. H.; MURAKAWA, T.; AMBROSE, P. G. **Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice.** Taylor & Francis, 2001. ISBN 9780824705619.

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

PASQUALE, T. R.; TAN, J. S. Nonantimicrobial Effects of Antibacterial Agents. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 1, p. 127-135, January 1, 2005 2005.

PEREIRA, M. O. “Comparação da Eficiência de Dois Biocidas (Carbamato e Glutaraldeído) em Sistemas de Biofilme”. 2001. 234 f. Tese de Doutorado, **Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia da Universidade do Minho**, Portugal 2001.

PERCIVAL, S. L. et al. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 20, n. 5, p. 647-657, 2012.

PERRIN, C. et al. Nickel promotes biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 strains that produce curli. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 6, p. 1723-33, Mar 2009.

PETERSON, R. V.; PITT, W. G. The effect of frequency and power density on the ultrasonically-enhanced killing of biofilm-sequestered *Escherichia coli*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 17, n. 4, p. 219-227, 2000.

POKROVSKAYA, V. et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Fluoroquinolone–Aminoglycoside Hybrid Antibiotics. **J of Med Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2243-2254, 2009/04/23 2009.

PORTA, V. Farmacologia Clínica: Fundamentos da terapêutica racional. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 616-617, 2006.

QUINTELAS, C. et al. Biosorption of Cr(VI) by three different bacterial species supported on granular activated carbon—A comparative study. **J of Hazardous Materials**, v. 153, n. 1–2, p. 799-809, 2008.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. CEA, 1998. ISBN 9788840809403.

RAZ, R.; GENNESIN, Y.; WASSER, J.; STOLER, Z.; ROSENFELD, S.; ROTTENSTERICH, E.; STAMM, W. E. Recurrent Urinary Tract Infections in Postmenopausal Women. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 152-156, 2014.

RENSING, C.; MITRA, B.; ROSEN, B. P. Insertional inactivation of *dsbA* produces sensitivity to cadmium and zinc in *Escherichia coli*. **J of Bacteriology**, v. 179, n. 8, p. 2769-71, April 1, 1997 1997.

RHOADS, D. D.; WOLCOTT, R. D.; PERCIVAL, S. L. Biofilms in wounds: management strategies. **J Wound Care**, v. 17, n. 11, p. 502-8, 2008.

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

RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **J of Internal Med**, v. 272, n. 6, p. 541-561, 2012.

SABOUNCHEI, S. J. et al. Mercury(II) complexes of unsymmetric phosphorus ylides: Synthesis, spectroscopic and antibacterial activity studies. **J of Molecular Structure**, v. 1061, n. 0, p. 90-96, 2014.

SAKAGAMI, Y.; KAJIMURA, K. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant enterococci. **J Hosp Infect**, v. 50, n. 2, p. 140-4, 2002,

SALTER, A. J. Trimethoprim-sulfamethoxazole: an assessment of more than 12 years of use. **Rev Infect Dis**, v. 4, n. 2, p. 196-236, 1982.

SHAH, S. S.; RIVERA, G.; ASHFAQ, M. Recent advances in medicinal chemistry of sulfonamides. Rational design as anti-tumoral, anti-bacterial and anti-inflammatory agents. **Mini Rev Med Chem**, v. 13, n. 1, p. 70-86, 2013.

SHARMA, V. K.; BEARSON, B. L. Hha controls *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by differential regulation of global transcriptional regulators FlhDC and CsgD. **Appl Environ Microbiol**, v. 79, n. 7, p. 2384-96, Apr 2013.

SHEA, K. M. Antibiotic resistance: what is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health? **Pediatrics**, v. 112, n. 1 Pt 2, p. 253-8, Jul 2003.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 9, p. 407-413, 2009.

SIMOES, M. Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. **Curr Med Chem**, v. 18, n. 14, p. 2129-45, 2011.

SRITHARAN, M.; SRITHARAN, V. Emerging problems in the management of infectious diseases: the biofilms. **Indian J Med Microbiol**, 2004 Jul-Sep;22(3):140-2., ISBN 0255-0857 (Print)0255-0857 (Linking).

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol**, v. 56, p. 187-209, 2002.

SUN, F. et al. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. **Future Microbiol**. v. 8, n. 7, p. 877-886, 2013/07/01 2013.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. Atheneu, 2002. ISBN 9788573791587.

TOMA, H. E. A Nanotecnologia das Moléculas, **Química Nova na Escola**, n. 21, p. 3-9, 2005.

VAN ACKER, H.; VAN DIJCK, P.; COENYE, T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. **Trends in Microbiol**. v. 22, n. 6, p. 326-333, 2014.

