

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

Daniele Fernanda Wille

**ANÁLISE DA ATIVIDADE DOS SAIS DE FERRO E
DEFERROXAMINA NA MATURAÇÃO DE BIOFILME DE
MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO**

Santa Maria, RS
2022

Daniele Fernanda Wille

**ANÁLISE DA ATIVIDADE DOS SAIS DE FERRO E DESFERROXAMINA NA
MATURAÇÃO DE BIOFILME DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO**

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

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Priscila de Arruda Trindade

Santa Maria, RS
2022

Wille, Daniele Fernanda
ANÁLISE DA ATIVIDADE DOS SAIS DE FERRO E
DESFERROXAMINA NA MATUREZAÇÃO DE BIOFILME DE MICOBACTÉRIAS
DE CRESCIMENTO RÁPIDO / Daniele Fernanda Wille.- 2022.
56 p.; 30 cm

Orientadora: Marli Matiko Anraku de Campos
Coorientadora: Priscila de Arruda Trindade
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2022

1. Micobactérias 2. Biofilme 3. Ferro 4.
Desferroxamina I. de Campos, Marli Matiko Anraku II.
Trindade, Priscila de Arruda III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

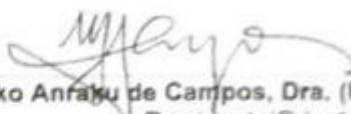
Declaro, DANIELE FERNANDA WILLE, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

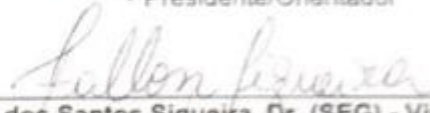
Daniele Fernanda Wille


**ANÁLISE DA ATIVIDADE DOS SAIS DE FERRO E DESFERROXAMINA NA
MATURAÇÃO DE BIOFILME DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO**

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

Aprovado em 03 de fevereiro de 2022:


Marli Matiko Anraju de Campos, Dra. (UFSM) - Videoconferência
Presidente/Orientador


Fallon dos Santos Siqueira, Dr. (SEG) - Videoconferência


Leticia Beatriz Matter, Dra. (PUCRS) - Videoconferência

Santa Maria, RS
2022

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãezinha, que hoje não está mais presente fisicamente entre nós, mas foi ela quem sempre me incentivou a nunca desistir dos meus sonhos e ir à busca constante do conhecimento. Obrigada Mãe!

AGRADECIMENTOS

Durante todo esse tempo não parei para agradecer as pessoas que fizeram parte deste trabalho, então meus sinceros agradecimentos:

- aos meus pais João e Lisete (*in memoriam*), por serem meu porto seguro. Por todo carinho, incentivo e amor incondicional. Gratidão por tudo que me proporcionaram.

- à minha irmã Luana, por ser além de irmã, amiga. E por estar sempre comigo, em todos os momentos.

- ao meu namorado Germano, pessoa com quem amo partilhar a vida. Obrigada por todo carinho, paciência e incentivo constante, e também, por dividir comigo as alegrias e angústias.

- aos meus sobrinhos amados, Augusto e Bernardo, Yasmin e Valentim, por tornarem minha vida mais alegre e cheia de luz.

- aos meus avós, pelo incentivo da busca por conhecimento, e jamais desistir de meus sonhos.

- à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Marli Matiko Anraku de Campos, por toda ajuda, incentivo, carinho, e principalmente por confiar em mim. Minha admiração pela profissional que és. E também à minha coorientadora Priscila de Arruda Trindade, pelo amparo e por toda ajuda fornecida sempre que solicitada.

- aos colegas do Laboratório de Micobacteriologia: Kevim, Grazielle, Fallon e Liliane, por todas as experiências compartilhadas, e por não medirem esforços para me ajudar.

- a todos os colegas e amigos (as), que de uma forma ou outra, tornaram toda esta trajetória mais “fácil” e divertida.

- a todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela dedicação, paciência e amor ao ensinar.

- à Universidade Federal de Santa Maria, pelo ensino de qualidade.

- ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo e apoio financeiro para a realização deste trabalho.

- E a todos que de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Educação não transforma o mundo.
Educação muda as pessoas.
Pessoas mudam o mundo.”*

(Paulo Freire)

RESUMO

ANÁLISE DA ATIVIDADE DOS SAIS DE FERRO E DESFERROXAMINA NA MATURAÇÃO DE BIOFILME DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO

AUTORA: Daniele Fernanda Wille
ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Marli Matiko Anraku de Campos
COORDINADORA: Prof^a. Dr^a. Priscila de Arruda Trindade

As infecções por micobactérias de crescimento rápido têm sido descritas gradativamente nos últimos anos, principalmente por estarem associadas a uma vasta gama de síndromes clínicas, variando de doenças leves a distúrbios mais graves, como por exemplo, infecções cutâneas, de tecidos moles, linfadenite cervical, infecções pulmonares crônicas e disseminadas. A formação de biofilmes por esses microrganismos causa grande preocupação para a saúde pública, devido sua maior patogenicidade em humanos e a resistência aos antimicrobianos. Desta forma, existe uma necessidade pressurosa de estudar e desenvolver métodos alternativos de tratamento, a partir de uma criteriosa avaliação no desenvolvimento e caracterização dos biofilmes. Diversos fatores estão envolvidos no processo de formação de biofilmes, dentre esses componentes destacam-se a presença de ferro, importante na maturação do biofilme. Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo analisar a ação do Sulfato ferroso e do Citrato férrico na formação de biofilmes de micobactérias de crescimento rápido, bem como, do quelante Desferroxamina. Para a realização desse estudo utilizou-se as cepas *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841), *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898) e *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977). Sulfato ferroso e Citrato férrico foram os sais utilizados para o tratamento das cepas de micobactérias de crescimento rápido, bem como o quelante Desferroxamina. Os biofilmes foram formados e tratados por macro técnica semiquantitativa e quantificados utilizando cristal violeta e a leitura realizada em espectrofotômetro. Os resultados demonstraram que houve interferência dos sais de ferro e da desferroxamina na formação de biofilmes das cepas testadas, visto que, a formação de biofilme foi significativamente inibida na condição de privação de ferro em contraste com o controle, além disso, a Desferroxamina isolada apresentou atividade antibiofilme, principalmente para *M. abscessus* e *M. massiliense*, e ainda, foi possível elucidar a importância do ferro para a formação de biofilme em micobactérias de crescimento rápido por uma análise do mecanismo da atividade anti-formação de biofilme da desferroxamina. Contudo, este trabalho vem para encorajar a realização de novas pesquisas, no sentido de explorar de forma mais minuciosa a atividade de novas e promissoras moléculas com atividade antibiofilme.

Palavras-chave: Micobactérias; Biofilme; Ferro; Desferroxamina.

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE ACTIVITY OF IRON SALTS AND DESFERROXAMINE IN THE MATURATION OF RAPID GROWING MYCOBACTERIA BIOFILM

AUTHOR: Daniele Fernanda Wille
ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Marli Matiko Anraku de Campos
COORDINATOR: Prof^a. Dr^a. Priscila de Arruda Trindade

Fast-growing mycobacterial infections have been gradually described in recent years, mainly because they are associated with a wide range of clinical syndromes, ranging from mild diseases to more severe disorders, such as skin and soft tissue infections, cervical lymphadenitis, chronic and disseminated lung infections. The formation of biofilms by these microorganisms is a major concern for public health, due to their greater pathogenicity in humans and resistance to antimicrobials. Thus, there is a pressing need to study and develop alternative methods of treatment, based on a careful assessment of the development and characterization of biofilms. Several factors are involved in the process of biofilm formation, among these components the presence of iron stands out, important in biofilm maturation. In this context, the present work aims to analyze the action of ferrous sulfate and ferric citrate in the formation of biofilms of fast-growing mycobacteria, as well as the deferoxamine chelator. To carry out this study, the strains *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841), *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898) and *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977) were used. Ferrous sulfate and ferric citrate were the salts used for the treatment of fast-growing mycobacterial strains, as well as the chelator deferoxamine. Biofilms were formed and treated by semi-quantitative macro-technique and quantified using crystal violet and reading performed in a spectrophotometer. The results showed that there was interference of iron salts and deferoxamine in the formation of biofilms of the strains tested, since the formation of biofilm was significantly inhibited in the condition of iron deprivation in contrast to the control, in addition, the isolated deferoxamine presented antibiofilm activity, mainly for *M. abscessus* and *M. massiliense*, and it was possible to elucidate the importance of iron for biofilm formation in fast-growing mycobacteria by analyzing the mechanism of the anti-biofilm formation activity of deferoxamine. However, this work comes to encourage further research, in order to explore in more detail, the activity of new and promising molecules with antibiofilm activity.

Keywords: Mycobacteria; Biofilm; Iron; Deferoxamine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Representação esquemática da parede celular das micobactérias. | 15 |
| Quadro 1 – Características estruturais e fisiológicas para a ecologia das MNT..... | 16 |
| Quadro 2 – Classificação das micobactérias de acordo com o tempo de crescimento e produção de pigmento..... | 18 |
| Figura 2 – Principais parâmetros que influenciam a estrutura do biofilme | 22 |
| Figura 3 – Etapas de formação do biofilme microbiano | 23 |
| Figura 4 – Propriedades emergentes de biofilmes e formação de habitat | 25 |
| Figura 5 – Aquisição de ferro bacteriano via sideróforos | 29 |
| Figura 6 – Formação do complexo metal/ligante..... | 31 |
| Figura 7 – Estrutura química da Desferroxamina | 32 |
| Figura 8 – Ação de diferentes concentrações do Citrato férrico na formação de biofilmes de <i>M. abscessus</i> , <i>M. massiliense</i> e <i>M. fortuitum</i> | 39 |
| Figura 9 – Ação de diferentes concentrações do Sulfato ferroso na formação de biofilmes de <i>M. abscessus</i> , <i>M. massiliense</i> e <i>M. fortuitum</i> | 39 |
| Figura 10 – Ação de diferentes concentrações de Desferroxamina na formação de biofilmes de <i>M. abscessus</i> , <i>M. massiliense</i> e <i>M. fortuitum</i> | 41 |
| Figura 11 – Ação de diferentes concentrações do Sulfato ferroso associado com a Desferroxamina na formação de biofilmes de <i>M. abscessus</i> , <i>M. massiliense</i> e <i>M. fortuitum</i> | 43 |
| Figura 12 – Ação de diferentes concentrações do Citrato férrico associado com a Desferroxamina na formação de biofilmes de <i>M. abscessus</i> , <i>M. massiliense</i> e <i>M. fortuitum</i> | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Determinação da concentração inibitória mínima dos sais de ferro e Desferroxamina frente a <i>M. abscessus</i> , <i>M. massiliense</i> e <i>M. fortuitum</i> | 38 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|---|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AAR | Álcool-ácido resistência |
| AIDS | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BAAR | Bacilos Álcool-ácido Resistentes |
| CIM/MIC | Concentração inibitória mínima/Minimum Inhibitory Concentration |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| CMTB | Complexo <i>M. Tuberculosis</i> |
| DFO | Desferroxamina |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DO | Densidade Ótica |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetra-acético |
| FDA | Food and Drug Administration |
| GPL | Glicopeptidolipídio |
| IdeR | Regulador dependente do ferro/Iron-Dependent Regulator |
| LJ | Lowenstein – Jensen |
| MAC | Complexo <i>Mycobacterium avium</i> |
| MCR | Micobactérias de crescimento rápido |
| MNT | Micobactérias não tuberculosas |
| MTB | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| QS | <i>Quorum sensing</i> |
| RS | Rio Grande do Sul |
| SPE | Substâncias poliméricas extracelulares |
| UFSM | Universidade Federal de Santa Maria |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1 | GÊNERO <i>MYCOBACTERIUM</i> | 14 |
| 1.2 | MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS..... | 15 |
| 1.2.1 | Classificação de Micobactérias Não Tuberculosas..... | 17 |
| 1.3 | MICOBACTERIOSES..... | 19 |
| 1.4 | BIOFILMES..... | 21 |
| 1.4.1 | Estrutura e composição de biofilmes..... | 21 |
| 1.4.2 | Processos envolvidos na formação de biofilmes..... | 22 |
| 1.4.3 | Fatores que influenciam na formação de biofilmes..... | 24 |
| 1.5 | FERRO E A SUA IMPORTÂNCIA PARA AS MICOBACTÉRIAS..... | 26 |
| 1.5.1 | Mecanismos de captação de ferro em microrganismos..... | 29 |
| 1.5.2 | Quelantes de ferro como agentes antimicrobianos..... | 30 |
| 2. | OBJETIVOS..... | 34 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 34 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 34 |
| 3. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 35 |
| 3.1 | MICRORGANISMOS, SAIS DE FERRO E DESFERROXAMINA..... | 35 |
| 3.2 | DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA..... | 35 |
| 3.3 | FORMAÇÃO E TRATAMENTO DOS BIOFILMES..... | 35 |
| 3.3.1 | Quantificação dos biofilmes..... | 36 |
| 3.3.2 | Análise estatística..... | 36 |
| 4. | RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 37 |
| 5. | CONCLUSÃO..... | 45 |
| | REFERÊNCIAS..... | 47 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 GÊNERO *Mycobacterium*

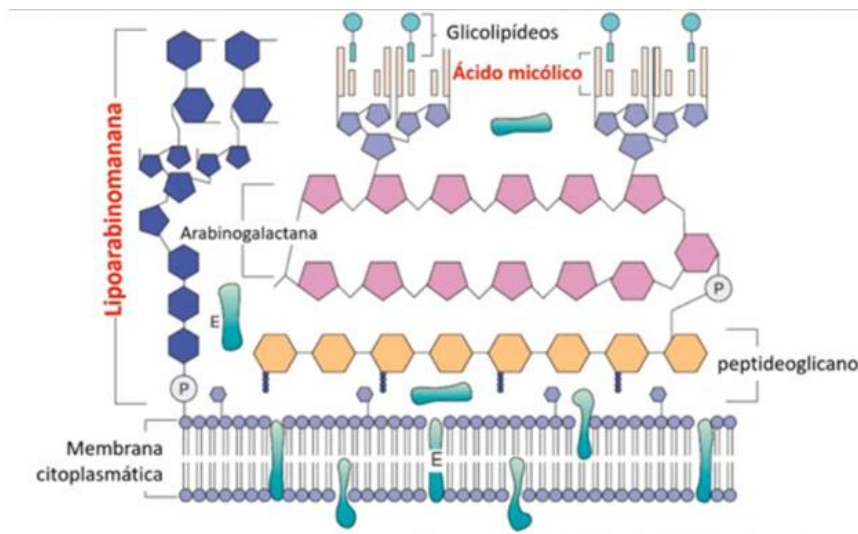
O gênero *Mycobacterium* foi proposto por Lehmann e Neuman, em 1896, com o intuito de abrigar microrganismos que não se enquadravam como bactérias e fungos. Este gênero pertence à família *Mycobacteriaceae*, e possui mais de 200 espécies reconhecidas, sendo um grupo bastante heterogêneo que varia de patógenos estritos, patógenos potenciais ou oportunistas e espécies saprófitas não patogênicas (ESTEBAN; NAVAS, 2018; TORTOLI, 2019).

