

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

Fallon dos Santos Siqueira

**ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA, ANTIBIOFILME E  
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *in vitro* DE COMPLEXOS  
METÁLICOS DO SULFAMETOXAZOL**

Santa Maria, RS  
2018

**Fallon dos Santos Siqueira**

**ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA, ANTIBIOFILME E AVALIAÇÃO DA  
TOXICIDADE *in vitro* DE COMPLEXOS METÁLICOS DO SULFAMETOXAZOL**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Marli Matiko Anraku de Campos

Santa Maria, RS  
2018

Siqueira, Fallon dos Santos  
ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA, ANTIBIOFILME E  
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE in vitro DE COMPLEXOS METÁLICOS  
DO SULFAMETOXAZOL / Fallon dos Santos Siqueira.- 2018.  
93 p.; 30 cm

Orientadora: Marli Matiko Anraku de Campos  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2018

1. Micobactéria 2. Biofilmes 3. Resistência 4.  
Compostos Inorgânicos I. Anraku de Campos, Marli Matiko  
II. Título.

**Fallon dos Santos Siqueira**

**ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA, ANTIBIOFILME E AVALIAÇÃO DA  
TOXICIDADE *in vitro* DE COMPLEXOS METÁLICOS DO SULFAMETOXAZOL**

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

**Aprovado em 05 de março de 2018:**

---

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

---

**Alencar Kolinski Machado; Dr. (UNIFRA)**

---

**Natália Brucker; Dra. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2018

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha mãe Ledi e ao meu Pai José, que nunca mediram esforços e sempre batalharam muito para que eu pudesse ter as oportunidades que não tiveram. O filho do caminhoneiro e da vendedora virou mestre! Vocês são meus orgulhos, amo vocês!*

## AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, que jamais me deixaram sozinho e me ensinaram a batalhar por meus objetivos. Vocês são tudo na minha vida, amo vocês!
- A minha irmã, amiga e companheira Bruna, que desde 2004 iluminou minha vida e, apesar da distância e da saudade, sempre esteve presente em todos os momentos, me apoiando e mostrando que além de laços de sangue temos laços de alma. Obrigado irmã, te amo!
- A Janete, que desde o início de minha jornada em Santa Maria me aceitou como membro da sua família, sempre me amparou e nunca mediu esforços para me apoiar e me aconselhar. Obrigado por me ensinar que “tudo passa” e “nada é por acaso”.
- A minha orientadora e amiga, Prof<sup>a</sup> Marli, que confiou em mim e no meu trabalho, que sempre me deu oportunidades e que nunca pensou duas vezes antes de estender sua mão. Obrigado pelas oportunidades, pela confiança e pela amizade. Sempre estarei seguindo-a!
- A Vanessa Flores, por ter sido minha mãe-científica e ter me ajudado em todos os momentos da minha trajetória acadêmica. Muito obrigado, tu és meu exemplo!
- A Camila F., que foi minha parceira e amiga fiel e foi essencial para que eu conseguisse realizar esse trabalho. Obrigado por ser minha dupla.
- Aos amigos do Laboratório de Micobacteriologia pela amizade e companheirismo sempre.
- Aos amigos do Banco de Sangue do HUSM, que sempre estão presentes em minha vida.
- Aos amigos do Dep. de Análises Clínicas e Toxicológicas, que me auxiliaram e foram solidários nesta etapa de minha formação.
- A Amanda e a Carol, por tudo que são e serão em minha vida. Obrigado, eu amo vocês.
- A Victória, que sempre esteve ao meu lado nos melhores e piores momentos e que sei que sempre estará. Obrigado por tudo, estarei sempre contigo!
- A Ani e a Olga, que tornaram os meus dias mais leves e formaram, juntamente comigo, com a Vicky e com o Renne, essa família de coração que quero sempre por perto. Obrigado por cada momento que passamos juntos, vocês são especiais e sempre serão. Amo vocês!
- Ao Renne, meu melhor amigo e companheiro, que está ao meu lado em todos os momentos e que me faz mais forte. Obrigado por estar comigo em cada etapa da minha vida. Sempre estarei ao teu lado!
- A Claudia, ao Manoel e a Camila, que abriram seu lar e sua família para que eu entrasse. Obrigado por tudo que fazem por mim e por todo o carinho. Vocês moram em meu coração!
- A Camille, que chegou na minha vida e permaneceu para mostrar que o importante é ser amigo e não estar amigo. Obrigado por estar ao meu lado. Te amo!
- A Jaque, Dai, Carmen e Hellen, que me fazem sorrir e que fazem de nossa amizade um refúgio de tudo que não nos faça bem. Vocês são extremamente importantes na minha vida. Obrigado por eternizarem essa amizade e por sempre estarmos juntos. Amo vocês.
- Ao Alencar, pela amizade, pelo auxílio imenso na realização desse trabalho e pelo exemplo profissional que se tornou para mim. Muito obrigado por tudo, sempre podés contar comigo!
- Aos colaboradores desse trabalho, amigos do Laboratório de Materiais Inorgânicos e Laboratório de Cultura Celular, em especial a Prof<sup>a</sup> Michele e a Josi. Muito obrigado!
- Aos meus gatinhos Luffy e Toni, companheiros fiéis, que amo e sempre me fazem companhia nos momentos felizes e tristes.

*“A mulher não volta pra cozinha, nem o negro pra senzala, nem o gay pro armário. O choro é livre (e nós também)”.*

*Pitty*

## RESUMO

### ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA, ANTIBIOFILME E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *in vitro* DE COMPLEXOS METÁLICOS DO SULFAMETOXAZOL

AUTOR: Fallon dos Santos Siqueira  
ORIENTADORA: Marli Matiko Anraku de Campos

Micobactérias de crescimento rápido (MCR) são microrganismos oportunistas, encontrados no ambiente, que podem causar infecções locais e disseminadas. As MCR podem formar comunidades estruturadas, que aderem a superfícies bióticas ou abióticas sólidas, caracterizando um de seus mais poderosos mecanismos de sobrevivência, os biofilmes. Os biofilmes são considerados fontes importantes de infecções em superfícies biomédicas e a maioria das infecções envolvendo formação de biofilmes estão associadas a implantes de dispositivos médicos, como cateteres e próteses. Portanto, existe uma necessidade urgente de novos compostos antimicrobianos que possam combater a resistência microbiana associada à formação de biofilmes de MCR. Nos últimos anos, a coordenação de metais a antimicrobianos clássicos vem demonstrando excelente atividade contra uma variedade de microrganismos na forma planctônica. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar, pela primeira vez, a atividade antibiofilme do sulfametoxazol complexado com Au, Cd, Cu, Ni e Hg frente a *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841), *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898) e seis isolados clínicos de MCR, bem como avaliar a segurança desses novos compostos através de ensaios citotóxicos. Diferentes perfis de suscetibilidade a fármacos utilizados na clínica e a novos compostos foram determinados em nosso estudo e os resultados demonstraram que os derivados do sulfametoxazol complexados com metais apresentaram, na grande maioria dos casos, atividade superior à do sulfametoxazol livre e outras drogas na inibição do crescimento de MCR. Todos os resultados demonstram a potencialização da atividade dos novos compostos na inibição da formação e destruição de biofilmes de MCR. Destacou-se a atividade antibiofilme do sulfametoxazol complexado com ouro, que foi capaz de inibir completamente a formação de biofilme. Além disso, este composto teve a capacidade de destruir o biofilme em todas as concentrações testadas. Todos os dados citotóxicos são sugestivos de que a maioria dos derivados metálicos do sulfametoxazol são alternativas antimicrobianas, bem como moléculas seguras que podem ser utilizadas como possíveis agentes terapêuticos para a eliminação de bactérias e biofilmes.

**Palavras-chave:** Micobactéria; Biofilmes; Resistência; Compostos Inorgânicos.



## ABSTRACT

### ANTIMICOBACTERIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITIES AND EVALUATION OF *in vitro* TOXICITY OF SULFAMETHOXAZOLE METALLIC COMPLEXES

AUTHOR: Fallon dos Santos Siqueira  
ADVISOR: Marli Matiko Anraku de Campos

Rapidly growing mycobacteria (RGM) are opportunistic microorganisms, found in the environment, that can cause both local and disseminated infections. RGM can form structured communities that adhere to solid biotic or abiotic surfaces, characterizing one of their most powerful survival mechanisms, biofilms. Biofilms are considered important sources of infections on biomedical surfaces, and most infections involving biofilm formation are associated with medical device implants such as catheters and prostheses. Therefore, there is an urgent need for new antimicrobial compounds that can combat microbial resistance associated with the formation of RGM biofilms. In recent years, the coordination of metals to classic antimicrobials have shown excellent activity against a variety of microorganisms in planktonic form. In this context, this work aimed to evaluate, for the first time, the antibiofilm action of sulfamethoxazole complexed with Au, Cd, Cu, Ni and Hg on *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841), *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898) and six clinical isolates of RGM, as well as to evaluate their safe through cytotoxic assays. Different profiles of susceptibility to drugs used in the clinic and to new compounds were determined in our study and in our results it was demonstrated that sulfamethoxazole derivatives complexed with metals showed, in the great majority of cases, activity superior to that of free sulfamethoxazole and other drugs in inhibiting the growth of RGM. The results demonstrate potentiation of the novel compounds in inhibiting the formation and destruction of biofilms of RGM. The antibiofilm activity of gold-complexed sulfamethoxazole, which was able to completely inhibit biofilm formation, is clearly pronounced. In addition, this compound had the capacity to destroy the biofilm at all concentrations tested. All cytotoxic data are suggestive that the majority of sulfamethoxazole metallic derivatives are antimicrobial alternatives as well as safe molecules which could be used as potential therapeutic agents for bacterial and biofilm elimination.

**Key words:** Mycobacteria; Biofilms; Resistance; Inorganic compounds.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1 – Parede celular dos microrganismos pertencentes ao gênero <i>Mycobacterium</i> ..	16
Figura 2 – Infecção pós-operatória causada por <i>M. fortuitum</i> .....	23
Figura 3 – Diagnóstico laboratorial das micobacterioses.....	24
Figura 4 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilme.....	28
Figura 5 – Processos envolvidos na formação de biofilmes.....	29
Figura 6 – Principais alvos para combate aos biofilmes microbianos.....	33
Figura 7 – Biossíntese do Ácido tetra-hidro-fólico.....	34
Figura 8 – Parede celular micobacteriana e seus determinantes de resistência.....	36
Figura 9 – Estrutura molecular do sulfametoxazol e de complexos metálicos.....	39

### MANUSCRITO

Figure 1 – Effect of different concentrations of Compounds on the inhibition of the biofilm from <i>Mycobacterium abscessus</i> .....	69
Figure 2 – Effect of different concentrations of Compounds on the inhibition of the biofilm from <i>Mycobacterium massiliense</i> .....	70
Figure 3 – Effect of different concentrations of Compounds on the inhibition of the biofilm from <i>Mycobacterium fortuitum</i> .....	71
Figure 4 – Effect of different concentrations of Compounds on the destruction of the biofilm from <i>Mycobacterium abscessus</i> .....	72
Figure 5 – Effect of different concentrations of Compounds on the destruction of the biofilm from <i>Mycobacterium massiliense</i> .....	73
Figure 6 – Effect of different concentrations of Compounds on the destruction of the biofilm from <i>Mycobacterium fortuitum</i> .....	74
Figure 7 – Effect of different concentrations of Sulfamethoxazole and [Au (sulfamethoxazolate)(PPh <sub>3</sub> ) on the inhibition and destruction of the biofilm from Clinical Isolate number I.....	75
Figure 8 – Effect of different concentrations of Sulfamethoxazole and [Au (sulfamethoxazolate)(PPh <sub>3</sub> ) on the inhibition and destruction of the biofilm from Clinical Isolate number II.....	76
Figure 9 – Effect of different concentrations of Sulfamethoxazole and [Au (sulfamethoxazolate)(PPh <sub>3</sub> ) on the inhibition and destruction of the biofilm from Clinical Isolate number IV.....	77
Figure 10 – PCR and PRA patterns of clinical isolates of mycobacteria after digestion with <i>BstEII</i> and <i>HaeIII</i> .....	78
Figure 11 – MTT assay with 24 hours incubation. Results expressed as percentage of the negative control (100%).....	78
Figure 12 – Free dsDNA quantification amount after treatments. Results expressed as percentage of the negative control (100%).....	79
Figure 13 – Total levels quantified of ROS after treatments. Results expressed as percentage of the negative control (100%).....	80
Figure 14 – Total levels quantified of ON after treatments. Results expressed as percentage of the negative control (100%).....	81

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Agentes mais frequentes de acordo com a população e manifestação da doença.....	18
Tabela 2 – Classificação das micobactérias de importância clínica.....	19
Tabela 3 – Distribuição dos casos notificados de infecções por MCR associadas a procedimentos invasivos, segundo o tipo de procedimento realizado no Brasil referente ao período de 1998 – 2009.....	21

### MANUSCRITO

Table 1 – Breakpoints for the rapidly growing mycobacteria.....	67
Table 2 – Standard susceptibility <i>in vitro</i> of <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i> .....	67
Table 3 – Susceptibility <i>in vitro</i> of clinical isolates of rapidly growing mycobacteria.....	67
Table 4 – Values of the minimum inhibitory concentration for the standard strains of rapidly growing mycobacteria.....	68
Table 5 – Values of the minimum inhibitory concentration for the clinical isolates of rapidly growing mycobacteria.....	68
Table 6 – Molecular weight values of the restriction patterns generated by PRA of clinical isolates.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS	American Thoracic Society
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AAR	Álcool-ácido resitência
CIM/MIC	Concentração inibitória mínima/Minimum Inhibitory Concentration
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMTB	Complexo <i>M. Tuberculosis</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
LJ	Lowenstein – Jensen
LMI	Laboratório de Materiais Inorgânicos
MAC	Complexo <i>M. Avium</i>
MCR/RGM	Micobactérias de crescimento rápido/rapidly Growing Mycobacteria
MNT/NTM	Micobactérias não tuberculosas/Nontuberculous Mycobacterial
NO	Nitric oxide
PABA	Ácido para-amino-benzóico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase/Polymerase Chain Reaction
<i>PRA-hsp65</i>	Análise de restrição enzimática do gene <i>hsp65</i>
QS	Quorum sensing
RS	Rio Grande do Sul
ROS	Reactive oxygen species
SPE	Substâncias poliméricas extracelulares
TB	Tuberculose
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
PBMCs	Mononuclear Peripheral Blood Cells/Células Mononucleadas do Sangue Periférico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
IC	Isolados Clínicos

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	14
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 GÊNERO <i>Mycobacterium</i> .....	15
1.2 MICOBATÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS.....	17
1.3 MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO.....	20
1.4 DIAGNÓSTICO DAS MICOBACTERIOSES.....	22
1.4.1 Análise de restrição enzimática do gene <i>hsp65</i> .....	25
1.5 TRATAMENTO DAS MICOBACTERIOSES.....	26
1.6 BIOFILMES.....	27
1.6.1 Estrutura e Formação.....	27
1.6.2 Patogênese e Resistência microbiana associada a formação de biofilmes.....	30
1.6.3 Combate e Abordagem Terapêutica Contra Biofilmes.....	32
1.7 SULFONAMIDAS E SULFAMETOXAZOL.....	33
1.8 COORDENAÇÃO DE METAIS A ANTIBIÓTICOS COMO UMA ESTRATÉGIA DE COMBATE À RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	37
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	40
2.1 OBJETIVO GERAL .....	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS</b> .....	41
3.1 Manuscrito.....	41
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	82
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	84

## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação está redigida contendo as seções **INTRODUÇÃO**, **OBJETIVOS**, **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA** e **CONCLUSÃO**. A seção **INTRODUÇÃO** contém na sua estrutura uma revisão bibliográfica a fim de contextualizar o presente trabalho e apresentar conteúdo suficiente para o entendimento e compreensão da importância desta dissertação e dos resultados obtidos. Os Materiais e Métodos utilizados, bem como os Resultados, a Discussão e as referências utilizadas encontram-se na seção **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA**, referente a um manuscrito que representa a íntegra deste estudo. O item **CONCLUSÃO** apresenta interpretações e comentários gerais sobre o conteúdo obtido a partir deste trabalho. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às utilizadas no item **INTRODUÇÃO**. Em anexo ao conteúdo da dissertação é possível encontrar o parecer de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e o comprovante de submissão do manuscrito.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 GÊNERO *Mycobacterium*

Paralelamente ao descobrimento da microbiologia clínica surgia o estudo das micobactérias. No ano de 1873 o médico Norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen identificou o primeiro agente etiológico de doença humana, que mais tarde receberia o nome de *Mycobacterium leprae*, agente etiológico da hanseníase. 9 anos após essa descoberta que revolucionava o estudo das infecções humanas por bactérias, Robert Koch apresentou ao mundo o agente etiológico responsável pelo maior número de infecções decorrentes de micobactérias até hoje, o bastonete da tuberculose (TB), denominado *Mycobacterium tuberculosis* (MACEDO et al., 2009).

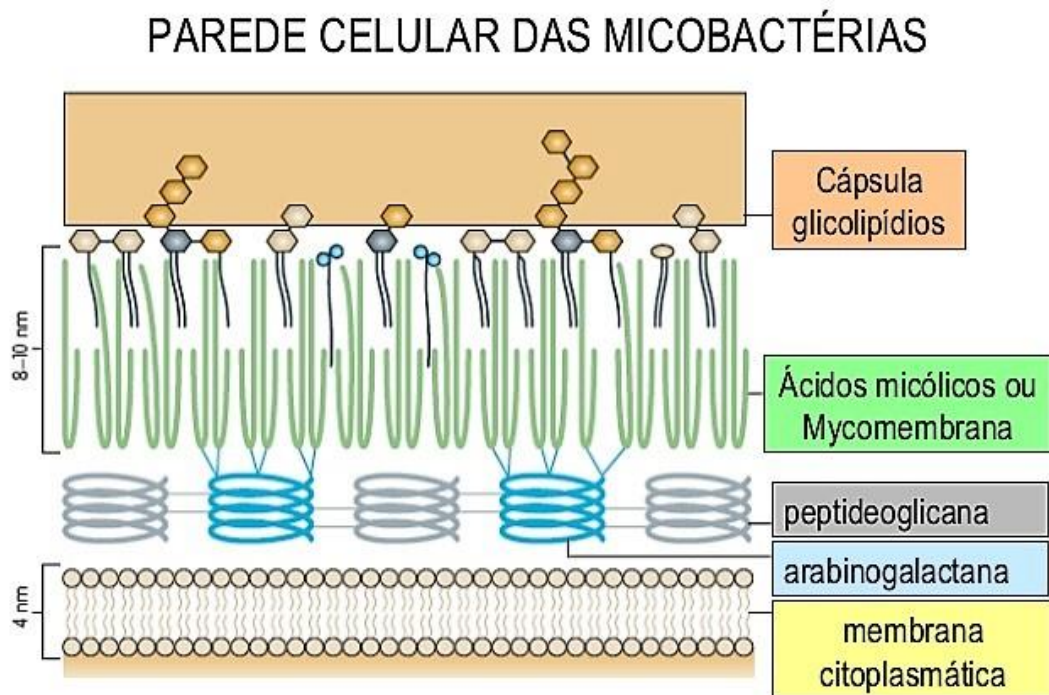
Em 1896 Lehmann e Neumann, visando à inclusão dos bacilos da TB e da hanseníase, propuseram pela primeira vez o gênero *Mycobacterium*, único inserido na família Mycobacteriaceae, pertencente à ordem Actinomycetales e classe Actinobacteria. Inicialmente, neste gênero foram incluídas as espécies *M. tuberculosis* e *M. leprae* e até o ano de 1938 apenas essas espécies constituíam o gênero e eram reconhecidas como patógenos humanos. Foi nesse ano então que da Costa e Cruz (1938) descreveram e nomearam a espécie *M. fortuitum*, uma nova espécie de micobactéria, isolada no Brasil, de um abscesso pós-inoculação (Leão et al., 2004). Desde então, com o aprimoramento das técnicas de identificação e com o avanço progressivo dos métodos moleculares, até o momento, são reconhecidas oficialmente dentro do gênero 175 espécies e 13 subespécies (EUZÉBY, 2018).

O gênero *Mycobacterium* apresenta propriedade de álcool ácido resistência (AAR) que pode ser identificada pela coloração de Ziehl-Neelsen (SHINNICK; GOOD, 1994). As micobactérias são bacilos aeróbicos que não formam esporos e apresentam uma morfologia reta ou ligeiramente curva, medindo de 0,2 a 0,4 µm de largura e 1 a 10 µm de comprimento. Apresentam uma temperatura ótima de crescimento que pode diferenciar de acordo com a espécie entre 30°C e 45°C, bem como uma variação de pH suportada entre 6 e 8 (SILVA, 2013; CARDOSO, 2009).

Os microrganismos desse gênero apresentam uma parede celular composta de quatro camadas bem delimitadas de uma superfície cérea, sendo a mais interna de peptidoglicano, que confere rigidez a parede micobacteriana. A segunda camada é composta de arabinoglicano que, a partir de ligações covalentes, está ligado ao peptidoglicano. A camada seguinte é formada por grande quantidade de um componente presente apenas em bactérias do

gênero *Mycobacterium*, os ácidos micólicos, que são constituídos de meromicolatos e cadeias  $\alpha$ -curtas, proporcionando as micobactérias resistência a descoloração por álcool-ácido (CARDOSO, 2009; HINRICHSEN et al., 2007). A camada mais externa contém uma grande variedade de lipídeos, incluindo glicolipídeos, sulfolipídeos, fenolglicolipídeos, peptideoglicolipídeos e lipoarabinomanano. Essa complexidade de lipídeos constituintes confere a esses microrganismos uma grande resistência à água, dessecação, a drogas antimicrobianas e a desinfetantes químicos (JOHNSON; ODELL, 2014). A representação da constituição da parede celular das micobactérias pode ser observada da figura 1.

Figura 1 – Representação da constituição da parede celular dos microrganismos pertencentes ao gênero *Mycobacterium*.



Fonte: Adaptado de Abdallah et al. (2007).

De forma geral, as micobactérias dividem-se em Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), composto por *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis*-BCG, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*, Micobactérias não tuberculosas (MNT) e *M. leprae* (GRIFFITH et al., 2007).



## 1.2 MICOBATÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

São consideradas MNT todas aquelas que não pertencem ao CMTB e não sejam *Mycobacterium leprae*, tendo sido identificadas mais de 140 espécies de MNT, das quais 50 espécies foram identificadas como patógenos oportunistas em humanos (KIM et al., 2013).

As MNT apresentam uma patogenicidade variável e são oriundas do ambiente, as infecções causadas por esse grupo de micobactérias não são contagiosas e ocorrem de forma oportunista (KING et al., 2017). Suas fontes incluem desde reservatórios como água, solos, animais e produtos lácteos até equipamentos médicos como endoscópio e soluções cirúrgicas (KING et al., 2017; MARINHO et al., 2008; WU et al., 2009). As MNT são agentes que toleram altas temperaturas e resistem a métodos padrões de descontaminação, apresentam resistência ao cloro e demais desinfetantes utilizados para tratar a água e dessa forma, a partir do abastecimento público, tornam-se fontes de contaminação, sendo capazes de colonizar hospitais, fábricas e áreas residenciais (ATS, 2010).

O corpo humano é colonizado por MNT na forma saprófita de vida e podem ser isoladas a partir da pele, ouvido externo, narinas, orofaringe, gengivas, vagina, genitália externa masculina e feminina, saliva, fezes, urina e escarro (MELLO et al., 2013). São responsáveis por doença pulmonar, doença cavitária fibronodular, doença nodular bronquiectásica, pneumonite de hipersensibilidade, linfadenite micobacteriana, doença cutânea, óssea e dos tecidos moles e doença disseminada, principalmente em casos avançados de imunodeficiência (GUNDAVDA et al., 2017).

Após a inoculação no organismo, as micobactérias sofrem fagocitose por parte dos macrófagos. Uma vez no meio intracelular, as micobactérias levam à produção de IL-12 por parte destes. A IL-12 estimula a secreção de IFN- $\gamma$  que promove a ativação dos neutrófilos e macrófagos com a produção de TNF- $\alpha$  e consequente morte de patógenos intracelulares, onde estão incluídas as micobactérias. Defeitos na imunidade humoral (produção de IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e seus receptores) e na imunidade celular – essencial para o controle de patógenos intracelulares, predispõem para a doença disseminada por MNT (ANTUNES et al., 2012).

Os pacientes acometidos por infecções provenientes desses patógenos oportunistas geralmente já apresentam doenças pulmonares como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), bronquiectasia, sequelas de TB pulmonar prévia e fibrose cística, são pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), com terapia imunossupressora ou

diabetes (MERTANIASIH et al., 2017). As infecções em indivíduos imunocompetentes geralmente são secundárias à inoculação direta, causadas após contaminação por procedimentos cirúrgicos ou lesões pré-existentes (GUNDAVDA et al., 2017). Pode-se observar na Tabela 1 uma relação das principais manifestações clínicas das micobacterioses com a população alvo e o agente etiológico.

Tabela 1 - Agentes mais frequentes de acordo com a população e manifestação da doença.

<b>População alvo</b>	<b>Apresentação Clínica</b>	<b>Principal agente etiológico</b>
Sexo masculino, 4ª - 5ª década de vida, alcoolismo, tabagismo, DPOC	Doença cavitária fibronodular	MAC; <i>M. kansasii</i> ; <i>M. malmoense</i>
Sexo feminino, cifoscoliose, <i>pocstum excavatum</i> , hiper mobilidade articular, prolapso mitral	Doença nodular bronquiectásica	MAC; <i>M. abscessus</i> ; <i>M. kansasii</i>
Jovens, não fumantes, frequência de spas, termas e piscinas aquecidas	Pneumonite de hipersensibilidade <i>like</i>	MAC
Crianças e adultos infectados pelo HIV	Linfadenite	<i>M. avium</i> ; <i>M. scrofulaceum</i> ; <i>M. malmoense</i> ; <i>M. haemophilum</i>
Soluções de continuidade, infecção nosocomial de feridas cirúrgicas, locais de inserção de drenos e cateteres de longa duração	Doenças cutâneas, ósseas ou de tecidos moles	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> ; <i>M. marinum</i> ; <i>M. ulcerans</i>
Infecção por HIV estágio 3	Doença disseminada	<i>M. avium</i> ; <i>M. Kansasii</i>

Fonte: Adaptado de ANTUNES et al. (2012).