WAKIMOTO, N. et al. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative Escherichia coli. **Am J Trop Med Hyg**, v. 71, n. 5, p. 687-90, Nov 2004.

WANG, Y. et al. Design, synthesis and evaluation of clinafloxacin triazole hybrids as a new type of antibacterial and antifungal agents. **Bioorganic & Med Chemistry Letters**, v. 22, n. 17, p. 5363-5366, 2012.

WEISSBRODT, D. G.; NEU, T. R.; KUHLCHE, U.; RAPPAZ, Y.; HOLLIGER, C. Assessment of bacterial biofilms and structural dynamics in aerobic granular. **Front Microbiol**. v. 4, p. 175, 2013.

WELLINGTON, E. M. H. et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 155-165, 2013.

WIDGEROW, A. D. Persistence of the chronic wound – implicating biofilm. In: **Wound Healing Southern Africa**, v. 1, n. 2, p. 05-07, 2008.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 85, n. 1, p. 11-19, 2008.

WRIGHT, G. D.; SUTHERLAND, A. D. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 6, p. 260-267, 2007.

YUN, M. K. et al. Catalysis and sulfa drug resistance in dihydropteroate synthase. **Science**, v. 335, n. 6072, p. 1110-4, 2012.

ZARANZA, A. V.; MORAIS, F. C.; CARMO, M. S.; MARQUES, A. M.; MONTEIRO, C. A.; FERRO, T. F.; MONTEIRO, V.; FIGUEIREDO, P. M. S. Antimicrobial Susceptibility, Biofilm Production and Adhesion to HEp-2 Cells of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Samples, **J of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 4, n. 1, p. 98-106, 2013

ZHOU, G. et al. Effects of nutritional and environmental conditions on plank growth and biofilm formation of *Citrobacter werkmanii* BF-6. **J Microbiol Biotechnol**, v. 23, n. 12, p. 1673-82, 2013.

ANEXOS

ANEXO A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Pesquisa de compostos que atuam sobre biofilmes microbianos

Pesquisador: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 12114713.1.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 203.802

Data da Relatoria: 19/02/2013

Apresentação do Projeto:

A deposição de microrganismos em determinadas superfícies e a consequente formação de biofilmes são fenômenos que ocorrem naturalmente, mas, também, são estratégias desenvolvidas pelos microrganismos para se protegerem de fatores agressivos externos. Os microrganismos, quando em biofilme, tornam-se alvo de preocupação na área clínica devido à baixa resposta aos tratamentos antimicrobianos e à facilidade de colonização de superfícies como próteses, cateteres e instrumentos cirúrgicos. Vários estudos demonstram que antimicrobianos e biocidas têm sua eficácia diminuída frente à biofilmes. Deste modo, este trabalho tem como objetivo principal avaliar a capacidade de inibição da formação de biofilmes de isolados clínicos de cateteres, frente a novos compostos sintetizados e a biocidas frequentemente utilizados no ambiente hospitalar. Para avaliar o grau de inibição da formação do biofilme serão utilizadas microplacas e através da leitura das absorvâncias será possível verificar a atividade dos compostos.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Avaliar a atividade de novos compostos sintetizados e biocidas sobre biofilmes microbianos.

Específicos:

- Determinar, através de disco-difusão, a atividade antimicrobiana dos compostos frente aos microrganismos testados;
- Verificar, através da técnica de microdiluição, as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) dos compostos frente a diferentes microrganismos;

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

Bairro: Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900

UF: RS **Município:** SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



- Determinar, através do ensaio de microtitulação em placa, a Concentração Mínima de Inibição de Biofilme (CMIB);
- Determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracional (FICI) de associações de desinfetantes frente aos biofilmes microbianos;
- Determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracional (FICI) de associações de sulfametoxazol com metais e trimetopim frente aos biofilmes microbianos;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa não trará risco de ordem física ou psicológica, nem benefícios diretos ao paciente, pois estes não serão envolvidos diretamente na pesquisa. Os testes in vitro serão realizados com material já coletado e processado não havendo intervenção dos pesquisadores na coleta e diagnóstico do paciente. Os prontuários também não serão consultados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa será conduzida por pesquisadores com experiência na área. Os resultados esperados terão importância prática e científica. A justificativa é contundente e a revisão bibliográfica adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores solicitaram a dispensa do TCLE, já que os pacientes não serão abordados. Além disso, os prontuários também não serão consultados.

Para os ensaios, será utilizada amostra de conveniência de cerca de 120 isolados clínicos de cateteres coletados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria (LAC-HUSM) no período de 12 meses.

