

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

Vanessa da Costa Flores

**RESISTÊNCIA DE BIOFILMES FORMADOS POR MICOBACTÉRIAS
DE CRESCIMENTO RÁPIDO FRENTE A ANTIMICROBIANOS**

Santa Maria, RS
2018

Vanessa da Costa Flores

**RESISTÊNCIA DE BIOFILMES FORMADOS POR MICOBACTÉRIAS DE
CRESCIMENTO RÁPIDO FRENTE A ANTIMICROBIANOS**

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

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

Santa Maria, RS
2018

Vanessa da Costa Flores

**RESISTÊNCIA DE BIOFILMES FORMADOS POR MICOBACTÉRIAS DE
CRESCIMENTO RÁPIDO FRENTE A ANTIMICROBIANOS**

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

Aprovado em 28 de março de 2018:

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

Laura Beatriz Rodrigues; Dra. (UPF)

Pedro Eduardo Almeida da Silva; Dr. (FURG)

Sônia de Avila Botton; Dra. (UFSM)

Sydney Hartz Alves; Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

RESUMO

RESISTÊNCIA DE BIOFILMES FORMADOS POR MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO FRENTE A ANTIMICROBIANOS

AUTORA: Vanessa da Costa Flores
ORIENTADORA: Marli Matiko Anraku de Campos

As micobactérias de crescimento rápido (MCR) são agentes patogênicos oportunistas que causam doenças em uma variedade de configurações clínicas. A natureza ambiental das MCR e sua capacidade de desenvolver biofilmes em diferentes superfícies desempenham um papel fundamental na sua patogênese. Os biofilmes constituem um modo protegido de crescimento que permite que os microrganismos sobrevivam em ambientes hostis, sendo sua fisiologia e comportamento significativamente diferentes das suas contrapartes planctônicas. Os biofilmes representam um grave problema para a saúde pública devido ao aumento da resistência aos agentes antimicrobianos e ao potencial desses microrganismos de causarem infecções. Quando em biofilmes, as micobactérias são altamente resistentes aos tratamentos antibacterianos. As terapias baseadas em nanopartículas são abordagens viáveis para tratar infecções associadas a biofilmes devido às suas propriedades químicas e físicas, concedidas pela sua alta relação área superficial / volume. Tendo-se em vista a importância da compreensão de fatores causadores de falência de tratamentos das micobacterioses, como a formação de biofilmes, este trabalho tem como objetivo principal avaliar a resistência a antimicrobianos apresentada por biofilmes de MCR. Foram testados os antimicrobianos amicacina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem e sulfametoxazol, normalmente empregados no tratamento de micobacterioses. Para cada fármaco, avaliou-se a suscetibilidade do microrganismo, a capacidade de inibição da formação de biofilmes e a resistência dos biofilmes a atuação antimicrobiana. Além disso, devido a claritromicina ser amplamente utilizada em esquemas terapêuticos contra infecções causadas por micobactérias, foram desenvolvidas nanocápsulas de claritromicina (NC-CLA) e suas propriedades antibiofilme avaliadas. Os resultados demonstraram que, embora os antimicrobianos testados sejam empregados como alternativa terapêutica para MCR, *Mycobacterium abscessus* apresentou-se resistente à claritromicina e *Mycobacterium massiliense* exibiu perfil resistente à claritromicina e ao sulfametoxazol. Além disso, a inibição da formação de biofilmes e a destruição dos mesmos não foram totalmente alcançadas. A claritromicina nanoencapsulada apresentou maior capacidade de inibição da formação do biofilme e destruição da película microbiana do que a claritromicina livre, em todas as concentrações testadas e para as três cepas de MCR utilizadas no ensaio. Dessa forma, ações que otimizam a permeabilidade antimicrobiana na matriz exopolimérica figuram como importantes estratégias de prevenção na formação e combate aos biofilmes.

Palavras-chave: Micobactérias de Crescimento Rápido. Biofilmes. Resistência. Antimicrobianos. Nanocápsulas.

ABSTRACT

RESISTANCE OF BIOFILMS FORMED BY RAPIDLY GROWING MYCOBACTERIA AGAINST ANTIMICROBIALS

AUTHOR: Vanessa da Costa Flores

ADVISOR: Marli Matiko Anraku de Campos

Rapidly growing mycobacteria (RGM) are opportunistic pathogens that produce diseases in a variety of clinical settings. The environmental nature of RGM and their ability to assemble biofilms on different surfaces play a key role in their pathogenesis. Biofilms constitute a protected mode of growth that allows microorganisms to survive in hostile environments, being their physiology and behavior significantly different from their planktonic counterparts. Biofilms pose a serious problem for public health because of the increased resistance of biofilm-associated organisms to antimicrobial agents and the potential for these organisms to cause infections. When in biofilms form, mycobacteria are highly resistant to antibacterial treatments. Nanoparticle-based therapies are viable approaches when it comes to treating biofilm-associated infections due to chemical and physical properties of such nanostructured systems, granted by a high superficial area to volume ratio. Bearing in mind the importance of comprehending all factors that cause mycobacteriosis treatments to fail, e.g. biofilm formation, the main objective of this study is to evaluate resistance to antimicrobials in RGM biofilms. The tested antimicrobials were amikacin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, imipenem and sulfamethoxazole, which are ordinarily employed in the treatment of mycobacteriosis. For each drug, evaluation was done according to the susceptibility of the pathogen, the ability to inhibit biofilm formation and the resistance of biofilms to antimicrobial activity. Furthermore, due to the broad use of clarithromycin in therapeutic schemes against mycobacterial infections, clarithromycin nanocapsules (NC-CLA) were developed and employed. Its antibiofilm properties were evaluated, as were those of the other above-stated antimicrobials. Results showed that although the tested antimicrobials are used as an alternative therapy for RGM, *Mycobacterium abscessus* presented to be resistant to clarithromycin and *Mycobacterium massiliense* showed a resistant profile to clarithromycin and sulfamethoxazole. Furthermore, the inhibition of biofilm formation and its destruction have not been fully met. The nanoencapsulated clarithromycin form showed higher capability in inhibiting biofilm formation and in microbial pellicle destruction than free clarithromycin, that is, in all tested concentrations and for all three RGM strains that were utilized in the essay. Thus, actions that aim to optimize antimicrobial permeability in the exopolimeric matrix emerge as important prevention strategies against formation of biofilm and in its combat.

Keywords: Rapidly Growing Mycobacteria. Biofilms. Resistance. Antimicrobials. Nanocapsules.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que sempre acreditaram e investiram em mim e não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao Benjamin, pessoa com quem amo compartilhar a vida.

Sem vocês nenhuma conquista teria sentido.

AGRADECIMENTOS

Muitas vezes a correria de nossas vidas nos impede de dar atenção ao que (ou quem) realmente vale à pena. E agradecer é uma das coisas que acabam ficando esquecidas. Por mais palavras que se escreva, estas não serão suficientes para demonstrar todo meu agradecimento às pessoas que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho. Em especial, agradeço:

Aos meus pais, por tudo que me proporcionaram, pelo amor incondicional, pelo carinho, pelo afeto e pelo apoio. Não encontro palavras para agradecer, simplesmente me sinto envolvida por um enorme sentimento: gratidão. Vocês são minha fortaleza.

Ao Benjamin, por ser tão importante em minha vida, sempre me instigar a crescer profissionalmente e me valorizar tanto como pessoa. Obrigada por dividir comigo as alegrias e angústias. Obrigada por todo amor e paciência.

Aos meus irmãos Édio e Rafael, por serem meus primeiros amigos e estarem sempre presentes em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos Lorenzo e Nicolý, por encherem minha vida de luz, alegria e amor.