Em termos gerais, as micobactérias são microrganismos em forma de bastonete, semelhantes a um fungo. São bacilos pequenos, aeróbicos estritos, intracelulares, não formadores de esporos, não dispõem de flagelos (imóveis), e apresentam uma camada externa da parede celular rica em lipídeos tornando-se resistentes à descoloração com álcool-ácido (AAR) conferindo a esses microrganismos uma grande resistência (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; MAIA et al., 2018).

A parede celular das micobactérias apresenta características únicas e específicas para esse gênero, como por exemplo, a presença de ácidos graxos de cadeia longa como os ácidos micólicos que representam cerca de 40% da massa da parede externa (Figura 1) (FALKINHAM, 2013). Essa composição singular é que torna a micobactéria impenetrável a nutrientes hidrofílicos e extremamente resistentes a agentes antimicrobianos, desinfetantes químicos e até mesmo metais pesados, facilitando a agregação bacteriana e dificultando a sua prevenção (JOHNSON; ODELL, 2014).

Esses microrganismos sobrevivem em uma ampla faixa de temperatura, visto que, a temperatura ideal de crescimento varia numa de 25°C a 45°C, e o pH entre 6 e 8, dependendo da espécie. A maioria das espécies é capaz de crescer em meios simples contendo aminoácidos, glicerol e sais minerais, mas algumas requerem suplementos, como por exemplo, o ferro. (BRASIL, 2009; WILDNER et al., 2011; RATNATUNGA et al., 2020).

Figura 1 – Representação esquemática da parede celular das micobactérias



Fonte: Adaptado de MURRAY, Medical Microbiology. 7ª ed. Elsevier, 2013.

De forma geral, as micobactérias podem ser classificadas em três grandes grupos: espécies que compõem o complexo *M. tuberculosis* (CMTB) que são altamente patogênicas causadoras da tuberculose, pelo *Mycobacterium leprae*, agente causador da lepra ou hanseníase, e por outras espécies denominadas micobactérias não tuberculosas (MNT) (FORBES et al., 2018; TORTOLI, 2019).

1.2 MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

MNT são bactérias globais e de vida livre, amplamente distribuídas na natureza, como água, solo e vegetação. Encontradas na água de reservatórios naturais (mananciais, lagoas, mares), de torneira (água potável), de piscinas e destilada; no solo, em pedras, aerossóis, vegetais, e em muitas espécies animais (WILDNER et al., 2011; FORBES et al., 2018). Acredita-se que, devido a essa difusão das MNT na natureza, a fonte de infecção em humanos seja o meio ambiente, mas os fatores que influenciam a transmissão do meio ambiente para os humanos são desconhecidos (HALSTROM; PRICE; THOMSON, 2015).

Para melhor compreender algumas estratégias de transmissão, resistência e suas relações, é necessário conhecer as características estruturais e fisiológicas das micobactérias não tuberculosas, que estão representadas no Quadro 1 (FALKINHAM, 2013).

Quadro 1 – Características estruturais e fisiológicas para a ecologia das MNT

| CARACTERÍSTICA | CONSEQUÊNCIAS ECOLÓGICAS |
|-----------------------------------|---|
| Membrana externa rica em lipídios | Superfície celular hidrofóbica |
| | Fixação de superfície e formação de biofilme |
| | Impermeável a nutrientes hidrofílicos |
| | Resistente a desinfetantes |
| | Resistente a antimicrobianos |
| | Crescimento lento (1 geração/dia) |
| | Degradação de hidrocarbonetos |
| Um ou dois operons de rRNA | Crescimento lento, resistência antimicrobiana |
| Microaeróbica | Crescimento em 6-12% de oxigênio |
| Oligotrófica | Crescimento em baixas concentrações de carbono |
| Tolerância térmica | Sobrevive e cresce em aquecedores de água e sistemas de recirculação de água quente |
| Resistente às amebas | Sobrevive em biofilmes povoados por amebas fagocíticas |

Fonte: adaptado de FALKINHAM, 2013.

As possíveis rotas de infecção de MNT de seus reservatórios incluem (1) ingestão de solo ou água por crianças levando a linfadenite cervical, (2) inalação de aerossóis carregados de MNT por adultos levando à infecção pulmonar, (3) inalação de poeiras de terra levando à doença pulmonar, (4) aspiração devido ao refluxo gástrico de MNT entrando no estômago via ingestão que leva à infecção pulmonar e (5) ingestão oral de MNT na água por pacientes com imunodeficiência profunda e redução da função normal de barreira do trato gastrointestinal (FALKINHAM, 2013).

As MNT são microrganismos importantes associados a infecções respiratórias e outras doenças oportunistas (SILVA, 2013; KING et al., 2017). A imunossupressão, o uso de antibióticos de amplo espectro, doenças pulmonares, são fatores que contribuem para o aumento de infecções por MNT, visto que, a doença pulmonar é uma das manifestações clínicas mais comuns destas infecções. Todavia, as infecções causadas pelas MNT manifestam-se como um amplo espectro de doenças afetando vários órgãos, principalmente devido a sua abundância fenotípica (BALDWIN et al., 2019; JOHANSEN; HERRMANN; KREMER, 2020).

Deve ser levado em consideração que mesmo na ausência de fatores de risco pressupostos, pode ocorrer a infecção por MNT. Como é o caso da *M. abscessus*, por exemplo, que infecta tanto pacientes com história de doenças pulmonares quanto pacientes sem nenhum fator de risco. Desta forma, é fundamental a identificação correta da espécie causadora da infecção, para utilização de uma adequada estratégia de tratamento (GRIFFITH et al., 2007; FLOTO et al., 2016).

Nos últimos anos, tem-se aumentado o interesse em estudar os isolados a partir de diferentes situações clínicas, devido, principalmente, às infecções em pacientes imunocomprometidos. Além disso, o aprimoramento das técnicas de cultura e identificação das MNT possibilitou o aumento dos relatos de infecções associadas (CARDOSO, 2009; JOHANSEN; HERRMANN; KREMER, 2020).

1.2.1 Classificação de Micobactérias Não Tuberculosas

Baseando-se na velocidade do crescimento da colônia *in vitro* e na produção de pigmento, dependente ou não de exposição à luz, Runyon, em 1959, foi o primeiro a propor a seguinte classificação para as MNT: crescimento lento que requerem de duas a seis semanas de incubação para apresentarem crescimento colonial visível e as de crescimento rápido que apresentam crescimento visível em menos de sete dias. Em relação à produção de pigmentação, essas bactérias podem ser divididas em três grupos: acromógenas, fotocromógenas e escotocromógenas. Estas características associadas (tempo de crescimento e pigmentação), juntamente com outros testes, possibilitam a classificação das micobactérias em quatro grupos, que podem ser avaliados no Quadro 2.

As MNT apresentam uma patogenicidade variável, desta forma, podem ser também classificadas de acordo com a capacidade de causar doenças, como potencialmente patogênicas (*M. abscessus*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, entre outras) e não patogênicas também conhecidas como raramente patogênicas (*M. gordonae*, *M. smegmatis*, *M. branderi*, *M. agri*, entre outras). (LEÃO et al., 2004).

Quadro 2 – Classificação das micobactérias de acordo com o tempo de crescimento e produção de pigmento

| GRUPOS | PIGMENTAÇÃO | TEMPO DE CRESCIMENTO |
|-----------|--|----------------------|
| GRUPO I | Fotocromógenas (produz pigmento apenas quando exposto à luz) | Lento |
| GRUPO II | Escotocromógenas (produz pigmento independente da presença ou ausência de luz) | Lento |
| GRUPO III | Acromógenas (não apresentam pigmentação) | Lento |
| GRUPO IV | Produtoras ou não de pigmento | Rápido |

Fonte: RUNYON (1959).

As micobactérias de crescimento rápido (MCR) são espécies saprófitas que, assim como as demais, estão amplamente distribuídas no ambiente, particularmente no solo e na água. Estão presentes na água que abastece os hospitais, residências domésticas e indústrias devido a sua resistência a agentes esterilizantes e, além disso, possuem habilidade de crescimento e sobrevivência em água destilada. São considerados importantes patógenos humanos podendo causar desde infecções localizadas até infecções disseminadas (ANVISA, 2009; CARDOSO, 2009).

Muitas espécies de MCR são patógenos oportunistas, principalmente *Mycobacterium fortuitum*, *M. abscessus* e *M. chelonae*, podendo causar abscessos localizados, doenças pulmonares e disseminadas (CARDOSO, 2009). Espécies como *M. abscessus* e *M. fortuitum* são MCR que causam doenças pulmonares, linfadenopatia e infecções de tecidos moles (HUANG et al., 2013). A espécie *M. abscessus* foi subclassificada em novas espécies relacionadas: *M. abscessus* sensu stricto (ss), *M. massiliense* e *Mycobacterium bolletii*, devido a diferentes fenótipos de resistência a antimicrobianos (RACHID et al., 2012).

Geralmente, as infecções hospitalares provocadas pelas MCR são causadas por falhas em procedimentos de desinfecção e esterilização dos materiais utilizados durante os atos médicos, ou ainda, devido a elevada resistência da maioria dessas espécies perante o uso de alguns saneantes (ANVISA, 2008). Constata-se que as MCR mais incidentes nos casos de infecções por procedimentos invasivos foram as espécies *M. abscessus* (31,3%), *M. abscessus* subespécie *bolletii* (30,4%); *M. fortuitum* (13,8%) e *M. chelonae* (1,5%). Outras espécies corresponderam a 2,7% dos casos

(ANVISA, 2011), mas novas espécies como *Mycobacterium goodii* e *M. massiliense* foram recentemente relatadas (FARIA; JOÃO; JORDÃO, 2015).

Em uma análise retrospectiva dos prontuários de pacientes diagnosticados com doença pulmonar por MNT atendidos em um centro de referência localizado na cidade de Porto Alegre/RS, entre 2003 e 2013, foi possível atestar que entre todas as espécies de MNT identificadas, três foram as mais prevalentes (em 64% dos casos) *M. avium complex* (MAC, complexo *M. avium*), em 35 pacientes; *M. kansasii*, em 17; e *M. abscessus*, em 12. Entre as espécies de MAC, 26 foram identificadas como *M. avium*, e 9, como *M. intracellulare*. Micobactérias de crescimento rápido foram identificadas em apenas 16 pacientes: *M. abscessus*, em 12; e *M. fortuitum*, em 4 (CARNEIRO et al., 2018).

A espécie *M. massiliense* causou no Brasil um surto de infecções generalizadas após cirurgias assistidas (LEÃO et al., 2010). Essa espécie é o agente causador da maioria das infecções relacionadas a MCR nas cidades brasileiras (SÃO PAULO, 2010). Sabe-se que dentre todas as MNT, as MCR das espécies *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* são responsáveis por grande parte das infecções notificadas no país (BRASIL, 2009). Esse grupo de micobactérias está frequentemente relacionado com a formação de biofilmes, o que contribui para o agravamento das micobacterioses (CARDOSO, 2009).

1.3 MICOBACTERIOSES

As micobacterioses são doenças causadas pelas MNT, que são responsáveis por infecções de pele e tecidos moles, infecções pulmonares, crônicas e progressivas, linfadenite cervical pediátrica e infecções disseminadas, especialmente em casos avançados de AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). Embora muitos pacientes com micobacterioses não sejam imunossuprimidos, a imunossupressão é um fator de risco importante para sua disseminação (WILDNER et al., 2011).

Para diagnosticar de forma correta essa doença, é necessária a realização de uma sequência de testes de identificação através de laboratórios de análises clínicas adequados para o isolamento e identificação das espécies, além do mais, se faz necessária a distinção para com a tuberculose pelo fato de ambas serem clinicamente

semelhantes, porém, apresentam diferenças no prognóstico e tratamento (CERCA, 2010; DE MELLO et al., 2013; FLORES et al., 2016).