As MNT foram classificadas em 1959 por Runyon de acordo com o tempo do seu crescimento, a semelhança de suas características morfológicas e a capacidade de produzir pigmentos após a presença ou ausência de luz (Tabela 2). A partir desse estudo, os grupos foram denominados I, II, III e IV. Os grupos I, II e III são as espécies de crescimento lento, que levam mais de 7 dias para crescer, e o grupo IV constitui as espécies de crescimento rápido, que se desenvolvem em tempo inferior a 7 dias (MOTA, 2011).

Em relação a produção de pigmento, as espécies de crescimento lento diferenciam-se entre si nos três primeiros grupos. O grupo I (fotocromogênicas) produz pigmento apenas quando exposto à luz; O grupo II (escotocromogênicas) produz pigmento independente da presença ou ausência de luz; O grupo III (não cromogênicas) nunca produzem pigmentos na ausência de luz e podem pigmentar-se de amarelo ou rosa quando expostos a luz (FLORES, 2014).

Tabela 2 - Classificação das micobactérias de importância clínica, conforme Runyon (1959).

Grupos	Espécies	Tempo de crescimento	Produção de Pigmento
Grupo I	<i>M. kansasii</i> <i>M. simiae</i> <i>M. asiaticum</i>	Lento	Fotocromogênicas
Grupo II	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. flavescens</i>	Lento	Escotocromogênicas
Grupo III	Complexo <i>M. avium</i> <i>M. malmoeense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. terrae</i> <i>M. ulcerans</i>	Lento	Não-cromogênicas
Grupo IV	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. massiliense</i>	Rápido	-

Fonte: Adaptado de Agertt (2016).

Essa classificação ainda fundamentada no proposto por Runyon é baseada sobretudo em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das micobactérias. Porém, com a evolução das técnicas de análise, a classificação consolidou-se com o descobrimento de evidências antigênicas e informações genômicas obtidas através da utilização da biologia molecular (LIMA, 2014).

### 1.3 MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO

Os representantes das MCR são espécies saprófitas encontradas em fontes ambientais como solo e água, incluindo água potável, biofilmes em tubulações de sistemas de distribuição de água, piscina, esgoto, superfícies e outros (PITOMBO et al., 2009). Continuam a emergir como importantes patógenos humanos que podem causar uma variedade de doenças cutâneas localizadas até doença disseminada. São patógenos oportunistas que, frequentemente, vem sendo relacionados a infecções pós-operatórias cardiotorácicas, oftalmológicas, ortopédicas, pediátricas e laparoscópicas. No campo da cirurgia estética, vem crescendo exponencialmente os casos de infecções por MCR, principalmente em procedimentos de lipoaspiração e mastoplastia de aumento (ANVISA, 2009; BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002).

As MCR compreendem as espécies que constituem o Complexo *Mycobacterium fortuitum* que inclui: *M. fortuitum*, *Mycobacterium peregrinum*, variantes de *M. fortuitum* (*M. houstonense*, *M. bonickei*, *M. septicum*, *M. mageritense*, *M. mucogenicum* e *M. senegalense*); micobactérias do Complexo *Mycobacterium chelonae-abscessus*, composto pelas espécies *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. bolletii*, *M. immunogenum*, *Mycobacterium massiliense*; e aquelas que compõem o Complexo *Mycobacterium smegmatis*, cujos componentes são *M. smegmatis*, *M. goodii* e *M. wolinskyi*; outras espécies de MCR não classificadas em complexos como, por exemplo, *M. aurum*, *M. elephantis*, *M. flavescens*, *M. gadium*, *M. gilvum*, *M. neoaurum*, *M. parafortuitum*, *M. phlei*, *M. phocaium*, *M. thermoresistibile*, *M. vaccae* e outras (AGERTT, 2016; WITEBSKY; CONVILLE, 2005).

Existe um aumento considerável de infecções causadas por MCR no mundo (VARGHESE et al., 2017). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) monitora a ocorrência de infecções pós-cirúrgicas por MCR em diferentes regiões do país, de forma permanente. As infecções por MCR estão fortemente relacionadas às falhas nos processos de limpeza, desinfecção e esterilização de produtos médicos. Na maioria dos serviços de saúde investigados, os instrumentais cirúrgicos foram submetidos somente ao processo de desinfecção e não ao processo de esterilização como é definido pela Resolução da Anvisa - RE nº. 2606/06. Também foi detectada a precariedade no funcionamento dos Centros de Material e Esterilização dos serviços, já que estes não possuem registros e validação dos processos de limpeza, desinfecção e esterilização dos instrumentais cirúrgicos (ANVISA, 2008).

No Relatório de investigação de casos de Infecções por MCR no Brasil referente ao período de 1998 a 2009, publicado pela ANVISA, foram descritas 2.520 notificações. Os casos notificados ocorreram em 23 Estados do país, sendo que dez estados concentraram 97,8% dos casos. A distribuição dos casos notificados de infecção por MCR associadas a procedimentos invasivos, segundo o tipo de procedimento realizado, pode ser visualizado na tabela 3. Verificou-se que as espécies mais incidentes foram as espécies *M. abscessus* (31,3%), *M. abscessus* subsp. *bolletii* (30,4%); *M. fortuitum* (13,8%; n= 117) e *M. chelonae* (1,5%; n= 13). Outras espécies corresponderam a 2,7% dos casos (ANVISA, 2011).

Tabela 3 – Distribuição dos casos notificados de infecções por MCR associadas a procedimentos invasivos, segundo o tipo de procedimento realizado no Brasil referente ao período de 1998 – 2009.

<b>Tipo de Procedimento</b>	<b>Número de casos</b>	<b>%</b>
Abdominal	1.492	59,2%
Mama	174	6,9%
Pélvica	167	6,6%
Invasivo não cirúrgico	135	5,4%
Ortopédica	117	4,6%
Urológica	60	2,4%
Lipoaspiração	31	1,2%
Facial	15	0,6%
Abdominal + mama + lipoaspiração	13	0,5%
Mama + lipoaspiração	13	0,5%
Torácica	11	0,4%
Obstétrica	6	0,2%
Abdominal + lipoaspiração	6	0,2%
Abdominal + mama	6	0,2%
Neurológica	1	0,0%
Oftalmológica	1	0,0%
Procedimento não invasivo	1	0,0%
Sem informação	270	10,7%
<b>Total</b>	<b>2.520</b>	<b>100,0%</b>

Fonte: ANVISA (2011).

Diversos surtos envolvendo MCR foram relatados na literatura nos últimos anos no Brasil. Na cidade de Campinas, no estado de São Paulo, 33 pacientes tiveram as espécies *M. fortuitum* e *M. porcinum* isoladas de próteses mamárias após serem submetidas a mastoplastia de aumento no ano de 2004 (Figura 2). No mesmo ano, em Belém do Pará, eclodiu um grande número de infecções pós-operatórias por *M. abscessus* e *M. massiliense* em diferentes serviços

de saúde. O surto foi controlado com a adoção de cuidados específicos como a limpeza, a desinfecção e a esterilização de todas as partes dos equipamentos considerados críticos, ou seja, artigos que penetram tecidos estéreis ou o sistema vascular, utilizados em vídeolaparoscopia, artroscopia, cistoscopia e outras "escopias" cirúrgicas (PADOVEZE et al., 2007; VIANA-NIERI et al., 2008).

Figura 2 – Infecção pós-cirúrgica causada por *M. fortuitum*. A: Paciente, com 20 semanas de pós-operatório de mastoplastia de aumento, apresentando drenagem de secreção serosa pela ferida operatória, cuja cultura do material coletado demonstrou a presença de *M. fortuitum*. B: Ressonância magnética da mama, demonstrando área de intenso processo inflamatório entre a ferida operatória inframamária e a prótese de silicone. C: Prótese mamária retirada, observando-se tecido de granulação fortemente aderido à prótese de silicone.



Fonte: Adaptado de Padoveze et al. (2007).

Um surto na região metropolitana do Rio de Janeiro, no ano de 2006, notificou 699 casos de infecções por MCR, principalmente por *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum*. Nos anos seguintes, um novo surto no Rio de Janeiro confirmou 148 isolados de *M. massiliense* tolerantes ao glutaraldeído 2% (GARCIA, 2007). Em 2007, *M. massiliense* foi responsável por um surto de infecção nos hospitais de Vitória, no Espírito Santo. 248 casos foram notificados, sendo que todos os pacientes tinham sido submetidos a operações em onze serviços privados de saúde. Sete hospitais e uma clínica da Grande Vitória receberam punições pelo descumprimento de normas consideradas importantes na prevenção das infecções envolvendo quebra de protocolos nos processos de limpeza e esterilização (MACEDO et al., 2009).

Baseado na gravidade da situação que se refletia em quase todo o país, a partir de notas técnicas a Anvisa solicitou especial atenção à avaliação dos processos de limpeza, desinfecção e esterilização de materiais médico-cirúrgicos, a capacitação de funcionários, supervisão e

manutenção preventiva de equipamentos, bem como a utilização de outros métodos de desinfecção devido à resistência de *M. massiliense* a glutaraldeído 2% (ANVISA, 2008).

Infecções por MCR, principalmente *M. fortuitum* e *M. chelonae*, relacionadas a cateteres de acesso venoso vem sendo relatadas com a mesma frequência que infecções envolvendo diálise intraperitoneal e intravascular de terapia de substituição renal. No caso de infecções a partir de cateteres venosos, a contaminação é decorrente da imunossupressão do paciente e da duração da colocação do cateter. Nas situações de diálise, a infecção pode envolver o local de inserção do cateter, o aparelho de encapsulamento ou o próprio peritônio (SOTO, 2013; DE GROOTE; HUITT, 2006).

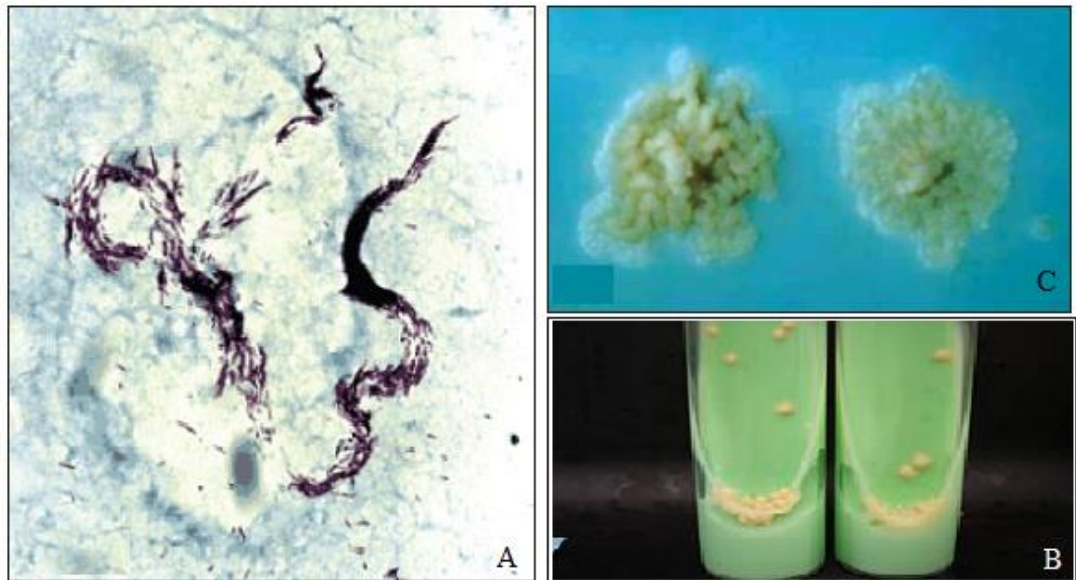
A infecção pulmonar geralmente está associada a doença pulmonar prévia, como TB ou fibrose cística e a dificuldade de eliminação desses microrganismos, podendo variar em relação aos sintomas da infecção, sendo ela assintomática ou manifestando-se até como doença pulmonar cavitária com significativa morbidade e mortalidade (DE GROOTE et al., 2014).

De modo geral, infecções decorrentes de MCR podem ser observadas a partir de diferentes situações, envolvendo doença pulmonar crônica, infecções cutâneas pós-cirúrgicas, feridas, geralmente relacionada aos equipamentos médicos contaminados, soluções e reagentes de laboratório, podendo ou não estar associada a formação de biofilmes (MONEGO et al., 2011).

#### 1.4 DIAGNÓSTICO DAS MICOBACTERIOSES

A suspeita inicial de uma micobacteriose é baseada em dados clínicos, mas o diagnóstico definitivo geralmente envolve o isolamento e a identificação do microrganismo em laboratório de análises clínicas. O procedimento utilizado envolve um fluxograma que inicia com a descontaminação da amostra clínica, seguido pelo exame microscópico para confirmar a presença de BAAR através da coloração de Ziehl-Neelsen (Figura 3A), o isolamento do microrganismo em cultura de Lowenstein - Jensen (LJ) ou Ogawa (Figura 3B), a avaliação da morfologia das colônias (Figura 3C) e, por fim, a sua identificação a nível de complexo ou espécie através de testes bioquímicos ou moleculares (CERCA, 2010; VIANANIERI, 2008).

Figura 3 – Diagnóstico laboratorial das micobacterioses. A: coloração de Ziehl-Neelsen evidenciando disposição de crescimento em cadeias paralelas de *Mycobacterium tuberculosis* em cor vermelha (coloração). B e C: Cultura de Micobactérias em meio LJ.



Fonte: Adaptado de Coelho e Marques (2006).

A diferenciação fenotípica é comumente realizada através de testes bioquímicos como o teste da niacina, crescimento a 25°C, crescimento a 45°C, inibição do crescimento em meio contendo NaCl 5%, hidrólise do tween 80, produção de  $\beta$ -galactosidase, redução do telurito de potássio, redução do nitrato, produção de urease e pirazinamidase, inibição do crescimento em meio contendo PNB e a determinação do tempo de crescimento (BARRETO et al., 2000; BRASIL, 2008). O poder discriminatório desses testes é limitado e insuficiente para determinar a terapia adequada no tratamento de infecções causadas por MCR. Desse modo, é ressaltada a importância dos métodos moleculares como ferramentas auxiliares na identificação das MCR, destacando-se ainda o potencial de reduzir para horas, ao invés de dias e até mesmo semanas, a identificação das espécies pelos métodos moleculares (BRASIL, 2008; DEEPA et al., 2005; YAM et al., 2006;).

A necessidade de um teste rápido e sensível para o diagnóstico laboratorial das micobactérias levou ao desenvolvimento dos métodos moleculares para detecção e identificação das espécies, diretamente de amostras clínicas ou a partir de colônias isoladas em cultivo. Estes métodos incluem testes baseados na amplificação de ácidos nucleicos, como



a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações (RFLP-PCR, Nested-PCR, Multiplex-PCR e PCR em tempo real, por exemplo), utilização de sondas genéticas, sequenciamento de DNA, análise de restrição enzimáticas de genes, como o gene *hsp65*, ensaio da mobilidade eletroforética de fitas heteroduplas, entre outros (WILDNER et al, 2011).

#### 1.4.1 Análise de restrição enzimática do gene *hsp65* (PRA-*hsp65*)

O gene *hsp65* é um gene encontrado em todas as espécies de micobactérias com sequências de nucleotídeos que são espécie-específicas. As variações na sequência desse gene podem ser exploradas para a identificação à nível da espécie tanto em micobactérias de crescimento lento como em espécies de crescimento rápido, contudo não diferencia as espécies membros do CMTB (BONA et al., 2011).

A técnica PRA-*hsp65*, padrão ouro para identificação de espécies de micobactérias no Brasil, consiste na análise do padrão de restrição de produtos de amplificação do gene *hsp65*, que codifica uma proteína conhecida como proteína de choque térmico (CAL SOLARI et al., 2015; SAIFI et al., 2013). As proteínas de choque térmico existem em todos os organismos e são divididas em famílias de acordo com seu tamanho, desempenham funções de auxílio na montagem das proteínas, fazendo parte do processo de síntese, dobramento e até mesmo de degradação proteica, sendo fundamentais para que as proteínas possam exercer todas as suas funções vitais. O gene também é expresso em situações de estresse, onde essas proteínas de choque térmico induzem a sua própria ação como resposta a estímulos, o que confere às células resistência, de forma que as lesões numa segunda exposição ao mesmo fator de estresse serão significativamente menores no organismo ou em parte dele. Em geral, são tratadas como recurso de sobrevivência (CARDOSO, 2012)

O método PRA-*hsp65* foi descrito por Telenti e colaboradores em 1993 e a identificação das espécies de micobactérias por esse método é baseada na amplificação de um fragmento de 441pb do gene *hsp65*, que codifica para uma proteína de choque térmico de 65 kDa. O fragmento amplificado do gene é digerido com duas enzimas de restrição, *BstEII* e *HaeIII* e, posteriormente, passa pela análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição, através de eletroforese em gel de agarose. A determinação da espécie é possível comparando os padrões de restrição com um algoritmo, sendo que o tamanho e número dos fragmentos de restrição são, geralmente, espécie-específicos (CHIMARA et al, 2008).

O algoritmo consiste de um compilado de perfis publicados por Telenti e colaboradores (1993), ampliado por outros autores, e disponível em banco de dados eletrônico Praside (<http://app.chuv.ch/praside/index.html>). Subsequentes relatos isolados sobre variantes de padrões específicos têm aumentado o número de espécies e subespécies identificadas por este método (BRASIL, 2008; CHIMARA, 2008; CALSOLARI, 2016).

Mais do que um exercício de classificação, a identificação precisa das espécies tem significados práticos importantes. Permite a realização de estudos epidemiológicos detalhados, orienta a análise laboratorial das amostras e, além disso, amplia o conhecimento sobre os perfis de sensibilidade das diferentes espécies aos antimicrobianos, o que representa um importante subsídio para a prática clínica frente a infecções associadas a tais microrganismos (BRASIL, 2008; KIM, S. H.; SHIN, J. H., 2018).

## 1.5 TRATAMENTO DAS MICOBACTERIOSES

Os esquemas utilizados para o manejo das micobacterioses são variáveis, porém ainda são mínimos os estudos relacionados para a grande maioria das espécies, não havendo regime terapêutico validado em estudos controlados e tampouco critério de cura para esse grupo de doenças (GRIFFITH, 2010). O princípio básico no tratamento das MNT obedece à mesma lógica da tuberculose, visando utilizar no mínimo dois fármacos bactericidas aos quais o patógeno seja sensível após passar por testes de suscetibilidade. Preferencialmente, a terapia deve envolver fármacos que não tenham sido previamente usados, prevenindo assim o surgimento de cepas resistentes. Os regimes utilizados devem ser de longa duração, não inferior a doze meses, visando a redução da carga bacteriana, dos sintomas e da bacteremia. (DALCOMO, 2014).

O tratamento para MCR pode variar conforme o local da infecção, o agente etiológico, a extensão do acometimento das lesões e a presença ou não de co-morbidades (FLORES et al., 2016). Dessa forma, para a escolha de um tratamento adequado é necessária uma avaliação clínica precisa, a identificação do agente causal e a determinação do perfil de suscetibilidade do microrganismo aos fármacos indicados na terapia da infecção (MERTANIASIH et al., 2017; WILDNER et al., 2012).

Para um tratamento eficiente de doença localizada, na maioria dos casos, a monoterapia é suficiente. Por outro lado, doenças cutâneas e pulmonares disseminadas necessitam de poliquimioterapia por diferentes vias de administração (AGERTT, 2016; BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002). De acordo com as diretrizes do *Clinical and*

*Laboratory Standards Institute* (CLSI), para escolha do tratamento das micobacterioses em geral devem ser realizados testes de suscetibilidade, através do método de microdiluição em caldo, com macrolídeos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, ceftazidima, imipenem, linezolida, tigeciclina, doxiciclina, minociclina e sulfonamidas (CLSI, 2011; GRIFFITH et al., 2007).

Macrolídeos, sulfonamidas, amicacina, doxiciclina, imipenem e fluorquinolonas geralmente apresentam ação frente as MCR e, na ausência de identificação da espécie, o tratamento deve ser otimizado com um regime de múltiplas drogas de acordo com a gravidade da infecção e a situação clínica do paciente (GHOSH *et al.*, 2017; PARIKH; GRANT, 2017).

No caso de infecção pulmonar, a ressecção cirúrgica parcial de pulmão, em casos de supurações ou áreas de bronquiectasias localizadas, pode ser essencial como adjuvante ao tratamento medicamentoso para que haja erradicação do agente infeccioso. Devido o grande número de espécies e a grande variabilidade existente em relação a suscetibilidade das micobactérias, infecções difíceis de tratar causadas por MCR são cada vez mais observadas em ambientes clínicos, o que destaca a importância do desenvolvimento de novas opções de tratamento, uma vez que as opções eficazes de tratamento contra MCR são limitadas e imprecisas (HATAKEYAMA et al., 2017).

Além disso, a capacidade de sobrevivência de microrganismos patogênicos em biofilmes torna o tratamento de infecções envolvendo microrganismos na forma sésil um desafio maior quando comparado ao tratamento envolvendo apenas microrganismos planctônicos e isso é decorrente, principalmente, do aumento expressivo da tolerância dos biofilmes aos fármacos já utilizados na clínica (RAMASAMY, 2016).

## 1.6 BIOFILMES

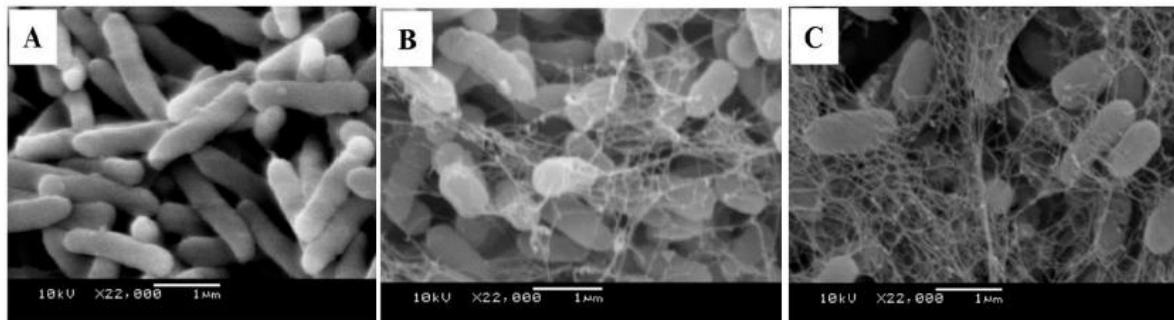
### 1.6.1 Estrutura e Formação

Os microrganismos podem apresentar-se na forma planctônica, dispersos no meio, ou na forma sésil, formando comunidades com diferentes graus de complexidade, denominadas biofilmes. Mais de 90% dos microrganismos são capazes de formar biofilmes, aderidos a diferentes superfícies, que são um ecossistema estruturado, altamente dinâmico e que atua de maneira coordenada. Estima-se que não exista superfície, sintética ou natural, que não sirva de base para a formação dessas comunidades (MORENO, 2010). Os biofilmes são estruturas que apresentam uma variável distribuição de células e agregados celulares, aos quais

constituem um modo protegido de crescimento em ambientes hostis, severos e de estresse para o microrganismo (HOIBY et al., 2011; LEWIS, 2001).

Em relação a sua composição, os biofilmes podem ser definidos como grupos de microrganismos, sejam ou não da mesma espécie, cercados por um polímero autoproduzido de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), aderidos a uma superfície (Figura 4) (VERT et al., 2012). São constituídos, por água, microrganismos, SPE (polissacarídeos, proteínas, lipídeos, DNA, RNA e íons) e resíduos do ambiente colonizado, aderidos a uma superfície sólida (GUPTA et al, 2016).

Figura 4 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilme formado por bacilo gram-negativo demonstrando progressiva produção de SPE com tempo de incubação a 37°C de A: 6 horas. B: 24 horas. C: 48 horas.



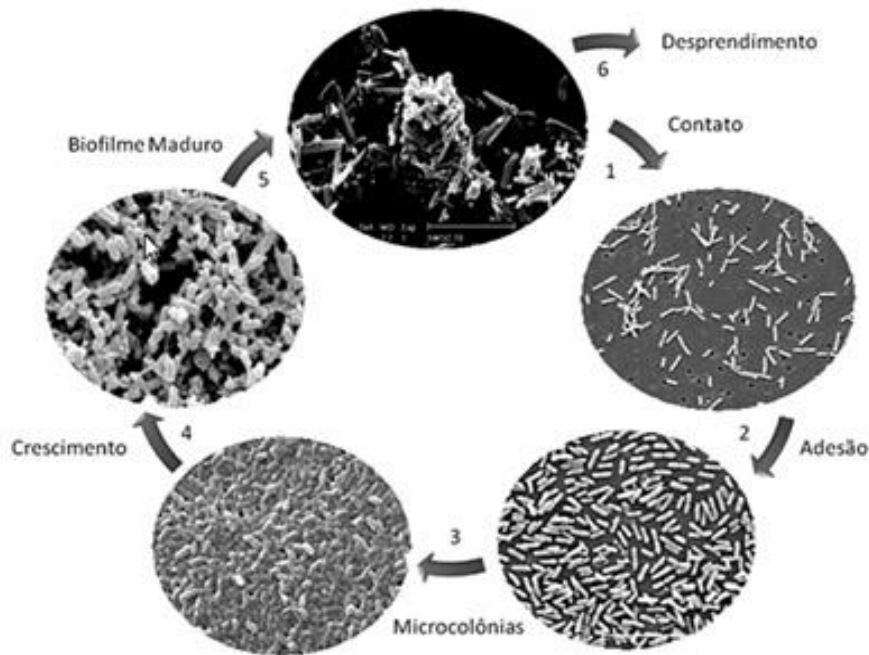
Fonte: Adaptado de Trentin et al. (2013).

As SPE são responsáveis por características morfológicas, biológicas e físico-químicas dos biofilmes ao passo que proporcionam a adesão e fixação dos biofilmes às superfícies, facilitam a agregação e comunicação das células bacterianas e formam uma rede de polímero, mediando a estabilidade mecânica do biofilme que determina a sua arquitetura. Também proporciona a retenção de água na estrutura, mantendo um microambiente altamente hidratado em torno dos microrganismos do biofilme, levando à tolerância a dessecação em ambientes deficientes em água. Além disso, as SPE conferem resistência às defesas do hospedeiro durante infecções e confere tolerância a vários agentes, como desinfetantes e antimicrobianos. Através da presença de atividade enzimática na SPE, permitem a digestão de macromoléculas exógenas para aquisição de nutriente e a degradação de SPE estruturais, permitindo a liberação de células dos biofilmes (BILLINGS et al., 2015; CHATTERJEE et al., 2014; MORYL, 2014; FLORES, 2014).