Aos meus avós, que sempre me incentivaram e me deram carinho para continuar seguindo em frente na constante busca pelo conhecimento.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Marli Matiko Anraku de Campos meus sinceros agradecimentos pela confiança, apoio e carinho. Minha admiração pelo exemplo de profissionalismo e por todo o tempo despendido auxiliando minha formação.

Ao Fallon, pela amizade, sua imensa disposição em ajudar e por todo apoio prestado em todas as etapas deste trabalho.

Às queridas colegas do Laboratório de Micobacteriologia: Pauline, Vanessa, Caren e Grazielle, pelas experiências compartilhadas.

Às minhas queridas amigas e colegas Camille e Valéria, que sempre me apoiaram quando eu precisei me ausentar do nosso local de trabalho para poder cumprir com os compromissos do doutorado. Obrigada por todo apoio, incentivo e carinho.

À minha pequena Lisa, por fazer meus dias mais alegres e por ajudar a descarregar a ansiedade e eventuais maus fluidos que sobram em alguns dias.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas por contribuírem com minha formação.

À Universidade Federal de Santa Maria, pelo ensino gratuito e de qualidade.

À Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade desta realização profissional.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Representação esquemática da parede celular das micobactérias.....	14
Figura 2 - Morfologia das colônias de micobactérias em meio sólido.....	15
Figura 3 - Lesões cutâneas causadas por MNT.....	21
Figura 4 - Estrutura do Biofilme.....	32
Figura 5 - Desenvolvimento do processo de formação do biofilme.....	34
Figura 6 - Biofilme de <i>M. smegmatis</i> cultivado em meio de cultura M63.....	34
Figura 7 - Mecanismos de resistência a antimicrobianos em biofilmes.....	37
Figura 8 - Representação esquemática das nanopartículas poliméricas.....	40
Figura 9 - Interações do biofilme com antimicrobianos solúveis e antimicrobianos incorporados em nanopartículas.....	42

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1 - Effect of different concentrations of amikacin on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i>	46
Figure 2 - Effect of different concentrations of ciprofloxacin on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i>	47
Figure 3 - Effect of different concentrations of clarithromycin on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i>	47
Figure 4 - Effect of different concentrations of doxycycline on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i>	48
Figure 5 - Effect of different concentrations of imipenem on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i>	48
Figure 6 - Effect of different concentrations of sulfamethoxazole on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i>	49

MANUSCRITO

- Figure 1 - Graphical representation of NC-CLA action on biofilm formation of *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. massiliense* * Statistical difference when compared to positive control. One-way ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test (n=3)..... 70
- Figure 2 - Graphical representation of NC-CLA action on biofilm destruction of *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. massiliense* * Statistical difference when compared to positive control. One-way ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test (n=3)..... 70

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 - Micobactérias de acordo com a classificação de Runyon.....	17
Tabela 2 - Funções de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) no biofilme bacteriano.....	31

ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1 - Breakpoints for the rapidly growing mycobacteria.....	45
Table 2 - Susceptibility profile <i>in vitro</i> of <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i>	46

MANUSCRITO

Table 1 - Physicochemical characteristics of suspensions of polymeric nanocapsules of clarithromycin (NC-CLA) and their respective formulation without the drug (NC-F) (n=3, mean \pm standard deviation).....	69
Table 2 - Suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> e <i>M. massiliense</i>	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAR	Álcool-Ácido Resistência
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
IMC	Índice de Massa Corporal
IPD	Índice de Polidispersão
LJ	Löwenstein-Jensen
MAC	<i>Mycobacterium avium complex</i>
MCL	Micobactérias de Crescimento Lento
MCR	Micobactérias de Crescimento Rápido
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
NC-B	Nanocápsulas Poliméricas Brancas
NC-CLA	Nanocápsulas Poliméricas de Claritromicina
PABA	Ácido p-aminobenzóico
PCL	Policaprolactona
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TB	Tuberculose
TCM	Triglicerídeos de Cadeia Média
TS	Teste de Suscetibilidade

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	13
2 INTRODUÇÃO	14
3 OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4 REVISÃO DE LITERATURA	17
4.1 GÊNERO <i>Mycobacterium</i>	17
4.2 MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS (MNT).....	20
4.2.1 Classificação de Micobactérias Não Tuberculosas (MNT)	20
4.3 MICOBACTERIOSES.....	23
4.4 TRATAMENTO DAS MICOBACTERIOSES.....	26
4.4.1 Amicacina	27
4.4.2 Claritromicina	28
4.4.3 Ciprofloxacino	29
4.4.4 Doxiciclina	30
4.4.5 Imipenem	30
4.4.6 Sulfametoxazol	31
4.5 TESTES DE SUSCETIBILIDADE.....	31
4.6 BIOFILMES.....	32
4.7.1 Estrutura e composição dos biofilmes	34
4.7.2 Processos envolvidos na formação de biofilmes.....	36
4.7.3 Resistência associada à presença de biofilmes	39
4.7.4 Biofilmes formados por micobactérias	42
4.8 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	44
5 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	48
5.1 ARTIGO CIENTÍFICO.....	48
5.2 MANUSCRITO.....	56
6 DISCUSSÃO	71
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXO I - PERMISSÃO DO PERIÓDICO MICROBIAL PATHOGENESIS PARA REPRODUÇÃO DO ARTIGO	88
ANEXO II - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO BIOFOULING	90

1 APRESENTAÇÃO

As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se no **ARTIGO CIENTÍFICO** e no **MANUSCRITO** e representam a integra deste estudo. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONSIDERAÇÕES FINAIS**, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais sobre as publicações científicas contidas neste trabalho. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO DE LITERATURA** e **DISCUSSÃO** desta tese, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração dos artigos estão mencionadas nos mesmos.

2 INTRODUÇÃO

As Micobactérias Não Tuberculosas (MNT) encontram-se dispersas na natureza, e podem colonizar o organismo humano e determinar o aparecimento de infecções ou doenças (ZAMARIOLI et al., 2008). As MNT são isoladas a partir de diversas partes do organismo como pele, ouvido externo, narinas, orofaringe, gengivas, vagina, genitália externa masculina e feminina, saliva, fezes, urina, além do escarro (LOPES et al., 2005).

Muitos estudos têm relatado o aumento do número de casos de infecções oportunistas causadas por espécies de MNT, principalmente Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR) (BRASIL, 2009;GHAFLI; HAJOJ, 2017). As MCR se destacam como patógenos emergentes, com expressivo potencial para causar infecções em pacientes imunodeprimidos e formar biofilmes (JEONG et al., 2004).

As doenças causadas por MNT, conhecidas como micobacterioses, são adquiridas principalmente através da exposição ambiental, uma vez que esse grupo de bactérias reside em fontes de água, em biofilmes e no solo de diversos ambientes (DAVIDSON et al., 2014). Estudos fornecem evidências de que, além das fontes de contaminação citadas, a transmissão de pessoa para pessoa é possível entre os indivíduos com fibrose cística (AITKEN et al., 2012; BRYANT et al., 2013).

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

Houve um crescente reconhecimento da necessidade de medidas de cuidados contra as MNT em todo o mundo, já que as taxas de infecção causadas por esses microrganismos começaram a superar as taxas de prevalência da tuberculose (TB). Os surtos de MNT associados a cuidados de saúde também representam um risco de controle de infecção para pacientes submetidos a cirurgias (CHERNG, 2017).

O tratamento das micobacterioses é bastante complexo, uma vez que elas são naturalmente resistentes ou apresentam pouca sensibilidade aos fármacos tuberculostáticos. Esta sensibilidade difere entre as espécies e entre cepas de uma

mesma espécie (WILDNER et al., 2011). Por esta razão, muitos são os esquemas utilizados para a terapia medicamentosa, que requer longos cursos de poliquimioterapia com ou sem intervenção cirúrgica adjuvante (RAMOS et al., 2010). Em um tratamento eficiente, é necessária inicialmente a identificação do agente causal, para que, de acordo com a sua sensibilidade, sejam escolhidos os fármacos a serem utilizados (WILDNER et al., 2011).