O procedimento utilizado para diagnosticar as micobacterioses se inicia com a descontaminação da amostra clínica, seguido pelo exame microscópico para confirmar a presença de BAAR através da coloração de Ziehl-Neelsen, o isolamento do microrganismo em cultura de Lowenstein - Jensen (LJ) ou Ogawa, a avaliação da morfologia das colônias e, por fim, a sua identificação a nível de complexo ou espécie através de testes bioquímicos ou moleculares, além da diferenciação fenotípica (CERCA, 2010; VIANA-NIERI, 2008). Alguns dos testes utilizados são vistos como limitados e/ou insuficientes para determinar a terapia adequada no tratamento das infecções causadas por MCR, desta forma, visando uma melhoria considerável na velocidade de identificação das MNT se faz necessário o uso de metodologias auxiliares, como por exemplo, os métodos moleculares mais rápidos e sensíveis com maior poder discriminatório e precisão, que podem detectar e identificar as espécies diretamente das amostras clínicas ou a partir de colônias de cultivo, incluindo testes baseados na amplificação de ácidos nucleicos como a Reação em Cadeia da Polimerase(PCR) e suas variações, sequenciamento de DNA, entre outros (BRASIL, 2008; NGAN et al., 2011; WILDNER et al, 2011).

A infecção pulmonar é o principal alvo das MNT, que ocorre pela inalação de aerossóis contendo os bacilos, geralmente em pacientes com doença pulmonar pré-existente. Nestes casos a avaliação clínica é complexa, pois os sinais e os sintomas são variáveis, inespecíficos e similares aos da Tuberculose. Os pacientes geralmente apresentam sintomas como tosse crônica com expectoração, fadiga, febre, hemoptise e perda de peso (SÃO PAULO, 2010).

Em um hospital universitário da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, foi desenvolvido um estudo onde se avaliou por três anos a preponderância de MNT em relação ao total de casos de micobactérias identificadas em pacientes do hospital. Os resultados denotaram que mais de 30% dos casos clínicos investigados foram causados por MNT, sendo que 18% da totalidade de casos pertenciam ao grupo de MCR (AGERTT et al., 2013; FLORES et al., 2016). Sendo assim, é relevante compreender as relações entre os casos de micobacterioses e as espécies causadoras de implicações clínicas.

1.4 BIOFILMES

Os microrganismos apresentam-se em ambientes aquosos tanto na forma planctônica (livre) com o na forma sésil. Na forma sésil encontram-se aderidos a superfícies sólidas sob a forma de biofilmes, enquanto que na forma planctônica encontra-se em suspensão e dispersos no meio aquoso (MACHADO, 2005; TRENTIN et al., 2013). A maioria das bactérias é encontrada no meio ambiente sob forma de biofilmes (comunidades de células sésseis), e não como células isoladas. (OJHA; HATFULL, 2007).

Os biofilmes são ecossistemas com elevado grau de organização, onde bactérias e outros microrganismos formam comunidades estruturadas, atuando de forma coordenada e funcional, e altamente dinâmica. As estruturas apresentam uma disposição variável de células e associados celulares, aos quais integram um modo protegido de crescimento de microrganismos (BONEZ et al., 2013; MORENO, 2010) e que influenciam na virulência bacteriana, patogênese e sobrevivência (ARAI et al., 2013; VASUDEVAN, 2014). As micobactérias são preponderantes na formação de biofilmes, podendo ser potenciais causadoras de surtos de doenças demonstrando um risco significativo a saúde (SENNA et al., 2008; MULLIS; FALKINHAM, 2013).

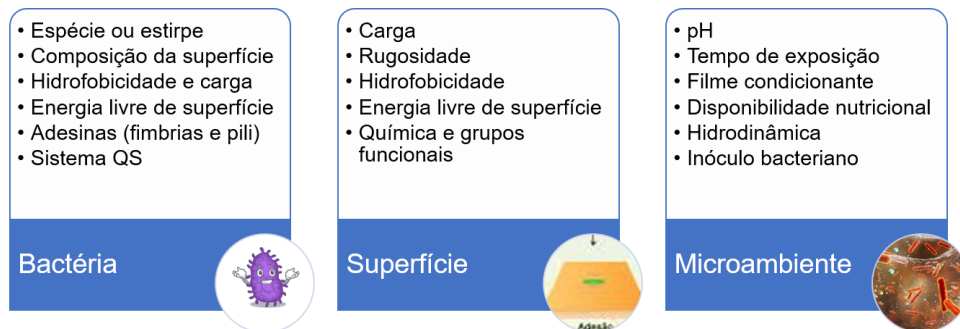
Os biofilmes podem formar-se nas mais diversas superfícies, nas quais se incluem os tecidos vivos, equipamentos hospitalares, nos sistemas de água potável ou industrial, ou ainda em sistemas aquáticos naturais (DONLAN, 2002). Quando o microrganismo está inserido em um biofilme garante proteção e alta resistência perante os agentes agressivos do meio, como os antimicrobianos, os sistemas imunitários dos hospedeiros e desinfetantes (ARAI et al., 2013). Os biofilmes demonstram, também, resistência acrescida à radiação UV, alterações de pH, desidratação e a predadores como protozoários (XAVIER et al., 2003).

1.4.1 Estrutura e composição de biofilmes

Biofilme é uma comunidade complexa e estruturada de diferentes microrganismos que podem ser da mesma espécie ou não, e estão envolvidos por uma matriz extracelular de polissacarídeos, sendo responsáveis pela adesão a superfícies e a coesão no biofilme. Este emaranhado polimérico envolve todas as células

microbianas (COSTERTON et al., 1995; FLEMMING; WINGENDER, 2010; OLIVEIRA, 2011). A composição do biofilme é dependente das condições do meio em que está inserido, sendo influenciado pela temperatura, pressão, pH e oxigênio dissolvido, entre outros parâmetros que podem ser melhor observados na Figura 2 (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

Figura 2 – Principais parâmetros que influenciam a estrutura do biofilme



Fonte: adaptado de TRENTIN et al., 2013; CAETANO, 2018.
Principais parâmetros que influenciam a estrutura do biofilme, conseqüentemente, na adesão bacteriana, dentre eles, fatores relacionados à superfície em questão, à bactéria envolvida e ao microambiente em que ambos se encontram.

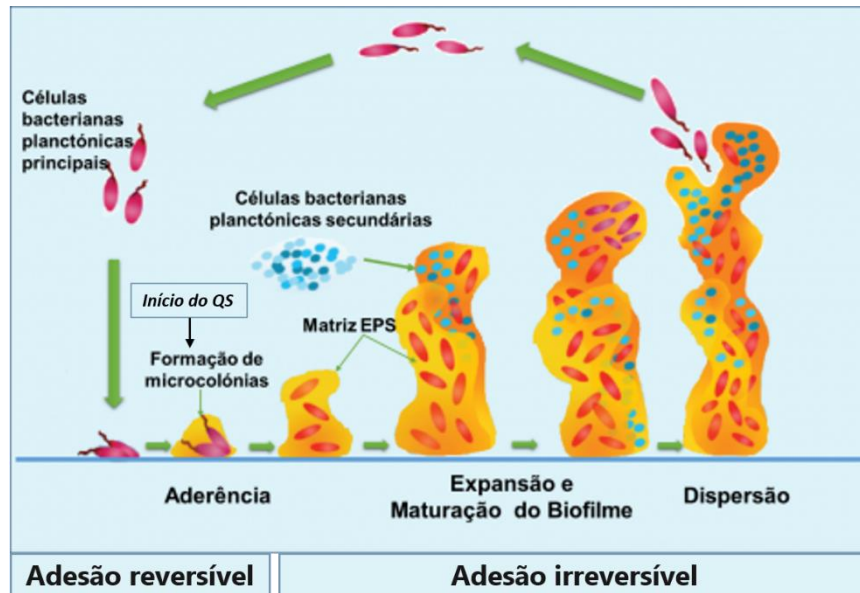
Além da matriz exopolissacarídica, os biofilmes são constituídos por água e por outras macromoléculas primordiais como: proteínas, lipídeos, enzimas, ácidos nucleicos, íons, e assim formam estrutura porosa e altamente hidratada, contribuindo para a permanência e sobrevivência dos microrganismos em condições hostis. De acordo com alguns autores, esta matriz tem potencial de prevenir o acesso físico de certos agentes antimicrobianos restringindo a difusão destes para o interior dos biofilmes (HOIBY et al., 2011; OLIVEIRA, 2011; VASUDEVAN, 2014). Esta matriz é produzida pelos próprios microrganismos ao qual o biofilme está incorporado e é responsável pela morfologia, estrutura, coesão, integridade funcional dos biofilmes e a sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes (MACHADO, 2005; BILLINGS et al., 2015).

1.4.2 Processos envolvidos na formação de biofilmes

Adesão, maturação e desprendimento/dispersão fazem parte do processo de formação de biofilmes. Este processo depende do tipo de microrganismo, da

composição da superfície e das influências do meio ambiente (DUNNE, 2002). As etapas envolvidas na formação de biofilmes podem ser observadas na Figura 3.

Figura 3 – Etapas de formação do biofilme microbiano



Fonte: Adaptado de TREMBLAY et al., 2014; MACEDO E ABRAHAM (2009).

As células inicialmente planctônicas aderem a uma superfície, primeiro de forma reversível e depois irreversivelmente, e tornam-se sésseis. As microcolônias de células microbianas iniciam a comunicação entre si através da produção de moléculas auto indutores (num processo denominado *quorum sensing* - QS) que levam à expressão de genes específicos. Como resultado, as células segregam uma matriz extracelular de polissacarídeos. As bactérias multiplicam-se, levando à expansão e maturação do biofilme. Finalmente o biofilme é disperso com as células a regressarem ao estágio planctônico para dar início a novos biofilmes em outros sítios de adesão.

O processo de formação do biofilme tem início com bactérias planctônicas, que ao entrarem em contato com uma superfície iniciam o processo de adesão, formando pontes de ligação entre si e a superfície. A primeira etapa da adesão é reversível e é mantida por interações físico-químicas constituindo a base para o crescimento do biofilme. À medida que a população bacteriana aumenta, os microrganismos se organizam em microcolônias, dispostas em monocamadas, através do QS. Então, subsequente à etapa da adesão reversível, tem-se a transição do estágio reversível para o irreversível, que resulta do auxílio de apêndices (pili, flagelo, proteínas adesina) e/ou da produção de substâncias poliméricas extracelulares, fazendo com que as ligações entre as células e a superfície se fortaleçam (BONEZ et al., 2013; CHRISTENSEN; CHARACKLIS, 1990; TRENTIN et al., 2013).

O fator que medeia a formação de biofilmes é o *Quorum Sensing* (QS). Trata-se de um sistema de comunicação que associa o crescimento populacional bacteriano com a liberação de moléculas sinalizadoras auto indutoras, ou seja, à medida que ocorre aumento da densidade bacteriana, mais moléculas auto indutoras são produzidas, as quais induzem a expressão de genes específicos envolvidos na formação do biofilme, como motilidade, virulência, produção de substâncias polissacarídicas extracelulares (SPE) (TRENTIN et al., 2013).

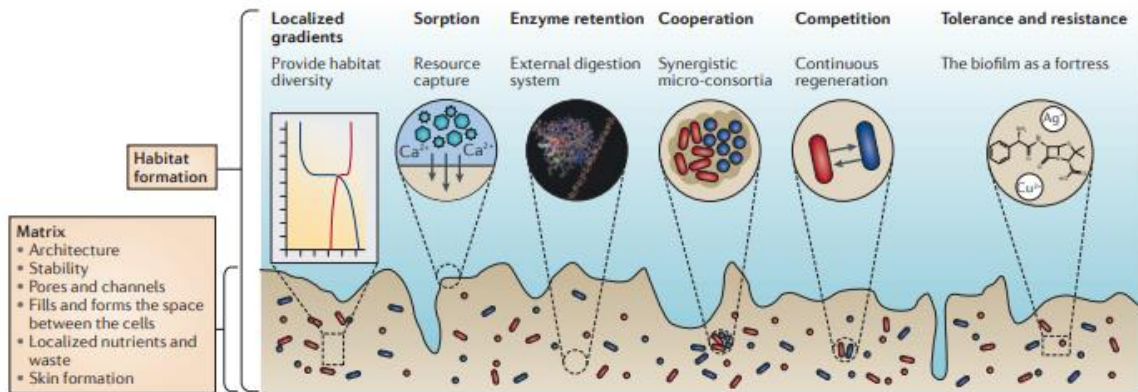
A maturidade do biofilme acontece, principalmente, por meio do aumento da densidade populacional e, também, pela produção e deposição de polímeros extracelulares gerados pelos microrganismos, aumentando a espessura do biofilme. O biofilme maduro caracteriza-se por apresentar estrutura hidratada, viscosa e elástica, com aspecto gelatinoso, são envoltos por diversas substâncias, principalmente açúcares e rodeados por poros e canais de água que funcionam como um sistema de troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos que precisam ser secretados para fora do biofilme (CULLER, 2014; DONLAN, 2002; STOODLEY, 2002).

Por fim, a última etapa de formação consiste no desprendimento/ descolamento do biofilme maduro em forma de agregados celulares ou células planctônicas, que ocorre quando o ambiente não é mais favorável à sua manutenção. Depois de desprendidas, as bactérias livres poderão colonizar novos ambientes, reiniciando a formação de novos biofilmes, tornando-se fontes de contaminação (BONEZ et al., 2013; CULLER, 2014; SIQUEIRA et al., 2018; STOODLEY, 2002).

1.4.3 Fatores que influenciam na formação de biofilmes

As características que integram o desenvolvimento estrutural do biofilme junto com sua complexa organização levam a formação de um habitat essencial para a vida dos microrganismos (CORNING et al., 2002). O papel da matriz exopolissacarídica que envolve os biofilmes é substancial para essas características do seu desenvolvimento, como a formação de interações físicas e sociais, uma maior taxa de troca de genes e uma maior tolerância a antimicrobianos (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Na Figura 4, é possível analisar as propriedades de desenvolvimento dos biofilmes e que influenciam na sua formação.

Figura 4 – Propriedades emergentes de biofilmes e formação de habitat



FONTE: FLEMMING et al., 2016.