O desenvolvimento do biofilme é um processo complexo, dinâmico e multiestágio (GERITS et al, 2017). O ciclo biológico para a formação de um biofilme passa por diferentes

etapas: contato, adesão (reversível e irreversível), formação de microcolônias, maturação e desprendimento/dispersão (MA et al., 2017). As etapas envolvidas na formação de biofilmes podem ser observadas na Figura 5.

Figura 5 – Processos envolvidos na formação de biofilmes: 1) Contato da forma planctônica com a superfície. 2) Adesão. 3) Formação de microcolônias. 4) Maturação e crescimento tridimensional. 5) Biofilme maduro com matriz extracelular e canais aquosos e 6) Desprendimento de formas planctônicas.



Fonte: Adaptado de Tamashiro et al. (2013).

Microrganismos planctônicos, ao entrarem em contato com uma superfície através de um movimento browniano ou flagelar, iniciam o processo de adesão formando pontes de ligação entre si e a superfície, sendo esse o primeiro estágio na formação de biofilmes, considerado um processo de alta complexidade. Esse estágio de adesão é reversível e ditado, inicialmente, por interações físico-químicas não específicas de longo alcance entre a bactéria e o material, incluindo forças hidrodinâmicas, interações eletrostáticas, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e por adesinas, podendo culminar na adesão irreversível. Os microrganismos fracamente aderidos à superfície consolidam-se na estrutura através da produção de SPE, caracterizando a etapa de adesão irreversível (OMAR et al., 2017; TRENTIN et al., 2013).

Após a etapa de adesão, à medida que a população microbiana em sua proximidade aumenta, as bactérias se organizam em microcolônias dispostas em monocamadas, ocorrendo um aumento na produção, na liberação e na detecção de moléculas sinalizadoras que ativam

e transcrevem genes específicos que alteram o fenótipo de bactérias planctônicas para o fenótipo de biofilme (TRENTIN et al., 2013). Essas moléculas são autoindutoras e responsáveis pela regulação da motilidade, virulência, produção de SPE e pela formação e maturação do biofilme. Esse processo de intensa comunicação celular mediado por moléculas sinalizadoras, que acopla a transcrição de genes específicos com a densidade celular bacteriana, é conhecido como *quorum sensing* (QS) e é encontrado em muitas espécies de bactérias patogênicas (BHARATI; CHATTERJI, 2013; TUTTLEBEE et al., 2002; TATEDA et al., 2007).

A ativação desses genes induz ao crescimento e agrupamento tridimensional das bactérias, proporciona um aumento da aderência da estrutura à superfície e a formação de canais aquosos para a troca de água e nutrientes com o meio externo. Sendo assim, o biofilme pode permanecer aderido à superfície por longo período ou então se dispersar, liberando microrganismos na forma planctônica para que iniciem um novo ciclo de formação de biofilme (TAMASHIRO et al., 2013).

#### 1.6.2 Patogênese e Resistência microbiana associada a formação de biofilmes

De acordo com o “National Institutes of Health”, dos Estados Unidos da América, biofilmes estão associados, em algum grau, a 80% de todas as infecções no mundo, incluindo endocardites, otites, prostatites, periodontites, conjuntivites, vaginites, infecções relacionadas à fibrose cística, sendo colonizadores de implantes biomédicos, tais como cateteres venosos, arteriais e urinários, dispositivos intrauterinos, lentes de contato e próteses (NIH, 2018; DONLAN; COSTERTON, 2001; HOIBY et al., 2011).

Embora a capacidade de desenvolvimento de biofilme não seja uma característica geral presente em todos os isolados clínicos de MCR, inúmeras espécies de MCR já foram associadas a biofilmes em dispositivos biomédicos e sistemas de água em ambientes hospitalares, apresentando grande impacto na saúde humana (MARTÍN-DE-HIJAS et al., 2009; PITOMBO et al., 2009). Além disso, estudos já relataram que biofilmes de micobactérias contribuem para a patogênese das infecções sanguíneas relacionadas ao uso de cateteres (EL HELOU et al., 2013).

Pacientes com micobacterioses decorrente de implantes de próteses articulares contaminadas com MCR apresentaram falha no tratamento medicamentoso, obtendo cura total somente após remoção das próteses associadas a biofilmes maduros (EID et al., 2007). Em outro caso, o exame microscópico de uma válvula aórtica protética retirada de um paciente

permitiu a identificação de uma estrutura composta por MCR, juntamente a uma fina camada de matriz de fibrina associada a macrófagos CD38 e um baixo número de plaquetas, consistentes em um biofilme. Neste caso, a endocardite da válvula protética teve como agente etiológico *M. fortuitum* (BOSIO et al., 2012).

Além de constituir uma estratégia eficaz de sobrevivência e proliferação dos microrganismos, estima-se que os biofilmes bacterianos estejam associados a 60-70% das infecções hospitalares, especialmente àquelas decorrentes de implantes biomédicos, como próteses e cateteres (WENZEL, 2007). Diferentes fatores podem ser considerados no estudo da resistência microbiana associada aos biofilmes, como a penetração restrita de antimicrobianos, a diminuição da taxa de crescimento dos microrganismos, a expressão de possíveis genes de resistência e a falha no reconhecimento dos biofilmes pela defesa imunológica humana. Isolados ou em combinação, esses fatores são úteis para desvendar a resistência conferida aos microrganismos através dessa estrutura (LEWIS, 2001).

A produção de SPE reduz expressivamente a capacidade de penetração de antimicrobianos e biocidas na estrutura do biofilme. Essa matriz polimérica retém a maior quantidade dos agentes químicos agressores, formando uma barreira física que impede a atuação dessas substâncias sobre as células. Além disso a matriz exopolimérica pode ligar-se a antimicrobianos, modificando suas características e inativando-os. Isso proporcionará resistência efetiva para células microbianas do biofilme contra grandes moléculas, como os antimicrobianos, lisozimas e sistema complemento (TRENTIN et al., 2013; LEWIS, 2012; LEWIS 2001).

A população heterogênea com variada taxa de crescimento e suscetibilidade que constitui o biofilme é, sem dúvida, outro fator a ser considerado quando se estuda a resistência de biofilmes bacterianos (STEWART; FRANKLIN, 2008). Na base estrutural do biofilme as células estão em estado de latência metabólica, diferentemente das células da camada mais externa, que se apresentam em alta atividade. Tendo em vista que a maioria dos antimicrobianos são mais eficazes contra microrganismos em alta atividade metabólica, o baixo metabolismo dessas células persistentes garante a sua resistência ao tratamento. Sendo assim, é possível erradicar uma grande parte da população do biofilme após a terapêutica, porém a fração de células dormentes não atingidas seguirão atuando como uma fonte de reinfecção (LEWIS, 2012; LEWIS, 2001).

Decorrente da proximidade dos microrganismos em biofilmes, as bactérias podem apresentar alta frequência de mutação devido a transmissão horizontal de genes, adquirindo através de plasmídeos os genes responsáveis pela codificação de inúmeros mecanismos de

resistências a variados antimicrobianos. Como exemplo, pode-se enumerar a produção enzimática, a modificação do alvo primário de atividade antimicrobiana e a produção de bombas de efluxo (MADSEN et al., 2012; SOUSA et al., 2015).

Além disso, o sistema imune apresenta dificuldade no reconhecimento dos biofilmes como agentes estranhos. Isso ocorre devido à presença de grande quantidade de SPE que mascara os microrganismos, impedindo assim a ação de anticorpos, radicais livres e fagócitos, dificultando expressivamente o combate à infecção pelo sistema imunitário do hospedeiro (BRYERS, 2008).

### 1.6.3 Combate e Abordagem Terapêutica Contra Biofilmes

As estratégias para o combate de biofilmes podem ser divididas em dois segmentos: a inibição da formação de biofilmes e a erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (TRENTIN et al., 2013). Os principais alvos para intervenção podem ser observados na figura 6.

O bloqueio da adesão bacteriana a superfícies de dispositivos implantáveis visa modificar a superfície externa desses materiais para dificultar a adesão e colonização microbiana (BAZAKA et al., 2012). Em equipamentos biomédicos como próteses e cateteres, pode ser uma alternativa promissora para reduzir a ocorrência de infecções decorrentes da utilização desses dispositivos. Dentro dessa alternativa, pode-se enumerar os revestimentos de dispositivos biomédicos, a imersão do dispositivo em soluções antibióticas, a irrigação do sítio cirúrgico com antibióticos e a terapia de bloqueio com antibiótico utilizada em cateteres (LYNCH; ROBERTSON, 2008).

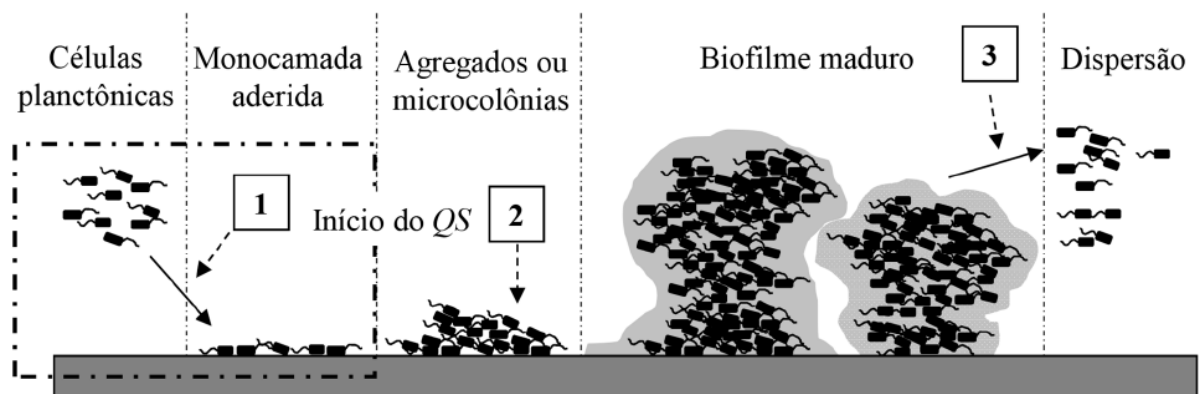
O rompimento da comunicação celular bacteriana é uma nova e promissora perspectiva para inibir a formação de biofilmes, através da utilização de inibidores de moléculas envolvidas no *QS*. Essas moléculas causariam uma interferência na comunicação bacteriana, reduzindo assim a mudança do fenótipo planctônico para o fenótipo de biofilme ao bloquear moléculas sinalizadoras que ativam e transcrevem genes específicos envolvidos na maturação e manutenção do biofilme. A associação de moléculas que interfiram no *QS* a antimicrobianos pode levar a uma potencialização do efeito antibiofilme, ao passo que deixa o biofilme mais suscetível a atuação do fármaco clássico e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (LAZAR, 2011; RASMUSSEN; GIVSKOV, 2006).

Além de inibir a formação do biofilme, também é possível erradicar o biofilme já formado. A erradicação de biofilmes, na prática clínica, ocorre através do uso de



antimicrobianos e da retirada e substituição de dispositivos biomédicos. Ao final do ciclo de formação, o biofilme converte parte de sua estrutura à forma planctônica, a fim de fornecer células para a formação de novos biofilmes (MACEDO; ABRAHAM, 2009). Isso, do ponto de vista clínico, leva a observar que, *in vivo*, os antimicrobianos são capazes de erradicar as formas planctônicas, liberadas pelo biofilme, mas dificilmente são capazes de chegar nas populações mais internas da estrutura para destruí-las, o que leva a uma recorrência de infecção após a suspensão da terapia antimicrobiana até que o biofilme seja removido cirurgicamente do corpo (GHOSH et al., 2017). Tendo isso em vista, uma característica essencial para que haja uma molécula alvo para a erradicação do biofilme baseia-se, principalmente, na característica do composto em penetrar a estrutura do biofilme e poder atuar sobre as populações bacterianas mais internas, que se apresentam em estado metabólico estacionário.

Figura 6 - Principais alvos para combate aos biofilmes microbianos: a inibição da formação de biofilmes via bloqueio da adesão bacteriana à superfície (etapa 1) ou o rompimento da comunicação celular bacteriana - *QS* (etapa 2) e erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (etapa 3).



Fonte: Adaptado de Macedo e Abraham (2009).

### 1.7 SULFONAMIDAS E SULFAMETOXAZOL

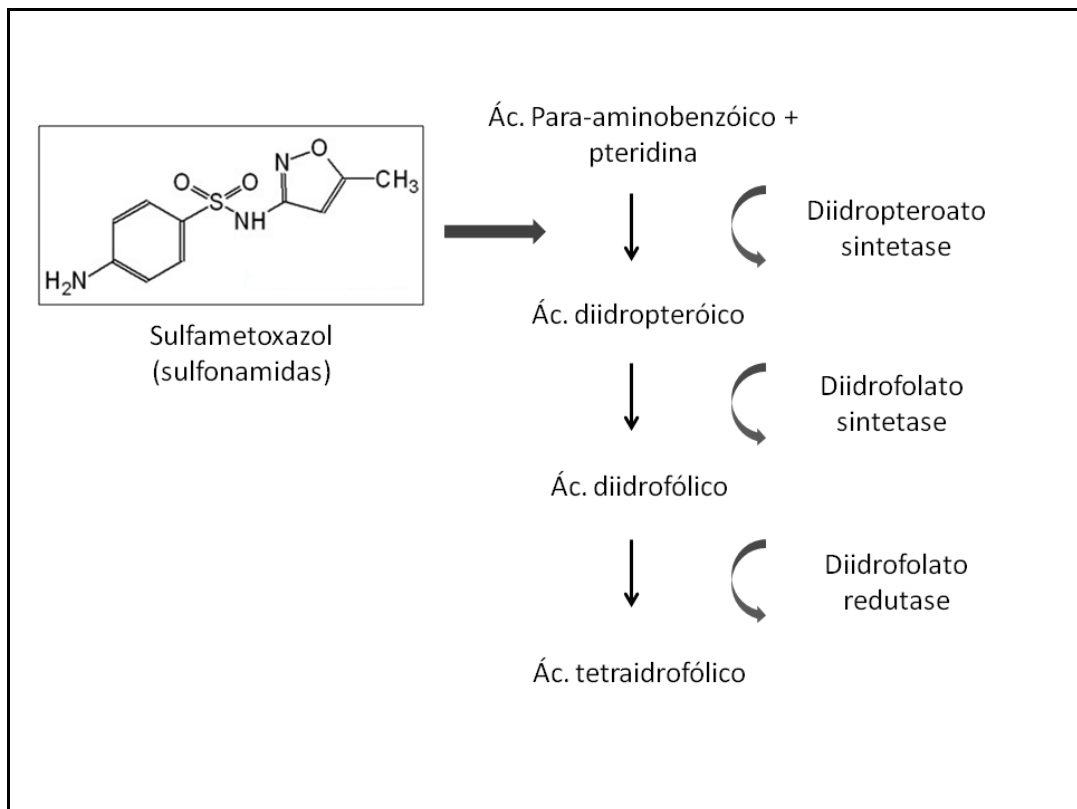
As sulfonamidas são antibacterianos, bacteriostáticos, que atuam interferindo na biossíntese bacteriana do ácido fólico. Além disso, foram os primeiros fármacos sistêmicos eficazes utilizados para o tratamento de infecções humanas. O ácido fólico é um componente envolvido em diversas vias metabólicas dos microrganismos, o que o torna essencial para a sua sobrevivência. Tem um papel importante como precursor e/ou cofator na biossíntese das

purinas e pirimidinas, na biossíntese de aminoácidos e na biossíntese de vitaminas, como o ácido pantotênico (GARCÍA-GALÁN et al., 2008).

Uma característica importante das sulfonamidas é a sua toxicidade seletiva. Isso ocorre devido ao fato dos microrganismos serem capazes de sintetizar o ácido tetra-hidro-fólico que necessitam, a partir do ácido para-amino-benzóico (PABA), diferentemente dos mamíferos que devem obter esse nutriente a partir da dieta, através de receptores específicos de absorção do ácido fólico (VILCHÈZE; JACOBS, 2012). Dessa forma, as sulfonamidas, que são análogas estruturais do PABA, têm efeito bacteriostático ao inibir o metabolismo do ácido fólico, por mecanismo competitivo (Figura 7). O grupo das sulfonamidas compreende seis drogas principais: sulfanilamida, sulfisoxazol, sulfacetamida, ácido para-aminobenzóico, sulfadiazina e sulfametoxazol, sendo as duas últimas de maior importância clínica (ANVISA, 2013).

O sulfametoxazol é uma sulfonamida de amplo espectro, considerada de grande importância no controle de infecções causadas por algumas MCR, como *M. abscessus* e *M. fortuitum*, devido à sua facilidade de administração por via oral (BRASIL, 2008).

Figura 7 - Biossíntese do Ácido-tetra-hidro-fólico (forma ativa do ácido fólico); Sítio de ação e estrutura molecular do sulfametoxazol.



Fonte: Adaptado de Agertt (2016).

A combinação do sulfametoxazol ao trimetropim já foi uma alternativa muito sugerida no tratamento de infecções causadas por microrganismos do gênero *Mycobacterium*. A indicação clínica para o sulfametoxazol isolado também persiste, porém é constatado que sua atividade diminui expressivamente quando o agente infeccioso apresenta-se na forma de biofilmes ou no interior de macrófagos do hospedeiro (FLORES et al., 2016; DAVIES et al., 2014).

No estudo de Flores e colaboradores (2016) foi demonstrado que, após tratamento com sulfametoxazol, biofilmes de MCR apresentaram quase nenhuma modificação em sua película microbiana já formada, apresentando alto índice de resistência ao fármaco. Quando tratando de sua capacidade de inibir a formação de biofilmes de MCR, o sulfametoxazol apresentou leve atividade apenas contra *M. fortuitum*.

A utilização clínica do sulfametoxazol, isolado ou associado ao Trimetropim, vem sendo diminuída e esse fármaco tem sido utilizado na prática clínica com grande restrição. Isso é decorrente do desenvolvimento de resistência a esse agente e a sua rápida disseminação, fazendo com que novos antimicrobianos substituam essa sulfonamida na maioria de suas indicações clínicas (HOUVINEN, 2001).

A resistência em micobactérias é conferida por sua parede celular altamente lipofílica e existem vários mecanismos que controlam o conteúdo da parede celular, o que inclui um baixo número de porinas, ampla gama de bombas de efluxo, biotransformação ativa por enzimas citossólicas e induzíveis mecanismos de resistência (VAN et al., 2012).

A presença de uma parede celular impermeável, constituída por uma espessa camada cética, atua como barreira física e química, devido a sua hidrofobicidade. O envelope celular e o seu alto teor lipídico, até 60% do peso seco da bactéria, é considerado o principal fator que contribui à sua baixa permeabilidade (NESSAR et al. 2012).

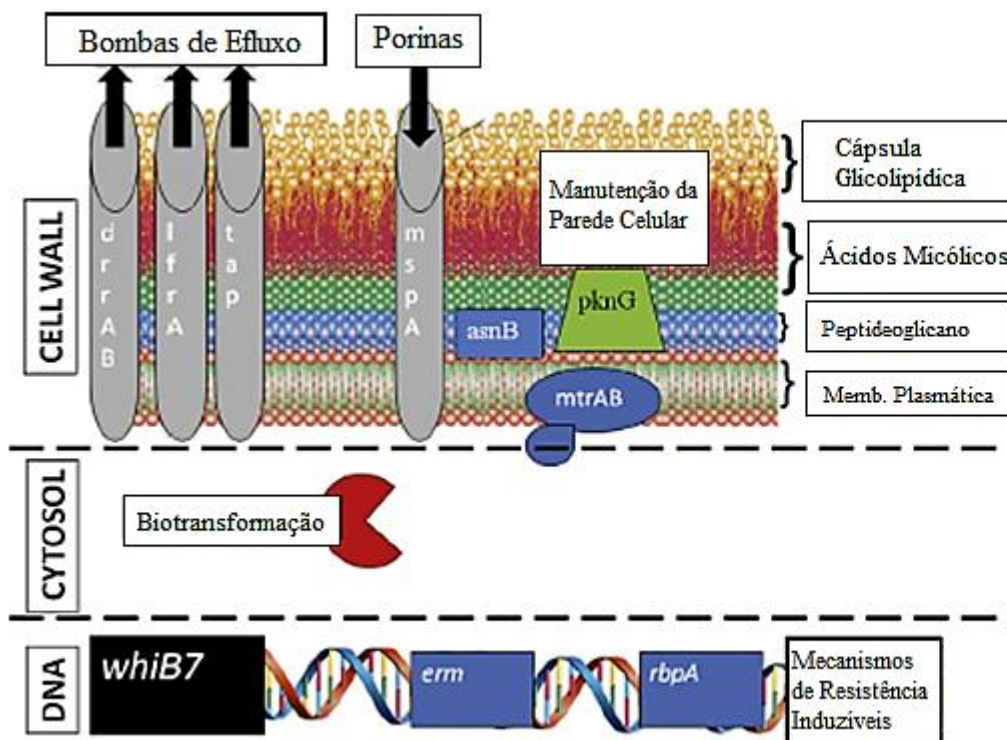
Além disso, uma vez internalizado, os antibióticos podem, ao atingir o citoplasma, ativar a expressão de genes de resistência a medicamentos, sendo que existe uma variedade de genes direcionados que contribuem para esse fenômeno. Está bem documentado que o envelope celular funciona sinergicamente com sistemas internos induzíveis por antibióticos na competição contra os efeitos das drogas. Este sistema interno, conhecido como resistência intrínseca, inclui bombas de efluxo e expressão de enzimas de modificação e inativação de antibióticos (NESSAR et al. 2012; VAN et al., 2012)

Vários genes e sistemas envolvidos na manutenção da parede celular são importantes para manter a resistência a muitos fármacos, incluindo a proteína quinase G, genes *fbpA* (codificando o chamado complexo 85) e *asnB* em *Mycobacterium smegmatis*, espécie modelo

para o estudo do gênero *Mycobacterium*. O sistema duplo de genes *mtrAB* em *M. smegmatis* e *M. avium*, *kasB* em *Mycobacterium marinum* e *Maa2520* e *pks12* de *M. avium* são outros exemplos. A interrupção desses genes geralmente reduz a hidrofobicidade da parede celular micobacteriana e leva a uma maior suscetibilidade aos antibióticos lipofílicos, incluindo as sulfonamidas, macrolídeos, ciprofloxacino, vancomicina, imipenem e penicilinas. Além disso, o reduzido número de Porinas na membrana micobacteriana reduz a suscetibilidade das micobactérias a fármacos hidrofílicos (VAN et al., 2012)

Uma visão geral simplificada dos vários determinantes da resistência de micobactérias são apresentados na Figura 8.

Figura 8 - Visão geral da parede celular micobacteriana e seus determinantes de resistência.



Fonte: adaptado de Van et al., (2012).

## 1.8 COORDENAÇÃO DE METAIS A ANTIBIÓTICOS COMO UMA ESTRATÉGIA DE COMBATE À RESISTÊNCIA BACTERIANA

A utilização de metais no desenvolvimento de novas moléculas vem ganhando destaque ao passo que se observa um número cada vez maior de atividades exercidas pelos

íons metálicos nos meios biológicos, estimulando assim o desenvolvimento de compostos inorgânicos através da química de coordenação (ROCHA et al., 2011).

Diferentes íons metálicos são essenciais para os processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na manutenção da vida dos microrganismos, porém, quando em excesso, tornam-se letais às células procariotas, seja o metal essencial ou não. Além disso, já é constatado que metais são capazes de interromper a formação de biofilmes, exercem atividade sinérgica com antimicrobianos e biocidas, inibem diferentes vias metabólicas e, dessa forma, são capazes de matar bactérias resistentes a diversos antimicrobianos através do estresse oxidativo, disfunção de proteínas ou danos a membrana celular. Porém, devido, principalmente, a diversidade metabólica dos microrganismos, o estudo exato da toxicidade frente a bactérias e do mecanismo de ação antimicrobiano dos metais ainda é impreciso (LEMIRE et al., 2013; MIZDAL, 2014).

Compostos de coordenação utilizando antimicrobianos clássicos como ligantes e explorando, concomitantemente, as características intrínsecas dos íons metálicos permite a obtenção de uma ampla variedade de complexos a serem explorados como potenciais agentes antimicrobianos. Recentemente, compostos de coordenação contendo sulfonamidas como ligantes vem destacando-se e demonstrando um amplo espectro de atividade antibacteriana, inclusive contra microrganismos do gênero *Mycobacterium* (ROCHA et al., 2011; AGERTT, 2016).

No estudo de Marques (2007) foram obtidos compostos a partir da interação do sulfametoxazol com acetatos de Cu, Cd, Hg, Ni, cloretos de Ag e cloretos de trifetilfosfina de Au, demonstrando seus comportamentos coordenativos e compreendendo a interação entre os diferentes centros metálicos e o ligante. Além disso, foi determinada a atividade antimicrobiana dos complexos, constatando alta atividade do sulfametoxazol coordenado com Au e Ag. O complexo de Au foi 256 vezes mais ativo do que a combinação Sulfametoxazol e Trimetropim, na proporção indicada na clínica de 5:1, frente a *S. aureus* e 64 vezes mais ativo quando comparado ao sulfametoxazol frente a *E. coli*. Quando avaliada a atividade do complexo de Ag, houve uma potencialização de 4 vezes em relação a atividade do sulfametoxazol livre frente aos dois microrganismos estudados. Além disso, frente a *P. aeruginosa*, os compostos foram 32 vezes mais ativos que o fármaco não coordenado (MARQUES, 2007).

Agertt e colaboradores (2013) avaliaram a atividade dos mesmos compostos e o sinergismo com o Trimetropim frente a *M. smegmatis*, demonstrando que as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) obtidas foram expressivamente baixas, ressaltando a

potencialização dos compostos inorgânicos como uma alternativa promissora no desenvolvimento de novos agentes antibacterianos. Além disso, o composto [Au (sulfatiazolato) (PPh<sub>3</sub>)] apresentou alto sinergismo ao trimetoprim na proporção de 1:5 e potencial atividade antimicrobiana frente a 9 isolados clínicos de *M. tuberculosis* na forma planctônica.