Os testes de suscetibilidade (TS) avaliam o resultado de uma interação muito complexa entre resistência natural, resistência induzida e resistência mutacional adquirida durante a exposição a medicamentos. O papel desses três fatores determinantes da suscetibilidade às drogas é diferente para os vários fármacos utilizados no regime terapêutico de doenças causadas por MNT (VAN INGEN et al., 2012a).

A resistência à terapêutica antimicrobiana parece envolver vários fatores (PÉRES et al., 2011). Entre os mecanismos de resistência as drogas em micobactérias, encontram-se o papel da parede celular, a biotransformação de fármacos no meio intracelular, mutações genéticas adquiridas, bombas de efluxo e a formação de biofilmes (VAN INGEN et al., 2012a; VAN INGEN et al., 2012b).

As infecções clínicas causadas por biofilmes são uma questão de saúde pública mais desafiadora do que aquelas causadas por células planctônicas. Nesse contexto, as infecções microbianas causadas por biofilmes bacterianos em superfícies biomédicas são uma das principais causas de morte em todo o mundo (RAMASAMY; LEE, 2016).

Os antimicrobianos convencionais, na maioria das vezes, não são efetivos frente a biofilmes. Deste modo, muitas estratégias alternativas têm sido estudadas e utilizadas para prevenir a adesão microbiana em superfícies, retardar a formação de biofilmes e eliminar ou pelo menos reduzir a sua acumulação (MARCINKIEWICZ et al., 2013; MARTINEZ-GUTIERREZ et al., 2013).

Essas abordagens incluem a utilização de moléculas de baixo peso molecular capazes de atuarem como inibidores do *quorum sensing*, nanopartículas, revestimentos antibiofilme, combinação de antimicrobianos, utilização de produtos naturais, entre outras (MARCINKIEWICZ et al., 2013).

As terapias baseadas em nanopartículas são abordagens viáveis para tratar infecções associadas a biofilmes devido às suas propriedades químicas e físicas, concedidas pela sua alta relação área superficial / volume (HAN et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resistência a antimicrobianos apresentada por MCR em biofilmes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar o perfil de suscetibilidade de MCR frente a antimicrobianos amplamente empregados no tratamento de micobacterioses;

3.2.2 Avaliar a atuação antimicrobiana na inibição da formação de biofilmes de MCR;

3.2.3 Avaliar o efeito antibiofilme de antimicrobianos sobre biofilmes de MCR;

3.2.4 Desenvolver nanocápsulas de claritromicina (NC-CLA);

3.2.5 Caracterizar físico-quimicamente as NC-CLA desenvolvidas;

3.2.6 Analisar a capacidade de inibição da formação de biofilmes de MCR pelas NC-CLA;

3.2.7 Avaliar o efeito antibiofilme de NC-CLA sobre biofilmes de MCR.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 GÊNERO *Mycobacterium*

O estudo das micobactérias confunde-se com o próprio surgimento da microbiologia clínica. O primeiro agente etiológico de doença humana foi descrito por Hansen, em 1868, e, em 1882, Koch demonstrou a associação entre a presença de microrganismos e a ocorrência da TB. Viviam-se uma nova era no desenvolvimento da ciência e as infecções por bactérias que mais tarde receberiam os nomes *M. leprae*, agente causador da lepra ou hanseníase, e *M. tuberculosis*, agente etiológico da TB encontravam-se em surto (MACEDO et al., 2009).

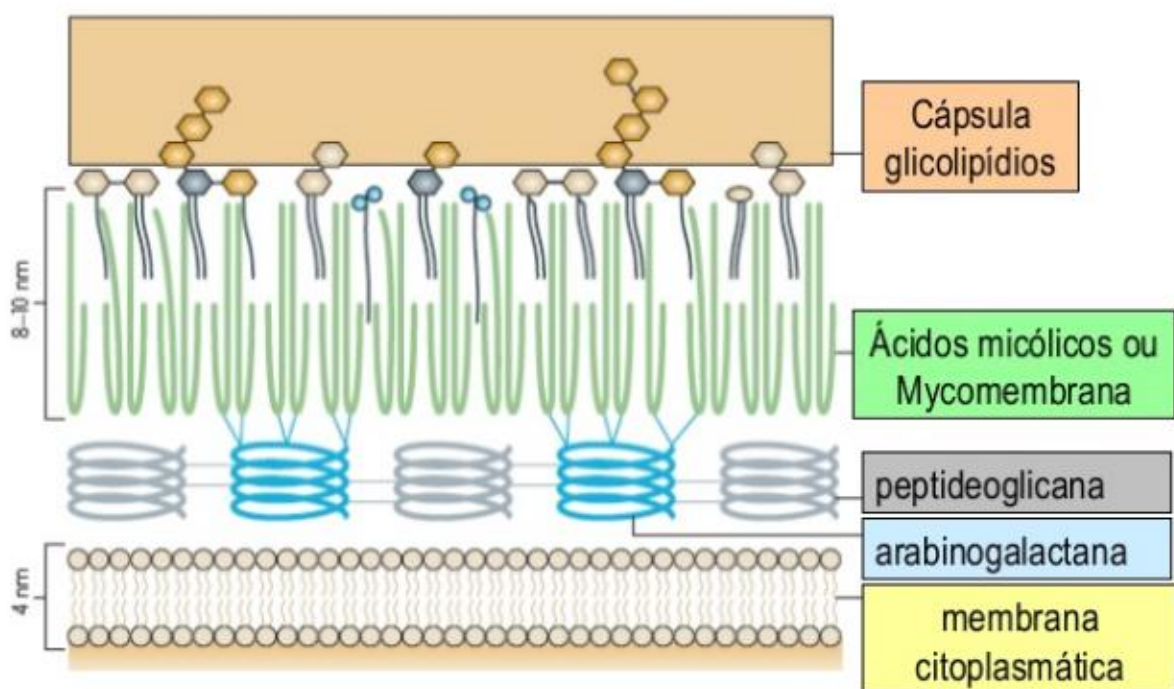
Em 1896, Lehmann e Neumann, visando à inclusão dos bacilos da TB e da hanseníase, propuseram a criação do gênero *Mycobacterium* (WILDNER et al., 2011). *M. tuberculosis* e *M. leprae* permaneceram, durante muitos anos, as espécies primárias de interesse clínico e microbiológico do gênero *Mycobacterium*. Os outros membros do gênero, referidos como MNT permaneceram por muitos anos pouco investigados. Nas últimas décadas, no entanto, o número de relatórios que ligam várias espécies de MNT a doenças humanas tem aumentado constantemente e as dificuldades de tratamento surgiram (FEDRIZZI et al., 2017).

O gênero *Mycobacterium* contém mais de 150 espécies reconhecidas que podem ser amplamente agrupadas em espécies de crescimento rápido e crescimento lento ou complexos de espécies, com base nas diferenças fisiológicas, fenotípicas e filogenéticas apresentadas pelos microrganismos (KING et al, 2017).

As micobactérias são bacilos aeróbicos não formadores de esporos. Apresentam-se como bacilos retos ou ligeiramente curvos, medindo de 0,2 a 0,4 μm de largura e 1 a 10 μm de comprimento. Muitas características desses microrganismos como a álcool-ácido resistência (AAR), a resistência a antimicrobianos e desinfetantes químicos, a resistência à dessecação e a patogenicidade estão relacionadas à parede celular, que é rica em ácidos micólicos (CARDOSO, 2009; MARTÍNEZ et al., 1999). A propriedade AAR é evidenciada pela técnica de Ziehl-Neelsen, a qual demonstra a resistência das células microbianas coradas pela fucsina à descoloração com mistura álcool-ácida (CARDOSO, 2009; HINRICHSEN, 2007).