As células bacterianas em biofilmes podem ser consideradas formadoras de habitat, devido à geração de uma matriz que forma a base física do biofilme. A matriz é composta por substâncias poliméricas extracelulares (SPE) que fornecem arquitetura e estabilidade ao biofilme. Nutrientes e outras moléculas podem ser capturados tanto por sorção para moléculas de SPE quanto para os poros e canais da matriz, enquanto a formação de pele por moléculas de SPE hidrofóbicas aumenta a capacidade do biofilme de sobreviver à dessecação. Os biofilmes derivam várias propriedades emergentes - isto é, propriedades que não são previsíveis a partir do estudo de células bacterianas de vida livre - da matriz SPE. Essas propriedades incluem gradientes localizados que fornecem diversidade de habitat, captura de recursos por sorção, retenção de enzima que fornece capacidades digestivas, interações sociais e a capacidade, por meio de tolerância e/ou resistência, de sobreviver à exposição a antibióticos.

A maioria das células bacterianas são carregadas negativamente e devido as forças de repulsão eletrostática, que mantém as células a certa distância da superfície, esta carga negativa é adversa a adesão bacteriana. Por isso, as propriedades físico-químicas da superfície são importantes para adesão bacteriana. Levando em consideração que a superfície celular bacteriana possui hidrofobicidade devido a presença dos flagelos, das fimbrias e lipopolissacarídeos, facilita a adesão dos microrganismos à superfície, demonstrando maior capacidade de formação de biofilmes (MILLEZI, 2012; SHI; ZUH, 2009).

Alguns estudos genéticos forneceram uma visão sobre alguns dos principais fatores necessários para a formação do biofilme de micobactérias. Os glicopeptídeos (GPL) são necessários para a fixação inicial na superfície das células bacterianas (NGUYEN et al., 2010). Os GPL são peptídeos lipídios glicosilados presentes na camada exterior do envelope celular das micobactérias e estão intimamente ligados a motilidade das mesmas, já que estas não possuem flagelos para a movimentação celular (RECHT et al., 2000).

A maioria dos microrganismos são capazes de desenvolver biofilmes somente em faixas neutras de pH, porém, existem algumas espécies que formam biofilmes em

pH mais baixo como é o caso da *Citrobacter werkmanii* (MACHADO, 2005). Além disso, concentrações maiores de sódio, cálcio e íon férrico reduzem as forças de repulsão entre a célula e a superfície facilitando a formação de biofilme, em algumas espécies (BONEZ et al., 2013; KOKARE, 2009).

A exigência de ferro e zinco também desempenha um papel importante na maturação do biofilme de *M. tuberculosis*, onde reduzir a quantidade normal de ferro não tem efeito sobre o crescimento planctônico, mas retarda severamente o crescimento do biofilme. A remoção do suplemento de zinco também interrompe o desenvolvimento do biofilme de *M. tuberculosis*, sem afetar o crescimento planctônico. Sendo assim, ferro e zinco são cofatores de metais importantes para enzimas envolvidas na geração e captura de CO₂, bem como na síntese de ácidos micólicos. Além deles, o oxigênio também é um elemento importante para *M. tuberculosis* frente à formação de biofilme, que ocorre na interface líquido-ar, o contrário do que acontece com a maioria dos microrganismos (OJHA et al., 2008).

Os ácidos micólicos possuem um papel fundamental na organização da parede celular da *M. tuberculosis*. Além de se encontrarem em grande quantidade na parede celular, os ácidos micólicos são de natureza lipídica e protegem a micobactéria da desidratação, de agentes químicos (desinfetantes) e de agentes antibacterianos (VANDER BEKEN et al., 2011).

Segundo Ojha e colaboradores (2008), os bacilos de *M. tuberculosis* têm capacidade de libertar ácidos micólicos da parede celular para formar biofilme, sendo este permeável aos gases facilitando assim a entrada de oxigênio e a sobrevivência da micobactéria no interior do macrófago. Outra característica importante consiste na função de barreira dos biofilmes aos antibióticos, impedindo o contato destes com a micobactéria. Os ácidos micólicos livres presentes no biofilme têm capacidade de induzir resposta inflamatória pulmonar e de ativar os macrófagos (VANDER BEKEN et al., 2011).

1.5 FERRO E A SUA IMPORTÂNCIA PARA AS MICOBACTÉRIAS

O ferro é um elemento essencial para as micobactérias, pois influencia no crescimento e na sobrevivência das mesmas, assim como em todos os organismos vivos. Ele pode existir em dois estados de oxidação, Fe²⁺ (forma reduzida, íon ferroso)

e Fe^{3+} (forma oxidada, íon férrico), mas em alta concentração de oxigênio ele está presente exclusivamente na forma de Fe^{3+} , a qual não apresenta boa solubilidade. O íon Fe^{2+} é muito mais solúvel, no entanto, existe apenas em condições de anoxia ou em pH bastante baixo (CHU et al., 2010). Desta forma, a capacidade de adquirir ferro em um hospedeiro é um atributo essencial da maioria dos patógenos, mas também representa um desafio porque o ferro não é solúvel na presença de oxigênio e em pH neutro (WEINBERG, 1999).

O ferro está envolvido no metabolismo das micobactérias, atua no transporte de elétrons, e atua como cofator de diversas enzimas, principalmente em micobactérias patogênicas (RATLEDGE, 2004; ROCHA, 2014; RODRIGUEZ; SMITH, 2003; VOSS et al., 1999). Porque o ferro não está disponível livremente no hospedeiro, os patógenos devem competir ativamente por esse metal para estabelecer uma infecção, mas também devem controlar cuidadosamente a aquisição de ferro, pois o excesso de ferro livre pode ser extremamente tóxico (IMLAY et al., 1988; YUN; VINCELETTE, 2015).

As micobactérias captam a forma insolúvel do íon ferro (Fe^{+3}) no hospedeiro, e a solubilidade extremamente baixa do íon férrico em solução aquosa, assim como o complexo de ligação com o ferro ter alta afinidade pelas proteínas do hospedeiro, dificultam a sua obtenção. Por isso, os microrganismos desenvolveram estratégias para adquirir ferro solúvel o suficiente para o crescimento e desta forma poder causar a infecção (ROCHA, 2014; RODRIGUEZ, 2006; VOSS et al., 1999).

Bactérias patogênicas desenvolveram mecanismos para obter ferro do hospedeiro que podem ser amplamente classificados em dois grupos; (a) aquisição de ferro mediada por sideróforo e (b) mecanismos de aquisição específicos que obtêm ferro a partir de proteínas complexas do hospedeiro, como heme, transferrina e lactoferrina (CASSAT; SKAAR, 2013; HUANG; WILKS, 2017; RICHARD; KELLEY; JOHNSON, 2019).

Uma destas estratégias utilizadas para suprir suas necessidades nutritivas é a síntese de sideróforos, que são quelantes de ferro com alta afinidade (GUERINOT, 1994; SILVA; FAUSTINO, 2015). Sideróforos apresentam uma unidade funcional que se liga com moléculas de ferro, (transferrinas e lactoferrinas, por exemplo) e uma cadeia peptídica que interage com um receptor na superfície da membrana bacteriana (CORNELIS et al., 1989; DE CHIAL et al., 2003; HOHNADDEL; MEYER, 1988; ROCHA, 2014; SPENCER et al., 2003). Temperatura, pH, fontes de carbono e outros metais

são fatores externos que influenciam na regulação da síntese de sideróforos, entretanto, o fator principal desta regulação é a deficiência de ferro (ROCHA, 2014; WINKELMANN, 2007).

As micobactinas são sideróforos produzidos pela micobactérias com alta afinidade pelo íon férrico. São produzidas duas formas de micobactinas: a forma mais polar, a carboximicobactina, é secretada para o meio extracelular, além de sequestrar ferro de proteínas do hospedeiro; e a forma menos polar, a micobactina, permanece associada à célula (RATLEDGE, 1999). Estudos revelaram que cepas mutantes de MTB com deficiência em micobactina são incapazes de estabelecer infecção em camundongos, desta forma, a síntese da micobactina se mostra como um potencial alvo no MTB (VOSS et al., 2000; REDDY et al., 2013).

Outras micobactérias, como o *M. tuberculosis*, sintetizam as micobactinas, e estas são críticas para o crescimento de condições limitadas de ferro em macrófagos e em camundongos. A expressão dos genes de aquisição normalmente é rigorosamente regulada e é induzida sob condições limitadas de ferro (VOSS et al., 1999; OJHA; HATFULL, 2007).

A proteína IdeR é um proteína reguladora dependente de ferro, que controla a síntese dos sideróforos. Atua como um sensor (promotor e repressor) do íon ferro que se liga nos sítios responsáveis pelas ativações de acordo com a disponibilidade do íon ferro. Resumidamente, IdeR regula negativamente a biosíntese de sideróforos e modula positivamente a estocagem de ferro, em condições de excesso de ferro (RODRIGUEZ et al., 2002).

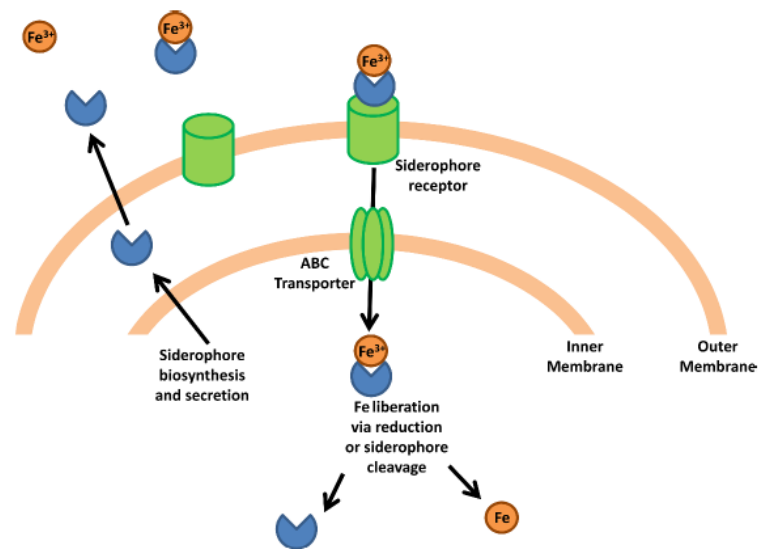
Todos os organismos vivos regulam intensamente os níveis celulares de ferro, através do uso de mecanismos de aquisição e estoque deste íon. Desta forma, sabe-se que a presença de ferro é essencial, porém o excesso de ferro livre causa efeitos tóxicos para a célula, já que este íon catalisa a produção de radicais reativos de O₂ pela reação de Fenton. Entretanto, o excesso de ferro pode ser estocado ou envolvido em processos fisiológicos (ANDREWS, 1998; OJHA; HATFULL, 2007).

Por exemplo, a maturação do biofilme no caso da *M. smegmatis* requer a presença de um suplemento de ferro, e a remoção deste suplemento, sem ter efeito sobre o crescimento planctônico, acaba prejudicando o desenvolvimento do biofilme. Sendo assim, os sistemas de captação de ferro podem desempenhar papéis importantes no desenvolvimento do biofilme (OJHA; HATFULL, 2007).

1.5.1 Mecanismos de captação de ferro em microrganismos

De modo geral, os sideróforos bacterianos são moléculas extracelulares com afinidade muito alta para o ferro férrico que são produzidas por muitas espécies patogênicas diferentes (Figura 5). A elevada afinidade dos sideróforos permite que eles retirem o ferro das proteínas do hospedeiro, logo depois, o complexo sideróforo-ferro é interligado por meio de um receptor específico de sideróforos na superfície da célula bacteriana (FOLEY; SIMEONOV, 2012; VINUESA; McCONNELL, 2021). Ao atingir o citosol bacteriano, o ferro férrico é liberado para o pool intracelular de ferro através da clivagem do sideróforo ou através da redução de Fe (III) em Fe (II), o que diminui a afinidade de ligação ao sideróforo, permitindo assim sua dissociação. Vale ressaltar que esse mecanismo não é válido a todos os sistemas de sideróforos (CASSAT; SKAAR, 2013).

Figura 5 – Aquisição de ferro bacteriano via sideróforos



Fonte: VINUESA; McCONNELL, 2021.

O esquema representa um sistema genérico de aquisição de ferro mediado por sideróforo com base em características comuns em espécies Gram-negativas. Os sideróforos são sintetizados e secretados pela célula bacteriana, onde capturam o ferro livre ou separam o ferro complexado com as proteínas do hospedeiro. O complexo sideróforo-ferro se liga a um receptor específico de sideróforo na superfície da célula bacteriana e é transportado através da membrana extracelular. Um transportador ABC transporta o complexo sideróforo-ferro para o citoplasma, onde o complexo é dissociado por redução ou clivagem enzimática do sideróforo, liberando o átomo de ferro para o reservatório de ferro intracelular.

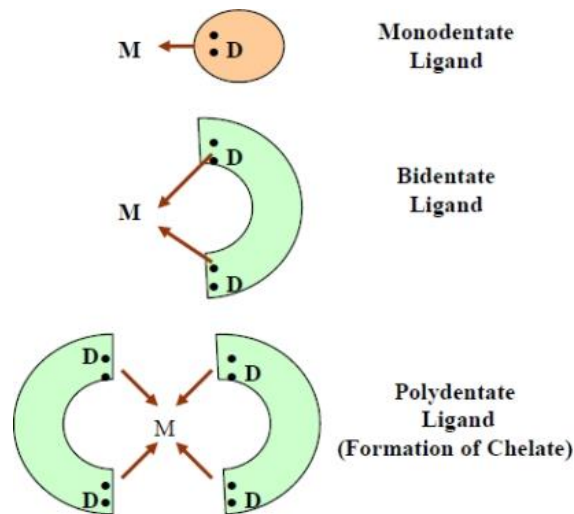
A aquisição de ferro da transferrina e lactoferrina do hospedeiro ocorre por meio da interação entre essas proteínas, complexadas com ferro férrico, e receptores específicos na superfície das células bacterianas. Esses receptores são capazes de retirar o Fe (III) da transferrina e da lactoferrina e transportá-las para o interior da célula (WANDERSMAN; DELEPELAIRE, 2004). Os receptores específicos na superfície da célula bacteriana ligam-se a esses complexos heme, que são então transportados para o citosol. Enzimas bacterianas, como a heme monooxigenase, clivam a porção heme e liberam o Fe (II) no reservatório de ferro intracelular. A aquisição de ferro ferroso também pode ser facilitada por sistemas de captação específicos, como o sistema Feo, que é amplamente distribuído em diferentes espécies de Gram negativos (LAU; KREWULAK; VOGEL, 2016; VINUESA; McCONNELL, 2021).