Quando formas planctônicas de cepas padrões de MCR foram submetidas a diferentes concentrações de derivados do sulfametoxazol complexados com Au, Cd, Ag, Cu, e Hg foi possível observar que, em todos os casos, as sulfonamidas complexadas com metais tiveram excelente atividade antimicrobiana quando comparada ao sulfametoxazol livre, apresentando atividade bactericida e efeito sinérgico quando combinado com trimetoprim (Agertt et al, 2016).

Os resultados obtidos por Mizdal e colaboradores (2017) revelaram que compostos inorgânicos do sulfametoxazol complexado com Hg, Cd, Cu e Ag apresentaram efeito significativo na inibição de biofilmes de *E. coli*. Além disso, demonstraram que a ação desses compostos foi muito superior a ação dos sais utilizados para a sua síntese e superior a atividade antibiofilme do sulfametoxazol livre, concluindo que se obteve, a partir da coordenação do sulfametoxazol e dos metais, uma ação sinérgica e mais efetiva na inibição de biofilmes de microrganismos dessa espécie.

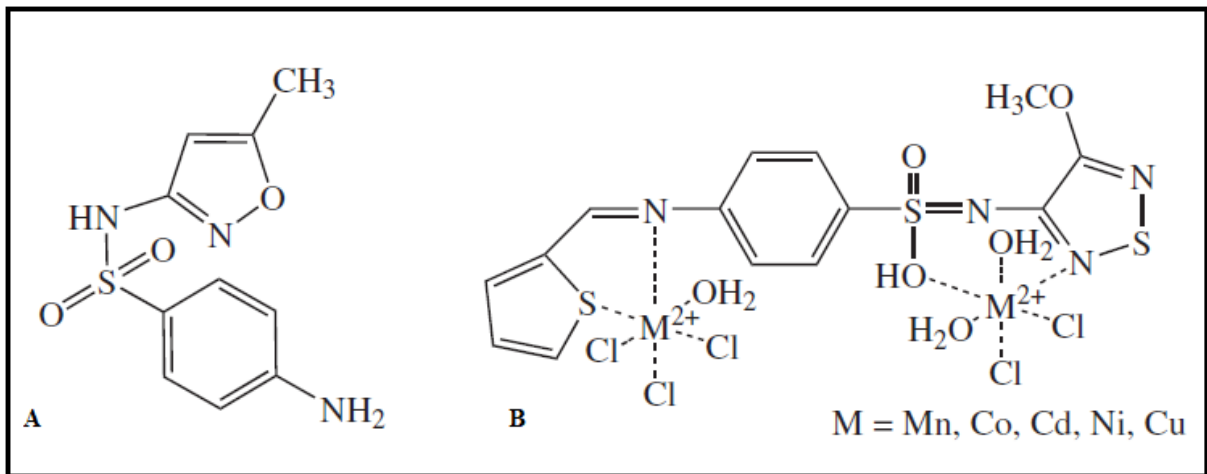
Atualmente, existe no mercado a sulfadiazina complexada com o íon prata, utilizada para o tratamento tópico de infecções e queimaduras. Essa preparação tem a ação da sulfadiazina potencializada quando complexada ao íon prata, que causa a precipitação de proteínas e age diretamente na membrana citoplasmática da célula bacteriana, exercendo ação bactericida imediata, e ação bacteriostática residual, pela liberação de pequenas quantidades de prata iônica (ROCHA et. al, 2011).

Compostos de coordenação sintetizados por Chohan e colaboradores (2010) utilizando Co, Cu, Ni e Zn foram avaliados em relação a sua atividade antibacteriana e antifúngica. Os resultados demonstraram que, embora apresentem atividade moderada frente a *E. coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, são potenciais agentes antifúngicos contra *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Microsporium canis* e *Trichophyton mentagrophytes*, demonstrando a importância da exploração das sulfonamidas coordenadas à metais como possíveis agentes anti-infecciosos.

A química de coordenação do sulfametoxazol é baseada em dois sítios nitrogenados principais: o átomo de nitrogênio do grupo amido e o átomo de nitrogênio do anel isoxazólico. A alta capacidade das sulfonamidas em atuar como ligante está baseada na acidez

da função  $-S(O)_2-NH$ , aliada à presença do anel de cinco membros, o grupo isoxazolid. Dessa forma, a desprotonação do grupo NH gera um ligante aniônico, com um átomo de nitrogênio isoxazólico, os quais possuem os requisitos estereoquímicos necessários a formação de complexos cujo ligante pode ser monodentado, quelante ou formador de ponte (MARQUES, 2007). A figura 9 apresenta as estruturas do sulfametoxazol livre e do esquema de coordenação do ligante sulfonamida a diferentes metais.

Figura 9 – A: estrutura molecular do sulfametoxazol. B: estrutura química de complexos metálicos com sulfonamidas.



Fonte: adaptado de Rocha e colaboradores (2011).

A síntese e o desenvolvimento de metalodrogas (*metal-based drugs*) é um grande desafio, principalmente quando se trata de compostos inorgânicos. A bioacumulação dos íons metálicos pode causar graves efeitos adversos e colaterais, o que exige uma investigação *in vitro* e *in vivo* acurada dos aspectos farmacológicos, fisiológicos e, principalmente, toxicológicos. Sendo assim, esses ensaios devem comprovar a eficácia e segurança do composto antes da sua liberação para testes clínicos em humanos (Rocha et al., 2011; SAGRILLO et al., 2015).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobacteriana, antibiofilme e a toxicidade *in vitro* do sulfametoxazol complexado com Au, Cu, Cd, Hg e Ni.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Determinar o perfil de suscetibilidade dos Isolados Clínicos (IC) de MCR e das cepas padrões *M. abcessus*, *M. fortuitum* e *M. massiliense* frente aos fármacos utilizados na clínica: amicacina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem e sulfametoxazol;
- 2.2.2 Determinar a CIM dos complexos metálicos do sulfametoxazol frente aos IC e cepas padrões de MCR.
- 2.2.3 Identificar molecularmente os IC de MCR.
- 2.2.4 Avaliar a capacidade do sulfametoxazol livre e complexado com metais em inibir a formação do biofilme das cepas padrões de MCR.
- 2.2.5 Avaliar a capacidade do sulfametoxazol livre e complexado com metais em destruir o biofilme formado pelas cepas padrões de MCR.
- 2.2.6 Avaliar a capacidade do sulfametoxazol de inibir e destruir biofilmes de IC de MCR.
- 2.2.7 Avaliar a capacidade do sulfametoxazolato de Au de inibir e destruir biofilmes de IC de MCR.
- 2.2.8 Investigar a toxicidade *in vitro* do sulfametoxazol livre e complexado com metais em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs).



### 3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

A publicação científica refere-se a um manuscrito submetido ao periódico *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, que se encontra em fase de revisão, e que está formatado de acordo com as normas exigidas pela revista.

#### 3.1 MANUSCRITO

##### **Sulfamethoxazole derivatives complexed with metals: a new alternative against biofilms of rapidly growing mycobacteria**

Fallon dos Santos Siqueira<sup>1</sup>, Vanessa da Costa Flores<sup>1</sup>, Camila Filippi dos Santos Alves<sup>1</sup>, Viviane Drescher Somavilla<sup>1</sup>, Vanessa Albertina Agertt<sup>1</sup>, Grazielle Guidolin Rossi<sup>1</sup>, Alencar Kolinski Machado<sup>2</sup>, Michele Rorato Sagrillo<sup>2</sup>, Priscila Marquezan Copetti<sup>2</sup>, Josiéli Demetrio Siqueira<sup>3</sup>, Renne de Sousa Dias<sup>3</sup>, Davi Fernando Back<sup>3</sup>, Marli Matiko Anraku de Campos<sup>1#</sup>

1. *Laboratório de Micobacteriologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.*
2. *Laboratório de Cultura Celular, Centro Universitário Franciscano, Brasil.*
3. *Laboratório de Materiais Inorgânicos, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.*

#Address correspondence to Marli Matiko Anraku de Campos,

[laboratoriomycobacteriologia@gmail.com](mailto:laboratoriomycobacteriologia@gmail.com).

## ABSTRACT

Rapidly growing mycobacteria (RGM) are opportunistic microorganisms that can cause mycobacteriosis and form biofilms, communities that adhere to solid surfaces, characterizing one of their most powerful survival mechanisms. Biofilms are considered important sources of infections on biomedical surfaces, and most infections involving biofilm formation are associated with medical device implants such as catheters and prostheses. Therefore, there is an urgent need for new antimicrobial compounds that can combat microbial resistance associated with the biofilms formation. In recent years, the coordination of metals to antimicrobials have shown excellent activity against a variety of microorganisms. In this context, this work aimed to evaluate, for the first time, the antibiofilm action of sulfamethoxazole complexed with Au, Cd, Cu, Ni and Hg on *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841), *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898), and RGM clinical isolates, as well as to evaluate their safety through cytotoxic assays. Different profiles of susceptibility to classic drugs and new compounds were determined, and it was demonstrated that sulfamethoxazole derivatives showed, in the great majority of cases, superior activity in inhibiting the RGM. The results demonstrate potentiation of the novel compounds in antibiofilm activity, mainly in the complex with Au, which was able to completely inhibit biofilm formation and had the capacity to destroy the biofilm at all concentrations tested. All cytotoxic data are suggestive that the majority of sulfamethoxazole metallic derivatives are antimicrobial alternatives, as well as safe molecules, which could be used as potential therapeutic agents for bacterial and biofilm elimination.

**Key words:** Mycobacteria; Biofilms; Resistance; Inorganic compounds.

## INTRODUCTION

Rapidly growing mycobacteria (RGM) can be isolated from several sites, depending on the site of infection, such as the genitals, saliva, feces, urine, sputum, oropharynx, skin, outer ear and nostrils (1). They are a subgroup of non-tuberculous mycobacteria (NTM) which have been increasingly described as the causative agent of mycobacteriosis, mainly in immunocompromised patients, making the implementation of an effective antimicrobial treatment for its eradication increasingly difficult (2). For efficient treatment, initially it is necessary to identify the etiological agent, according to its susceptibility profile, in order to choose the drugs to be used in proper therapy (3).

Most mycobacteria are found in the environment in a variety of soil types and water distribution systems, which act as potential contamination reservoirs for humans and animals (4). Understanding the factors causing failure of treatments contributes to elucidation of the pathogenic mechanism and of the drug resistance presented by these microorganisms. RGM form structured communities that adhere to solid surfaces, characterizing one of their most powerful survival mechanisms, known as biofilms (5).

Biofilms are considered important sources of infections on biomedical surfaces, and most infections involving biofilm formation are associated with medical device implants such as catheters and prostheses (6,7). In this way, antimicrobial resistance is a major topic when studying mycobacteria, in particular related to the formation of biofilms (8). Studies suggest that the capacity for biofilm development is related to environmental survival of the microorganism, pathogenicity in humans, virulence and resistance to antimicrobial agents (9,10).

In this context, the importance of the search for strategies to combat microbial resistance associated with the formation of RGM biofilms is indisputable. The coordination of metals to classic antimicrobials, such as sulfamethoxazole, has shown promising results against different species of microorganisms in planktonic form, both Gram-negative and Gram-positive, for example, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, among others (11,12). In addition, different sulfamethoxazole derivatives complexed with metals have shown *in vitro* efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense*, four highly pathogenic mycobacteria of clinical importance responsible for large numbers of hospital outbreaks of mycobacterial origin, demonstrating the efficacy of these new compounds as a promising strategy in the eradication of mycobacteria (13, 14, 15, 16).

It is known that microbial infections caused by microorganisms in sessile form are a more challenging issue, with respect to treatment, than infections caused by planktonic microorganisms (17). Therefore, evaluation of the antibiofilm activity of new sulfamethoxazole derivatives complexed with metals was the main target of this study.

## MATERIAL AND METHODS

### Sulfonamide compounds and antimicrobial agents

Compounds [Hg (sulfamethoxazolate)<sub>2</sub>], [Cu<sub>2</sub> (acet)<sub>4</sub>(sulfamethoxazolate)<sub>2</sub>], [Ni (sulfamethoxazolate)<sub>2</sub>], [Au (sulfamethoxazolate)(PPh<sub>3</sub>)] and [Cd (sulfamethoxazolate)<sub>2</sub>] were synthesized in the Laboratório de Materiais Inorgânicos (LMI) of the Departamento de Química of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (18). The antibiotics tested include amikacin (Fluka, Saint Louis, MO, USA), ciprofloxacin (Fluka, Saint Louis, MO, USA), clarithromycin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), doxycycline (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), imipenem (Fluka, Saint Louis, MO, USA) and sulfamethoxazole (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

### Microorganisms

In this study, the standard strains *M. abscessus* (ATCC 19977), *M. fortuitum* (ATCC 6841) and *M. massiliense* (ATCC 48898) were used in all assays. In addition, six clinical isolates of RGM from the Hospital Universitario de Santa Maria (HUSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, collected during a 12-month period between 2016 and 2017, were used. The isolates were classified as RGM from the results of phenotypic tests conducted in the Clinical Analysis Laboratory of HUSM. These microorganisms were maintained at -80 °C and were grown on Löwenstein–Jensen agar for use (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, India). This work was conducted with authorization from the Research Ethics Committee of UFSM, and approved by Presentation for Ethics Assessment Certificate number 71795417.6.0000.5346.

### Susceptibility tests

The susceptibility tests were evaluated by the broth microdilution method according to the standard protocol CLSI M24-A2 (19). The antimicrobial agents were evaluated at the following concentrations: amikacin 1–128 µg/mL, ciprofloxacin 0.125–16 µg/mL,

clarithromycin 0.06–64 µg/mL, doxycycline 0.25–32 µg/mL, imipenem 1–64 µg/mL and sulfamethoxazole 1–128 µg/mL. The sulfonamide compounds were evaluated at concentrations of 156.25–1.22 µg/mL. Initial stock solutions of the sulfonamide compounds were made in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 50 mg/mL, from which further dilutions were made in Mueller–Hinton broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, India). Standardization of the inoculum density for susceptibility testing was performed according to McFarland 0.5 scale. Reading of the plates was done after incubation for 72 h at 30 °C, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the indicator 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Vetec<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The breakpoints for the interpretation of susceptibility of microorganisms to antimicrobial agents can be seen in Table 1.

### **Biofilm formation inhibition test**

Antimicrobial agents and sulfonamides were tested individually for their ability to inhibit biofilm formation of a mycobacterial species. The concentrations of antibiotics and sulfonamide compounds used were equal to or lower than the MICs. Middlebrook 7H9 medium (1 mL; BD<sup>®</sup>, Le Pont de Claix, France) containing  $1 \times 10^7$  CFU/mL of each bacterial species to be tested and 1 mL of the dilution of the antimicrobial or sulfonamide compound to be evaluated were added to polystyrene test tubes with a 5 mL capacity. The tubes were covered with Parafilm<sup>®</sup> and incubated at 30 °C for 7 days (20).

### **Biofilm destruction test**

Middlebrook 7H9 medium (1 mL) containing  $1 \times 10^7$  CFU/mL of the bacterial species was added to polystyrene test tubes which were covered with Parafilm<sup>®</sup> and incubated at 30 °C for 7 days. After biofilm formation, 1 mL of antimicrobial or sulfonamide compound was added to each tube, at a concentration equal to or higher than the MIC. The tube was covered with Parafilm<sup>®</sup>, and it was incubated at 30 °C for a further 24 h (20).

### **Quantification of biofilms**

Cells that were weakly adhered to the biofilm were removed by rinsing with saline, and the remainder were dried at room temperature for a few minutes. After this, 2 mL of a suspension of 0.1% crystal violet was added, and the tubes were kept at rest for 10 min before further rinsing with saline to remove any remaining planktonic cells and the excess dye. Two milliliters of 95% ethanol was added to each test tube, kept for 15 min and transferred to

disposable cuvettes for later reading at an optical density (OD) of 570 nm. The absorbance was measured in a spectrophotometer (Spectrophotometer U-1800, Hitachi) (20).

### **Species identification of clinical isolates**

Clinical isolates were identified by *PRA-hsp65* analysis, as described previously by Chimara et al. (2008). Using primers Tb11 (ACCAACGATGGTGTGTCCAT) and Tb12 (CTTGTCGAACCGCATACCCT), a 441-bp fragment of the *hsp65* gene was amplified, and digested separately with *BstEII* and *HaeIII* (Promega, São Paulo, Brazil) in a thermocycler (Foster City, CA, USA). The digestion patterns obtained were added to GelRed™ (Biotium, Fremont, CA, USA) and gel-loading buffer (6×) (Biotium, Fremont, CA, USA), and underwent electrophoresis on 4 % agarose gel (Ludwig Biotec, Alvorada, Brazil) run at 110 V/cm (21). For interpretation, the patterns observed were compared with published tables and to the patterns reported on PRASITE (22).

### **Cytotoxicity evaluation**

#### **Cell culture and treatments**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) derived from discarded total blood samples of healthy adults were obtained from the Clinical Analysis Laboratory of Centro Universitário Franciscano (LEAC-UNIFRA) (experimental protocol approved by UNIFRA ethics committee for research with human beings, CAAE number: 31211214.4.0000.5306). Blood samples were processed for PBMCs separation through the procedure based on density gradient difference using Ficoll Histopaque-1077® reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After blood disposition into the reagent (1 : 1), samples were centrifuged for 30 min at room temperature. PBMCs were plated in ninety-six-well plates containing RPMI 1640 cellular medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) containing 10% fetal bovine serum, and supplemented with 1% of antibiotics and antimycotic. Cells were cultured at an initial density of  $2 \times 10^5$  cells/mL per well (23). Then, cells were exposed to each compound tested for the efficacy protocol described in this research, at the same concentrations for 24 h, to evaluate their effect on cellular modulation through different colorimetric and fluorimetric assays. All treatments and assays were performed in at least triplicate to ensure coherent statistical analysis; hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at 200 μM was used as a positive control for all assays.

### **Cell viability measurements**

After the period of treatment, cellular viability was evaluated. The first assay performed was the MTT assay using MTT bromide salt {[3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]} reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 5 mg/mL diluted in pH 7.4 phosphate buffer, following the instructions of Mosmann et al. (1983). After 4 h of incubation at room temperature, the intracellular formazan crystals formed were solubilized with DMSO. Absorbance was determined at 570 nm using Anthos 2010 microplate reader equipment (Anthos, London, UK) (24).

To confirm the results obtained from the MTT assay, dsDNA measurement was performed on the extracellular medium, as a parameter of cellular mortality through lysis and dsDNA release. This evaluation was accomplished using PicoGreen<sup>®</sup> reagent following previous descriptions by Ha et al. (2011). This reagent has high dsDNA affinity even when it is present at peak concentrations. Treatment supernatants were plated on dark 96-well plates, and mixed with PicoGreen<sup>®</sup> reagent diluted with TE 1X buffer. After 5 min of incubation at room temperature, fluorescence was determined at 480 nm for excitation and 520 nm for emission using a SpectraMax microplate reader (SpectraMax Solutions Ltd, London, UK) (25).

### **Quantification of total levels of reactive oxygen species**

Quantification of total levels of reactive oxygen species (ROS) was determined using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), as described by Ahn et al. (1996) (26). DCFH-DA reagent has the ability to cross the cellular membrane. Inside the cell, it is deacetylated by mitochondrial enzymes, giving rise to 2',7'-dichlorodihydrofluorescein which reacts with ROS, mainly hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and produces DCFH which emits fluorescence. Treated and untreated PBMCs were mixed with DCFH-DA reagent for 1 h at room temperature. Thus, fluorescence was determined in a spectrofluorimeter (SpectraMax Solutions Ltd, London, UK) based on the wavelengths of 488 nm for excitation and 525 nm for emission (27).

### **Determination of nitric oxide levels**

Nitric oxide level evaluation was performed through an indirect assay used to detect the presence of organic nitrite in the sample, following instructions published by Choi et al. (2012). Nitrite is detected and analyzed by the formation of a pinkish color when Griess

reagent is added to a sample containing  $\text{NO}_2^-$ . The sulfanilamide present in Griess reagent is responsible for the formation of diazonium in the sample. When the azo compound (N-1-naphthylenediamino-bichlorohydrate) interacts with the diazonium salts, pink coloration appears in the sample. Supernatants of PBMCs exposed or not to the compounds in question were transferred to another clear 96-well plate containing 100  $\mu\text{L}$  of Griess reagent. Assay incubation was 15 min at room temperature, and absorbance was determined at 540 nm using an Anthos 2010 microplate reader (Anthos, London, UK) (28).

### Statistical analysis

Biofilm formation was determined by a significant difference between the averages of absorbance obtained in the positive control (culture medium and bacteria) and the average obtained in the negative control (culture medium only). The experiment was performed in triplicate. The OD readings obtained in the biofilm formation assay were recorded as mean  $\pm$  standard deviation (SD), and were submitted to a t-test (compared with the positive control). Values with  $p < 0.05$  were considered to indicate statistical significance.

Cytotoxicity results were presented as % of the untreated control group (NC). Data were expressed as mean  $\pm$  SD. Analyses were performed by 1-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. Values with  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Being \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ . Graphs were prepared using GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## RESULTS

### Susceptibility tests

The susceptibility profiles of standard strains and of clinical isolates of the antimicrobial agents used in the therapy of mycobacteriosis are shown in Tables 2 and 3, respectively.

According to the breakpoints displayed in Table 1, the strain *M. massiliense* was classified as resistant to clarithromycin and sulfamethoxazole, and *M. abscessus* as resistant to clarithromycin. Clinical isolates presented a higher resistance index to sulfamethoxazole (three resistant isolates), followed by ciprofloxacin (two isolates), clarithromycin (two resistant isolates and two isolates with intermediate resistance), doxycycline (one isolate with resistance) and amikacin and imipenem (one clinical isolate with intermediate resistance).



From the results cited above, considering the high resistance index of sulfamethoxazole, the MICs of the new sulfonamide complexes were determined by broth microdilution assay; the susceptibility profiles of strains and of clinical isolates are shown in Tables 4 and 5, respectively.

The results obtained demonstrate that the standard strain *M. massiliense*, which presented a resistance profile to sulfamethoxazole, presented a sensitivity profile to the five new compounds tested. The same condition was observed for clinical isolates II, III and V. The MICs demonstrated, in the great majority of cases, that when complexed with metals, sulfamethoxazole has action against the microorganism in planktonic form potentiated, including standard strains and the clinical isolates.

### **Biofilm formation inhibition test and biofilm destruction test**

The results for the inhibition of biofilm formation and for biofilm destruction are shown in Figs. 1–6. Each figure represents the graphs obtained for the five compounds studied and sulfamethoxazole against the three strains evaluated.

RGM were able to form biofilms at the air–liquid interface and on the surface of polystyrene tubes. Sulfamethoxazole had a slight ability to inhibit the formation of biofilms in the three strains evaluated only at the highest concentrations. The sulfonamides complexed with metals were able to inhibit the formation of these biofilms, when used at subinhibitory concentrations. [Au (sulfamethoxazole)(PPh<sub>3</sub>)] was able to inhibit the formation of *M. abscessus*, *M. massiliense* and *M. fortuitum* biofilms, at all concentrations tested, presenting values similar to those for the negative control, demonstrating a greater capacity to inhibit the formation of RGM biofilms than sulfamethoxazole and other sulfonamides complexed with metals (Figs. 1–3).

Free sulfamethoxazole did not completely destroy biofilms. In action against *M. massiliense* and *M. abscessus* biofilms, sulfamethoxazole showed no difference between microbial growth in the positive control and the growth obtained at the concentrations tested; the same antibiotic, at concentrations ranging from 32 to 1024 µg/mL, showed weak antibiofilm activity for *M. fortuitum*. However, all sulfonamides complexed with metals showed activity, and were able to destroy biofilm to some degree. Besides that, [Au (sulfamethoxazole)(PPh<sub>3</sub>)] and [Cd (sulfamethoxazole)<sub>2</sub>] were able to completely destroy *M. fortuitum* and *M. abscessus* biofilms, respectively, at some concentrations. In addition, [Au (sulfamethoxazole)(PPh<sub>3</sub>)] showed a significant difference compared to the positive control for biofilm destruction for the three strains evaluated at all concentrations tested (Figs. 4–6).

Considering the results obtained in the biofilm inhibition and destruction trials, and the potential demonstrated by [Au (sulfamethoxazolate)(PPh<sub>3</sub>)], the activity of this compound against the clinical isolates was evaluated and compared to the activity of free sulfamethoxazole. Of the six clinical isolates, three formed biofilms under the same conditions to which the standard strains were submitted. The results can be seen in Figs. 7–9. The results show that the compound exhibits much higher activity than free sulfamethoxazole in both antibiofilm activity assays.

### Species identification of clinical isolates

PCR and PRA patterns of clinical isolates of mycobacteria after digestion with *BstEII* and *HaeIII* can be seen in Fig. 10, and the molecular weights of the restriction patterns generated by PRA of clinical isolates and the species identified can be seen in Table 6. Through the analyses, it was verified that all clinical isolates evaluated had a band of 441 base pairs referring to the *hsp65* gene of mycobacteria. The restriction patterns of the isolates were evaluated, and the species identified. All isolates, with the exception of isolate III, were identified as *M. fortuitum* type 1. Isolate III had already been identified as *M. poriferae* type 1.

### Cytotoxicity evaluation

#### Cell viability measurements

In the MTT technique, as expected, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (positive death control) decreased cell viability significantly (cell viability about 69.17%) when compared to the negative control group. As seen in Fig. 11, the majority of the compounds tested maintained cell viability at a similar level to the negative control, except [Hg (sulfamethoxazolate)<sub>2</sub>] which at 4.88 and 19.53 µg/mL presented cell viability around 73.63% and 74.1%, respectively. Also, [Au (sulfamethoxazolate)(PPh<sub>3</sub>)], which presented better antibiofilm activity, reduced cellular viability slightly to 78.02% at 19.53 µg/mL.

A similar profile of cell viability was assessed through free dsDNA quantification, confirming the results obtained via MTT assay; the results can be seen in Fig. 12. Again, [Hg (sulfamethoxazolate)<sub>2</sub>] exposure at the highest concentration was able to increase dsDNA release into the extracellular environment, as well as both concentrations of [Au (sulfamethoxazolate)(PPh<sub>3</sub>)]. However, different from the MTT data, exposure to [Cu<sub>2</sub> (acet)<sub>4</sub>(sulfamethoxazolate)<sub>2</sub>] at 4.88 and 19.53 µg/mL was able to increase dsDNA release

compared to the negative control, as an index of cellular mortality. Despite that, compared to the positive control, all treatments with the compounds tested presented a safe profile or only a slight reduction in cellular viability.