A parede celular das micobactérias, hidrofóbica e rica em lipídios, é substancialmente mais espessa do que a maioria das outras bactérias (Figura 1). A espessura e a composição da parede celular tornam as micobactérias impermeáveis a nutrientes hidrófilos e resistentes a metais pesados, desinfetantes e antimicrobianos (JOHNSON; ODELL, 2014).

Figura 1 - Representação esquemática da parede celular das micobactérias



A parede celular das micobactérias é composta por três macromoléculas distintas - peptidoglicano (cinza), arabinogalactano (azul) e ácidos micólicos (verde). Os ácidos micólicos são orientados perpendicularmente ao plano da membrana e proporcionam uma barreira lipídica (Adaptado de Abdallah et al., 2007).

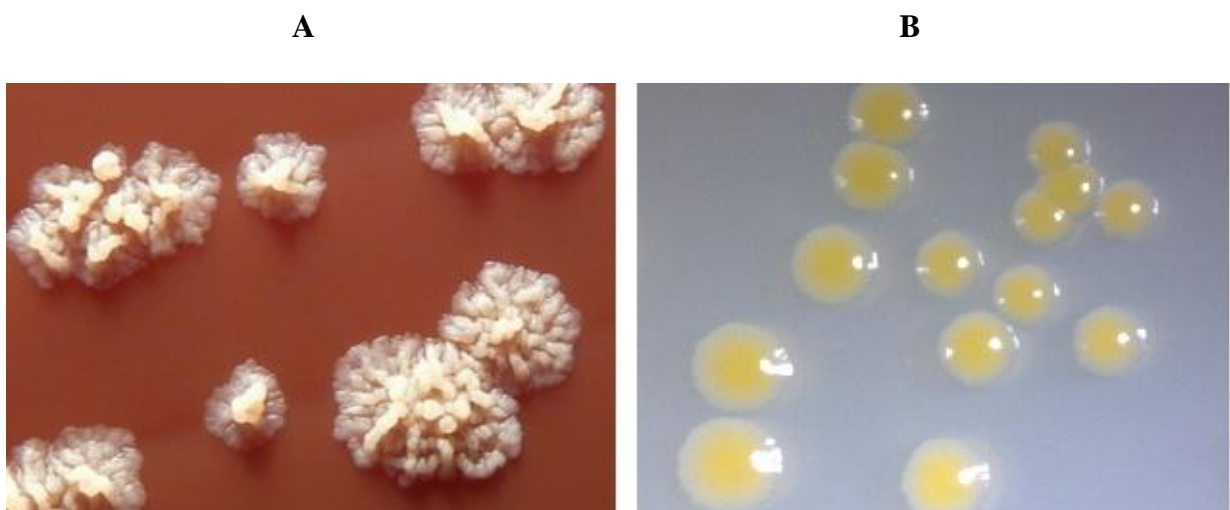
Os ácidos micólicos presentes na camada externa da parede celular, encontrados apenas no gênero *Mycobacterium*, formam uma camada cérea resistente à água. Os nutrientes entram lentamente na célula por essa camada, o que contribui para a taxa de crescimento lento de algumas micobactérias (CARDOSO, 2009; HINRICHSEN, 2007). Outra importante característica que contribui para o crescimento lento das micobactérias deve-se à sua superfície celular

hidrofóbica. A hidrofobicidade faz com que os microrganismos se agrupem e, assim, os nutrientes não são facilmente acessíveis às células (SILVA, 2013).

A parede celular é uma característica definidora de micobactérias. Esta estrutura é responsável pela morfologia distinta das colônias e resistência aos antimicrobianos. Os componentes da parede celular contribuem para a virulência, a persistência no interior de macrófagos e a modulação da resposta imune do hospedeiro. A morfologia das colônias é um complexo fenótipo influenciado pela comunicação entre as células e pode estar relacionada com a suscetibilidade aos antimicrobianos (CHEN et al., 2006; SHI et al., 2011).

A temperatura ótima de crescimento para as micobactérias varia consoante a espécie e pode ser entre 30°C e 45°C, e as variações de pH suportadas são limitadas entre 6 e 8. A morfologia das colônias (Figura 2) varia conforme a espécie de micobactéria e pode se apresentar arredondada, de superfície lisa ou irregular, de aspecto seco ou úmido, de consistência mucóide e de não pigmentada a pigmentada (SUTRE, 2010). O pigmento pode ser amarelo, laranja ou, menos comumente, róseo (SILVA, 2013).

Figura 2 - Morfologia das colônias de micobactérias em meio sólido



(A) Colônias rugosas sem pigmentação e (B) colônias lisas e pigmentadas. Adaptado de *Bacteria in Photos*, disponível em: [http://www.bacteriainphotos.com/Mycobacterium %20fortuitum.html](http://www.bacteriainphotos.com/Mycobacterium%20fortuitum.html).

4.2 MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS (MNT)

As MNT também são conhecidas como micobactérias atípicas, micobactérias ambientais ou micobactérias oportunistas. Normalmente esses microrganismos não são contagiosos e o homem não é o hospedeiro de escolha (FONSECA et al., 2008; MARINHO et al., 2008; MOTA, 2011). As infecções ocorrem de forma oportunista, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (HERMANSEN et al. 2014). Porém, infecções também são detectadas em indivíduos imunocompetentes (MERTANIASIH et al. 2017).

A maioria das micobactérias é encontrada no meio ambiente em uma variedade de tipos de solo e sistemas de distribuição de água, que atuam como potenciais reservatórios de contaminação para humanos e animais (KING et al., 2017). Além disso, as MNT também estão amplamente distribuídas em equipamentos cirúrgicos e em soluções desinfetantes (COWMAN et al., 2012; GÓMEZ, 2009). Isso explica o número crescente de infecções notificadas de MNT que ocorrem por ingestão direta, inalação e incubação de agentes virulentos micobacterianos (GHAFIL; HAJOJ; 2017).

4.2.1 Classificação de Micobactérias Não Tuberculosas (MNT)

O tempo de crescimento é definido como o tempo necessário para as colônias serem visualizadas a olho nu, em meio sólido (BRASIL, 2004). Em relação ao tempo de crescimento, as micobactérias podem ser classificadas em dois grupos: micobactérias de crescimento lento (MCL) e MCR (JOHNSON; ODELL, 2014).

As espécies que formam colônias visíveis em cultura em meio sólido em 3-7 dias são classificadas como MCR, enquanto as espécies que levam mais de 7 dias para formar uma colônia visível são classificadas como MCL. A determinação precoce do tempo de crescimento das micobactérias é útil para escolher antimicrobianos empíricos apropriados, uma vez que os regimes de tratamento que são eficazes para MCR podem não ser eficazes para MCL, e vice-versa (KIM et al., 2013).

Em 1959, Runyon propôs uma classificação para as micobactérias diferentes de *M. tuberculosis*, agrupando-as com base nas taxas de crescimento, morfologia

das colônias e pigmentação na presença e ausência de luz. Conforme pode-se observar na Tabela 1, reconhecem-se assim quatro grupos: I, II, III e IV. Os três primeiros grupos englobam as espécies de crescimento lento, enquanto o último grupo inclui as espécies de crescimento rápido (TORTOLI, 2006; MOTA, 2011).