1.5.2 Quelantes de ferro como agentes antimicrobianos

Os agentes quelantes são moléculas orgânicas ou inorgânicas competentes na formação de um complexo em formato de anel, também chamada de “quelato”, devido a capacidade de ligação covalente com íons metálicos (FLORA; PACHAURI, 2010; SÁ, 2013). As ligações covalentes com os íons metálicos são dependentes do tamanho do metal, das interações elétricas e da compatibilidade para com o ligante. Vale ressaltar que, ligantes que formam apenas uma ligação com o íon metálico (central) são denominados de monodentados, além disso, os que se ligam por interposto de dois átomos são chamados de bidentados, e por último, caso a ligação ocorra com mais de dois átomos denomina-se ligação multi ou polidentados. Esta explicação pode ser melhor visualizada na Figura 6 (LIU; HIDER, 2001; SHIRIVER; ATKINS, 2008; HARRIS, 2001; SÁ, 2013).

Segundo Andersen (2004), quanto maior for o número de ligações do ligante com o íon metálico, maior é a estabilidade do complexo formado, sendo assim, os ligantes bi ou multidentados são mais estáveis do que comparado com os monodentados. Existem várias explicações para este fato, mas o tamanho dos íons e o tamanho do anel influenciam consideravelmente na estabilidade.

Figura 6 – Formação do complexo metal/ligante



FONTE: FLORA; PACHAURI, (2010).

Formação de ligantes metálicos usando ligantes mono, bi e polidentados.

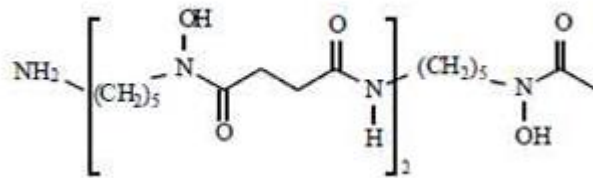
Para que os agentes quelantes sejam adequados são necessárias algumas características importantes, como por exemplo, apresentar elevada solubilidade em água, serem resistentes à biotransformação, terem capacidade de atingir os locais de armazenamento de metal, reterem a capacidade quelante no pH dos fluidos corporais e, além disso, serem capazes de formar complexos metálicos que são menos tóxicos que o íon de metal livre (FLORA; PACHAURI, 2010).

Ambos estados de ferro (ferrosos e férricos), podem ser ligados por agentes quelantes, todavia, eles habitualmente apresentam maior afinidade por um ou outro. Além disso, alguns quelantes também podem ser capazes de se ligar a outros íons metálicos, como cobre (II), zinco (II) ou gálio (III). A capacidade desses compostos em quelar Fe (III) com maior estabilidade e afinidade depende dos ligantes disponíveis para a coordenação do ferro, e isso pode explicar porque a maioria dos sideróforos produzidos por microrganismos usam coordenação hexadentada (ZHOU et al., 2011).

Perante o exposto, um dos planos utilizados para atingir a limitação de ferro é o uso de moléculas quelantes (sideróforos) que sequestram o metal e evitam sua absorção pelo microrganismo causador da infecção. Já que o ferro é necessário ao crescimento e sobrevivência de inúmeros microrganismos patogênicos, minimizar a quantidade dele disponível no local da infecção tem clara capacidade de auxiliar com abordagens de tratamento (LIU; HIDER, 2001; ZHOU et al., 2011).

A atividade antimicrobiana dos quelantes de ferro já vem sendo estudada e demonstrada há muitos anos. Na classe dos quelantes Hidroxamatos, um dos primeiros quelantes de ferro a ser avaliado como um antimicrobiano foi a Desferroxamina (DFO), um sideróforo hexadentado trihidroxamato (Figura 7) produzido por *Streptomyces pilosus* que é aprovado pela FDA para o tratamento de talassemia e outros distúrbios do ferro (GOKARN; PAL, 2018). Este agente quelante é conhecido pela sua elevada afinidade de ligação ao ferro trivalente e menor afinidade por outros metais (FLORA; PACHAURI, 2010).

Figura 7 – Estrutura química da Desferroxamina



Fonte: FLORA; PACHAURI, 2010.

Em um estudo realizado por GOKARN e PAL (2018) foi exposto que a Desferroxamina é capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, em um meio com elevado teor de ferro. E em outro estudo, o mesmo composto foi testado contra esses mesmos patógenos em um meio pobre em ferro e a inibição deles não foi observada (THOMPSON et al., 2012). Além disso, a ação da Desferroxamina em reduzir a formação de biofilmes também foi estudada, e demonstrou eficácia em um modelo molecular de fibrose cística em 42% em *P. aeruginosa* (MOREAU-MARQUIS; O'TOOLE; STANTON, 2009).

Uma limitação potencial dos compostos derivados de microrganismos é a possibilidade de que outras espécies microbianas possam reconhecer esses xenosideróforos, internalizá-los e explorar o ferro associado. Diferentes patógenos, mostraram ser capazes de usar complexos de ferro-DFO como fonte de ferro (CUÍV et al., 2006; CLARKE et al., 2002; LLAMAS et al., 2006). E ainda, alguns estudos descrevem a capacidade de alguns microrganismos crescerem em um meio pobre em ferro em concentração subótima de DFO melhor do que sem ele (VISCA et al., 2013).

Isso pode explicar os altos MIC vistos com DFO contra esses microrganismos. No entanto, a capacidade do DFO de ser absorvido por bactérias que não o produzem foi revelada como uma estratégia eficaz para transportar diferentes moléculas com atividade antimicrobiana para esses patógenos (BANIN et al., 2008; HUAYHUAZ et al., 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a ação do Sulfato ferroso e do Citrato férrico na formação de biofilmes de micobactérias de crescimento rápido, bem como, do quelante Desferroxamina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Determinar a Concentração Inibitória Mínima do Sulfato ferroso (FeSO_4) e do Citrato férrico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), e da Desferroxamina frente a *M. abscessus*, *M. massiliense*, e *M. fortuitum*.

2.2.2 Avaliar a influência de concentrações subinibitórias do Sulfato Ferroso, do Citrato Férrico, e da Desferroxamina na formação dos biofilmes de *M. abscessus*, *M. massiliense*, e *M. fortuitum*.

2.2.3 Avaliar a capacidade da Desferroxamina em quelar o ferro, nos seus diferentes estados de oxidação, durante o processo de formação de biofilme das cepas em estudo, em meios de cultura suplementados com Sulfato ferroso e com Citrato férrico, a partir disso, determinar a influência desse tratamento na formação do biofilme micobacteriano.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS, SAIS DE FERRO E DESFERROXAMINA

Para a realização deste estudo foram utilizadas cepas padrões provenientes da micobacterioteca do Laboratório de Micobacteriologia do Departamento de Análises Clínicas da UFSM: *M. abscessus* (ATCC 19977), *M. massiliense* (ATCC 48898) e *M. fortuitum* (ATCC 6841). Os sais de ferro testados incluem Sulfato ferroso (Fluka) e Citrato férrico (Fluka), e o outro composto testado foi a Desferroxamina (Novartis).

3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A suscetibilidade dos microrganismos na forma planctônica foi obtida através de técnicas convencionais de microdiluição em caldo segundo CLSI M24 (CLSI, 2020). A padronização da densidade do inóculo para o teste de suscetibilidade foi realizada de acordo com a escala 0,5 de Mac Farland. Para a preparação do inóculo final (5×10^5 UFC/mL) transferiu-se o volume de 50 µL da suspensão bacteriana para um tubo de ensaio contendo 9,950 mL de caldo Mueller-Hinton (Merck). Foram transferidos 100 µL do inóculo para microplacas de titulação estéreis já acrescidas da diluição dos sais de ferro e da Desferroxamina em igual volume, mais 100 µL de meio. A leitura das placas foi realizada após incubação por 72 horas a 37°C e as CIM determinadas.

3.3 FORMAÇÃO E TRATAMENTO DOS BIOFILMES

Para a realização do ensaio, foram utilizadas concentrações dos sais de ferro e da Desferroxamina, iguais e inferiores às CIM determinadas pela técnica de microdiluição em caldo. A formação do biofilme foi desenvolvida como descrito por Flores e colaboradores (2016). Em tubos de ensaio de poliestireno foram adicionadas concentrações subinibitórias dos compostos testados, contendo 01 ml de suspensão bacteriana na concentração 1×10^7 UFC/mL. Os tubos foram cobertos com parafilm® e incubados a 37°C por sete dias.

3.3.1 Quantificação dos biofilmes

O biofilme foi quantificado conforme descrito por Flores e colaboradores (2016). As células fracamente aderidas ao biofilme formado foram removidas pela lavagem com solução fisiológica e o restante seco à temperatura ambiente por alguns minutos. Após, foram adicionados 02mL de suspensão de cristal violeta 0,1%, e os tubos foram mantidos em repouso por 10 minutos para posterior lavagem com solução fisiológica para remoção de células planctônicas remanescentes e do excesso de corante. Foram adicionados 02mL de etanol 95% a cada tubo de ensaio, mantidos por 15 minutos, e transferidos para cubetas descartáveis para posterior leitura em densidade ótica (DO) de 570nm. A formação do biofilme foi determinada pela diferença significativa entre as médias das absorbâncias obtidas no controle positivo (meio de cultura e bactéria) e a média obtida pelo controle negativo (apenas o composto). O experimento foi realizado em triplicata para os compostos escolhidos neste estudo.

3.3.2 Análise estatística

Para descrever e resumir o conjunto de dados qualitativos, obtidos na realização dos ensaios descritos, foram utilizados métodos de estatística descritiva, gráficos descritivos e descrição tabular. Os dados quantitativos foram tabulados em planilhas eletrônicas. As leituras de densidade óptica obtidas nos ensaios de formação de biofilme foram expressas em média \pm desvio padrão. Foi utilizado ANOVA de uma via seguido pelo Bonferroni's Multiple Comparison Test, considerando-se diferença estatística quando $p < 0,05$. Para a realização dos gráficos, foi utilizado o software Graph Pad Prism versão 5.01.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Micobactérias não tuberculosas são bactérias patogênicas oportunistas que afetam tanto humanos como animais, estando presentes em grande parte do meio ambiente, sendo essa uma importante fonte de infecção. Geralmente, as MNT apresentam uma patogenicidade distinta ao *M. tuberculosis*, que difere de acordo com a espécie, sem comprovação científica de transmissão entre os seres humanos (FALKINHAM, 2002; PRIMM; FALKINHAM, 2017).

As micobacterioses são doenças causadas por este grupo de microrganismo, cuja frequência tem aumentado nos últimos anos, representando uma grande preocupação de saúde pública. Grande parte das infecções provocadas por MNT acometem pele e tecidos moles, sendo as espécies de crescimento rápido mais comumente descritas em diferentes quadros clínicos (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. massiliense* e *M. abscessus*) (ALCAIDE; ESTEBAN, 2010; ESTEBAN; NAVAS, 2018).

Padrão ouro na avaliação laboratorial da suscetibilidade de micobactérias, o método de microdiluição em caldo é sensível e reprodutível, fornecendo resultados quantitativos que auxiliam na implementação de uma terapêutica adequada. É utilizada para relacionar a proporção de crescimento do microrganismo no meio líquido de acordo com a concentração da substância biologicamente ativa testada (PINTO et al., 2003). Nesse estudo, foram determinadas as CIM dos sais de ferro e Desferroxamina, visando selecionar concentrações adequadas, que não inibam o crescimento desses microrganismos na forma séssil e somente influencie nos mecanismos de produção do biofilme.

A susceptibilidade das cepas de MCR frente aos sais de ferro e Desferroxamina está descrita na Tabela 1. Em nossos resultados, foi possível observar que na concentração de 625µg/mL de Sulfato ferroso e 1.250µg/mL de Citrato férrico houve a inibição do crescimento das micobactérias testadas. Já na Desferroxamina houve diferença no CIM de acordo com a micobactéria testada, sendo que, o valor da CIM foi de 12.500µg/mL para *M. abscessus* e *M. massiliense* e 3.125µg/mL para *M. fortuitum*.

Tabela 1 - Determinação da concentração inibitória mínima dos sais de ferro e Desferroxamina frente a *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. fortuitum*

| Compostos | Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}^{-1}$) | | |
|---|--|-----------------------|---------------------|
| | <i>M. abscessus</i> | <i>M. massiliense</i> | <i>M. fortuitum</i> |
| FeSO ₄ | 625 | 625 | 625 |
| Fe(C ₆ H ₅ O ₇) | 1250 | 1250 | 1250 |
| C ₂₅ H ₄₈ N ₆ O ₈ | 12.500 | 12.500 | 3.125 |

Fonte: Autora.