### **Quantification of total levels of reactive oxygen species (ROS)**

After the period of incubation, treated and untreated PBMCs were evaluated for ROS production levels. As shown in Fig. 13, compared to the positive control, all compounds tested presented reduced levels of ROS. However, at some concentrations, especially the highest, a capacity to increase ROS production was shown, but these results were not significant. Moreover, while all concentrations of [Cu<sub>2</sub> (acet)<sub>4</sub>(sulfamethoxazolate)<sub>2</sub>] caused a slight increase in cellular ROS levels, treatment with all concentrations of [Ni (sulfamethoxazolate)<sub>2</sub>] and [Au (sulfamethoxazolate)(PPh<sub>3</sub>)] resulted in ROS amounts similar to that for the negative control.

### **Determination of nitric oxide (NO) levels**

Considering that NO is a reactive nitrogen species (RNS), its total cellular levels were determined (Fig. 14). As expected, treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased total PBMC levels of NO compared to that for the negative control. On the other hand, no concentration of any of the compounds used was able to significantly modify cellular NO production, maintaining it at a similar level to that of the negative control.

## **DISCUSSION**

Microbial resistance is a growing phenomenon that results in a reduced therapeutic arsenal available for the treatment of infections caused by different microorganisms (29). The appearance of non-sensitive bacterial strains, capable of multiplying in the presence of antibacterials at concentrations higher than those used in the clinic, has become a prominent topic when studying mycobacteria (30,31).

Different profiles of susceptibility to drugs used in the clinic were determined in our study, highlighting the importance of prior knowledge of these results, associated with the identification of causal agents, for the implementation of appropriate therapy in the treatment of mycobacteriosis. In evaluating the susceptibility of standard strains, we can observe that the results obtained were similar to those reported by Flores et al. (2016), where *M. massiliense* presented a resistance profile to sulfamethoxazole and clarithromycin and *M.*

*abscessus* to clarithromycin, a profiles also observed in the study by Cardoso et al. (2011) (32). In addition, clinical isolates of RGM identified as *M. fortuitum* (isolates II and V) and *M. poriferae* (isolate III) were also resistant to sulfamethoxazole. Three other clinical isolates were also identified as *M. fortuitum* (isolates I, IV and VI), but demonstrated a sensitivity profile to sulfamethoxazole. These results evidence the need to evaluate the susceptibility of RGM, taking into account that the same species may present different profiles of drug susceptibility (20). Clinical isolate III, identified as *M. poriferae*, was classified as multidrug-resistant (MDR) (33), and the first report of this microorganism was in a clinical isolate of sputum from a patient with chronic bronchitis in the year 2011 (34). This is alarming, since the susceptibility profile proposed by Pujol et al. (2011), in which *M. poriferae* shows sensitivity to the same drugs as used in this study, differs from that in our study, where the microorganism already presents multiresistance. Among RGM, some studies have demonstrated resistance to a broad spectrum of antimicrobials that are commonly used to treat infections caused by these microorganisms (35).

The use of sulfonamides as binders has increasingly attracted attention in supramolecular chemistry because they are able to combine interesting biological activity resources with the ability to coordinate metals from phenylamino and sulfonyl acid groups (36). In view of this, the complexation of sulfamethoxazole with metals becomes a promising alternative in combating mycobacteria.

*In vitro* studies have demonstrated significant results for the use of new sulfonamides complexed with metals in the combat against planktonic RGM (16). In our study, it was demonstrated that sulfamethoxazole derivatives complexed with Au, Hg, Cu, Ni and Cd showed, in the great majority of cases, superior activity to that of free sulfamethoxazole in inhibiting the growth of *M. abscessus*, *M. massiliense* and *M. fortuitum*. The same was observed for the clinical isolates of RGM used in the study, the majority of which had the same or lower MIC for compounds derived from sulfamethoxazole. In another study from our research group, clinical isolates of *M. tuberculosis* were used to evaluate the antimycobacterial activity of the same metal complexes. In this case, there was also high susceptibility of the isolates used to the new compounds when compared to the free drug (15). It is suggested that potentiation of the antimicrobial activity by the metal complexes occurs due to the release of ions into the medium, causing damage to the cell membrane and to the bacterial DNA, allowing greater performance of the drug and causing the death of the target cells (37).

RGM can form structured communities that adhere to solid biotic or abiotic surfaces and at air–liquid interfaces, characterizing one of their most powerful survival mechanisms, known as biofilms (38,39). Mycobacteria within biofilms can withstand much higher concentrations of antimicrobials than their planktonic counterparts, and different mechanisms acting together may explain the resistance of biofilms to antimicrobials and biocides (5, 40).

Biofilms formed by standard strains and clinical isolates of RGM were treated with sulfamethoxazole. After analyzing the results, it was observed that sulfamethoxazole had a limited ability to inhibit the formation of biofilm, slightly inhibiting the formation of microbial film only at the highest concentrations. In the biofilm destruction test, it was observed that *M. abscessus* and *M. massiliense* biofilms and biofilms formed by clinical isolates I and II presented total resistance to the drug; biofilms of *M. fortuitum* and those formed by clinical isolate IV were slightly destroyed by the action of sulfamethoxazole. Confirming our results regarding resistance of RGM biofilms to sulfamethoxazole, Flores et al. (2016) treated RGM biofilms with amikacin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline and sulfamethoxazole, and none of the antimicrobials successfully eradicated bacterial films. In addition, *M. fortuitum* in general was the microorganism that presented the most resistance to antimicrobial inhibitory action when applied before the formation of mature biofilm (20), which corroborates to our results, where the three biofilm-forming clinical isolates that were not susceptible to sulfamethoxazole in sessile form were identified as *M. fortuitum*. In another study, biofilms of *P. aeruginosa* (PA01), methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA UC18) and *E. coli* (BSC11380) were highly tolerant to sulfamethoxazole and other drugs (37).

Biofilms of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense* were treated with sulfamethoxazole derivatives complexed with Au, Cu, Ni, Cd and Hg. The results expressly demonstrate potentiation of the novel compounds in inhibiting the formation of biofilms of the three standard strains; the antibiofilm activity of [Au (sulfamethoxazolate) (PPh<sub>3</sub>)], which was able to completely inhibit biofilm formation, is clearly pronounced. Comparing the MICs and the concentrations capable of inhibiting biofilm for the compounds evaluated, it was observed that all of them were able to inhibit the formation of biofilm at concentrations smaller than their respective MIC. In this way, it was possible to prove inhibition of biofilm formation of the microorganism in the sessile form, and not only inhibition of bacterial growth in the planktonic form, since above the MIC the microorganisms would not be viable for formation of the film. From the biofilm destruction assays, we can observe that no compound was efficient in completely eradicating the microbial film after treatment, but the

gold-complexed sulfamethoxazole had the capacity to significantly destroy the biofilm at all concentrations tested.

Thoroughly exploring the antibiofilm activity of the Au complex, we verified its activity against the three biofilm-forming clinical isolates; the complex showed a high degree of inhibition of biofilm formation in isolates I, II and IV, superior to that presented by free sulfamethoxazole. In addition, it has demonstrated potential in the destruction of biofilms formed in relation to sulfamethoxazole, although this potential is less than that for inhibiting formation of the biofilm. In a study performed by Al-Khodir et al. (2018), results of the antibacterial and antifungal activity of chloramphenicol derivatives with Ca (II), Fe (III), Pd (II) and Au (III) indicated, as in our study, that the gold (III) complex is highly active in relation to the free drug and the other complexes evaluated (41).

It is believed that the greater activity of metal complexes in inhibiting the formation of biofilm in relation to destruction is due to the fact that the tolerance of biofilms to metallic cations is time-dependent. Thus, the coordinated compounds slowly release metal ions from the binder for a longer period in the biofilm formation inhibition assay (11, 42). It can be suggested that the metallic ions can contribute to inhibit the biofilm formation by avoiding physicochemical interactions that mediate the primary adhesion of bacteria to the surface, or by breaking the bacterial cellular communication inside the biofilm, also called quorum sensing, through the interaction between ions and signaling molecules, responsible for the transcription of specific genes which act in the formation and maturation of the biofilm. This could make the microorganisms more susceptible to the action of sulfamethoxazole. (10, 40, 42, 43, 44).

In addition, the substantial thickness and composition of the cell wall of mycobacteria, being hydrophobic and rich in lipids, mainly mycolic acids, make it impermeable to hydrophilic nutrients and resistant to heavy metals, disinfectants and antimicrobials (45). It is suggested that the potentiation of metal-complexed sulfamethoxazole activity can be better understood on the basis of Overtone's concept and Tweedy's chelation theory (46, 47). According to Overtone's concept of cellular permeability, the lipid membrane surrounding the bacterial cell favors the passage only of liposoluble materials, which makes liposolubility an important factor in the control of antimycobacterial and antibiofilm activity. In Tweedy's chelation theory, the polarity of the metal ion is reduced to a greater degree due to overlapping of the ligand orbitals, and the partial sharing of the positive charge of the metal ion with the donor groups. In addition, delocalization of  $\pi$ -electrons on the chelate ring is increased, which consequently increases the liposolubility of the complexes (41, 42, 48, 49).

Therefore, sulfamethoxazole derivatives could penetrate easily the microbial structure, acting even against the most attached microorganisms to the biofilm, which are in the stationary metabolic phase and act as a potential reinfection source (39,50).

It is already known that every compound or pharmacological formulation that presents biological and/or therapeutic activity has to also be safe otherwise it might not be used, or it could induce side effects, which has been a problem with several current commercial drugs of different kinds (51,52). In this study, a cellular *in vitro* experiment was performed to evaluate the cytotoxic and genotoxic profiles of all the antimicrobial structures tested, aiming to prove their safety through a PBMC cell culture model. PBMCs in ideal cell culture conditions have been an excellent experimental model in the cyto-genotoxic field of understanding (51, 53, 54).

The concentrations chosen for each compound to evaluate cellular effects were selected based on previous MIC results obtained. To measure the effect of sulfamethoxazole and its metallic derivatives, two different assays were performed. Through the MTT colorimetric assay, it was shown that all [Hg (sulfamethoxazolate)<sub>2</sub>] and Au concentrations as well as the highest concentration of [Ni (sulfamethoxazolate)<sub>2</sub>] and the lower [Cd (sulfamethoxazolate)<sub>2</sub>] concentration slightly decreased cellular viability. This same profile of cellular viability modulation was found for free dsDNA measurement. Oliveira (2009), in a study with nanostructures, established a classification for standard cellular viability, considering the percentage of modification as non-cytotoxic (viability > 90%), slightly cytotoxic (viability about 80–89%), moderately cytotoxic (viability around 50–79%) or highly cytotoxic (viability < 50%). In this sense, most of the sulfamethoxazole metallic complexes derived can be classified as non-cytotoxic or slightly cytotoxic (55, 56). However, the Hg compound and the highest concentrations of [Ni (sulfamethoxazolate)<sub>2</sub>] and [Au (sulfamethoxazolate)(PPh<sub>3</sub>)] could be cataloged as moderately cytotoxic; fortunately, no compound presented results that could be called highly cytotoxic. These results are in concordance with the pharmacological principle that is currently defended, where a formulation which has effective biological properties and safety profile at small concentrations is preferable (56, 57, 58).

It is already known that there are some molecules which have antimicrobial activity through induction of oxidative stress (59). However, eukaryotic cellular oxidative stress can be a specific pathway to damage cells and reduce cellular viability. For this reason, PBMC ROS production was measured in treated and untreated cells as another method to prove the compounds' safety. It was found that cells exposed to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> positive control presented

high ROS levels compared to those for the negative control, showing that the experimental model was working very well. Different concentrations of  $[\text{Cu}_2(\text{acet})_4(\text{sulfamethoxazole})_2]$  were able to increase cellular ROS production, but these results were not significant against the negative control. On the other hand, cells exposed to the majority of the concentrations evaluated here, including the reference drug and its derivatives, presented levels of oxidative molecule production close to that of the negative control. Oxidative stress can be induced by different particles or molecules able to interact and cause cellular unbalance in the internal antioxidant system and/or directly to the mitochondria (60,61). Several different diseases are associated with mitochondrial dysfunction followed by a reduction in ATP synthesis and an increment in ROS production. This kind of imbalance might cause protein oxidation, lipid peroxidation and targeting and damage of nuclear as well as mitochondrial DNA (60, 62). Also, there are some microorganisms such as *M. tuberculosis*, for example, that can induce cellular death through mitochondrial modulation (63), directly modulating cellular oxidative metabolism. Additionally, mitochondria-targeted antioxidants have been highly associated with effective antibiotic properties (64). So, the exploration and development of a new alternative of antimicrobial therapy with antioxidant capacity and/or that keeps oxidative metabolism standards is the ideal in drug production.

Moreover, cells exposed to all compounds tested did not present modulation of cell NO production, all groups having a similar amount of NO to that of the negative control. These results are in concordance with those for ROS determination, since NO is an RNS that is related to superoxide anion and peroxynitrite synthesis. NO is an endogenous molecule related to different pathways in humans (65, 66), including neuron neurotransmission (67) and the vascular system (68), as well as inflammatory response activation (69). The inflammatory response is very important for elimination of any bacterial infection; however, it might be controlled (70, 71). In this sense, every effective antimicrobial drug or molecule might preferably eliminate the etiologic agent, and maintain inflammatory activator molecules at a basal level, or even contribute to anti-inflammatory cytokine production after bacterial elimination. Jamaati et al. (2017), in a review study, have described the importance of NO in *Mycobacterium* pathogenesis. This gaseous molecule is involved in a significant pathway that works to exclude mycobacteria through macrophage activation (72). In this sense, considering the contribution of NO in microbial combat, and the necessity for controlled inflammatory activation, the majority of the formulations tested look to be potential mediators of NO maintenance.



As an *in vitro* investigational protocol, limitations are present, and additional evaluations using a different experimental design are needed. However, all cyto-genotoxic data are suggestive that the majority of sulfamethoxazole metallic derivatives are antimicrobial alternatives as well as safe molecules which could be used as potential therapeutic agents for bacterial and biofilm elimination.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)” and “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)” for Brazilian financial support.

## REFERENCES

1. **Huang, C.W. et al.** 2012. Synergistic activities of tigecycline with clarithromycin or amikacin against rapidly growing mycobacteria in Taiwan. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 41, p. 218-223. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.10.021
2. **Ghafli, H.A.; Hajoj, S.A.** 2017. Nontuberculous Mycobacteria in Saudi Arabia and Gulf Countries: A Review. *Canadian Respiratory Journal*. v. 2017, p. 1- 13. doi: 10.1155/2017/5035932
3. **Kim, S. H.; Shin, J. H.** 2018. Identification of nontuberculous mycobacteria using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, hsp65, and rpoB. *J Clin Lab Anal*, v. 32, n. 1. doi: 10.1002/jcla.22184.
4. **King, H. C. et al.** 2017. Environmental reservoirs of pathogenic mycobacteria across the Ethiopian biogeographical landscape. *Plos One*. v. 12, n. 3, p. 1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0173811.g001
5. **Aung T. T.; Yam, J. K. H.; Lin, S.; Salleh, S. M.; Givskov, M. Liu, S. Lwin, N. C.; Yang, L.; Beuerman, R. W.** 2016. Biofilms of pathogenic nontuberculous mycobacteria targeted by new therapeutic approaches. *Antimicrob Agents Chemother* 60:24–35. doi: 10.1128/AAC.01509-15.

6. **Ojha, A.; Hatfull, G.F.** 2007. The role of iron in *Mycobacterium smegmatis* biofilm formation: the exochelin siderophore is essential in limiting iron conditions for biofilm formation but not for planktonic growth. *Molecular Microbiology*. v. 66, n. 2, p. 468-483. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05935.x
7. **Bonez, P. C. et al.** 2017. Anti-biofilm activity of A22 ((S-3,4-dichlorobenzyl) isothioureia hydrochloride) against *Pseudomonas aeruginosa*: Influence on biofilm formation, motility and bioadhesion. *Microbial Pathogenesis*. v. 111, p. 6-13. doi: 10.1016/j.micpath.2017.08.008.
8. **Macedo J.L.S; Maierovitch, C.; Henriques, C.M.P.** 2009. Postoperative infections due to rapidly growing mycobacteria in Brazil. *Brazilian Journal of Plastic Surgery*. v.24, n.4, p.544-551.
9. **Arai, M.; Niikawa, H.; Kobayashi, M.** 2013. Marine-derived fungal sesterterpenes, ophiobolins, inhibit biofilm formation of *Mycobacterium* species. *Journal of Natural Medicines*. v.67, p.271-275. doi: 10.1007/s11418-012-0676-5.
10. **Lewis, K.** 2011. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. v. 45, n. 4, p. 999-1007. doi: 10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001
11. **Mizdal, C.** 2017. Anti-biofilm and Antibacterial Effects of Novel Metal-coordinated Sulfamethoxazole Against *Escherichia coli*. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 14, p. 339-344. doi: 10.2174/1570180813666160930101653
12. **Chohan, Z. H. et al.** 2010. Some new biologically active metal-based sulfonamide. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 7, p. 2893-2901. doi: 10.1016/j.ejmech.2010.03.014.
13. **Owen, D.J.; Davis, C. B.; Hartnell, R. D.; Madge, P. D.; Thomson, R. J.; Chong, A.K.J.; Coppel, R. L.; Itzstein, M.** 2007. Synthesis and evaluation of galactofuranosyl N, N-dialkylsulfenamides and sulfenamides as antimycobacterial agents. *Bioorg Med Chem*, v. 17, n. 8, p. 2274-2277. doi: 10.1016/j.bmcl.2007.01.068

14. **Wilkinson, B. L. et al.** 2007. Anti-mycobacterial activity of a bis-sulfonamide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 17, n. 5, p. 1355–1357. doi: 10.1016/j.bmcl.2006.11.079
15. **Agertt, V. A.; Marques, L. L., Bonez, P.C. ; Dalmolin, T. V. ; Oliveira, G. M.; Campos, M.M.A.** 2013. Evaluation of antimycobacterial activity of a sulphonamide derivative. *Tuberculosis (Edinburgh)*, v. 93, p. 318. doi: 10.1016/j.tube.2013.02.003
16. **Agertt, V. A.; Bonez, P.C.; Rossi, G. G.; Flores, V. C.; Siqueira, F. S.; Mizdal, C.R. ; Marques, L. L.; Oliveira, G. M.; Campos, M. M. A.** 2016. Identification of antimicrobial activity among new sulfonamide metal complexes for combating rapidly growing mycobacteria. *BioMetals (Oxford)*, v. 29, n. 5, p. 807-816. doi: 10.1007/s10534-016-9951-3
17. **Ramasamy, M.; Lee, J.** 2016. Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices. *BioMed Reserarch International*. v. 16, p. 1-17. doi: 10.1155/2016/1851242
18. **Marques L. L.** Synthesis, structure and antimicrobial activity evaluation of meralllic complezes with sulfamethoxazole. Thesis presented to post-graduate course in Pharmaceutical Sciences. Federal University of Santa Maria. 2007.
19. **CLSI.** 2011. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes. Approved standard. CLSI document M24-A2. CLSI, Wayne, PA. v. 31, n. 5.
20. **Flores, V. C. et al.** 2016. Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis. *Microbial Pathogenesis*, v. 99, p. 229-235. doi: 10.1016/j.micpath.2016.08.017.
21. **Chimara, E. et al.** 2008. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. *BMC Microbiology*, v. 8, n. 48, p 1-12. doi: 10.1186/1471-2180-8-48

22. **Telenti, A; Marchesi, F.; Balz, M.; Bally, F.; Bottger, E.C.; Bodmer, T.** 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*, v. 31, n. 2, p. 175-178.
23. **Botton, G.; Pires, C. W.; Praetzel, J. ; Sadrillo, M. R.** 2015 . Induction of cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. *International Endodontic Journal Online*, v. 1, p. 12-18 doi: [.http://dx.doi.org/10.1111/iej.12509](http://dx.doi.org/10.1111/iej.12509).
24. **Mosmann, T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55–63.
25. **Há, T. T. N.; Huy, N. T.; Murao, L. A.; Lan, N. T. P.; Thuy, T. T.** 2011. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. *PloS One*, v. 6, n. 10. doi: [10.1371/journal.pone.0025969](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025969)
26. **Ahn, S.J.; Costa, J.; Emanuel, J.R.** 1996. PicoGreen quantification of DNA: Effective evaluation of samples Pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 24, n. 13, p. 2623–2625.
27. **Esposti, M. D.** 2002. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods*. v. 26, n. 4, p.335-340, 2002. doi: [10.1016/S1046-2023\(02\)00039-7](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00039-7)
28. **Choi, W. S.; Shin, P. G.; Lee, J. H.; Kim, G. D.** 2012. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cell Immunol*, v. 280, n.2, 164-170. doi:[10.1016/j.cellimm.2012.12.007](https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.007).
29. **Chua, S. L. et al.** 2014. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. *Nat commun*, v. 5, p. 1-12. doi: [10.1038/ncomms5462](https://doi.org/10.1038/ncomms5462)

30. **Wellington, E. M. H. et al.** 2013. 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. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70317-1
  
31. **Mertaniasih, N. M. et al.** 2017. Nontuberculous mycobacterial species and *Mycobacterium tuberculosis* complex coinfection in patients with pulmonary tuberculosis in Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia. *The International Journal of Mycobacteriology*. v. 6, n. 1, p. 9-13. doi: 10.4103/2212-5531.201894.
  
32. **Cardoso, A.M.; Junqueira-Kipnis, A.P.; Kipnis, A.** 2011 *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium massiliense* Recovered from wound samples of patients submitted to arthroscopic and laparoscopic surgeries, *Minim. Invasive Surg.*, v. 2011. doi: 10.1155/2011/724635.
  
33. **Magiorakos, A. P. et al.** 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance, *Clin. Microbiol. Infect.* 18 (2012) 168-281, doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
  
34. **Pujol, F. B. I; Alcaide, F.; Pizarro, I.; Simo, J. M.; Camps, J. J.** 2011. First Human Isolate of *Mycobacterium poriferae* in the Sputum of a Patient with Chronic Bronchitis. *Journal Of Clinical Microbiology*, p. 3107–3108 v. 49, n. 8. doi:10.1128/JCM.00436-11
  
35. **Pérez, A.O.; Hijas, N.M.; Rodríguez, N.A.; Molina-Manso, D.; Fernández-Roblas R, Esteban J.** 2011. Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. v. 29, n. 2, p. 79-84 doi: 10.1016/j.eimc.2010.08.016.
  
36. **Shah, S. S.; Rivera, G.; Ashfaq, M.** 2013. Recent advances in medical 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. doi: 10.2174/1389557511307010070

37. **Kostenko, V; Lyczak J.; Turner, K.; Martinuzzi, R. J.** 2010 Impact of silver-containing wound dressings on bacterial biofilm viability and susceptibility to antibiotics during prolonged treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 12, p. 5120–51310. doi: 10.1128/AAC.00825-10
38. **Aung, T.T.; Yam, J.KH.; Lin, S.; Salleh, S.M.; Givskov, M.; Liu, S.; Lwin, N. C.; Yang, L.; Beuerman, R.W.** 2016. Biofilms of pathogenic nontuberculous mycobacteria targeted by new therapeutic approaches. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 60, p. 24–35. doi:10.1128/AAC.01509-15.
39. **Lewis, K.** 2012. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 211, p. 121-133, 2012. doi: doi: 10.1007/978-3-642-28951-4\_8
40. **Xiang, X.; Deng, W.; Liu, M.; Xie, J.** 2014. *Mycobacterium* Biofilms : Factors Involved in Development , Dispersal , and Therapeutic Strategies Against Biofilm-Relevant Pathogens. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, v. 24, n. 3, p. 269-279. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2014010545
41. **Al-Khodir , F. A. I.; Refat , M. S.;** 2016. Synthesis, spectroscopic, thermal and anticancer studies of metal antibiotic chelations: Ca(II), Fe(III), Pd(II) and Au(III) chloramphenicol complexes. *Journal of Molecular Structure*, v. 1119, p. 157-166. doi: 10.1016/j.molstruc.2016.04.069
42. **Lemire, J. A.; Harrison, J. J.; Turner, R. J.** 2013 Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology* , v. 11, p. 371-383; doi: 10.1038/nrmicro3028
43. **Sharma, I. M.; Petchiappan, A.; Chatterji, D.** 2014. *Quorum sensing* and biofilm formation in mycobacteria: Role of c-di-GMP and methods to study this second messenger. *IUBMB Life*. V. 66, n. 12, p. 823-834. doi:10.1002/iub.1339.