Os três primeiros grupos distinguem-se entre si pela produção de pigmento. As estirpes do grupo I (fotocromogênicas) apenas produzem pigmento após exposição à luz; as do grupo II (escotocromogênicas) produzem pigmento independentemente da exposição à luz; e as do grupo III (não cromogênicas) nunca produzem pigmento na obscuridade, mas por vezes podem pigmentar-se ligeiramente, de amarelo ou rosa sob o efeito da luz (TORTOLI, 2006; MOTA, 2011).

Embora agora ultrapassada, esta classificação permitiu que os laboratórios de micobactérias identificassem mais facilmente espécies individuais de MNT, resultando numa caracterização mais clara de doenças ou síndromes distintas associadas a estes organismos (GRIFFITH, 2016).

Tabela 1: Micobactérias de acordo com a classificação de Runyon

Grupos	Espécies	Tempo de Crescimento
Grupo I	<i>M. kansasii</i> <i>M. simiae</i> <i>M. asiaticum</i>	Lento
Grupo II	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. flavescens</i>	Lento
Grupo III	Complexo <i>M. avium</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. terrae</i> <i>M. ulcerans</i>	Lento
Grupo IV	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. massiliense</i>	Rápido

A diferenciação fenotípica entre espécies do gênero *Mycobacterium* pode ser realizada através de testes bioquímicos em que as colônias são submetidas às provas de: inibição do crescimento em meio contendo ácido p-nitrobenzóico (PNB), teste da niacina, crescimento a 25°C, crescimento a 45°C, inibição do crescimento em meio contendo NaCl 5%, hidrólise do tween 80, produção de β -galactosidase, redução do telurito de potássio, redução do nitrato, produção de urease e pirazinamidase (BRASIL, 2008).

O poder discriminatório dos testes bioquímicos pode ser limitado em algumas situações, sobretudo na identificação de MCR. Desse modo, é ressaltada a importância dos métodos moleculares como ferramentas auxiliares na identificação das MNT, destacando-se ainda o potencial de reduzir para horas, ao invés de dias e até mesmo semanas, a identificação das espécies pelos métodos moleculares (BRASIL, 2004).

Entre as MCR encontram-se as espécies *M. abscessus* e *M. fortuitum*, que causam um amplo espectro de doenças tais como doença pulmonar, linfadenopatia e infecções dos tecidos moles (HUANG et al., 2013). Devido à diferença de fenótipos de resistência a antimicrobianos, a espécie *M. abscessus* foi subclassificada em três novas espécies estreitamente relacionadas: *M. abscessus sensu stricto* (ss), *M. massiliense* e *M. bolletii* (RACHID et al., 2012).

A diferenciação das espécies melhorou drasticamente com o desenvolvimento de técnicas moleculares que permitiram a detecção de diferenças no gene 16S rRNA. Este gene é altamente conservado entre espécies e ligeiras diferenças caracterizam espécies distintas (JOHNSON; ODELL, 2014). O sequenciamento de genes é o método de referência para a identificação de espécies de MNT e pode ser realizado para espécies raramente encontradas ou identificação ao nível da subespécie (RYU et al., 2016).

Além disso, a disponibilidade de outras técnicas de identificação como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e análise de restrição enzimática do gene hsp65 (PRA-hsp65) tem facilitado a correta identificação de espécies de micobactérias (GRIFFITH, 2016).

4.3 MICOBACTERIOSES

A presença das MNT em patologias humanas foi descrita pela primeira vez em 1893, não muito distante da descoberta de *M. tuberculosis* por Robert Koch. Subsequentemente, numerosos relatos corroboraram o papel de patógeno humano dessas espécies (MARRAS; DALEY, 2002).

As MNT estão causando problemas de saúde em todo o mundo. Isto é indicado por uma quantidade crescente de relatórios científicos que mostram não só espécies bem identificadas ressurgindo, mas também a emergência de novas espécies (GHAFLI; HAJOJ, 2017). Na última década, a prevalência de doenças pulmonares e extrapulmonares causadas por MNT aumentou. Esta elevação nas taxas de casos pode ser devido ao surgimento real de novas infecções ou devido ao desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico avançado. Por outro lado, a elevação das condições imunossupressoras, incluindo doenças e terapias medicamentosas, contribuem consideravelmente nesse fenômeno (VARGHESE et al., 2017).

A infecção por MNT é considerada uma das causas de doenças infecciosas oportunistas. Como exemplo disso pode-se citar a infecção pulmonar, que ocorre principalmente em pacientes imunocomprometidos, como pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), com terapia imunossupressora, com TB ou diabetes, entre outras comorbidades (MERTANIASIH et al., 2017).

Várias espécies de MNT estão associadas a doenças em humanos. As infecções pulmonares são as mais frequentes, seguidas de infecções cutâneas e tecidos moles, linfadenites em crianças e infecções disseminadas em pacientes com imunodeficiência grave. As MNT são uma importante causa de morbidade e mortalidade, muitas vezes sob a forma de doença pulmonar progressiva (STOUT et al., 2016). A imunossupressão é um fator de risco para sua disseminação, embora muitos pacientes com micobacterioses não sejam imunossuprimidos (WILDNER et al., 2011). As infecções em indivíduos imunocompetentes geralmente são secundárias à inoculação direta, causadas após contaminação por procedimentos cirúrgicos ou lesões pré-existentes (GUNDAVDA et al., 2017).

Fatores de risco para o acometimento de infecção por MNT incluem exposição ocupacional a poeiras e fibrose cística. Recentemente, foi demonstrado que mulheres idosas, de cor branca e com um índice de massa corporal (IMC) baixo,

possuem alto risco para desenvolver infecção pulmonar causada por micobactérias atípicas (MULLIS; FALKINHAM, 2013).

A doença pulmonar 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 TB. Os pacientes geralmente apresentam sintomas como tosse crônica com expectoração, fadiga, febre, hemoptise e perda de peso (SÃO PAULO, 2005).

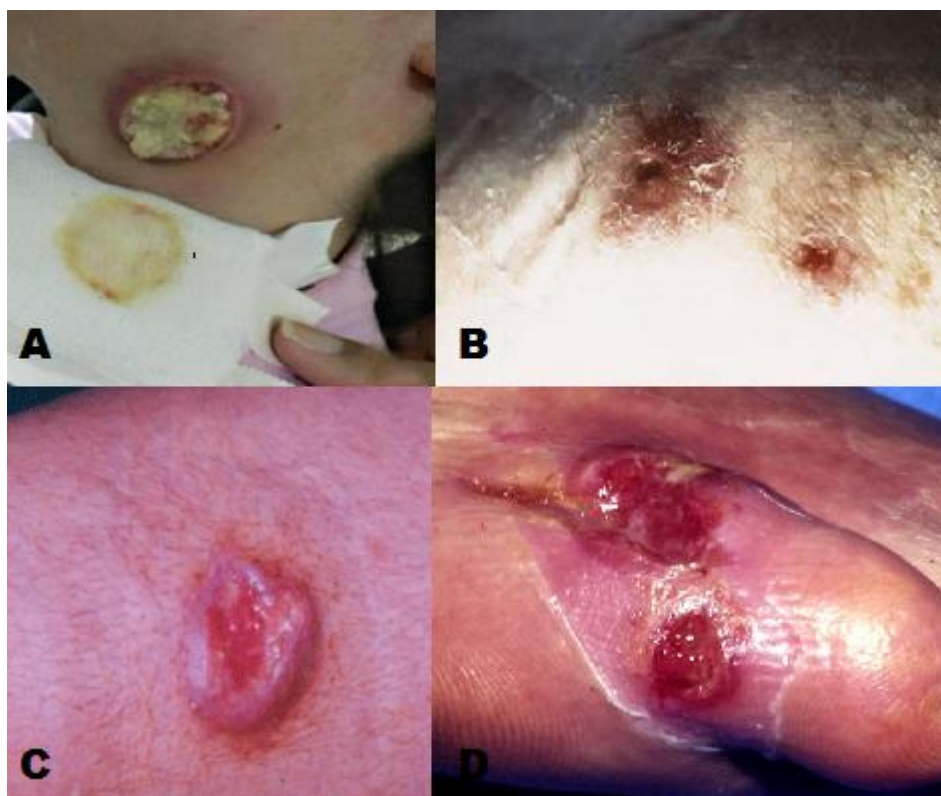
A incidência e a prevalência da doença pulmonar causada por MNT estão aumentando em todo o mundo, e esse tipo de infecção é responsável pela maioria dos casos clínicos de micobacterioses. Entre as MCR mais comuns causadoras da doença pulmonar estão *M. kansasii* e *M. abscessus* (KOH, 2017).