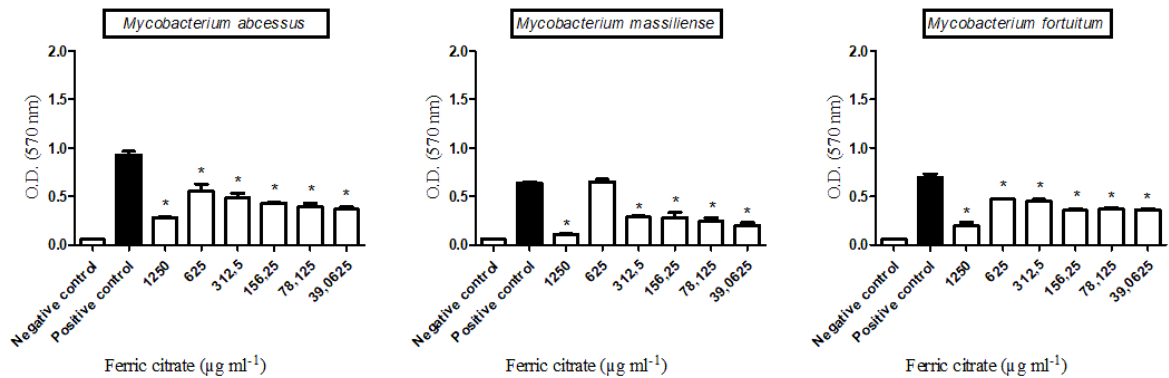
A maioria dos microrganismos desenvolvem diferentes tipos de mecanismos de sobrevivência para se adaptar às condições de estresse. Para as micobactérias a formação de biofilme é a melhor estratégia de continuidade, pois atua como uma barreira contra agressões externas físicas e químicas, fornecendo um ambiente de proteção ao microrganismo (HOYLE; COSTERTON, 1991; KUMAR et al., 2017).

O desenvolvimento de biofilmes é um fator importante na resistência antimicrobiana, devido a proteção fornecida à muitas espécies bacterianas contra esses medicamentos, visto que, diferentes mecanismos como permeabilidade e estado metabólico, têm influenciado nessa resistência. Desta forma, a resistência aos antimicrobianos providos pela formação de biofilmes pode levar a falhas terapêuticas sendo necessária então a total erradicação dos biofilmes para resolução de determinada patologia (CIOFU et al., 2017; ESTEBAN; GARCÍA-COCA, 2018; HOYLE; COSTERTON, 1991).

Diferentes componentes estão envolvidos na formação do biofilme. Durante o processo há a formação de uma matriz polimérica extracelular, acúmulo de ácidos micólicos livres (ácidos graxos de cadeia longa), produção de sideróforos de íons ferro, entre outros. Esses fatores contribuem para a aderência, hidratação, rigidez e formação tridimensional do biofilme. Além destes, os nutrientes, íons (Ca²⁺, Mg²⁺ e Zn²⁺) e fontes de carbono, como glicose e peptona, também influenciam o comportamento bacteriano e apresentam um papel regulador na formação de biofilme (CARTER et al., 2003). Os metais como ferro, cálcio, zinco e magnésio, podem aumentar a formação de biofilme em comparação com o biofilme cultivado somente em água, justamente por estarem envolvidos na manutenção da integridade da matriz polimérica extracelular (VOSS et al., 1999; XIANG et al., 2014).

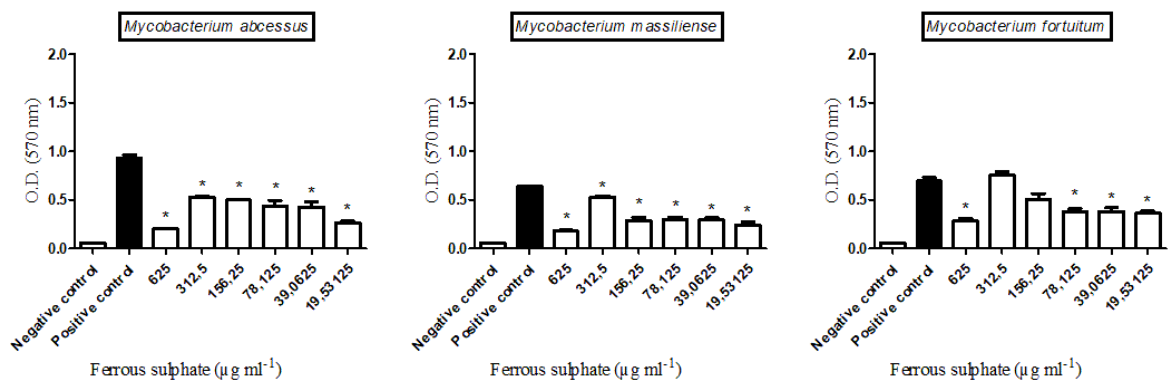
Como já descrito anteriormente, o ferro é um pré-requisito para o crescimento *in vitro* de micobactérias, e sua influência na formação de biofilmes carece de uma importante análise para um melhor conhecimento da fisiopatologia e dos mecanismos utilizados. A capacidade do Sulfato ferroso e do Citrato férrico em influenciar na maturação de biofilme de *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. fortuitum* na CIM e em todas as concentrações subinibitórias testadas, está exibida na Figura 8 e 9.

Figura 8 – Ação de diferentes concentrações do Citrato férrico na formação de biofilmes de *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. fortuitum*



*Diferença significativa entre a concentração testada e o controle positivo. Os testes foram submetidos ao teste t de Student (n = 3), considerando diferenças estatísticas quando p < 0,05.

Figura 9 – Ação de diferentes concentrações do Sulfato ferroso na formação de biofilmes de *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. fortuitum*



* Diferença significativa entre a concentração testada e o controle positivo. Os testes foram submetidos ao teste t de Student (n = 3), considerando diferenças estatísticas quando p < 0,05.

Sabe-se que o ferro atua favorecendo o estágio de maturação do biofilme, sem comprometer o crescimento planctônico, e, além disso, desempenha um papel importante na geração e utilização de gás carbônico como cofatores de metais vitais para a síntese de enzimas, bem como para a síntese de ácidos micólicos, que são muito importantes para a maturação do biofilme (OJHA et al., 2010; VOSS et al., 1999; XIANG et al., 2014).

O presente estudo tem finalidade de expandir o conhecimento existente sobre o papel do ferro na sobrevivência e virulência das cepas testadas. Desta forma, foi possível elucidar o efeito da privação de ferro na formação de biofilme frente à *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. fortuitum*, visto que, o resultado da quantificação mostrou que a formação de biofilme foi significativamente inibida na condição de privação de ferro em contraste com o controle (Fig. 8 e 9), confirmando os achados encontrados por Rahul Pal e colaboradores (2016). Esse resultado segue o mesmo entendimento, tanto para o Sulfato ferroso como para o Citrato férrico, ou seja, independentemente dos estados de oxidação do ferro.

O estudo realizado por Ojha e Hatfull (2007), demonstra que o desenvolvimento completo de biofilmes de *M. smegmatis* requer a adição de ferro suplementar acima de 1 μ M de Sulfato ferroso, embora a adição de ferro não seja necessária para o crescimento planctônico. Especificamente a quantidade necessária de suplementação usada no estudo foi de 2 μ M de Sulfato ferroso para maturação do biofilme de *M. smegmatis* e que a ablação deste suprimento prejudica o desenvolvimento do biofilme, sugerindo que os sistemas de absorção de ferro podem desempenhar papéis importantes no desenvolvimento de biofilme.

De acordo com os resultados encontrados, a concentração de 625 μ g/mL de Citrato férrico na *M. massiliense* está representando a formação completa do biofilme e para isso foi necessária a adição de 1,28 μ M de ferro. Diferentemente ocorre com o Sulfato ferroso na *M. massiliense*, onde, mesmo com a adição de 2,05 μ M de ferro não foi possível obter a maturação completa do biofilme. Com as demais micobactérias, nas concentrações de sais de ferro testadas, também não foi possível visualizar a formação completa do biofilme, com exceção da *M. fortuitum* no Sulfato ferroso.

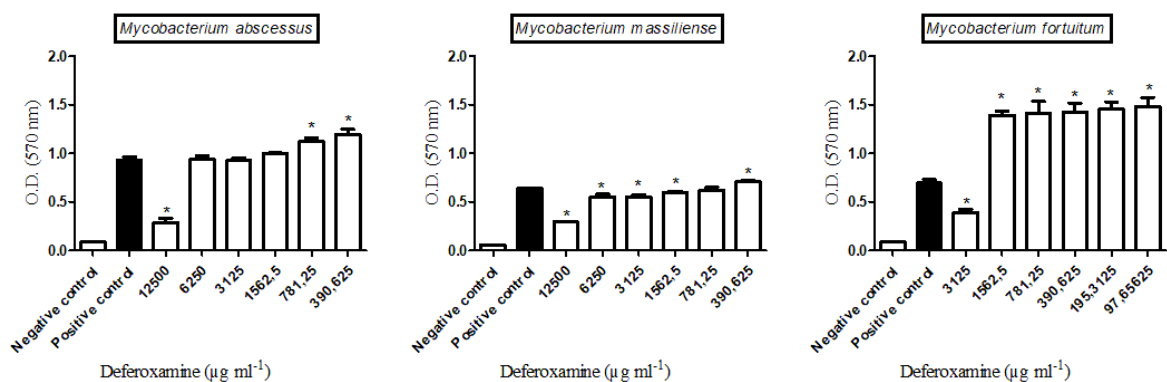
Com vista em estabelecer a infecção, as micobactérias fazem o uso de diferentes mecanismos para atender as suas necessidades nutritivas, incluindo a captura de uma quantidade limitada de ferro em um ambiente hostil (RODRIGUEZ, 2006). Uma forma do hospedeiro se defender dos patógenos bacterianos é

controlando/diminuindo o acesso das micobactérias ao ferro, justamente pela retenção de ferro representar um desafio imenso para o crescimento *in vivo* de micobactérias patogênicas. Por exemplo, *M. tuberculosis* deve batalhar contra o sequestro de ferro para sobreviver no pulmão humano, por isso que, na maioria das vezes, pacientes com tuberculose pulmonar são anêmicos, propondo sequestro de ferro disponível pelo hospedeiro (OJHA; HATFULL, 2007; OJHA et al., 2010; VOSS et al., 1999).

O íon ferro não é encontrado solto, e sim unido a um complexo que apresenta elevada afinidade pelas proteínas do hospedeiro que se unem ao ferro. Nessa circunstância, a micobactéria se vê diante de um desafio para capturar a forma insolúvel do íon ferro (Fe^{3+}), e além disso, o ferro não é solúvel na presença de oxigênio e em pH neutro (RODRIGUEZ, 2006; HOOD; SKAAR, 2012). Em resposta a esse desafio, as micobactérias desenvolveram uma estratégia de sintetizar sideróforos, são agentes quelantes que se ligam ao ferro com alta afinidade, especificamente ferro (III) (GUERINOT, 1994).

Diante disso, foi realizado o estudo com a Desferroxamina, com a ideia de simular o uso de um sideróforo durante a formação de biofilme de *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. fortuitum*, diagnosticando a ação do composto isolado e associado com os sais de ferro testados. Na Figura 10 pode ser avaliada a ação da Desferroxamina isolada na CIM e nas concentrações subinibitórias frente às três cepas em estudo.

Figura 10 – Ação de diferentes concentrações de Desferroxamina na formação de biofilmes de *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. fortuitum*



* Diferença significativa entre a concentração testada e o controle positivo. Os testes foram submetidos ao teste t de Student ($n = 3$), considerando diferenças estatísticas quando $p < 0,05$.

Segundo a avaliação preliminar de Gokarn e Pal (2017), a Desferroxamina B sozinha inibiu, em concentrações máximas de 1000µg/mL, nove dos dez isolados multirresistentes a *M. tuberculosis*. Além disso, o quelante apresentou atividade sinérgica a fármacos antituberculostáticos diminuindo a concentração inibitória mínima, demonstrando que esses sideróforos podem ser adjuvantes úteis aos antibióticos na superação do problema de *M. tuberculosis* resistente a medicamentos no ambiente clínico. Ainda, Phelan e colaboradores (2020), sugerem que Desferroxamina exibe potencial para aumentar as respostas imunometabólicas e aumentar a função imune do hospedeiro durante a infecção precoce por *M. tuberculosis*, em ambientes clínicos selecionados.

Concentrações muito elevadas da Desferroxamina B (10000µg/mL) também apresentaram efeito bacteriostático em algumas cepas bacterianas, além do sinergismo com diversos antibióticos. Fora o mecanismo de privação de ferro, a interferência de íons Zn^{+2} da célula bacteriana também explica essa inibição, tornando a célula bacteriana mais suscetível a ação dos antibióticos (GOKARN; PAL, 2018).

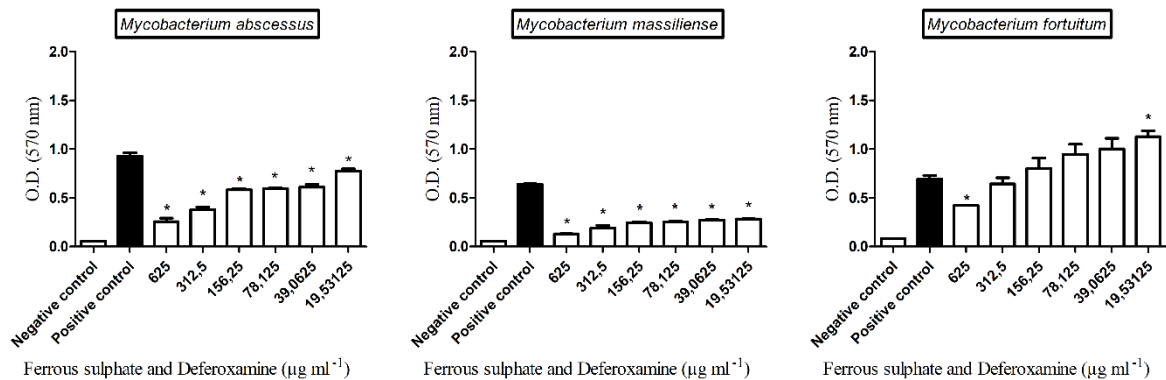
Em um estudo realizado por Shunsuke Ishida e colaboradores (2011), a Desferroxamina E inibiu a formação de biofilme de *M. smegmatis* e *M. bovis* (BCG) com um valor de CIM de 10µM, enquanto seu valor de CIM de atividade antimicrobiana foi uma concentração de mais de 160µM. Sendo assim, nossos resultados mostram uma hipótese similar ao desse achado para outras cepas de micobactérias patogênicas, visto que, a Desferroxamina isolada apresenta atividade antibiofilme, principalmente para *M. abscessus* e *M. massiliense*, porém foi necessária uma concentração maior do composto, do que comparado com o que foi utilizado no artigo.