44. **Trentin, D. S.; Giordani, R. B.; Macedo, A. J.** 2013. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*, v. 14, n. 22, p. 113-238.
45. **Johnson, M. M.; Odell, J. A.** 2014. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Journal of Thoracic Disease*. v. 6, n. 3, p. 210-220. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.12.24.
46. Tweedy, B. G.; Turner, N. Effect of dacthal on soil microorganisms. ***Phytopathology***, v. 55, n. 10, p. 1080-1098, 1965.
47. **Raman, N.; Kulandaisamy, A.; Thangaraj, C.** Synthesis, structural characterisation and electrochemical and antibacterial studies of Schiff base copper complexes. *Transition Metal Chemistry*, v. 29, e. 2, p. 129–135. doi: 10.1023/B:TMCH.0000019409.50574.0a
48. **Sartaj, T; Assim, A.; Farukh, A.; Mohd, A.; Bagchi, V.** 2012. Synthesis and characterization of copper(II) and zinc(II)-based potential chemotherapeutic compounds: Their biological evaluation viz. DNA binding profile, cleavage and antimicrobial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 58, p. 308-316. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.09.051
49. **Dharmaraj, N.; Viseanathamurthi, P.; Natarajan, K.** 2001. Ruthenium(II) complexes containing bidentate Schiff bases and their antifungal activity. *Transition Metal Chemistry*, v. 26, n. 1-2, p. 105-109, doi: 10.1023/A:1007132408648
50. **Nessar, R.; Cambau, E. ; Reyrat, J. M. ; Murray, A.; Gicquel, B.** 2012. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother* 2012; v. 67, n. 4, p. 810–818. doi:10.1093/jac/dkr578
51. **Sagrillo, M. R.; Garcia, L. F. M.; FILHO, O. C. S.; Duarte, M. M. M. F.; Ribeiro, E. E. ; Cadona, F. C. ; Cruz, I. B. M.** 2015 . Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human

- lymphocytes. *Food Chemistry*, v. 173, p. 741-748. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.067
52. **Pavelka, K.; Kivitz, A; Dokoupilova, E.; Blanco, R.; Maradiaga, M.; Tahir, H.; Pricop, L.; Andersson, M.; Readie, A.; Porter, B.** 2017. Efficacy, safety, and tolerability of secukinumab in patients with active ankylosing spondylitis: a randomized, double-blind phase 3 study, MEASURE 3. *2017 Arthritis Res Ther.* 2017 Dec 22;19(1):285. doi: 10.1186/s13075-017-1490-y.
53. **Boligon, A. A.; Pereira, R. P.; Feltrin, A. C.; Machado, M. M; Janovik, V.; Rocha, J. B. T.** 2009. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Biores Technol.* v. 100, n. 24, p. 6592-6598. doi: 10.1016/j.biortech.2009.03.091.
54. **Boligon, A. A.; Sagrillo, M. R. ; Garcia, L. F. M. ; Souza-Filho, O. C.; Machado, M. M.; Cruz, I. B. M. ; Athayde, M. L.** 2012. Protective Effects of Extracts and Flavonoids Isolated from *Scutia buxifolia* Reissek against Chromosome Damage in Human Lymphocytes Exposed to Hydrogen Peroxide. *Molecules (Basel. Online)*, v. 17, p. 5757-5769. doi: 10.3390/molecules17055757
55. **Oliveira M. P.** 2009. Análise *in vitro* da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana. Tese de mestrado em Medicina e Ciências da Saúde da Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.
56. **Mendes, L. P. ; Delgado, J. M. F.; Costa, A. D.; Vieira, M.S. ; Benfica, P; LIMA, E. M. ; Valandares, M. C.** 2015. Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: the number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. *Toxicology in Vitro*, v. 14, p. 270-277. doi: 10.1016/j.tiv.2014.12.021
57. **Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.** 2016. Henderson, G. *Pharmacology*, 8th Edition: Elsevier.



58. **Machado, A.K.; Andrezza, A. C.; Silva, T. M.; Boligon, A. A.; Nascimento, V.; Scola, G.; Duong, A.; Cadoná, F.C. ; Ribeiro, E. E.; Cruz, I. B. M.** 2016. Neuroprotective effects of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against rotenone *in vitro* exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Print), v. 2016, p. 1. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8940850>
59. **Wang, L.; Hu, C.; Shao, L.** 2017. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, v. 12, p. 1227–1249. doi: 10.2147/IJN.S121956
60. **Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M.** 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* v. 160, n. 1, p. 1-40. doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009 p 1-40
61. **Rosenfeldt, F.; Wilson, M.; Lee, G. Kure, C.; Ou, R.; Braun, L.; de Haan, J.** 2013. Oxidative stress in surgery in an ageing population: pathophysiology and therapy. *Exp Gerontol*, v. 48, n. 1, p. 45-54. doi: 10.1016/j.exger.2012.03.010.
62. **Kirkinezos I. G; Moraes, C. T.** 2001. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol*, v. 12, n. 6, p. 449-457. doi: 10.1006/scdb.2001.0282
63. **Aguilo, N.; Uranga, S.; Marinova, D.; Martín, C.; Pardo, J.;** 2014. Bim is a crucial regulator of apoptosis induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Death and Disease*, v. 5, n. 1343, p. 1-10. doi:10.1038/cddis.2014.313
64. **Nazarov, P. A. et al.** 2017. Mitochondria-targeted antioxidants as highly effective antibiotics. *Sci Rep*, v. 7, n. 1, p. 1-12. doi: 10.1038/s41598-017-00802-8
65. **Salvador, M.; Annie, H.** 1993. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med*, v. 329, n. 27, p. 2002-2012. doi: 10.1056/NEJM199312303292706
66. **Monteiro, H. P.; Silva, E. F.; Sternd, A.** 2004. Nitric oxide: a potential inducer of adhesion-related apoptosis—anoikis. *Nitric Oxide*, v. 10, p. 1–10. doi:10.1016/j.niox.2004.02.002

67. **Carletti, F; Gambino, G; Rizzo, V; Ferrar,o G; Sardo, P.** 2017. Neuronal nitric oxide synthase is involved in CB/TRPV1 signalling: Focus on control of hippocampal hyperexcitability. *Epilepsy Res.* v. 138, p. 18-25. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2017.09.018.
68. **Schuh, A. K.; Sheybani, B.; Jortzik, E.; Niemann, B.; Wilhelm, J.; Boening, A.; Becker, K.** 2018. Redox status of patients before cardiac surgery. *Redox Rep.*, v. 23, n. 1, p. 83-93. doi: 10.1080/13510002.2017.1418620.
69. **Matheus, M. E.; de Oliveira, F. S. B.; Silveira, C. S.; Rodrigues, V. P de Sousa; Menezes, F. Fernandes, P. D.** 2006. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. *J Ethnopharmacol.* v. 107, n. 2, p; 291-296. doi: 10.1016/j.jep.2006.03.010
70. **O'connell, R. M.; Kahn, D.; Gibson, W. S.; Round, J. L.; Scholz, R. L.; Chaudhuri, A. A.; Kahn, M. E.; Rao, D. S.; Baltimore, D.** 2010. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity.* v. 33, p. 607-619. doi: 10.1016/j.immuni.2010.09.009.
71. **Dhand, I.; Ma, W.; Hussain, T.** 2015. Angiotensin AT2 receptor stimulation is anti-inflammatory in lipopolysaccharide-activated THP-1 macrophages via increased interleukin- 10 production. *Hypertension Research.* v. 38, p. 21-29. doi: 10.1038/hr.2014.132.
72. **Jamaati, H. et al.** 2017. Nitric Oxide in the Pathogenesis and Treatment of Tuberculosis , *Front. Microbiol.*, v. n. 8, p. 1-11. doi: 10.3389/fmicb.2017.02008

## TABLES

**Table 1:** Breakpoints for the rapidly growing mycobacteria.

Antimicrobial Agent	Minimal Inhibitory Concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ ), by category		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Amikacin	$\leq 16$	32	$\geq 64$
Ciprofloxacin	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Clarithromycin	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Doxycycline	$\leq 1$	2-4	$\geq 8$
Imipenem	$\leq 4$	8-16	$\geq 32$
Sulfamethoxazole	$\leq 38$	-	$\geq 76$

**Table 2:** Standard susceptibility *in vitro* of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense*.

Antimicrobial agent	Minimal Inhibitory Concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	<i>M. abscessus</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. massiliense</i>
Amikacin	2	2	2
Ciprofloxacin	1	0.500	0.250
Clarithromycin	16 *	1	32 *
Doxycycline	0.125	0.250	1
Imipenem	2	4	2
Sulfamethoxazole	8	32	128*

\* Resistance index.

**Table 3:** Susceptibility *in vitro* of clinical isolates of rapidly growing mycobacteria.

Antimicrobial agent	Minimal Inhibitory Concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	I	II	III	IV	V	VI
Amikacin	2	2	8	32**	1	0,5
Ciprofloxacin	4*	4*	0,312	0,125	1	0,125
Clarithromycin	2	0,5	64*	16*	4**	4**
Doxycycline	0,125	0,5	32*	0,250	2	0,125
Imipenem	8**	4	0,25	1	0,5	1
Sulfamethoxazole	16	128*	128*	16	128*	32

\* Resistance index. \*\* Intermediate Resistance

**Table 4:** Values of the minimum inhibitory concentration for the standard strains of rapidly growing mycobacteria.

Compound	Minimal Inhibitory Concentrations (µg/mL)		
	<i>M. abscessus</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. massiliense</i>
[Hg(sulfamethoxazolate) <sub>2</sub> ]	19,52	4,88	19,52
[Cu <sub>2</sub> (acet) <sub>4</sub> (sulfamethoxazolate) <sub>2</sub> ]	2,44	19,52	4,88
[Ni(sulfamethoxazolate) <sub>2</sub> ]	9,76	19,52	9,76
[Au(sulfamethoxazolate)(PPh <sub>3</sub> )]	19,52	19,52	9,76
[Cd (sulfamethoxazolate) <sub>2</sub> ]	2,44	9,76	2,44

**Table 5:** Values of the minimum inhibitory concentration for the clinical isolates of rapidly growing mycobacteria.

Compounds	Minimal Inhibitory Concentrations (µg/mL)					
	I	II	III	IV	V	VI
[Hg(sulfamethoxazolate) <sub>2</sub> ]	2,44	2,44	1,22	4,88	19,52	4,88
[Cu <sub>2</sub> (acet) <sub>4</sub> (sulfamethoxazolate) <sub>2</sub> ]	19,52	9,76	4,88	19,52	4,88	19,52
[Ni(sulfamethoxazolate) <sub>2</sub> ]	78,12	9,76	4,88	19,52	9,76	19,52
[Au(sulfamethoxazolate)(PPh <sub>3</sub> )]	2,44	4,88	9,76	19,52	9,76	19,52
[Cd (sulfamethoxazolate) <sub>2</sub> ]	39,06	19,52	9,76	9,76	2,44	9,76

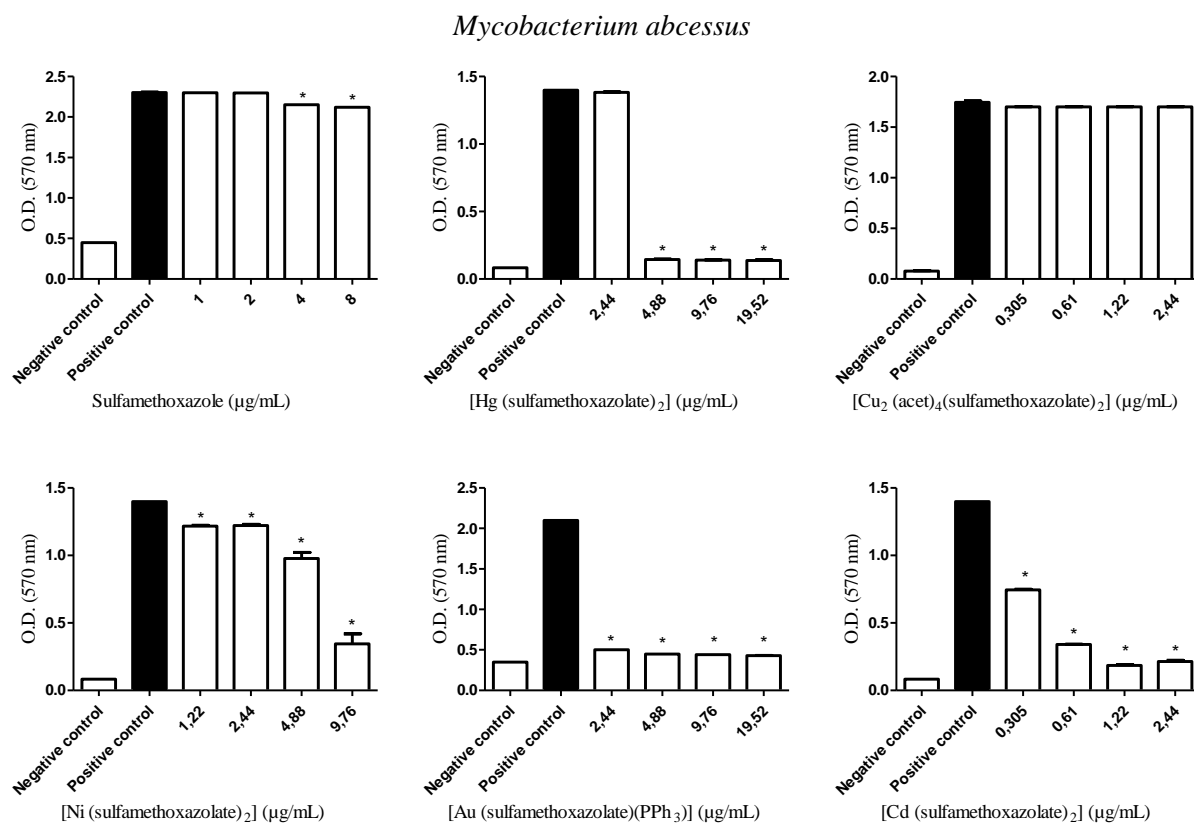
**Table 6.** Molecular weight values of the restriction patterns generated by PRA of clinical isolates.

Clinical Isolate	PRA pattern	Molecular weight values	
		<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>
I	<i>M. fortuitum</i> type 1*	235 / 120 / 85	145/120/60
II	<i>M. fortuitum</i> type 1*	235 / 120 / 85	145/120/60
III	<i>M. poriferae</i> type 1**	235/210	160 / 95 / 50
IV	<i>M. fortuitum</i> type 1*	235 / 115 / 100	145/120/60
V	<i>M. fortuitum</i> type 1*	235 / 115 / 100	145/120/60
VI	<i>M. fortuitum</i> type 1*	235 / 115 / 100	145/120/60

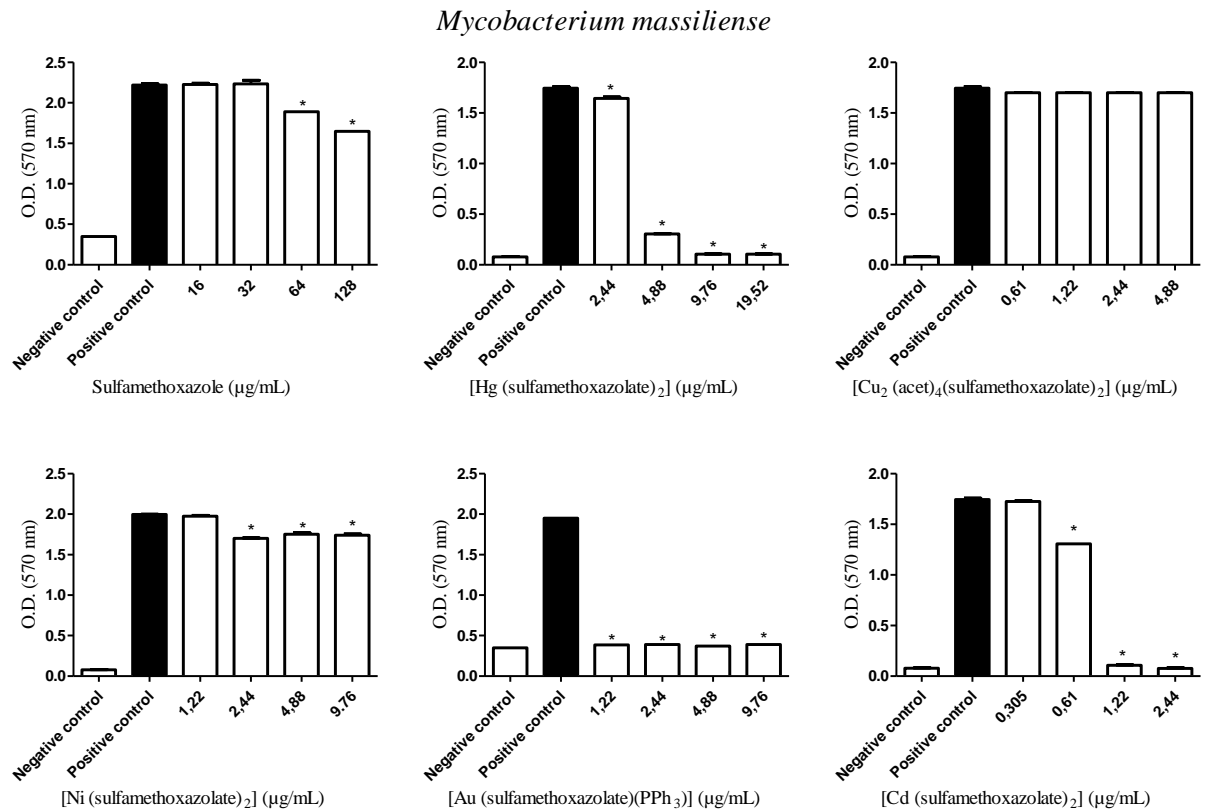
\* As described by Telenti *et al.* (1993).

\*\* As described by by Padgitt and Moshier (1987).

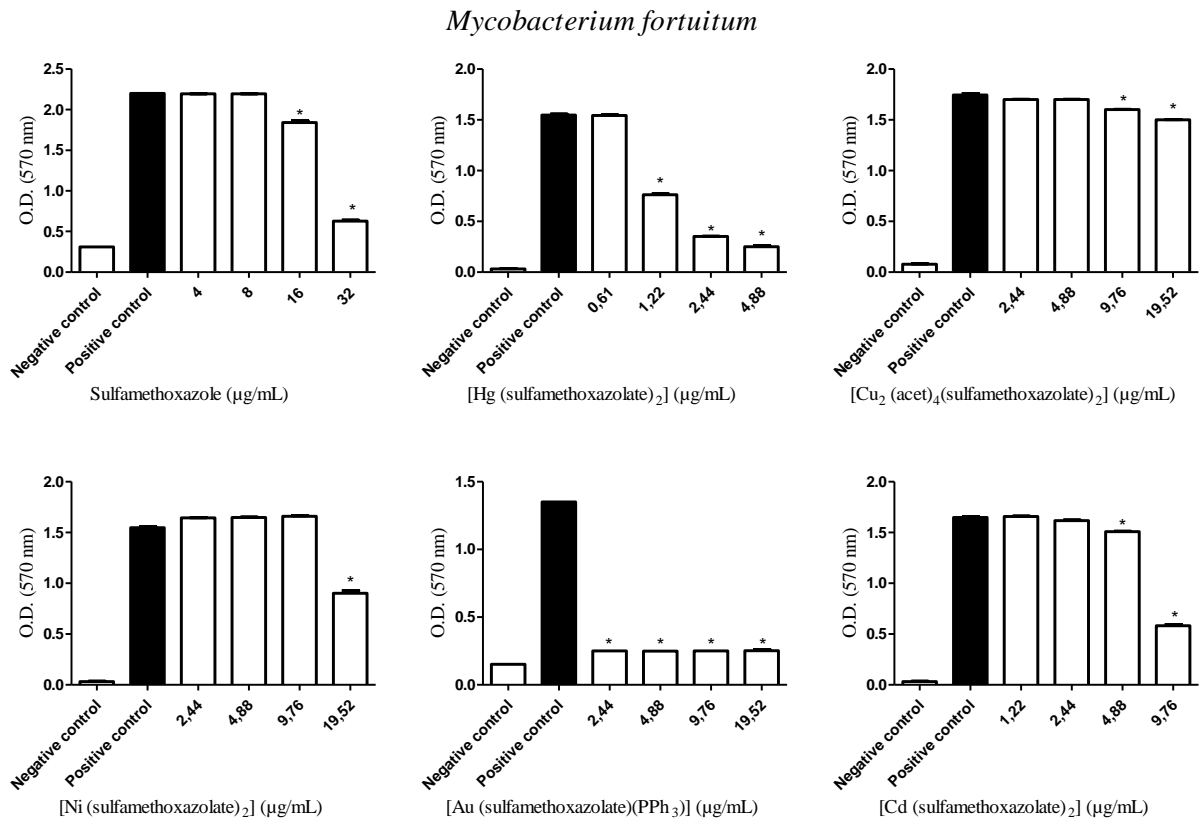
## FIGURES



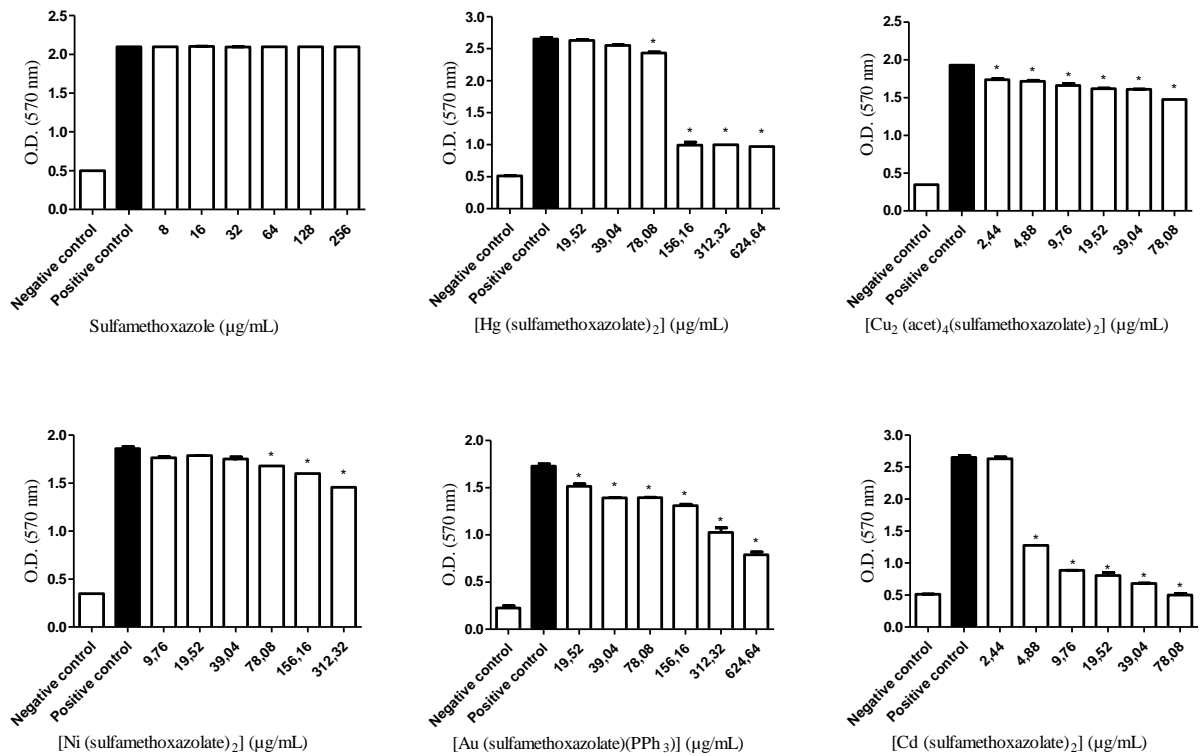
**Fig. 1.** Effect of different concentrations of Compounds on the inhibition of the biofilm from *Mycobacterium abscessus*. \* Represents significant difference between the concentration tested and the positive control (PC). The tests were subjected to the Student t-test (n = 3), considering statistical differences when  $p < 0.05$ .



**Fig. 2.** Effect of different concentrations of Compounds on the inhibition of the biofilm from *Mycobacterium massiliense*. \* Represents significant difference between the concentration tested and the positive control (PC). The tests were subjected to the Student t-test (n = 3), considering statistical differences when  $p < 0.05$ .

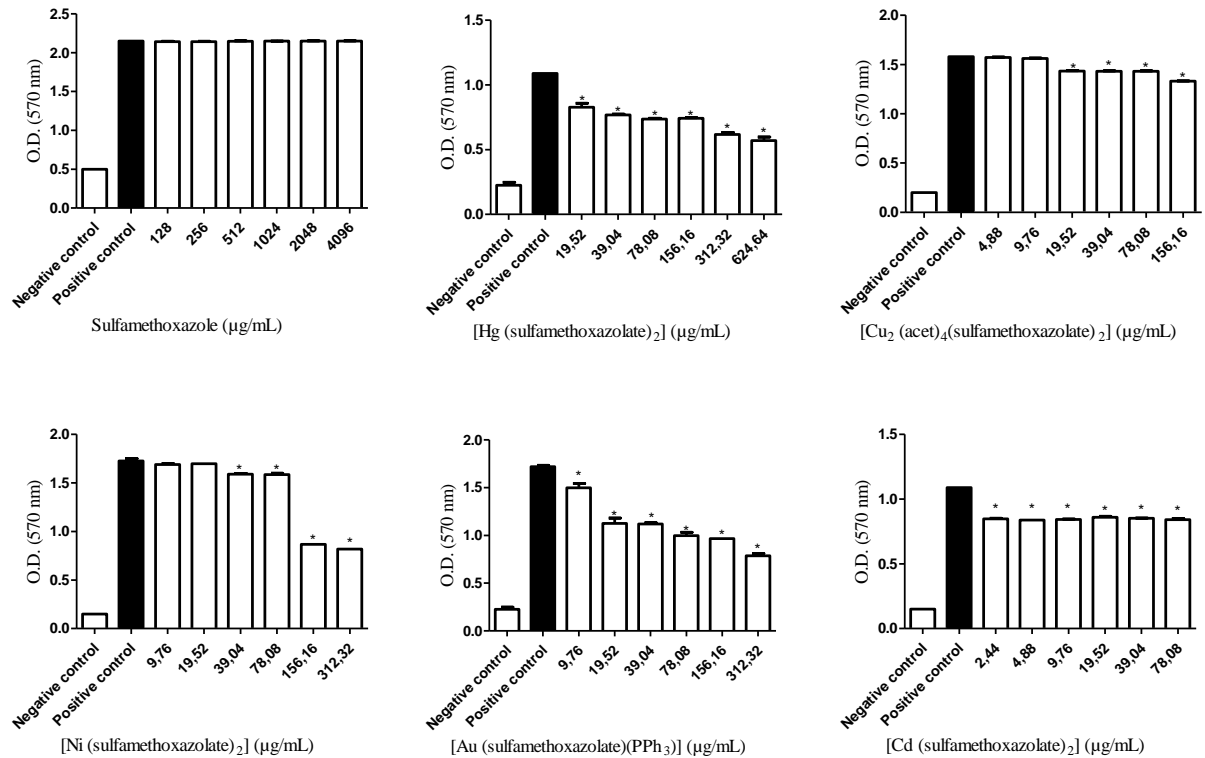


**Fig. 3.** Effect of different concentrations of Compounds on the inhibition of the biofilm from *Mycobacterium fortuitum*. \* Represents significant difference between the concentration tested and the positive control (PC). The tests were subjected to the Student t-test ( $n = 3$ ), considering statistical differences when  $p < 0.05$ .