Outras manifestações clínicas de infecções causadas por MNT podem ser causadas devido a infecções peritoneais por cateterização; infecções pós-cirúrgicas, como em mamoplastias e transplantes cardíacos; em decorrência de procedimentos invasivos, como videoscopias e procedimentos estéticos (PADOVEZE et al., 2007).

As infecções de pele e tecido subcutâneo (Figura 3) causadas por MCR se apresentam, em geral, como abscessos piogênicos, com reação inflamatória aguda e supuração. As espécies mais comumente associadas a doenças de pele e tecido subcutâneo incluem *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*, e estas são responsáveis pela formação de abscessos nos locais de punção, ferimentos ou fraturas expostas. Geralmente as lesões ocorrem após traumatismos, fraturas ou injeções, após cirurgias ou procedimentos hospitalares onde os dispositivos médicos podem estar contaminados. Infecções ocorrem também após ferimento acidental onde a ferida é contaminada pelo solo (FONTANA, 2008).

Em sua maioria, os estudos de surtos apresentam evidência de procedimentos inadequados de esterilização e/ou desinfecção, criando condições favoráveis à ocorrência desses eventos (PITOMBO et al., 2009). A frequente presença desses microrganismos na água de torneira de hospitais, a relativa resistência a agentes esterilizantes, sua habilidade em sobreviver e crescer em água destilada e dentro de amebas, bem como seu frequente envolvimento na formação de biofilmes contribuem para que espécies de MCR causem infecções relacionadas a assistência a saúde (CARDOSO, 2009; SEXTON; HARRISON, 2008).

Figura 3 - Lesões cutâneas causadas por MNT



Micobacterioses cutâneas causadas por *M. fortuitum*(A), *M. abscessus*(B), *M. avium* (C) e *M. kansasii* (D) (FERREIRA et al., 2010; GALIL et al.,1999; HAMODAT, 2015; LUZ et al., 2014).

Apesar de serem distribuídas mundialmente, as MNT apresentam diferenças geográficas significativas em termos de incidência de espécies, amplamente explicadas pela natureza ambiental desses microrganismos. As bactérias do *Mycobacterium avium complex* (MAC) predominam na maioria dos países ocidentais e países da União Europeia (UE). Nos países da UE, *M. fortuitum* tem sido bastante isolado recentemente. Nos Estados Unidos da América, os membros do MAC possuem alta prevalência, seguidos por *M. kansasii* e *M. abscessus* (FARIA et al., 2015).

No Brasil, poucos são os dados oficiais referentes às micobacterioses (WILDNER, 2012). Devido à ocorrência de surtos de infecções causadas por micobactérias, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou, em 2009, a notificação compulsória das infecções causadas por MCR. Dentre as MNT, as espécies *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*, classificadas como MCR, são grandes responsáveis pelos surtos de infecções notificadas no país

(BRASIL, 2007; BRASIL, 2009). O agente etiológico mais prevalente na maioria das cidades brasileiras é a espécie *M. massiliense*, exceto nas infecções secundárias a mamoplastias, onde a maior prevalência é de *M. fortuitum* (SÃO PAULO, 2010).

A maior epidemia de infecção pós-cirúrgica causada por MNT documentado no Brasil foi relatada por Duarte e colaboradores (2009). Em estudo desenvolvido no Rio de Janeiro (RJ), os autores relataram a existência de um clone epidêmico de *M. massiliense* circulando no país, de modo que as cepas oriundas de Belém, Goiás e Rio de Janeiro apresentaram perfis idênticos detectados em genotipagem por eletroforese em gel em campo pulsado. Além disso, 38 hospitais localizados no Rio de Janeiro tiveram casos confirmados por culturas microbiológicas, totalizando 148 isolados de *M. massiliense* tolerantes ao glutaraldeído a 2%.

Em Santa Maria, RS, foi realizado um estudo em que se avaliou a prevalência de MNT em relação ao total de casos de micobacterioses identificadas em pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), em um período de três anos. Os resultados evidenciaram que 33% dos casos clínicos investigados foram causados por MNT, sendo que 18% da totalidade de casos pertenciam ao grupo de MCR (AGERTT et al., 2013).

4.4 TRATAMENTO DAS MICOBACTERIOSES

A resistência aos antimicrobianos é um tema de destaque quando se estudam as micobactérias. Estão presentes as dificuldades conhecidas, semelhantes àquelas que se apresentam no tratamento da TB, em especial a proteção que as bactérias obtêm por se alojarem dentro das células do hospedeiro, o que exige fármacos que alcancem tais sítios (MACEDO et al., 2009).

O diagnóstico de infecções causadas por MNT possui grande significado clínico, pois a maioria dos isolados clínicos das micobactérias atípicas é resistente a quase todos os medicamentos testados em concentrações clínicas estabelecidas para *M. tuberculosis* (GUNDAVDA et al., 2017). Muitos são os esquemas utilizados para o tratamento das MNT, entretanto, ainda são poucos os estudos randomizados relacionados a este tema para grande parte das espécies. Sabe-se que para alguns fármacos e espécies, não há correlação da suscetibilidade *in vitro* com a resposta efetiva aos antimicrobianos *in vivo* (GRIFFITH, 2010).

As diferenças na suscetibilidade aos antimicrobianos às várias espécies de MNT precisam ser levadas em consideração na escolha da terapia antimicrobiana, mas devido à dificuldade em distinguir as manifestações clínicas, é necessário que primeiramente sejam determinadas as espécies de MNT (MERTANIASIH et al. 2017). Na ausência da identificação de espécies e de resultados de suscetibilidade, são recomendados regimes de tratamento com múltiplas drogas, contendo ao menos um macrolídeo e um aminoglicosídeo (GHOSH et al., 2017).

Para o sucesso terapêutico, devem ser combinados pelo menos dois fármacos, visando evitar a seleção de cepas resistentes. O número de fármacos utilizados deve ser mantido por todo o tempo de tratamento, o qual não deve ser inferior a 18 meses. Dentre as micobactérias mais resistentes estão as do MAC, *M. fortuitum* e *M. chelonae*, que exigem, com frequência, poliquimioterapia com quatro a cinco fármacos (VICENTE, 2003).

As MCR geralmente são suscetíveis a macrolídeos, sulfonamidas, amicacina, doxiciclina, imipenem e fluoroquinolonas. Esses medicamentos devem ser otimizados de forma que a combinação de antimicrobianos, a dose e a duração do tratamento estejam de acordo com a gravidade da infecção e as comorbidades presentes no paciente (PARIKH; GRANT, 2017).

Infecções difíceis de tratar causadas por MCR são cada vez mais observadas em ambientes clínicos, especialmente por *M. abscessus*, que é considerada uma das espécies que apresenta mais resistência a antimicrobianos. O desenvolvimento de novas opções de tratamento se torna necessária, uma vez que as opções eficazes de tratamento contra MCR são limitadas (HATAKEYAMA et al., 2017).