Projeto aprovado pela DEPE.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como o material utilizado será coletado e processado sem que haja intervenção dos pesquisadores na coleta e diagnóstico do paciente, o projeto não precisaria de aprovação deste Comitê.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

Bairro: Cidade Universitária - Camobi

CEP: 97.105-900

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



SANTA MARIA, 23 de Fevereiro de 2013

Assinador por:

Félix Alexandre Antunes Soares
(Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

Bairro: Cidade Universitária - Camobi

CEP: 97.105-900

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resumos Publicados em Congressos.

MIZDAL, C. R. ; FLORES, V. C. ; SIQUEIRA, F. S. ; ROSSI, G. G. ; DALMOLIN, T. V. ; BIANCHINI, B. ; CAMPOS, M. M. A. . Avaliação do complexo sulfametoxazol e prata na inibição do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. In: III Congresso Latino-americano de Resistência Microbiana, 2013, Gramado, RS. III CLRM, 2013.

MIZDAL, C. R. ; FLORES, V. C. ; SIQUEIRA, F. S. ; ROSSI, G. G. ; DALMOLIN, T. V. ; BIANCHINI, B. ; MARQUES, J. B. ; CAMPOS, M. M. A. . Avaliação de um novo composto antimicrobiano na inibição da formação do biofilme bacteriano. In: III Congresso Latino-americano de Resistência Microbiana, 2013, Gramado, RS. III CLRM, 2013.

MIZDAL, C. R. ; FLORES, V. C. ; SIQUEIRA, F. S. ; ROSSI, G. G. ; DALMOLIN, T. V. ; BIANCHINI, B. ; CAMPOS, M. M. A. . Efeito de novos compostos frente à formação do biofilme de *Escherichia coli*. In: III Congresso Latino-americano de Resistência Microbiana, 2013, Gramado, RS. III CLRM, 2013.

MIZDAL, C. R. ; STEFANELLO, S. T. ; CAMPOS, M. M. A. . Avaliação do complexo SMTZ+Ag na inibição da formação do biofilme bacteriano. In: 27^a Jornada Acadêmica Integrada UFSM, 2012, Santa Maria. 27^a JAI, 2012.

MIZDAL, C. R. ; DALMOLIN, T. V. ; BONEZ, P. C. ; AGERTT, V. A. ; MARQUES, J. B. ; CAMPOS, M. M. A. . Atividade antimicobacteriana da associação de derivados de sulfã e trimetoprim.. In: IV Congresso Internacional de Bioanálises, 2011, Novo Hamburgo. IV CIBIO, 2011.

APÊNDICE B – Artigo

Evaluation of novel antimicrobial compounds in the inhibition of *Escherichia coli* biofilm formation

Antimicrobial compounds against the biofilm formation

Authors: Caren R. Mizdal^a, Sílvio T. Stefanello^b, Vanessa A. Agertt^a, Pauline C. Bonez^a, Tanise V. Dalmolin^a, Jaciane B. Marques^a, Bianca V. Bianchini^a, Vanessa C. Flores^a, Lenice L. Marques^b, Gelson N. M. Oliveira^b e Marli M. A. Campos^{a#}.

^a Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil.

^b Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil.

#Corresponding author:

Marli Matiko Anraku de Campos - Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil.

Phone: +55-55-3220-8464. E-mail: marlimatiko@yahoo.com

ABSTRACT

Background: Microorganisms in the form of biofilm represent the predominant type of microbial growth in nature, playing a crucial role in the development of infections and being frequently associated with high levels of resistance to antimicrobial agents. Therefore, the objective of the following research was to evaluate the inhibition capacity of biofilm formation by sulfamethoxazole (SMTZ) when complexed with the metals mercury, copper, cadmium, and silver; and tested on the bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Results: In this study, we were used the Microtiter plates to assess the degree of inhibition in biofilm formation through the reading of absorbance values. The results showed that SMTZ antibacterial was able to inhibit biofilm growth. However, when the SMTZ was combined with mercury (SMTZ-Hg), copper (SMTZ-Cu), cadmium (SMTZ-Cd), and silver (SMTZ-Ag) the inhibition of the biofilm formation occurred at lower concentration than the one with SMTZ.

Conclusion: The results indicated that the tested compounds were significantly active against *Escherichia coli* biofilm formation, being promising also against other bacterial species.

Keywords: Bacterial biofilm; Sulfamethoxazole; Metals, Antimicrobial complexes and Potential drugs.

INTRODUCTION

Biofilms can be defined as complex functional structures, which have a variable distribution of cells and cell aggregates and constitute a protected mode of living for microorganisms (1). Microorganisms in biofilm represent the predominant type of microbial growth in nature and are crucial in the development of infections, being frequently associated with high levels of resistance to antimicrobial agents (2).