No mesmo estudo realizado por Shunsuke Ishida e colaboradores (2011), houve a comparação do efeito do ferro na atividade de formação antibiofilme da Desferroxamina E, e foi provada a importância do ferro para a formação de biofilme em espécies de *Mycobacterium*. Essa análise mostrou que o quelante inibiu a formação de biofilme de *M. smegmatis* e *M. bovis* (BCG) e sugeriu que tal inibição pode advir da depleção de ferro no meio.

Nas Figuras 11, e 12 pode-se observar a ação da Desferroxamina associada aos sais de ferro na CIM e nas concentrações subinibitórias frente às três cepas em estudo. De acordo com os resultados encontrados no nosso estudo, pode-se confirmar o que foi proposto por Shunsuke Ishida e colaboradores (2011), visto que, a Desferroxamina retira o ferro do meio para inibir a formação do biofilme, desta forma,

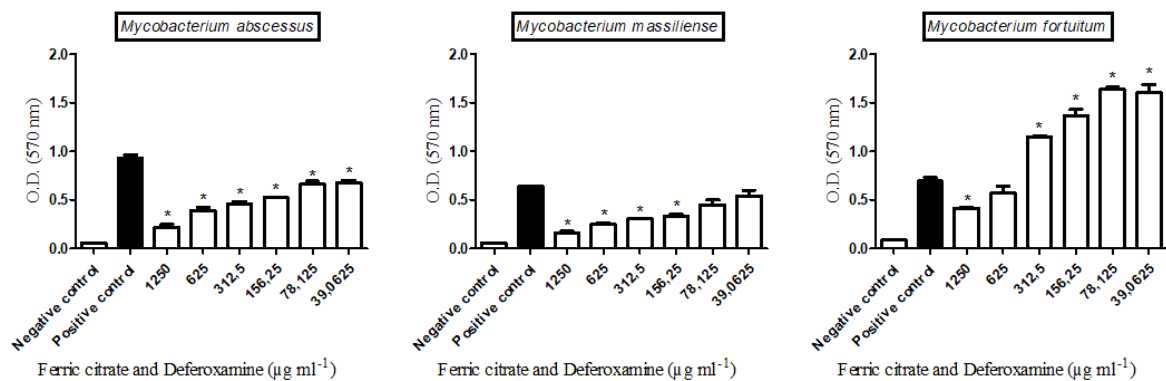
quanto maior a concentração de ferro no meio maior a ação do quelante, sendo assim, maior será a inibição do biofilme.

Figura 11 – Ação de diferentes concentrações do Sulfato ferroso associado com a Desferroxamina na formação de biofilmes de *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. fortuitum*



* Diferença significativa entre a concentração testada e o controle positivo. Os testes foram submetidos ao teste t de Student (n = 3), considerando diferenças estatísticas quando p < 0,05.

Figura 12 – Ação de diferentes concentrações do Citrato férrico associado com a Desferroxamina na formação de biofilmes de *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. fortuitum*



* Diferença significativa entre a concentração testada e o controle positivo. Os testes foram submetidos ao teste t de Student (n = 3), considerando diferenças estatísticas quando p < 0,05.

Cronjé e colaboradores (2005), sugerem que a terapia de quelação deve ser considerada em condições de sobrecarga de ferro e que agentes quelantes eficazes como a Desferroxamina, com acesso intracelular limitado, podem precisar ser usados em combinação com agentes quelantes lipofílicos. Ainda assim, ressalta-se que as

estratégias de captação de ferro dependem muito da habilidade e da composição celular de cada espécie de microrganismo (QIU et al., 2011; XU et al., 2011).

A Lactoferrina, bem como o Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA), também inibem a bactéria de aderir-se à uma superfície, devido a sua capacidade em quelar ferro, diminuindo assim a disponibilidade do metal evitando a adesão irreversível (TRENTIN et al., 2013). Em um estudo realizado com *Pseudomonas aeruginosa*, concentrações subinibitórias da Lactoferrina foram capazes de inibir a formação do biofilme, e em concentrações mais elevadas também inibe o crescimento bacteriano (SING, 2002).

O estudo realizado por O'MAY e colaboradores (2009), investigou os efeitos da limitação dos níveis de ferro como uma estratégia de prevenir a formação de biofilmes de *P. aeruginosa* e também examinou uma variedade de agentes quelantes de ferro, sintéticos e naturais. Determinou que o desenvolvimento do biofilme pela cepa de *P. aeruginosa* foi significativamente diminuído pela remoção de ferro em ambientes aeróbicos, e além disso, a capacidade dos quelantes sintéticos de prejudicar a formação de biofilme pode ser revertida pela adição de ferro às culturas, fornecendo evidências de que esses compostos quelantes eficazes funcionam reduzindo diretamente a disponibilidade de ferro para *P. aeruginosa*. Já o quelante biológico Lactoferrina demonstrou efeitos antibiofilme aumentados com o aumento da suplementação de ferro, portanto, a inibição do biofilme pela Lactoferrina parece ocorrer por meio de mecanismos mais complexos aos dos quelantes sintéticos.

Segundo Tarallo e colaboradores (2010), alguns complexos de ferro com diferentes moléculas apresentaram atividade antimicrobiana, visto que, alguns complexos de ferro se mostraram bacteriostáticos ou bactericidas contra *M. tuberculosis*, por exemplo. Além dessa característica, vale evidenciar que a complexação de metais exibe uma capacidade de melhorar a atividade biológica de alguns antimicrobianos, como foi o caso da desferroxamina E que foi capaz de restaurar a atividade antimicrobiana da isoniazida contra *M. smegmatis* ao inibir a formação de biofilme. Em geral, a coordenação de íons metálicos para agentes terapêuticos melhora sua eficácia e acelera a bioatividade (ISHIDA et al., 2011; DHOLARIYA et al., 2013).

5. CONCLUSÃO

A necessidade absoluta de ferro em vários processos bacterianos essenciais de muitas bactérias patogênicas aumentou o interesse no uso de quelantes de ferro e de compostos a base de ferro, principalmente como terapias antibiofilme. Com base nos objetivos propostos neste trabalho e de acordo com os resultados experimentais obtidos, é possível concluir que os sais de ferro e a desferroxamina influenciam na formação e maturação de biofilmes das micobactérias de crescimento rápido testadas, salientando a importância de avaliá-los de forma correta e compreensível, a fim de minimizar o impacto causado à saúde humana. Além disso, é possível pontuar que:

- A concentração inibitória mínima do Citrato férrico, do Sulfato ferroso e da Desferroxamina foram determinadas, permitindo a utilização de concentrações subinibitórias dessas substâncias, garantido a viabilidade celular do microrganismo para o seu crescimento na forma séssil.

- Na atividade dos sais de ferro isolados frente à formação de biofilme de *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. fortuitum*, foi possível elucidar o efeito da privação de ferro, visto que, o resultado da quantificação mostrou que a formação de biofilme foi significativamente inibida na condição de privação de ferro em contraste com o controle.

- A Desferroxamina isolada apresenta atividade antibiofilme, principalmente para *M. abscessus* e *M. massiliense*, porém foi necessária uma concentração maior do composto. Esta evidência indica que a desferroxamina pode ser uma possível liderança de drogas anti-formação de biofilme para espécies de *Mycobacterium* patogênicas.

- A ação de diferentes concentrações dos sais de ferro associados com a Desferroxamina provou que o quelante inibiu a formação de biofilme sugerindo que tal inibição pode advir da depleção de ferro no meio, sendo assim, pode-se confirmar que a Desferroxamina retira o ferro do meio para inibir a formação do biofilme.

Os dados gerados a partir deste estudo estabelecem claramente a indispensabilidade do ferro para as características de virulência do gênero *Mycobacterium*, bem como, a importância do ferro para a formação de biofilme em micobactérias de crescimento rápido por uma análise do mecanismo da atividade anti-

formação de biofilme da desferroxamina. Contudo, este trabalho vem para encorajar a realização de novas pesquisas, no sentido de explorar de forma mais minuciosa a atividade de novas e promissoras moléculas com atividade antibiofilme.

REFERÊNCIAS

- AGERTT, V. A. et al. Identification of mycobacteria isolated at University Hospital of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 49, n. 2, p. 115-117, 2013.
- ALCAIDE, F.; ESTEBAN, J. Infecciones cutáneas y de partes blandas por micobacterias no tuberculosas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 28, n. 1, p. 46-50, 2010.
- ANDREWS, S. C. Iron storage in bacteria. **Advances in microbial physiology**. v. 40, p. 281–351, 1998.
- 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.
- ANDERSEN, O. Chemical and Biological Considerations in the Treatment of Metal Intoxications by Chelating Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 4, p. 11-21, 2004.
- ARAI, M.; NIIKAWA, H.; KOBAYASHI, M. Marine-derived fungal sesterterpenes, ophiobiolins, inhibit biofilm formation of *Mycobacterium* species. **Journal of Natural Medicines**. v. 67, p. 271-275, 2013.
- BALDWIN, S. L. et al. The complexities and challenges of preventing and treating nontuberculous mycobacterial diseases. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 13, n. 2, 2019.
- BANIN, E. et al. The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 105, p. 16761–16766, 2008.
- 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.
- BONEZ, P.C. et al. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. **American Journal of Infection Control**. v. 41, p. 119-122, 2013.

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

BRASIL. 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.

CAETANO, A.C.L. **Biofilmes e Antimicrobianos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2018.

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

CARNEIRO, M. S. et al. Doença pulmonar por micobactérias não tuberculosas em uma região de alta incidência de tuberculose no Brasil. **J Bras Pneumol**. v. 44, n. 2, p. 106-111, 2018.

CARTER, G. et al. Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. **Journal of Medical Microbiology**. v. 52, n. 9, p. 747–752, 2003.

CASSAT, J.E.; SKAAR, E.P. Iron in Infection and Immunity. **Cell Host Microbe**. v. 13, p. 509–519, 2013.

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.

CHRISTENSEN, B. E.; CHARACKLIS, W.G. Physical and chemical properties of biofilms. **Nature Reviews Microbiology**. v. 72, p. 93-130, 1990.

CHU, B. C. et al. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. **Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**. v. 23, n. 4, p. 601–11, 2010.

CLARKE, T. E. et al. X-ray crystallographic structures of the *Escherichia coli* periplasmic protein fhud bound to hydroxamate-type siderophores and the antibiotic albomycin. **J. Biol. Chem**. v. 277, p. 13966–13972, 2002.

CLSI. **Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes**; Approved Standard – Second edition. CLSI document M24-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2020.

CIOFU, O. et al. Antibiotic treatment of biofilm infections. **Acta pathologica, microbiologica, e immunologica Scandinavica**. v. 125, p. 304–319, 2017.

CORNING, P. A. The re-emergence of “emergence”: a venerable concept in search of a theory. **Complexity**. v. 7, p. 18–30, 2002.

CORNELIS, P. et al. Evidence for different pyoverdine mediated iron uptake systems among *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Infection and immunity**. v. 57, p. 3491–3497, 1989.

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

CRONJÉ, L. et al. Iron and iron chelating agents modulate *Mycobacterium tuberculosis* growth and monocyte-macrophage viability and effector functions. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. n. 45, p. 103–112, 2005.

CUÍV, P.O. et al. FoxB of *Pseudomonas aeruginosa* functions in the utilization of the xenosiderophores ferrichrome, ferrioxamine b, and schizokinen: Evidence for transport redundancy at the inner membrane. **J. Bacteriol.** v. 189, p. 284–287, 2006.

CULLER, H. F. et al. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains form Biofilm on Abiotic Surfaces Regardless of Their Adherence Pattern on Cultured Epithelial Cells. **BioMed research international**. p. 1-10, 2014.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DE CHIAL, M. et al. Identification of type II and type III pyoverdine receptors from *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**. v. 149, p. 821–831, 2003.

DE MELLO, K. G. C. et al. Clinical and therapeutic features of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Brazil, 1993-2011. **Emerg Infect Dis**. v. 19, n. 3, p. 393–9, 2013.

DHOLARIYA, H. R. et al. Dicoumarol complexes of Cu(II) based on 1,10-phenanthroline: Synthesis, X-ray diffraction studies, thermal behavior and biological evaluation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. v. 108, p. 319-328, 2013.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**. v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DUNNE Jr, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15, p. 155-166, 2002.

ESTEBAN, J.; NAVAS, E. Treatment of infections caused by nontuberculous mycobacteria. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 36, n. 9, p. 586–592, 2018.

ESTEBAN, J.; GARCÍA-COCA, M. *Mycobacterium* Biofilms. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, 2018.

FALKINHAM, J.O. III. Nontuberculous mycobacteria in the environment. **Clinics in Chest Medicine**. v. 23, p. 529–551, 2002.

FALKINHAM, J. O. III, Ecology of nontuberculous mycobacteriae where do human infections come from? **Semin Respir Crit Care Med**. v. 34, n. 1, p. 95-102, 2013.

FARIA, S.; JOÃO, I.; JORDÃO, L. General Overview on Nontuberculous Mycobacteria, Biofilms, and Human Infection. **Journal of Pathogens**. p. 1-10, 2015.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, p. 623-633, 2010.

FLEMMING, H.C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**. v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FLORA, S. J. S.; PACHAURI, V. Chelation in Metal Intoxication. **International Journal of Environmental Research Public Health**. v. 7, p. 2745-2788, 2010.