4.4.1 Amicacina

Os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica ao ligar-se de maneira irreversível à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, interferindo na integridade da membrana celular (ZHANG, 2005) e são utilizados, principalmente, em casos de resistência à claritromicina (SÃO PAULO, 2005).

A amicacina, um composto semissintético derivado da canamicina, é um aminoglicosídeo potente e de amplo espectro (AMIR et al., 2017). É um fármaco bactericida e sua ação é concentração dependente e residual, ou seja, pode

apresentar efeito bactericida mesmo com a concentração sérica abaixo da concentração inibitória mínima (CIM) (ARBEX et al., 2010).

Devido à sua resistência a muitas das enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, a amicacina tem um papel especial nos hospitais onde os microrganismos apresentam resistência à gentamicina e a tobramicina. A amicacina é ativa contra *M. tuberculosis* (99% das cepas são inibidas por 4 µg/mL de amicacina) e MNT (PACIFICI; MARCHINI, 2017).

A amicacina é prescrita em tratamentos de infecções por MCR, sendo aplicada como alternativa terapêutica em lesões múltiplas ou individuais na pele e região subcutânea, infecções profundas (acometimento de fáscia, músculos, intraperitonal), artrite e osteomielite, infecções secundárias a mamoplastia de aumento. Nesses casos, a amicacina pode ser aplicada em terapias com a duração de até seis meses, de acordo com a evolução do caso. A posologia do medicamento é ajustada conforme o local acometido e a extensão das lesões. Além disso, recomenda-se atenção especial à nefro e a neurotoxicidade (BRASIL, 2009).

4.4.2 Claritromicina

A claritromicina é um agente antimicrobiano macrolídeo sistêmico e semissintético que apresenta propriedade bacteriostática contra microrganismos suscetíveis, embora também possa ser bactericida em altas concentrações. A claritromicina tem seu mecanismo de ação baseado na inibição da síntese de proteínas, penetrando a parede celular e ligando-se às subunidades ribossomais 50S, interrompendo a síntese de proteínas em organismos sensíveis (KANATANI; GUGLIELMO, 1994).

Os macrolídeos são as únicas drogas que se pode correlacionar com segurança a suscetibilidade *in vitro* com os resultados clínicos e a resposta ao tratamento de micobacterioses (BINDER et al., 2013).

Os macrolídeos, especialmente a claritromicina, continuam a ser o alicerce da terapia para infecções causadas por MNT, principalmente contra *M. abscessus* (ZHANG et al., 2017). No tratamento de infecções provocadas por MCR, a claritromicina é empregada nas mesmas lesões em que o uso da amicacina é recomendado (BRASIL, 2009).

A claritromicina tem sido crescentemente empregada no tratamento de micobacterioses em pacientes HIV positivos em associação com etambutol e rifabutina. Em infecções causadas por micobactérias como *M. fortuitum* e *M. chelonae*, a claritromicina é a terapêutica de escolha, em associação com outros dois antimicrobianos (GRIFFITH et al., 2007).

Muitas espécies patogênicas de MCR são consideradas suscetíveis aos macrolídeos, e estes agentes são componentes importantes no tratamento de infecções por MCR. No entanto, várias espécies desse grupo de microrganismos expressam resistência intrínseca a essa classe de fármacos (NASH et al., 2006).

A resistência induzível aos macrolídeos, um fenômeno recentemente reconhecido, pode restringir o papel terapêutico dessa classe de medicamentos (HATAKEYAMA et al., 2017). O microrganismo desenvolve resistência aos macrolídeos *in vitro* após incubação prolongada (suscetível no dia 3, mas resistente no dia 14), ou por pré-incubação em meio contendo macrolídeos (RYU et al., 2016). Esta resistência pode estar relacionada com a eficácia insuficiente do tratamento baseado em claritromicina contra infecções causadas por *M. abscessus* (HATAKEYAMA et al., 2017).

4.4.3 Ciprofloxacino

O ciprofloxacino é uma fluorquinolona de segunda geração vastamente prescrita. Apresenta amplo espectro de ação e é eficaz contra diversos patógenos, incluindo gram-negativos, gram-positivos e micobactérias (ANDREU et al., 2007; BRASIL, 2009; SHAZLY, 2017). As fluoroquinolonas estão atualmente entre os antimicrobianos mais habitualmente prescritos no mundo devido ao seu espectro de ação, seus perfis farmacocinéticos e a boa tolerância clínica (GRILLON et al., 2016).

O mecanismo de ação do ciprofloxacino decorre do bloqueio de DNA girase, resultando em efeito bactericida contra amplo espectro de bactérias (ANVISA, 2013a). A inibição da atividade da DNA girase bacteriana, que regula a topologia do DNA é essencial à sobrevivência da bactéria. A DNA girase torna a molécula de DNA bacteriana compacta e biologicamente ativa. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA deixa de possuir a propriedade de super-helicoidização para que possa ocupar um pequeno espaço celular para sua expressão, recombinação e replicação. As extremidades livres do DNA induzem a síntese descontrolada de RNAm e de

proteínas, assim como a produção de exonucleases e a degradação cromossomal. Esses fatores levam à morte celular (ARBEX et al., 2010).

O ciprofloxacino é uma opção importante no tratamento de infecções causadas por micobactérias como *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. massiliense*, *M. chelonae* e *M. abscessus* e, também é considerado uma alternativa terapêutica em casos de resistência à claritromicina (BRASIL 2009; SÃO PAULO, 2005).

4.4.4 Doxiciclina

A doxiciclina é uma tetraciclina semissintética que possui ação prolongada e atua como um agente bacteriostático, sendo altamente eficaz contra muitos microrganismos. Seu mecanismo de ação se baseia na capacidade que o fármaco possui de se ligar à subunidade 30S dos ribossomos microbianos, bloqueando a ligação da RNA-aminoacil transferase e inibindo a síntese de proteínas (KRAKAUER; BUCKLEY, 2003).

A doxiciclina apresenta elevado grau de lipossolubilidade e alcança elevada concentração sanguínea e tecidual, penetrando rapidamente na maioria das células (ANVISA, 2013b).

No tratamento de micobacterioses, a doxiciclina é amplamente empregada, incluindo o tratamento de infecções causadas por MCR como *M. fortuitum*, *M. massiliense* e *M. abscessus* (BRASIL, 2009).

4.4.5 Imipenem

O imipenem é um antimicrobiano sintético do grupo dos carbapenêmicos, que constituem uma classe de antibióticos betalactâmicos, e é um importante agente no arsenal terapêutico de infecções causadas por diversos microrganismos devido ao seu amplo espectro de ação (FREITAS; BARTH, 2002; KABBARA et al., 2015). A estabilidade diante das betalactamases o diferencia de outros betalactâmicos. O imipenem é um potente inibidor da síntese da parede celular bacteriana e é bactericida contra um amplo espectro de patógenos. Liga-se às proteínas fixadoras de penicilina presentes na parede bacteriana, principalmente as PBPg1 e PBP2, provocando a lise osmótica da bactérias (ANVISA, 2013c).

Para manter sua atividade antibacteriana e diminuir sua nefrotoxicidade é recomendado que o imipenem seja coadministrado com a cilastatina, que bloqueia o metabolismo renal do imipenem e aumenta substancialmente sua concentração no trato urinário (GALES; MENDES, 2002).

Em infecções causadas por MCR, o imipenem é bastante utilizado, pois usualmente esses microrganismos são sensíveis ao antimicrobiano. Nos testes de suscetibilidade, o imipenem não deve ser avaliado rotineiramente, em função de sua labilidade durante a incubação (BRASIL, 2009; CLSI, 2011).