Bacterial biofilms can colonize teeth, contact lenses, catheters and artificial heart valves, causing, in addition to serious infections, rejection of prosthetic material (3, 4). Nosocomial infections in patients with venous or urinary catheters are generally preceded by the formation of biofilm on the catheters inner walls, in which cases the fragments released from the biofilm can penetrate the bladder or the bloodstream (5).

The uropathogenic *Escherichia coli* is the most common etiologic agent of urinary tract infections (UTI), aside from being one of the most common causes of bacteremia in hospitalized individuals (6). Due to its ability to form thick biofilm, *E. coli* bacteria have been broadly used in models for studies. According to Peterson et al. (7), its ability to form biofilm is directly related to the availability of nutrients in the medium; the greater the availability, the more evident becomes the biofilm.

The combination of sulfamethoxazole (SMTZ) with metals can result in compounds with potential biological activity, since the interaction of the diverse metal ions with the antimicrobial may occur in different ways, leading to a series of new structures with distinct physical, chemical, and biological properties (8).

In order to prevent bacterial adhesion, detain biofilm formation, and eliminate - or at least reduce - its accumulation, many strategies could be employed. This study used the application of compounds derived from the coordination of ions of copper (Cu), cadmium (Cd), mercury (Hg), and silver (Ag) with SMTZ as an attempt to promote the inhibition of *E. coli* (ATCC 25922) biofilm formation.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

In order to evaluate the inhibition of bacterial biofilm formation, it has been used the strain of *Escherichia coli* (ATCC 25922), inasmuch as it retains the ability to form biofilm (7). The fragility of the polymeric matrix of biofilms was tested by the exposure to complexes derived from interaction of several metal centers with SMTZ antibacterial.

Compounds

The synthesis and the minimum inhibitory concentrations (MICs) of the compounds were determined as previously described (9), as shown in Tables 1 and 2. The compounds tested were [Hg(sulfamethoxazolato)₂].2DMSO (SMTZ-Hg), [Cu(μ-CH₃COO)₄(sulfamethoxazolato)₂] (SMTZ-Cu), [Ag(sulfamethoxazolato)] (SMTZ-Ag), [Cd(sulfamethoxazolato)₂(CH₃OH)₂]_n.x(CH₃OH) (SMTZ-Cd), Hg (CH₃COO)₂ (salt of Hg), Cu (CH₃COO)₂.H₂O (salt of Cu), Cd (CH₃COO)₂.2H₂O (salt of Cd) and AgCl (salt of Ag). These compounds were dissolved in DMSO and diluted in Mueller-Hinton broth.

Inhibition of biofilm formation

The ability of inhibiting biofilm formation was tested in microtiter plates according to the method described (10) with some modifications. The wells were filled with 180 μL of Mueller - Hinton broth and 100 mL of sulfa compounds. Serial dilutions

were performed and 20 μL of bacterial suspension - at 0.5 McFarland - was added. The plates were then incubated at room temperature for 18 hours. After the incubation period, the Mueller-Hinton broth with bacterial growth was aspirated and biofilm formed on the bottom of the well was washed three times with 200 μL of sterile saline. Fixation of biofilm was performed by adding 150 μL of methanol (P.A.) for 20 min. Methanol solution was removed and biofilm was dyed with 150 μL of 0.5% crystal violet solution for 15 min. After this period, the plate was washed with running water to remove excess dye and then dried at room temperature.

In order to allow the reading of the plates, 150 μL of 95% ethanol was added to the dyed button, and after a 30 min period, the absorbance was quantified at 570 nm as previously described (11), using Spectra Max Plate Reader® M2 (Molecular Devices), Sunnyvale, California, USA.

Statistical Analysis

The optical density readings obtained in the biofilm formation assay were expressed in mean \pm standard error. It was used one-way ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test, considering statistical difference when $p < 0.05$. Graph Pad Prism software, version 5.01, was used in order to set the graphics.

RESULTS

SMTZ in the biofilm assay

Fig. 1 showed that the SMTZ is able to reduce the *E. coli* biofilm formation only from the concentration 256 $\mu\text{g/ml}$.

Hg and SMTZ-Hg in the biofilm assay

The complex SMTZ-Hg (Fig. 2A) and the salt of Hg (Fig. 2B) were capable to inhibit the biofilm formation in all concentrations tested. However, the MIC to the SMTZ-Hg is lower than the one found to the salt of Hg.

Cu and SMTZ-Cu in the biofilm assay

The SMTZ-Cu (Fig. 3A) decreased the biofilm formation significantly when compared with the control group from the first concentration tested (16 $\mu\text{g/mL}$). In the same line, the salt of Cu (Fig. 3B) also inhibited the *E. coli* biofilm formation from the concentration 16 $\mu\text{g/mL}$.