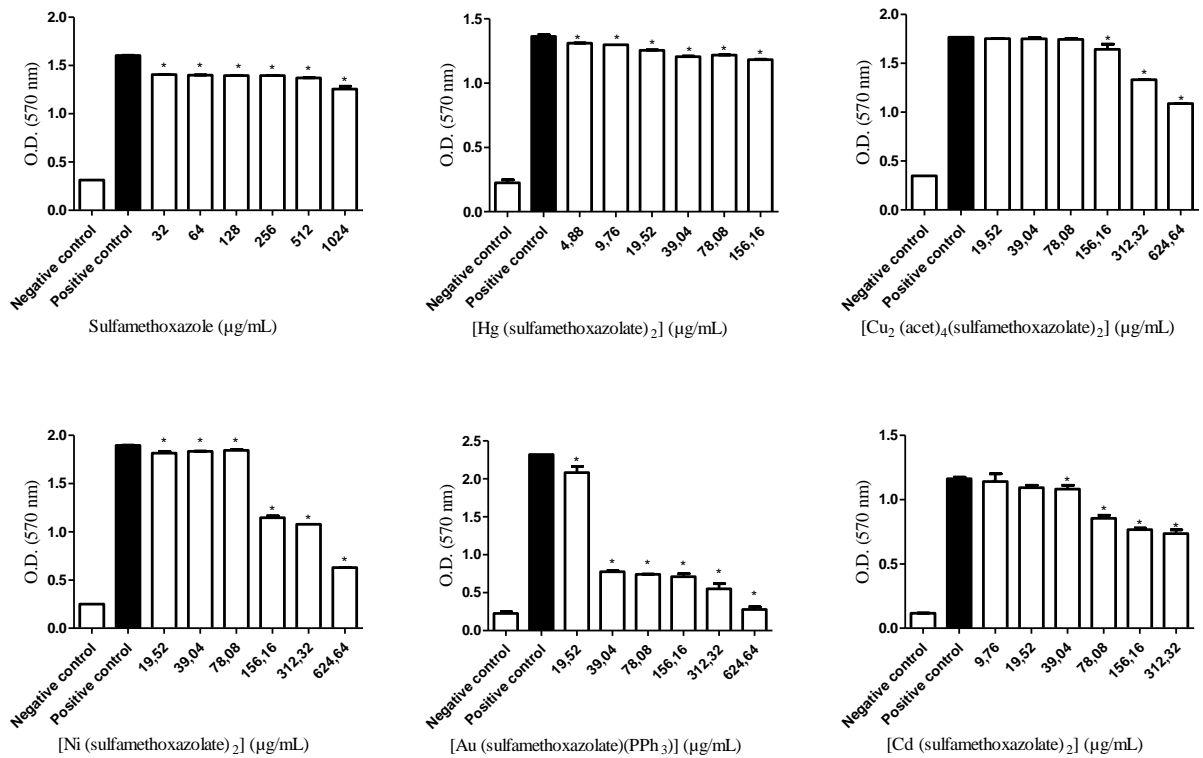
*Mycobacterium abscessus*

**Fig. 4.** Effect of different concentrations of Compounds on the destruction of the biofilm from *Mycobacterium abscessus*. \* Represents significant difference between the concentration tested and the positive control (PC). The tests were subjected to the Student t-test ( $n = 3$ ), considering statistical differences when  $p < 0.05$ .

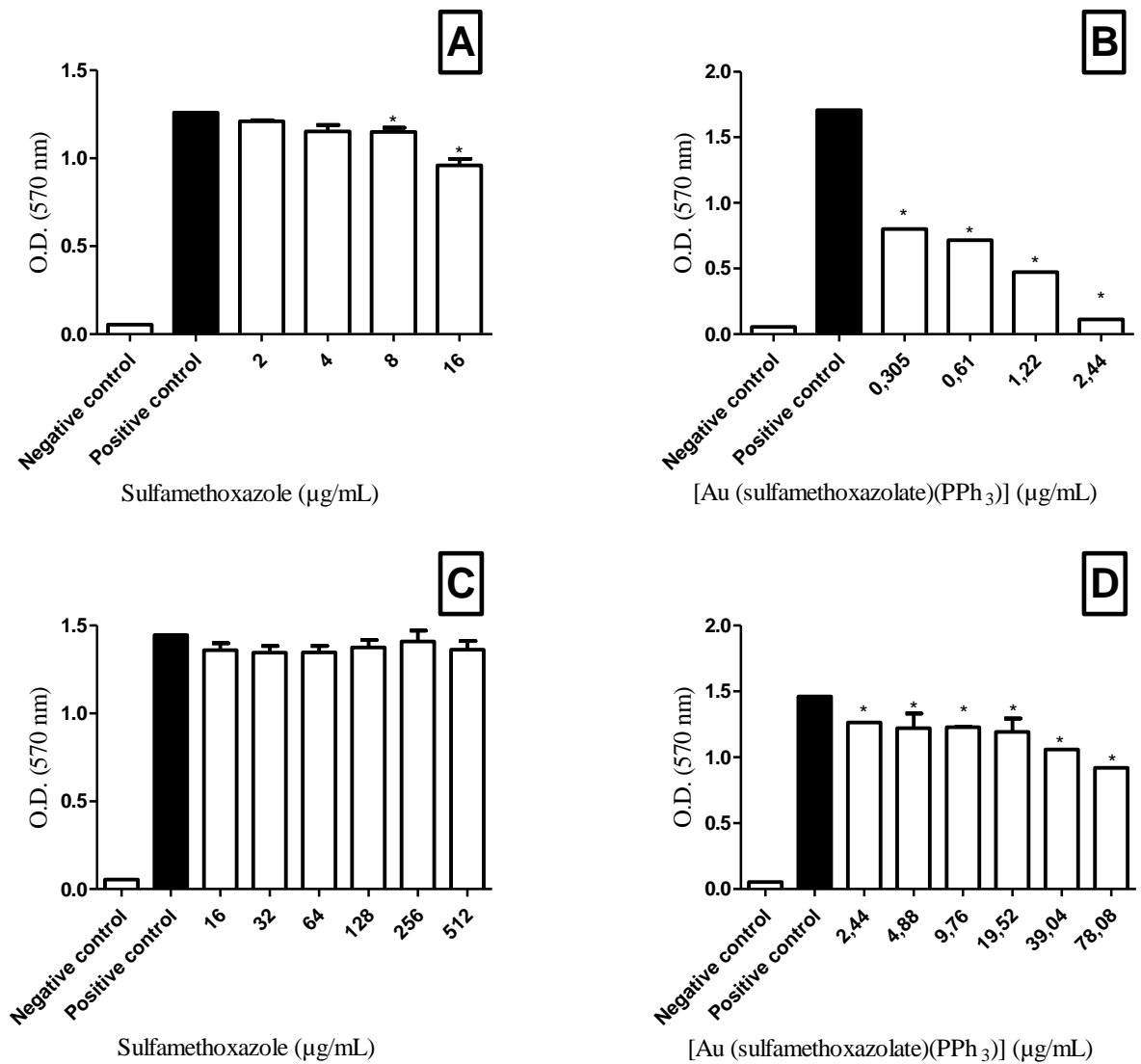


*Mycobacterium massiliense*

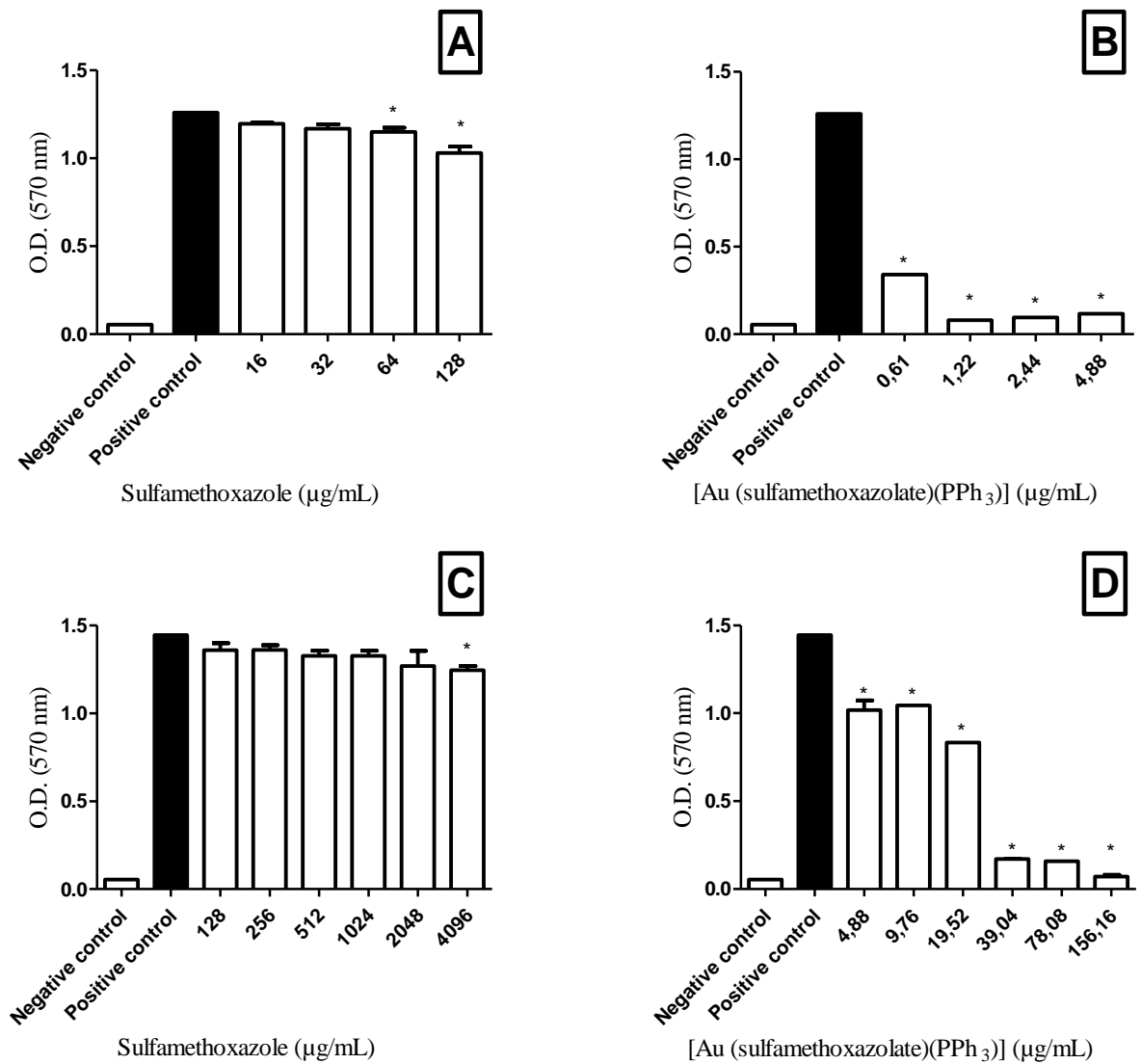
**Fig. 5.** Effect of different concentrations of Compounds on the destruction of the biofilm from *Mycobacterium massiliense*. \* Represents significant difference between the concentration tested and the positive control (PC). The tests were subjected to the Student t-test ( $n = 3$ ), considering statistical differences when  $p < 0.05$ .

*Mycobacterium fortuitum*

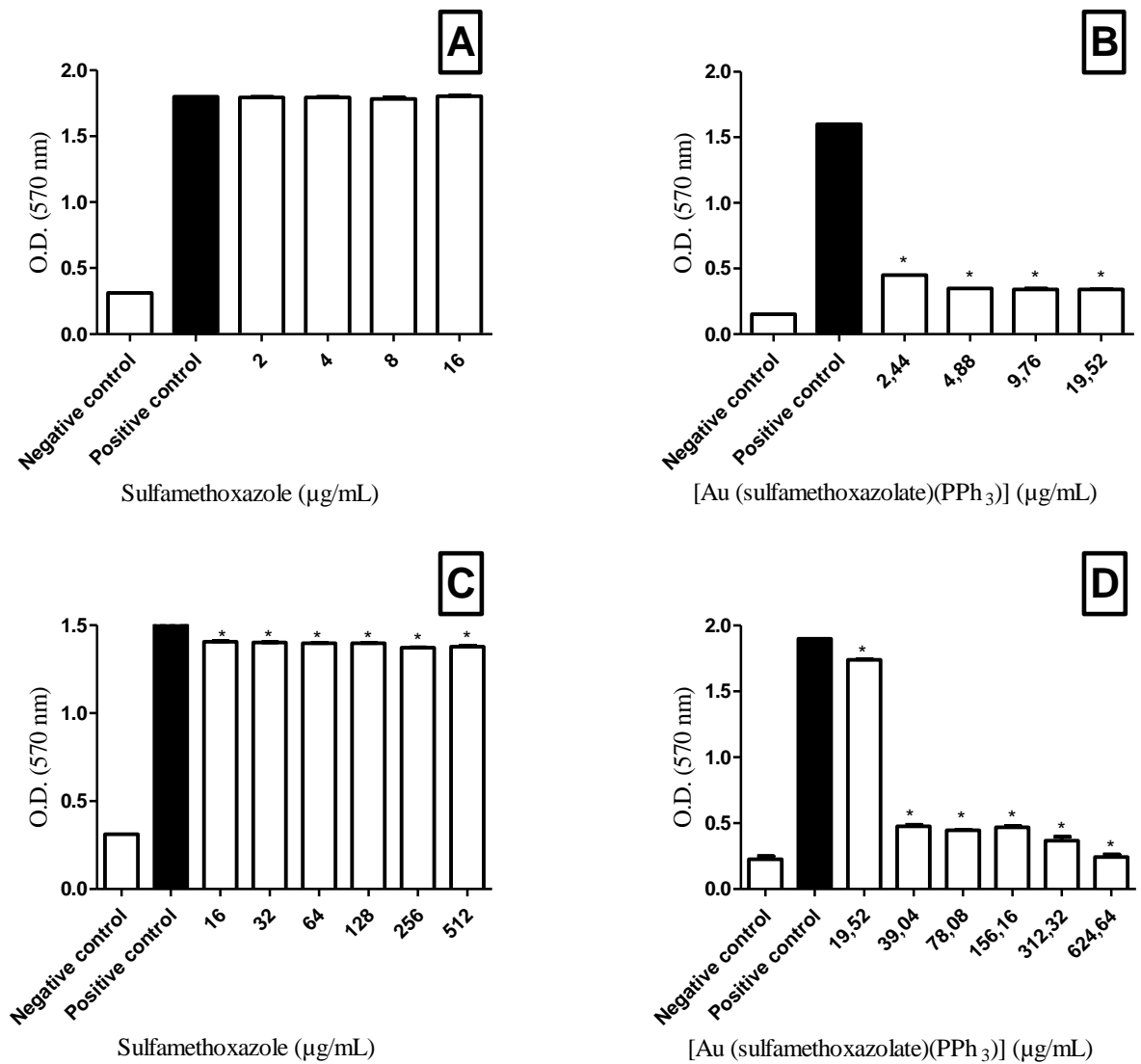
**Fig. 6.** Effect of different concentrations of Compounds on the destruction of the biofilm from *Mycobacterium fortuitum*. \* Represents significant difference between the concentration tested and the positive control (PC). The tests were subjected to the Student t-test ( $n = 3$ ), considering statistical differences when  $p < 0.05$ .



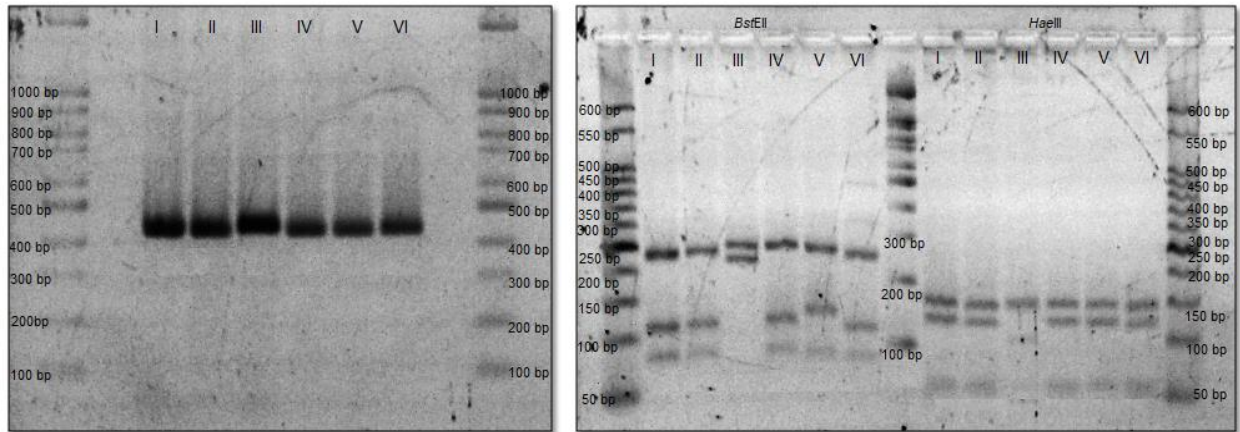
**Fig. 7.** Effect of different concentrations of Sulfamethoxazole and [Au (sulfamethoxazolate)(PPh<sub>3</sub>) on the inhibition (A and B) and destruction (C and D) of the biofilm from Clinical Isolate number I. \* Represents significant difference between the concentration tested and the positive control (PC). The tests were subjected to the Student t-test (n = 3), considering statistical differences when  $p < 0.05$ .



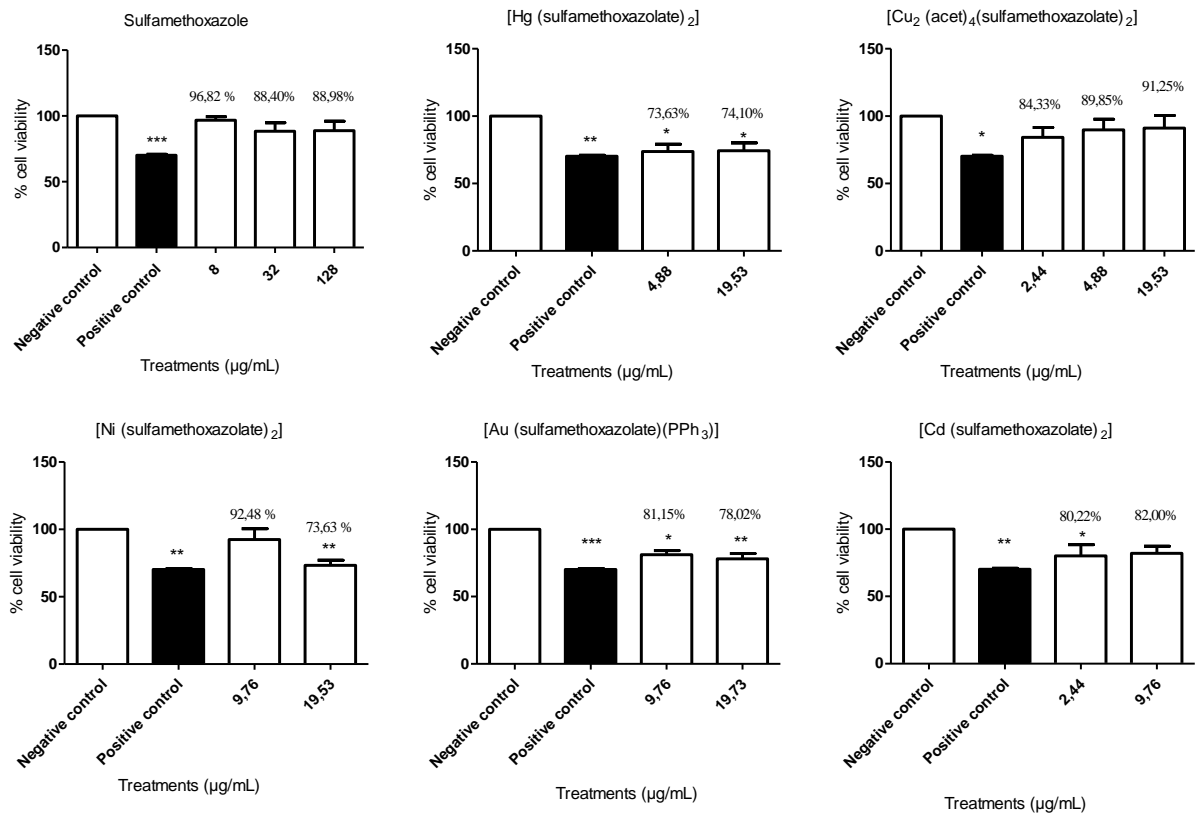
**Fig. 8.** Effect of different concentrations of Sulfamethoxazole and [Au (sulfamethoxazolate)(PPh<sub>3</sub>) on the inhibition (A and B) and destruction (C and D) of the biofilm from Clinical Isolate number II. \* Represents significant difference between the concentration tested and the positive control (PC). The tests were subjected to the Student t-test ( $n = 3$ ), considering statistical differences when  $p < 0.05$ .



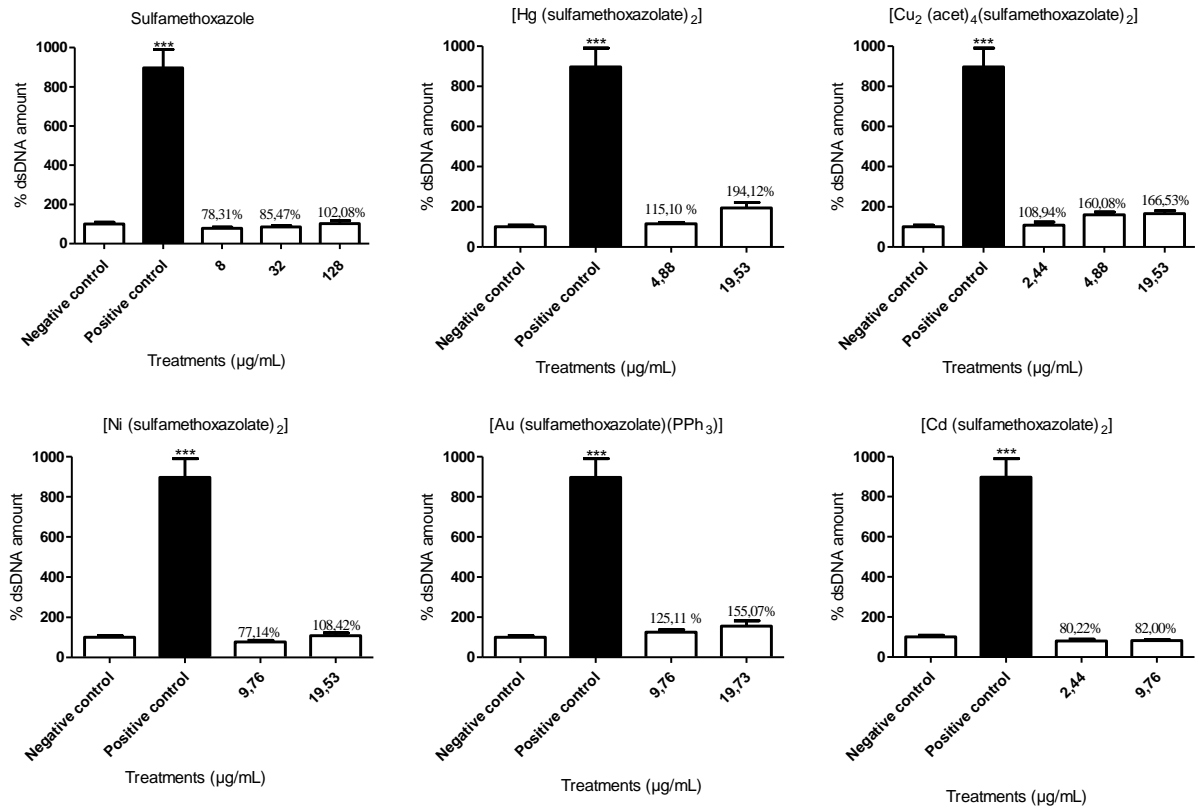
**Fig. 9.** Effect of different concentrations of Sulfamethoxazole and [Au (sulfamethoxazolate)(PPh<sub>3</sub>) on the inhibition (A and B) and destruction (C and D) of the biofilm from Clinical Isolate number IV. \* Represents significant difference between the concentration tested and the positive control (PC). The tests were subjected to the Student t-test (n = 3), considering statistical differences when p < 0.05.



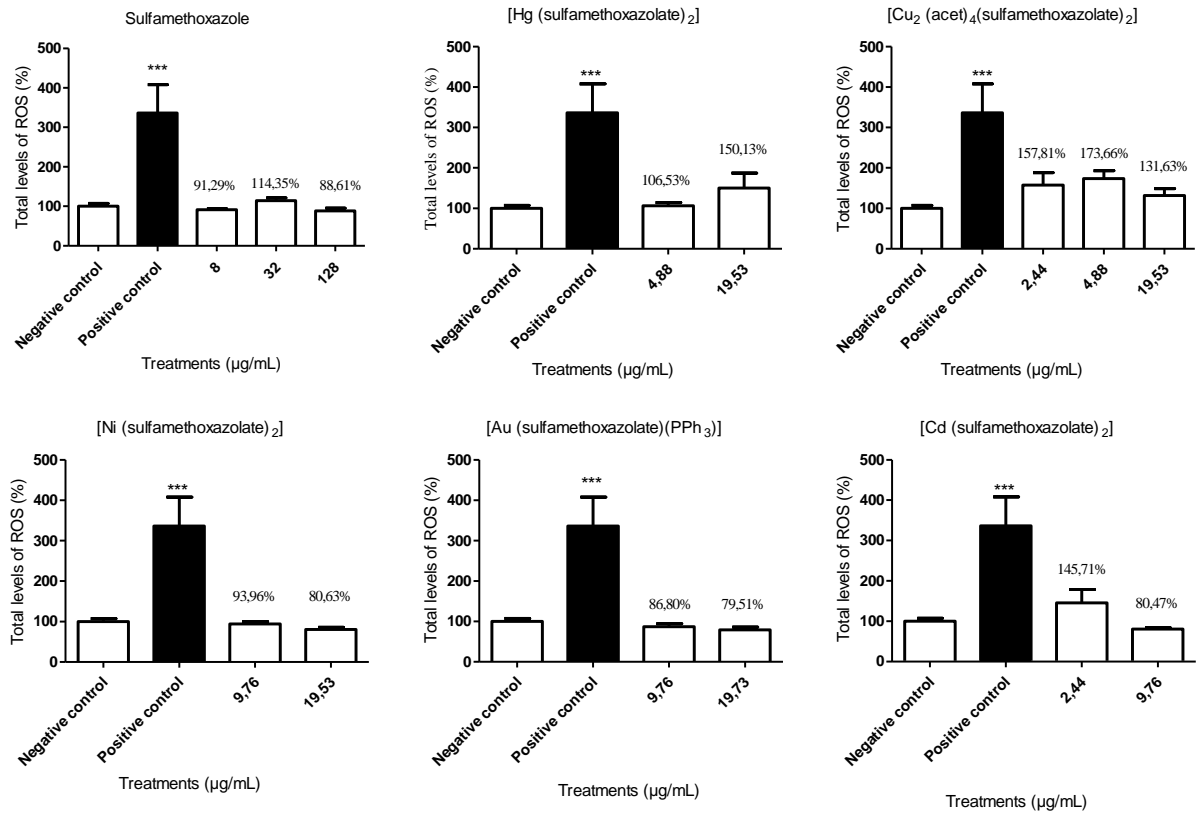
**Fig. 10.** PCR and PRA patterns of clinical isolates of mycobacteria after digestion with *BstEII* and *HaeIII*. The molecular weight marker is a 100 bp ladder for PCR and 50 and 100bp ladder for PRA digestion.