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

FLOTO, R. A. et al. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of nontuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis: executive summary. **Thorax**. v. 71, p. 88–90, 2016.

FOLEY, T.L.; SIMEONOV, A. Targeting iron assimilation to develop new antibacterials. **Expert Opin. Drug Discov**. 2012.

FORBES, B. A. et al. Practice Guidelines for Clinical Microbiology. **Clin Microbiol Rev**. v. 31, n. 2, p. 1-66, 2018.

GOKARN, K; PAL, R. Preliminary evaluation of anti-tuberculosis potential of siderophores against drugresistant *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacteria growth indicator tube-drug sensitivity test. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 17, p. 161, 2017.

GOKARN, K.; PAL, R. Activity of siderophores against drug-resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Infection and Drug Resistance**. v. 11, p. 61–75, 2018.

GRIFFITH, D. E. et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**. v. 175, p. 367–416, 2007.

GUERINOT, M. L. Microbial iron transport. **Annual Review of Microbiology**. v. 48, p. 743–772, 1994.

HALSTROM S, PRICE P, THOMSON R. Review: Environmental mycobacteria as a cause of human infection. **Int J Mycobacteriol**. v.4, p. 81-91, 2015.

- HARRI, S. D. C. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro, LTC Editora, 2001.
- HOHNADDEL, D.; MEYER, J. M. Specificity of pyoverdine-mediated iron uptake among fluorescent *Pseudomonas strains*. **Journal of Bacteriology**. v. 170, p. 4865–4873, 1988.
- HOIBY, N. et al. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Sciences**. v. 3, p. 55-65, 2011.
- HOOD, M. I.; SKAAR, E. P. “Nutritional Immunity: Transition Metals at the Pathogen-Host Interface.” **Nature Reviews**. Microbiology. v. 10, n. 8, p. 525–37, 2012.
- HOYLE, B. D.; COSTERTON, J. W. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. **Progress in Drug Research**. v. 37, p. 91–105, 1991.
- HUANG, C.W. et al. Synergistic activities of tigecycline with clarithromycin or amikacin against rapidly growing mycobacteria in Taiwan. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 41, p. 218-223, 2013.
- HUANG, W.; WILKS, A. Extracellular heme uptake and the challenge of bacterial cell membranes. **Annu. Rev. Biochem.** v. 86, p. 799–823, 2017.
- HUAYHUAZ, J.A.A., et al. Desferrioxamine and desferrioxamine-caffeine as carriers of aluminum and gallium to microbes via the Trojan Horse Effect. **J. Trace Elements Med. Biol.** v. 41, p. 16–22, 2017.
- IMLAY, J.A. et al. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. **Science**. v. 240, p. 640–642, 1988.
- ISHIDA, Shunsuke. et al. Inhibitory Effect of Cyclic Trihydroxamate Siderophore, Desferrioxamine E, on the Biofilm Formation of *Mycobacterium* Species. **Biol. Pharm. Bull.** v. 34, n. 6, p. 917-920, 2011.
- JOHANSEN M.D.; HERRMANN J.; KREMER L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. **Nat Rev Microbiol.** v. 18, p. 392–407, 2020.
- JOHNSON, M.M.; ODELL, J.A. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. **Journal of Thoracic Disease**. v. 6, n. 3, p. 210-220, 2014.
- 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.
- KOKARE, C. R. et al. Biofilm: Importance and applications. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 8, p. 159-168, 2009.
- KUMAR, A. et al. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 307, p. 481–489, 2017.
- LAU, C.K.Y.; KREWULAK, K.D.; VOGEL, H.J. Bacterial ferrous iron transport: The feo system. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 40, p. 273–298, 2016.

LEÃO S.C. et al. **Practical handbook for phenotypic and genotypic identification of Mycobacteria**. p. 9-147, 2004. Disponível em: <<http://www.esmycobacteriology.eu/PDF%20files/foreword.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

LEÃO, S.C. et al. Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in Brazil. **Future Microbiology**. v. 5, p. 971–980, 2010.

LEHMANN, K.B.; NEUMANN, R.O. **Atlas and Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik**. 1. ed. Munchen, 1896. 63 p.

LIU, Z.D.; HIDER, R.C. Design of clinically useful iron (III)-selective chelators. **Med. Res. Rev.** v. 22, p. 26–64, 2001.

LLAMAS, M.A. et al. The heterologous siderophores ferrioxamine b and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.** v. 188, p. 1882–1891, 2006.

MACEDO, A.J.; ABRAHAM, W.R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 5, n. 6, p.517-28, 2009.

MACHADO, S. M. O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controle da formação de biofilmes indesejáveis**. 2005. 129 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Universidade de Minho, Braga, 2005.

MAIA, C. S, et al. Infecções pós cirúrgicas por micobactérias não tuberculosas. **Anais III CONBRACIS**. Campina Grande: Realize Editora, 2018. Disponível em: <<https://editorarealize.com.br/artigo/visualizar/41139>>. Acesso em: 08/09/2021.

MILLEZI, A.F. **Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2012. 113 f. Tese. (Pós-graduação em Microbiologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MOREAU-MARQUIS, S.; O'TOOLE, G.A.; STANTON, B.A. Tobramycin and FDA-Approved Iron Chelators Eliminate *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis cells. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** v, 41, p. 305–313, 2009.

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.

MULLIS, S.N.; FALKINHAM, J.O. III. Adherence and biofilm formation of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium abscessus* to household plumbing materials. **Journal of Applied Microbiology**. v. 115, p. 908-914, 2013.

MURRAY. P. R. **Medical Microbiology**. 7^a ed. Elsevier, 2013.

- NGAN, G. J. Y. et al. Development of multiplex PCR assays based on the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer for the detection of clinically relevant nontuberculous mycobacteria. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 52, n. 5, p. 546-554, 2011.
- NGUYEN, K.T. et al. Mycobacterial biofilms facilitate horizontal DNA transfer between strains of *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Bacteriology.** v. 192, n. 19, p. 5134-5142, 2010.
- OJHA, A.; HATFULL, G. F. 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, p. 468–483, 2007.
- OJHA, A. et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. **Molecular Microbiology.** v. 69, n. 1, p. 164-174, 2008.
- OJHA, A. et al. Enzymatic hydrolysis of trehalose dimycolate releases free mycolic acids during mycobacterial growth in biofilms. **Journal of Biological Chemistry.** v. 285, n. 23, 2010.
- OLIVEIRA, K. R. **Análise da formação de biofilmes em cateteres:** métodos de identificação e controle. 2011. Monografia (Pós-graduação em Análises Clínicas e Gestão de Laboratório) – Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, 2011.
- O'MAY, C. Y. et al.,. Iron-binding compounds impair *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, especially under anaerobic conditions. **Journal of Medical Microbiology.** v. 58, p. 765–773, 2009.
- PAL, Rahul. et al. Influence of iron deprivation on virulence traits of mycobacteria. **Braz J Infect Dis.** v. 20, n. 6, p.585–591, 2016.
- PHELAN, J.J. et al. Desferrioxamine Supports Metabolic Function in Primary Human Macrophages Infected With *Mycobacterium tuberculosis*. **Front. Immunol.** v. 11, p.836, 2020.
- PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos.** 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p, 2003.
- PRIMM, T. P.; FALKINHAM, J. O. Nontuberculous Mycobacteria. **International Encyclopedia of Public Health.** v. 5, n. 2, p. 257-263, 2017.
- QIU, Di-Hong., et al. In vitro inhibition of bacterial growth by iron chelators. **FEMS Microbiology Letters.** v. 314, n. 2, p. 107-111, 2011.
- RACHID, N.R. et al. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 87, p. 810-818, 2012.

RATLEDGE, C. Iron metabolism. **Mycobacteria: Molecular Biology and Virulence**. p. 260–286, 1999.

RATLEDGE, C. Iron, mycobacteria and tuberculosis. **Tuberculosis**. v. 84, n. 1-2, p. 110–130, 2004.

RATNATUNGA, C. N. et al. The Rise of Non-Tuberculosis Mycobacterial Lung Disease. **Front Immunol**. v. 11 n. 303, p. 1-12, 2020.

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

REDDY, P.V. et al. Disruption of Mycobactin Biosynthesis Leads to Attenuation of *Mycobacterium tuberculosis* for Growth and Virulence **J. Infect. Dis.** v. 208, p. 1255-1265, 2013.

RICHARD, K.L.; KELLEY, B.R.; JOHNSON, J.G. Heme uptake and utilization by gram-negative bacterial pathogens. **Front. Cell. Infect Microbiol**. v.9, p. 81, 2019.

ROCHA, V. L. **Avaliação da expressão de um suposto gene responsável pela síntese de sideróforo em *Mycobacterium massiliense*, em diferentes condições de disponibilidade de ferro**. 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

RODRIGUEZ, G. M. Control of iron metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends in Microbiology**. v. 14, n. 7, p. 320–327, 2006.

RODRIGUEZ, G. M. et al. ideR , an Essential Gene in *Mycobacterium tuberculosis* : Role of IdeR in Iron-Dependent Gene Expression , Iron Metabolism , and Oxidative Stress Response. **Infection and immunity**. v. 70, n. 7, p. 3371–3381, 2002.

RODRIGUEZ, G. M.; SMITH, I. Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence. **Molecular Microbiology**. v. 47, n. 6, p. 1485–1494, 2003.

RUNYON, E. H. Anonymous Mycobacteria in Pulmonary Disease. **Medical Clinics of North America**. v. 43, n. 1, p.273-290, 1959.

SÁ, Hélder José de Oliveira. **Agentes quelantes com utilização terapêutica**. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

SÃO PAULO. Secretaria Estadual de Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. **Casos de Infecção por Micobactéria não tuberculosa de Crescimento Rápido (MCR), notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE, dados acumulados de 2002 a 2010**. 2010.

SENNA, S.G. et al. Sequencing of *hsp65* gene for identification of *Mycobacterium* species isolated from environmental and clinical sources in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 11, p. 3822-3825, 2008.

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

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química inorgânica**. Porto Alegre, Editora Bookman, 2008.

SILVA, B.; FAUSTINO, P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. **Biochim Biophys Acta**. v. 1852, p. 1347-59, 2015.

SILVA, J.M.I. **Caracterização morfológica de Micobactérias Não Tuberculosas Ambientais por ensaios neutrográficos**. 2013. 145 f. Tese (Doutorado em Engenharia Nuclear) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SING, P.K. et al. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. **Nature**. v. 417, p. 552-555, 2002.

SIQUEIRA, F. S. et al. Sulfamethoxazole derivatives complexed with metals: a new alternative against biofilms of rapidly growing mycobacteria. **BIOFOULING**. v. 34, p. 1-19, 2018.

SPENCER, D. H. et al. Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**. v. 185, p. 1316–1325, 2003.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**. v. 56, n. 1, p. 187-209, 2002.

TARALLO, M. B. et al. Design of novel iron compounds as potential therapeutic agents against tuberculosis. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 104, n. 11, p. 1164–1170, 2010.

THOMPSON, M.G., et al. Antibacterial activities of iron chelators against common nosocomial pathogens. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 56, p. 5419–5421, 2012.

TORTOLI, E. **The Taxonomy of the Genus Mycobacterium**. In: VELAYATI, A. A.; FARNIA, P. Nontuberculous Mycobacteria (NTM). Teerã: Editora Academic Press, 2019. cap. 1, p. 1–10.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TREMBLAY, Y.D.N. et al. Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 78, p. 110-116, 2014.

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. 213-238, 2013

VANDER BEKEN, S. et al. Molecular structure of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern. **European Journal of Immunology**. v, 41, p. 450-460, 2011.

VASUDEVAN, R. Biofilms: microbial cities of scientific significance. **Journal of Microbiology & Experimentation**. v. 1, n. 3, 2014.

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.

VINUESA, V.; McCONNELL, M. J. Recent Advances in Iron Chelation and Gallium-Based Therapies for Antibiotic Resistant Bacterial Infections. **Int. J. Mol. Sci**. v. 22, p. 2876, 2021.

VISCA, P. et al. The dual personality of iron chelators: Growth inhibitors or promoters? **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 57, p. 2432–2433, 2013.

VOSS De, J.J. et al. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. **Journal of Bacteriology**. v, 181, n. 15, p. 4443–4451, 1999.

VOSS De, J.J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* salicylate-derived siderophores are essential for growth in macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci**. v. 97, p. 1252-7, 2000.

WANDERSMAN, C.; DELEPELAIRE, P. Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. **Annu. Rev. Microbiol**. v. 58, 611–647, 2004.

WEINBERG, E.D. Iron loading and disease surveillance. **Emerg. Infect. Dis**. v. 5, p. 346–352, 1999.

WILDNER, L. M. et al. Micobactérias: Epidemiologia E Diagnóstico. **Revista de Patologia Tropical**. v, 40, p. 207–229, 2011.

WINKELMANN, G. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. **BioMetals**. v, 20, n. 3-4, p. 379-392, 2007.

XAVIER, J.B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**. v, 76, p. 2-13. 2003.

XIANG, X. et al. *Mycobacterium* Biofilms: Factors Involved in Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies Against Biofilm-Relevant Pathogens. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**. v. 24, n. 3, p. 269-279, 2014.

XU, B. et al. Synthesis, iron(III)-binding affinity and in vitro evaluation of 3-hydroxypyridin-4-one hexadentate ligands as potential antimicrobial agents. **Bioorg Med Chem Lett**. v. 1, n. 21, p. 6376-80, 2011.

YUN, S.; VINCELETTE, N. D. Update on iron metabolism and molecular perspective of common genetic and acquired disorder, hemochromatosis. **Crit Rev Oncol Hematol** v. 95, p. 12-25, 2015.

ZHOU, T. et al. Design of clinically useful macromolecular iron chelators. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 63, p, 893–903, 2011.