Cd and SMTZ-Cd in the biofilm assay

The Fig. 4B presented that the salt of Cd was capable of inhibiting the biofilm formation in all concentrations tested. SMTZ-Cd (Fig. 4A) presented inhibitory effect on the biofilm formation from the concentration 2 $\mu\text{g/mL}$. In this way, it is possible to affirm that the MIC of SMTZ-Cd is lower than the one found to the salt of Cd.

AgCl and SMTZ-Ag in the biofilm assay

The salt of Ag (Fig. 5B) only presented significant results from the concentration 256 $\mu\text{g/mL}$, while that the SMTZ-Ag (Fig. 5A) presented an inhibitory effect on the biofilm formation from the lowest concentration tested (2 $\mu\text{g/mL}$).

DISCUSSION

Biofilms of different microorganisms, including *E. coli*, are usually tolerant to free metal ions, often being favored by them (12). When metal salts of Hg, Cu, Cd, and Ag are in contact with the culture medium, they dissociate causing a decrease in the antibiofilm activity, whereas when coordinated to the SMTZ, they have greater activity against bacterial biofilms. It probably happens, since the metals coordinated with the SMTZ do not dissociate, or dissociate slowly. Many studies have made it clear that cells grown on biofilm express different properties from planktonic cells and the main difference is the increase of microbial resistance against antimicrobial agents commonly used in clinical practice (13).

SMTZ appeared to be less efficient in inhibiting the growth of the biofilm, it was able to inhibit biofilm growth at concentrations of 256 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 1), only one dilution below its MIC, in concentrations below this one, it did not present significant results. Although SMTZ is one of the most used and effective antibiotic for treatment of bacterial infections, it did not show any significant action against the biofilm, Kostenko et al. conducted studies in which SMTZ (free) has not been effective against bacterial biofilms (14).

The complex SMTZ+Hg when compared to SMTZ free and its salt Hg (CH_3COO)₂ antibiofilm presented excellent activity, inhibiting it from the concentration 0:31 / mL (Fig. 2) significantly reduced biofilm formation. It is suggested that it may act by blocking the cellular metabolism inhibiting the action of specific enzymes. Already coordination compound SMTZ + Cu showed activity similar to salt Cu (CH_3COO)₂.H₂O, however, when comparing the free SMTZ, coordination compounds presented significant activity in inhibiting biofilm formation. Rocha et al. describes the fact that in addition to presenting the complex antibacterial activity of SMTZ+Cu, it has good antifungal activity against various strains (15).

Rensing et al. conducted tests to evaluate the effect of metals on the growth of *E. coli* which showed that the bacteria showed sensitive when incubated with the salt of Cd (CH_3COO)₂.2H₂O, corroborating our study where cadmium compounds also proved effective. When tested against the biofilm formation, they showed satisfactory results, being able to inhibit its formation (16). Biofilms like *E. coli* have the capability of bioabsorption, a high affinity in the uptake of metals such as Cd, Cr, and Ni. Lameiras et al. says that this propensity can be directly related to the effectiveness of the complex SMTX+Cd, due to the greater ability to penetrate in the biofilm of the bacterium, SMTX can act on microorganisms surrounded by the biofilm (17). The complex SMTZ+Cd had effect from the concentration of 2 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 4).

Kostenko et al. showed positive results regarding the sensitivity of the biofilm when treated with silver and sulfamethoxazole (14). Corroborating our study where the complex SMTZ+Ag proved to be very effective in inhibiting biofilm formation. In contrast, AgCl was not able to inhibit bacterial biofilm formation at concentrations below the MIC. Inhibition of biofilm formation by the complex SMTZ+Ag was in accordance with the degree of its concentration, there is a proportional increase in biofilm formation as the concentration of SMTZ+Ag was decreased.

According to Kostenko et al., Ag cations constantly released in the middle would act causing damage to the cell membrane and causing death of bacterial DNA into the target cells in the biofilm (14). Since the tolerance of biofilms to metal cations is time dependent (12), we believe that the SMTZ-Ag had better anti-biofilm activity than its salt AgCl due to the fact that this coordinated compound releases more slowly these Ag ions.

Comparing the MICs and the concentrations capable of inhibiting biofilm for coordinated compounds of Hg, Cd, and Ag, it was observed that they were all capable of inhibiting biofilm formation in concentrations lower than their respective minimum inhibitory concentration (MIC). Thus, it was proved that there was a biofilm inhibition and not only growth inhibition, since in concentrations above the MIC micro-organisms would not be feasible for the formation of films.