**Fig. 11.** MTT assay with 24 hours incubation. Results expressed as percentage of the negative control (100%). Data are presented as % of the untreated control group (NC). Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Analyzes were performed by 1-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. Values with  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Being \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

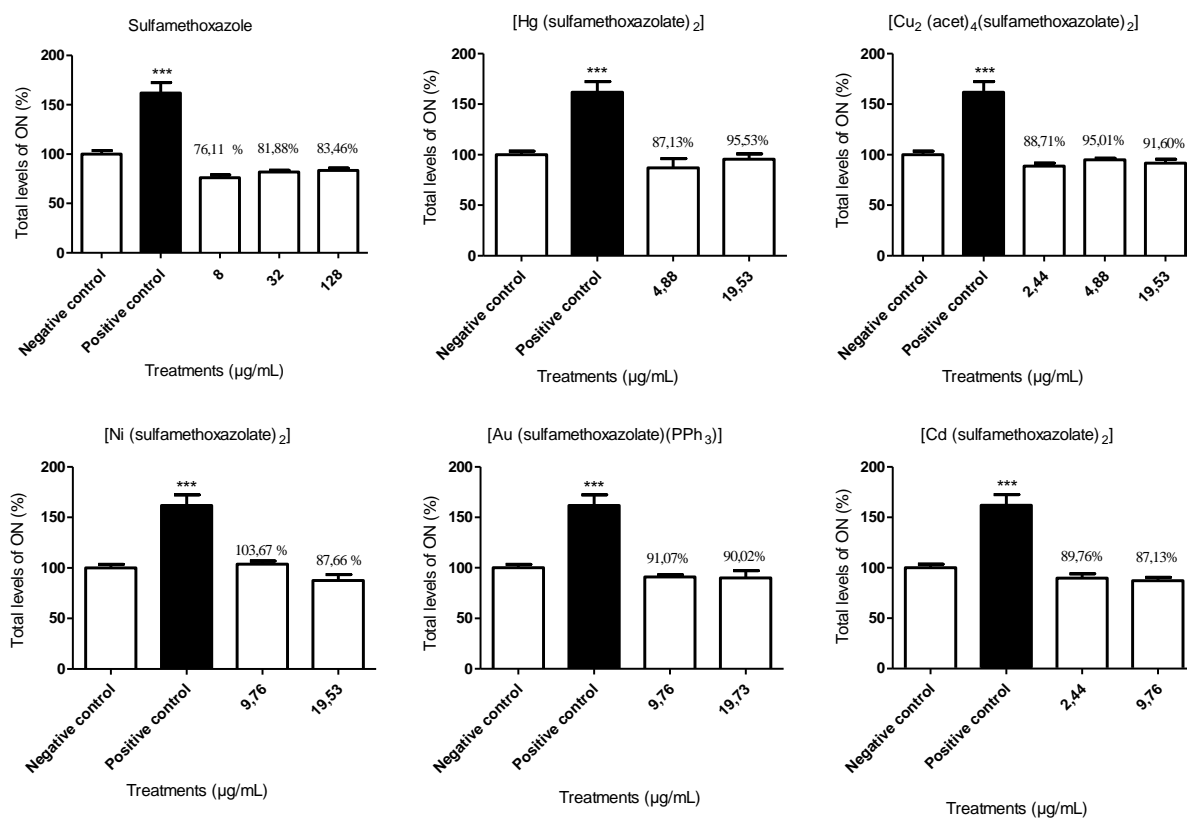


**Fig.12** Free dsDNA quantification amount after treatments. Results expressed as percentage of the negative control (100%). Data are presented as % of the untreated control group (NC). Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Analyzes were performed by 1-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. Values with  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Being \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Fig. 13.** Total levels quantified of ROS after treatments. Results expressed as percentage of the negative control (100%). Data are presented as % of the untreated control group (NC). Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Analyzes were performed by 1-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. Values with  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Being \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .





**Fig. 14.** Total levels quantified of ON after treatments. Results expressed as percentage of the negative control (100%). Data are presented as % of the untreated control group (NC). Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Analyzes were performed by 1-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. Values with  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Being \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 4 CONCLUSÕES

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

- Uma grande variedade de perfis de suscetibilidade foram determinados, com altos índices de resistência à claritromicina e ao sulfametoxazol, o que ressalta a importância da realização do teste de suscetibilidade utilizando os fármacos usuais na clínica para a implementação de uma terapêutica adequada em casos de micobacterioses.

- Todos os complexos metálicos derivados do sulfametoxazol apresentaram capacidade de inibir o crescimento das cepas padrões e dos isolados clínicos de MCR utilizados no estudo, obtendo valores de CIMs iguais e menores quando comparados aos valores obtidos para o sulfametoxazol livre e demais antimicrobianos utilizados na clínica das micobacterioses.

- A identificação molecular dos IC de MCR utilizados no estudo nos permite concluir que há uma necessidade de avaliar, isoladamente, a suscetibilidade de todos os agentes causadores de micobacterioses, visto que a mesma espécie pode apresentar diferentes perfis de suscetibilidade aos fármacos e, além disso, pode diferir em características genotípicas, o que influencia diretamente na sua patogênese e na sua capacidade de formar biofilmes.

- Todos os derivados do sulfametoxazol apresentaram, em algum grau, capacidade de inibir e destruir os biofilmes formados pelas cepas padrões de MCR. Quando comparados aos resultados obtidos do sulfametoxazol livre, podemos concluir que, em todos os casos, houve uma expressiva potencialização da atividade antibiofilme do fármaco quando complexado aos metais.

- Entre os novos compostos avaliados, o sulfametoxazolato de ouro destacou-se em relação a atividade antibiofilme, sendo capaz de inibir completamente a formação dos biofilmes analisados e tendo a capacidade de destruir o biofilme em todas as concentrações testadas.

- O complexo de ouro apresentou atividade frente aos 3 isolados clínicos formadores de biofilme, apresentando alta capacidade em inibi-los e destruí-los. Quando comparado ao sulfametoxazol livre, observa-se que o novo composto apresentou atividade muito superior.
  
- A avaliação toxicológica *in vitro*, realizada em PBMCs, demonstrou que a maioria dos derivados metálicos são alternativas seguras, apresentando resultados semelhantes aos encontrados nos controles negativos dos ensaios de determinação de viabilidade celular e quantificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.
  
- Novos ensaios experimentais *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para comprovar a aplicação terapêutica desses compostos e sua possível utilização como princípio ativo de agentes antimicrobianos e/ou desinfetantes. Contudo, este trabalho vem para encorajar a realização de novas pesquisas, no sentido de explorar de forma mais minuciosa a atividade dessas novas moléculas, elucidar seu mecanismo de ação e investigar aspectos fisiológicos e toxicológicos que comprovem sua eficácia e segurança.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, A. M. et al. Type VII secretion-mycobacteria show the way. **Nature**. v. 5, n. 11, p. 883-891, 2007.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Nota Técnica - SVS/MS e ANVISA Nº 08**. Micobactérias, 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Nota Técnica Conjunta Nº 01/2009 - SVS/MS e ANVISA**. Infecções por micobactérias de crescimento rápido: fluxo de notificações, diagnósticos clínico, microbiológico e tratamento, 2009.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Relatório descrito de investigação de casos de infecções por micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido (MCR) no Brasil no período de 1998 a 2009**. Unidade de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos, 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Bulário Eletrônico Sulfametoxazol**. 2013. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frm VisualizarBula.asp?pNuTransacao=9115802013&pIdAnexo=1844097](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frm VisualizarBula.asp?pNuTransacao=9115802013&pIdAnexo=1844097). Acesso em: 20 jan 2018.
- AGERTT, V. A. et al. Evaluation of antimycobacterial activity of a sulphonamide derivative. **Tuberculosis (Edinburgh)**, v. 93, p. 318, 2013.
- AGERTT, V. A. et al. Identification of antimicrobial activity among new sulfonamide metal complexes for combating rapidly growing mycobacteria. **BioMetals** (Oxford), v. 29, n. 5, p. 807-816, 2016.
- AGERTT, V. A. **Atividade antimicobacteriana e antibiofilme de sulfonamidas complexadas com Au, Cu, Cd, Ag e Hg**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.
- AMERICAN THORACIC SOCIETY. Breathing in America: Diseases, Progress and Hope. Chapter 12. **Nontuberculous Mycobacterial Disease**, p. 121-129, 2010.
- ANTUNES, A.; VIVEIROS, F.; CARVALHO, A.; DUARTE, R.; Micobacterioses Não-Tuberculosas - Das Manifestações Clínicas ao Tratamento. **Arq Med**, v. 26, n. 1, 2012.
- BARRETO, M. M. et al. Comparison among three methods for mycobacteria identification. **Salud Pública de México**, v. 42, n. 6, p. 484-489, 2000.
- BAZAKA, K. et al. Plasma-enhanced synthesis of bioactive polymeric coatings from monoterpene alcohols: a combined experimental and theoretical study. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 2016-2026, 2010.
- BHARATI, B.K.; CHATTERJI, D. Quorum sensing and pathogenesis: role of small signalling molecules in bacterial persistence. **Current Science**. v. 105, n. 5, 2013.

BILLINGS, N. et al. Material properties of biofilms – key methods for understanding permeability and mechanics. **Reports on Progress in Physics**. v. 78, n. 3, 2015.

BONA, M. G. M. et al. Enzyme analysis of the *hsp65* gene in clinical isolates from patients suspected of having pulmonary tuberculosis in Teresina, Piauí. **J. bras. pneumol.** v.37 n. 5, 2011

BOSIO, S. et al. Mycobacterium fortuitum prosthetic valve endocarditis: a case for the pathogenetic role of biofilms. **Cardiovascular Pathology**. v. 4, p. 361-364, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. Brasília, 2008.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 716–746, 2002.

BRYERS, J. D. Medical biofilms. **Biotechnol-ogy and Bioengineering**, v. 100, p. 1-18, 2008.

CRUZ, J. C et al. *Mycobacterium fortuitum*: um novo bacilo ácido-resistente patogênico para o homem. **Acta Med. (Rio de Janeiro)**, v. 1, p. 298-301, 1938.

CALSOLARI, R. A. O. et al. Identification and Susceptibility Testing on Samples of *Mycobacterium* spp. **Br. J. Med. Res.**, v. 7, n. 11, p. 942-947, 2015.

CALSOLARI, R. A. O. **Diagnóstico laboratorial de *Mycobacterium* spp. em Botucatu e região, utilizando a técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em material biológico e avaliação de condições associadas**. Tese (Doutorado em Saúde Coletiva) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

CARDOSO, C. M. **Avaliação de Técnicas Moleculares para Identificação de Micobactérias não causadoras de Tuberculose**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

CARDOSO, A.M. **Surto de Infecção após videoscopias causado por *Mycobacterium massiliense* em Goiânia: Análise molecular e determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos**. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

CERCA, P. A. R. **Identificação de micobactérias não tuberculosas através de métodos moleculares não comerciais**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova De Lisboa, Lisboa, Portugal, 2010.

CHATTERJEE, S. et, al. Biofilms on indwelling urologic devices: microbes and antimicrobial management prospect. **Ann. Med. Health Sci. Res.**, v. 4, p. 100 –104, 2014.

CHIMARA, E. et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-

based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 48, p 1-12, 2008.

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

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes. Approved standard. CLSI document M24-A2. CLSI, Wayne, PA. v. 31, n. 5, 2011.

COELHO, F. S.; MARQUES, E. A. Etiologia. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**. v. 2, p. 24-26, 2006

DALCOMO, M. Importance of mycobacteria in chronic pulmonary suppurations. **Pulmão RJ**, v. 23, n. 3, p. 37-41, 2014.

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

DEEPA, P.; THERESE, K. L.; MADHAVAN, H. N. Application of PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) for the identification of mycobacterial isolates. **Indian Journal of Medical Research**, v. 121, p. 694-700, 2005.

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

DE GROOTE, M. A. et al. GM-CSF knockout mice for preclinical testing of agents with antimicrobial activity against Mycobacterium abscessus. **J Antimicrob Chemother.** v. 69, n. 4, p. 1057-1064, 2014.

DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clin Infect Dis.** v. 33, n. 8, p. 1387-1392, 2001.

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

EL HELOU, G. et al. Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 13, n. 2, p. 166-174, 2013.

EUZÉBY, J.P. **List of bacterial names with standing in nomenclature**. Disponível em: <http://www.bacterio.net/mycobacterium.htm>. Acesso em 06 janeiro de 2018.

FLORES, V. D. C. **Perfil de susceptibilidade e atividade antimicrobiana sobre biofilmes de micobactérias Não Tuberculosas de Crescimento Rápido**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

FLORES, V. C. et al. Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 229-235, 2016.

GARCIA, M. H. O. Investigação de surto de infecção hospitalar associado a micobactérias de crescimento rápido, Rio de Janeiro. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, p. 39, 2007.

GARCÍA-GALÁN, M.J.; DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. **Trends in Analytical Chemistry**. v.27, n.11, p.1008-1022, 2008.

GERITS, E.; VERSTRAETEN, N.; MICHIELS, J. New approaches to combat *Porphyromonas gingivalis* biofilms. **Journal of Oral Microbiology**. v. 9, n. 1, 2017.

GHOSH, R. et al. Port-site infections by nontuberculous mycobacterium: A retrospective clinico-microbiological study. **The International Journal of Mycobacteriology**. v. 6, n. 1, p. 34-37, 2017.

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

GRIFFITH, D.E. Nontuberculous mycobacterial lung disease. **Current opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 185-190, 2010.

GUNDAVDA, M.K. et al. Nontuberculous mycobacterial infection of the musculoskeletal system in immunocompetent hosts. **Indian Journal of Orthopaedics**. v. 51, n. 2, p. 20-212, 2017.

GUPTA, P. et al. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. **Archives of Microbiology**. v. 198, n. 1, p. 1-15, 2016.

HATAKEYAMA, S. et al. Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria isolated in Japan. **BioMed Central Infectious Diseases**. v. 17, n. 197, 2017.

HINRICHSEN, S.L. Micobactéria de crescimento rápido – MCR. **Prática Hospitalar**. n.53, p.106-111, 2007.

HOIBY, N. et al. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Sciences**, v. 3, p. 55-65, 2011.

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

JOHNSON, M.M.; ODELL, J.A. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. **Journal of Thoracic Disease**. v. 6, n. 3, p. 210-220, 2014.

KIM, C. J. et al. Differentiating rapid- and slow-growing mycobacteria by difference in time to growth detection in liquid media. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**. v. 75, n. 1, p. 73-76, 2013.

- KIM, S. H.; SHIN, J. H. Identification of nontuberculous mycobacteria using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, hsp65, and rpoB. **J Clin Lab Anal**, v. 32, n. 1, 2018.
- KING, H. C. et al. Environmental reservoirs of pathogenic mycobacteria across the Ethiopian biogeographical landscape. **Plos One**. v. 12, n. 3, p. 1-15, 2017.
- LAZAR, V. Quorum sensing in biofilms - How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? **Anaerobe**, v. 17, p. 280- 285, 2011.
- LEÃO, S. C. et al. **Practical handbook for phenotypic and genotypic identification of Mycobacteria**, 2004.
- LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 371-383, 2013.
- LEWIS, K. Riddle of Biofilm Resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001.
- LEWIS, K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 211, p. 121-133, 2012.
- LIMA, A. S. **Fatores e espécies de micobactérias não tuberculosas associadas aos casos de micobacterioses pulmonar e extrapulmonar no estado de Pernambuco**. Tese (Doutorado em saúde pública) - Centro de Pesquisas Ageu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.
- LYNCH, A.S.; ROBERTSON, G.T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 415-428, 2008.
- MA, W. et al. *Bacillus subtilis* biofilm development in the presence of soil clay minerals and iron oxides. **Nature**. v. 3, n. 4, 2017.
- MACEDO, J. L. S; MAIEROVITCH, C.; HENRIQUES, C. M. P. Postoperative infections due to rapidly growing mycobacteria in Brazil. **Brazilian Journal of Plastic Surgery**. v. 24, n. 4, p. 544-551, 2009.
- MACEDO, A.J.; ABRAHAM, W.R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 517-528, 2009.
- MADSEN, J. S. et al. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 65, p. 183-195, 2012.
- MARINHO, A. et al. Nontuberculous mycobacteria in non-AIDS patients. **Revista Portuguesa de Pneumologia**. v.14, n.3, p. 323-337, 2008.
- MARQUES, L. L. **Synthesis, structure and antimicrobial activity evaluation of merallic complezes with sulfamethoxazole**. Thesis presented to post-graduate course in Pharmaceutical Sciences. Federal University of Santa Maria. 2007.



- MARTÍN-DE-HIJAS, N. Z. et al. Biofilm development by clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria. **Clinical microbiology and infection**, v. 15, n. 10, p. 931–936, 2009.
- MELLO, K. G. C. et al. Clinical and Therapeutic Features of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Brazil, 1993–2011. **Emerging Infectious Diseases**. v. 19, n. 3, p. 393-399, 2013.
- MERTANIASIH, N.M. et al. Nontuberculous mycobacterial species and *Mycobacterium tuberculosis* complex coinfection in patients with pulmonary tuberculosis in Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia. **The International Journal of Mycobacteriology**. v. 6, n. 1, p. 9-13, 2017.
- MIZDAL, C. R. **Avaliação de novos compostos antimicrobianos na inibição da formação do biofilme de *Escherichia coli***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.
- MIZDAL, C. R. et. al. Anti-biofilm and Antibacterial Effects of Novel Metal-coordinated Sulfamethoxazole Against *Escherichia coli*. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 14, p. 339-344, 2017.
- MONEGO, F. et al. Molecular identification and typing of *Mycobacterium massiliense* isolated from postsurgical infections in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 436–441, 2011.
- MORENO, J. M.; **Formação de Biofilmes de cepas de Micobactérias de Crescimento Rápido de fenótipos liso e rugoso**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2010.
- MORYL, M. et al. Effect of nutrient and stress factors on polysaccharides synthesis in *Proteus mirabilis* biofilm. **Acta Biochim Pol**, v. 61, n. 1, p. 133-139, 2014.
- MOTA, S.P.M.S. **Isolamento e identificação molecular de micobactérias não tuberculosas**. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2011.
- NIH: National Institutes of Health [Internet]. Disponível em: <http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html>., Acesso em: 11 jan 2018.
- NESSAR, R et al. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 4, p. 810–818, 2012.
- OMAR, A. et al. Microbial Biofilms and Chronic Wounds. **Microorganisms**. v. 5, n.9, 2017.
- PADOVEZE, M. C. et al. Outbreak of surgical infection caused by nontuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil. **J Hosp Infect**, v. 67, n. 2, p. 161-167, 2007.

- PARIKH, R.B.; GRANT, M. *Mycobacterium goodii* endocarditis following mitral valve ring annuloplasty. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 16, n. 14, 2017.
- PITOMBO, M. B.; LUPI, O.; DUARTE, R. S. Infections by rapidly growing mycobacteria resistant to disinfectants: a national matter? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v.31, n.11, p.529-533, 2009.
- RASMUSSEN, T. B.; GIVSKOV, M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. **Int J Med Microbiol**, v. 296, p. 149-161, 2006
- ROCHA, D. P. et al. Coordenação de metais e antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111–118, 2011.
- SAIFI, E. et al. HSP65-PRA identification of non-tuberculosis mycobacteria from 4892 samples suspicious for mycobacterial infections. **Clin Microbiol Infect**. 19: 723–728, 2013.
- SAGRILLO, M. R. et al. Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. **Food Chemistry**, v. 173, p. 741-748, 2015.
- STEWART, P. S.; FRANKLIN, M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 199-210, 2008.
- SHINNICK, T.M.; GOOD, R.C. Mycobacterial taxonomy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v.13, n.11, p.884-901, 1994.
- SILVA, J.M.I. **Caracterização morfológica de Micobactérias Não Tuberculosas Ambientais por ensaios neutrongráficos**. Tese (Doutorado em Engenharia Nuclear) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
- SOUSA, S. et al. Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. **International Journal of Mycobacteriology**. v. 4, p. 36-43, 2015.
- SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 223–9, 2013.
- TATEDA, K. et al. Suppression of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems by macrolides: a promising strategy or an oriental mystery? **Journal of Infection and Chemotherapy**. v.13, n.6, p.357-367, 2007.
- TAMASHIRO, E. et al. Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis: what does this concept change in therapeutical approach? **Revista Brasileira de Medicina**, p. 130-135, 2013.
- TELENTI, A. et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 2, p. 175-178, 1993.

TRENTIN, D. S., GIORDANI, R. B., MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**. v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

TUTTLEBEE, C.M. et al. Effective control of dental chair unit waterline biofilm and marked reduction of bacterial contamination of output water using two peroxide-based disinfectants. **Journal of Hospital Infection**. v.52, n.3, p.192-2005, 2002.

VARGHESE, B. et al. Emergence of Rare Species of Nontuberculous Mycobacteria as Potential Pathogens in Saudi Arabian Clinical Setting. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v. 11, n.1, 2017.

VAN et al. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. **Drug Resist Updat**, v. 15, n. 3, p. 149-161, 2012.

VERT, M. et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**. v. 84, p. 377-410, 2012.

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

VIANA-NIERI, L. K. V. et al. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **J Clin Microbiol**. v. 46, n. 3, p. 850-855, 2008.

WILDNER, L.M. et al. Micobactérias: Epidemiologia e diagnóstico. **Revista de Patologia Tropical**. v. 40, n. 3, p. 207-229, 2011.

WILDNER, L. M. **Isolamento e Identificação de Micobactérias Não-Tuberculosas em Laboratório e Hospital de Referência do Estado de Santa Catarina**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

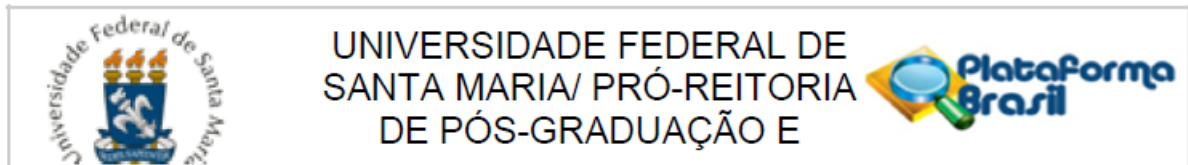
WITEBSKY, F. G., CONVILLE, P. S. Rapidly growing mycobacteria. In: Borriello SP, Murray PR, Funke G, editors. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections: bacteriology*. Washington, DC: ASM Press, v. 2, p. 1236-69, 2005.

WENZEL, R.P. Health care-associated infections: major issues in the early years of the 21st century. **Clinical Infectious Disease**, v. 45, p. 85-88, 2007.

WU, C. W. et al. Optical mapping of the *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genome. **BMC Genomics**, v. 10, p. 25-35, 2009.

YAM, W. C. et al. Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 529-536, 2006.

## ANEXOS

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
(UFSM)

## COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO

**Pesquisador:** MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS

**Versão:** 2

**CAAE:** 71795417.6.0000.5346

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

## DADOS DO COMPROVANTE

**Número do Comprovante:** 082876/2017


**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

## - DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO  
**Pesquisador Responsável:** MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS  
**Área Temática:**  
**Versão:** 2  
**CAAE:** 71795417.6.0000.5346  
**Submetido em:** 22/08/2017  
**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa  
**Situação da Versão do Projeto:** Aprovado  
**Localização atual da Versão do Projeto:** Pesquisador Responsável  
**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio



Comprovante de Recepção:  PB\_COMPROVANTE\_RECEPCAO\_964317

## ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO



AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

PUBLICATIONS   EVENTS   SCIENCE SKILLS   CAREERS   MEMBERSHIP   PUBLIC POLICY

Antimicrobial Agents and Chemotherapy®   Manuscript Submission and Peer Review System

Home   Help for Authors   Help for Reviewers   Contact Us   Logout

Your manuscript has been successfully submitted. Your manuscript tracking number is: AAC00211-18

The ASM Journals program strives for constant improvement in our submission and publication process. Please tell us how we can improve your experience by taking this quick [Author Survey](#).

[Return Home](#)

[Go to Manuscript](#)

AAC00211-18: Manuscript Received

Entrada x



asm@msubmit.net

12:59 (Há 11 horas)

para mim

Dear Mr. Siqueira,

On February 1, 2018, we received the manuscript "Sulfamethoxazole derivatives complexed with metals: a new alternative against biofilms of rapidly growing mycobacteria" by Fallon Siqueira, Vanessa Flores, Camilla Alves, Viviane Somavilla, Grazielle Rossi, Vanessa Agertt, Alencar Machado, Michele Sagrillo, Priscila Copetti, Josiéli Siqueira, Renne Dias, Davi Back, and Marli Anraku de Campos. The submission form indicates that this paper should be processed as a(n) Full-Length Text intended for publication in the section Susceptibility.

The manuscript has been assigned the control number AAC00211-18. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor.

You can check the status of this manuscript by clicking on the link below and selecting Check Status:

<https://aac.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A7GG5BJeW4A6BpBt1F5A9ftdmqNw1f0wTm5D8qpxEQF8pQZ>

All authors must disclose any commercial affiliations as well as consultancies, stock or equity interests, and patent-licensing arrangements that could be considered to pose a conflict of interest regarding the submitted manuscript. All funding sources for the project, institutional and corporate, and any potentially conflicting interests, such as relationships that might detract from an author's objectivity in presentation of study results, must be acknowledged, both in the Acknowledgments section and on this form. The corresponding author must review this policy with all coauthors.