The success of the coordinated compounds Hg, Cd, and Ag, in the inhibition of the biofilm formation, as shown in this study, is a promising tool for reducing the microbial colonization of surfaces which subsequently lead to infections. Several reasons are suggested for such inhibition. First, the cell attachment is the initial stage to the formation of the biofilm, the complexes may act to create an unfavorable environment for this fixation and consequently the inhibition of biofilm formation. Another explanation could be the fact that the conditioning surface being hindered by the complex as adsorption of substances including nutrients, organic and inorganic molecules, are important for cell growth, which in turn affect these elements, and lack cell adhesion. Therefore, it can be postulated that the treatment with sulphamethoxazole complexes with metals produced an unfavorable biofilm which promotes detachment, thereby reducing adhesion to the surface.

It is also suggested that the increase in antimicrobial activity of compounds coordinated with metal ions is probably due to the presence of a system of donor compounds in the non-coordinated compounds. Such donating groups and electron delocalization within the chelate reduce the polarity of the complexed metal, decreasing the polarity. The process of chelation thus increases the lipophilic character of the central metal atom, which in turn favors the penetration of the compound through the lipid layer of the microorganism cell membrane (18).

CONCLUSION

The coordination of metals to the sulfonamides represents a considerable potential to increase the arsenal of available drugs for the treatment of diseases, since it enhances the action of such antimicrobials. This study encourages further research in order to demonstrate and improve the activity of these complexes as well as make them applicable and safe for clinical practice.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support provided by CAPES, CNPq and *Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas*.

REFERENCES

1. **Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP.** 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**:295-298.
2. **Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Donati ME, Baldassarri L, Montanaro L.** 2003. Occurrence of ica genes for slime synthesis in a collection of *Staphylococcus epidermidis* strains from orthopedic prosthesis infections. *Acta Orthop Scand* **74**:617-621.
3. **Davey ME, O'Toole G A.** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:847-867.

4. **O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R.** 2000. BIOFILM FORMATION AS MICROBIAL DEVELOPMENT. *Annual Review of Microbiology* **54**:49-79.
5. **Morales M, Mendez-Alvarez S, Martin-Lopez JV, Marrero C, Freytes CO.** 2004. Biofilm: the microbial "bunker" for intravascular catheter-related infection. *Support Care Cancer* **12**:701-707.
6. **Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN.** 2004. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis* **50**:59-69.
7. **Peterson RV, Pitt WG.** 2000. The effect of frequency and power density on the ultrasonically-enhanced killing of biofilm-sequestered *Escherichia coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **17**:219-227.
8. **Kesimli B, Topacli A.** 2001. The effects of heating on the molecular structures of Cd and Co complexes of sulfamethoxazole. *Journal of Molecular Structure* **561**:55-59.
9. **Marques LL.** 2007. Síntese, estrutura e avaliação da atividade antimicrobiana de complexos metálicos com sulfametoxazol., Santa Maria.
10. **Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, Ruzicka F.** 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* **115**:891-899.
11. **Wakimoto N, Nishi J, Sheikh J, Nataro JP, Sarantuya J, Iwashita M, Manago K, Tokuda K, Yoshinaga M, Kawano Y.** 2004. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg* **71**:687-690.
12. **Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H.** 2005. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiol* **5**:53.
13. **Mah T-FC, O'Toole GA.** 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology* **9**:34-39.
14. **Kostenko V, Lyczak J, Turner K, Martinuzzi RJ.** 2010. Impact of silver-containing wound dressings on bacterial biofilm viability and susceptibility to antibiotics during prolonged treatment. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:5120-5131.
15. **Rocha DP, Pinto GF, Ruggiero R, Oliveira CA, Guerra W, Fontes APS, Tavares TT, Marzano IM, Pereira-Maia EC.** 2011. Coordenação de metais e antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. *Química Nova* **34**:111-118.
16. **Rensing C, Mitra B, Rosen BP.** 1997. Insertional inactivation of *dsbA* produces sensitivity to cadmium and zinc in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **179**:2769-2771.
17. **Lameiras S, Quintelas C, Tavares T.** 2008. Biosorption of Cr (VI) using a bacterial biofilm supported on granular activated carbon and on zeolite. *Bioresour Technol* **99**:801-806.
18. **Chohan ZH, Shad HA, Yousoufi MH, Ben Hadda T.** 2010. Some new biologically active metal-based sulfonamide. *European Journal of Medicinal Chemistry* **45**:2893-2901.

Tables

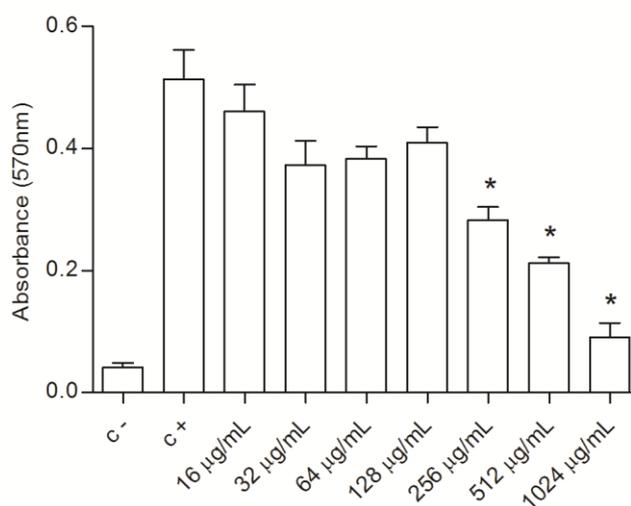
Table 1: MIC of metal-SMTZ complexes in *E. coli*. The values were expressed at $\mu\text{g/mL}$.

Compounds	<i>E. coli</i> ($\mu\text{g/mL}$)
SMTZ	512.0
[Hg(sulfametoxazolato) ₂].2DMSO	2.0
[Cu(μ -CH ₃ COO) ₄ (sulfametoxazolato) ₂]	512.0
[Cd(sulfametoxazolato) ₂ (CH ₃ OH) ₂] _n .x(CH ₃ OH)	16.0
[Ag(sulfametoxazolato)]	64.0

Table 2: MIC of metals (Hg, Cu, Cd and Ag) in *E. coli*. The values were expressed at $\mu\text{g/mL}$.

Compounds	<i>E. coli</i> ($\mu\text{g/mL}$)
Hg (CH ₃ COO) ₂	32.0
Cu (CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O	512.0
Cd (CH ₃ COO) ₂ .2H ₂ O	512.0
AgCl	256.0

Figures and legends

**FIG 1:** Effect of different concentrations of SMTZ in the inhibition of *E. coli* biofilm formation. The results are expressed using the means \pm SE, n=4. * represent a significant difference when compared with the positive control group (c+).

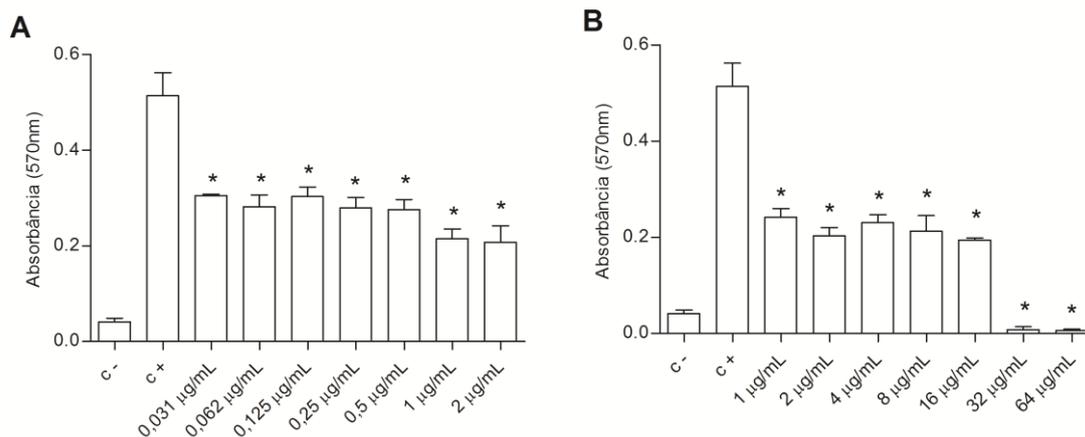


FIG 2: Effect of different concentrations of the SMTZ-Hg complex (A) and the salt of Hg (B) in the inhibition of *E.coli* biofilm formation. The results are expressed using the means \pm SE, n=4. * represent a significant difference when compared with the positive control group (c+).

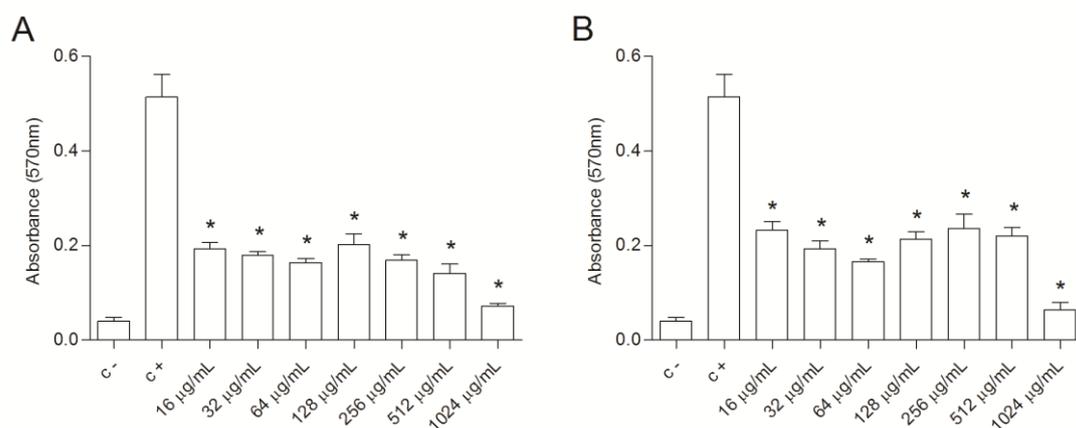


FIG 3: Effect of different concentrations of the SMTZ-Cu complex (A) and the salt of Cu (B) in the inhibition of *E.coli* biofilm formation. The results are expressed using the means \pm SE, n=4. * represent a significant difference when compared with the positive control group (c+).

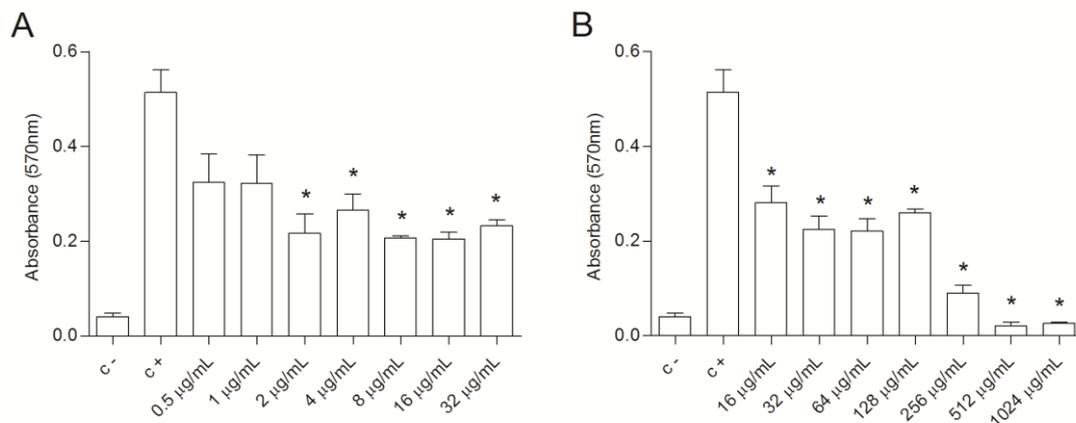


FIG 4: Effect of different concentrations of the SMTZ-Cd complex (A) and the salt of Cd (B) in the inhibition of *E. coli* biofilm formation. The results are expressed using the means \pm SE, n=4. * represent a significant difference when compared with the positive control group (c+).

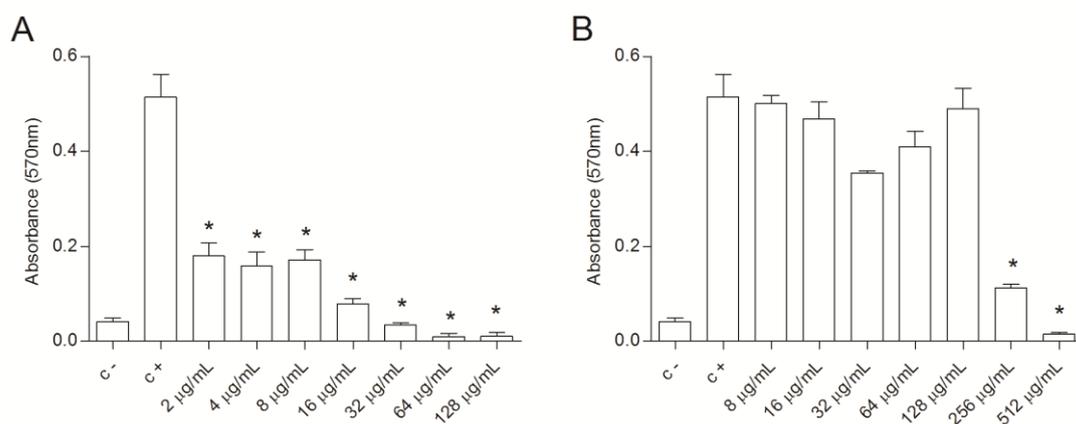


FIG 5: Effect of different concentrations of the SMTZ-Ag complex (A) and the salt of Ag (B) in the inhibition of *E. coli* biofilm formation. The results are expressed using the means \pm SE, n=4. * represent a significant difference when compared with the positive control group (c+).