4.4.6 Sulfametoxazol

O sulfametoxazol é uma sulfonamida de amplo espectro. As sulfonamidas foram os primeiros fármacos antibacterianos sistêmicos eficazes utilizadas em humanos. Elas são primariamente bacteriostáticas e atuam interferindo na síntese bacteriana do ácido fólico (GARCÍA-GALÁN et al., 2008).

As sulfonamidas são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido p-aminobenzoico (PABA), impedindo a sua utilização pelas bactérias na síntese do ácido fólico. Os microrganismos sensíveis são aqueles que exigem a presença do PABA para sintetizar seu próprio ácido fólico (FORGACS et al., 2009).

No controle de infecções causadas por algumas MCR, como *M. abscessus* e *M. fortuitum*, o sulfametoxazol é uma alternativa importante no tratamento devido à facilidade de administração por via oral (BRASIL, 2009).

4.5 TESTES DE SUSCETIBILIDADE (TS)

A avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em espécies do gênero *Mycobacterium* é importante no manejo de pacientes com infecções causadas por MNT. Para auxiliar na padronização de métodos utilizados para estabelecer o perfil de suscetibilidade de micobactérias, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) publicou o documento M24-A2, contendo padronizações para testar MNT (CLSI, 2011).

O CLSI (2011) recomenda como padrão-ouro a microdiluição em caldo para a realização do TS. O teste pode ser aplicado em qualquer MCR com significado clínico (isolados de sangue, líquidos corporais estéreis, tecidos, e amostras oriundas

de lesões de pele e tecidos moles). Os agentes antimicrobianos que devem ser testados são: amicacina, cefoxitina, ciprofloxacina, claritromicina, doxiciclina, imipenem e sulfametoxazol. Os resultados dos TS das MCR são obtidos entre três e quatro dias e os valores de CIM, bem como a interpretação dos resultados, são baseados em tabelas de ponto de corte propostas pelo CLSI.

A Sociedade de Doenças Infecciosas da América e a *American Thoracic Society* recomendam testes de rotina para avaliar a suscetibilidade de isolados de MCR clinicamente significativos. A suscetibilidade aos antimicrobianos deve ser relatada e utilizada como guia clínico para a implantação de tratamentos adequados. Embora o método de microdiluição em caldo seja recomendado pelo CLSI para a determinação da suscetibilidade de MNT, as duas entidades consideram que o método de disco difusão pode fornecer uma boa técnica de triagem para MCR (GHOSH et al., 2017).

4.6 BIOFILMES

Os microrganismos apresentam-se nos ambientes aquosos tanto na forma planctônica como na forma séssil. Na forma planctônica se encontram em suspensão e dispersos no meio aquoso, enquanto que na forma séssil se encontram aderidos a superfícies sólidas sob a forma de biofilmes (MACHADO, 2005).

Os biofilmes são comunidades biológicas com elevado grau de organização, onde bactérias e outros microrganismos formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais. As estruturas apresentam uma distribuição variável de células e agregados celulares, aos quais constituem um modo protegido de crescimento de microrganismos (BONEZ et al., 2013) e influenciam na virulência bacteriana, patogênese e sobrevivência ambiental (ARAI et al., 2013).

Ainda nesse contexto, os biofilmes podem ser definidos como agregados de microrganismos em que as células são frequentemente incorporadas em uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) aderentes entre si e/ou em uma superfície (VERT et al., 2012).

Isso explica o fato de que a maioria das células em biofilmes de múltiplas camadas experimentam contato célula a célula, em que apenas uma camada está em contato direto com o substrato. Através de interações intercelulares, tanto sociais

como físicas, juntamente com as propriedades da matriz, o estilo de vida do biofilme é claramente distinto do das células bacterianas de vida livre. Assim, as comunidades de biofilme possuem propriedades que não são previsíveis a partir do estudo de células bacterianas planctônicas (FLEMMING et al., 2016).

Pesquisas realizadas nas últimas décadas já estabeleceram claramente que 99,9% de todos os microrganismos conhecidos em ambientes naturais estão ligados a superfícies, devido aos benefícios nutricionais e protetores associados à vida em uma população sésil, aderida a uma superfície (COWAN, 2011; OJHA; HATFULL, 2007; OMAR et al, 2017).

As vantagens de uma célula bacteriana em se encontrar inserida em um biofilme são numerosas, principalmente na proteção contra agentes agressivos (ARAI et al., 2013). A formação de biofilmes é uma estratégia bem sucedida para os microrganismos ubíquos no meio ambiente, e pode ser uma resposta ao *stress* oxidativo em hospedeiros mamíferos e no ambiente externo, onde a reação a espécies reativas de oxigênio é fundamental para a sobrevivência das bactérias (GEIER et al., 2008; SOUSA et al., 2015).

Entre os benefícios para os microrganismos que o compõe, encontra-se o aumento da concentração de nutrientes na interface biofilme-líquido, possibilidade de troca de material genético e utilização de substratos de difícil degradação devido ao estabelecimento de relações de simbiose (MITTELMAN, 1998). Os biofilmes demonstram, também, resistência acrescida à radiação UV, alterações de pH, desidratação e a predadores como protozoários (XAVIER et al., 2005).

Em seus ambientes naturais, as bactérias encontram uma infinidade de adversidades que provocam uma série de respostas adaptativas altamente reguladas. Estas respostas não só protegem as células bacterianas, como também causam impacto na suscetibilidade a agentes antimicrobianos (POOLE, 2012).

Durante o desenvolvimento do biofilme, as bactérias sofrem várias mudanças em seu estado fenotípico formando uma comunidade heterogênea, dinâmica e diferenciada. Fazem parte de uma estratégia de sobrevivência bacteriana bem sucedida em ambientes severos (FARIA, 2015).

4.6.1 Estrutura e composição dos biofilmes

Os biofilmes permitem a coexistência de diferentes microrganismos em sua estrutura, sejam ou não de mesma espécie (OLIVEIRA, 2011; GUPTA et al., 2016). A composição do biofilme é dependente das condições do meio em que biofilme está inserido, sendo influenciado pela temperatura, pressão, pH e oxigênio dissolvido. Além disso, o biofilme pode englobar partículas sólidas, como areia e partículas orgânicas provenientes do meio aquoso onde está imerso. As comunidades biológicas sésseis encontram-se envolvidas em matrizes poliméricas (também chamadas de matrizes exopoliméricas) produzidas por elas próprias, o que favorece relações simbióticas e permite a sobrevivência de microrganismos em ambientes hostis (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

Um biofilme é considerado uma estrutura muito adsorvente e porosa devido a ser constituído essencialmente por água (cerca de 80 a 95%). A estrutura do biofilme é composta por um conglomerado de diferentes tipos de EPS. Os microrganismos representam somente uma parte da massa de biofilme que, frequentemente, é menor que 10% (FLEMMING; WINGENDER, 2010; OLIVEIRA, 2011).

As propriedades centrais do biofilme são regidas pela matriz exopolissacarídica, que (1) proporciona estabilidade mecânica à estrutura 3D do biofilme, (2) regula a capacidade de aderência às superfícies e (3) determina a capacidade do biofilme para adsorver gases, solutos e células estranhas (BILLINGS et al., 2015). Além disso, a matriz polimérica é responsável pela integridade funcional da estrutura e determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes (MACHADO, 2005).

A composição química das EPS é muito heterogênea e complexa, no entanto, de uma maneira geral, são os polissacarídeos que predominam. A matriz polimérica pode ser constituída por proteínas, água, ácidos nucleicos, glicoproteínas, íons, fosfolípidios, entre outros componentes (Figura 4). Além disso, a matriz tem o potencial de prevenir o acesso físico de certos agentes antimicrobianos restringindo a difusão destes para o interior dos biofilmes (OLIVEIRA, 2011). Na Tabela 2, podem-se observar algumas das funções desempenhadas pelas EPS no biofilme bacteriano.

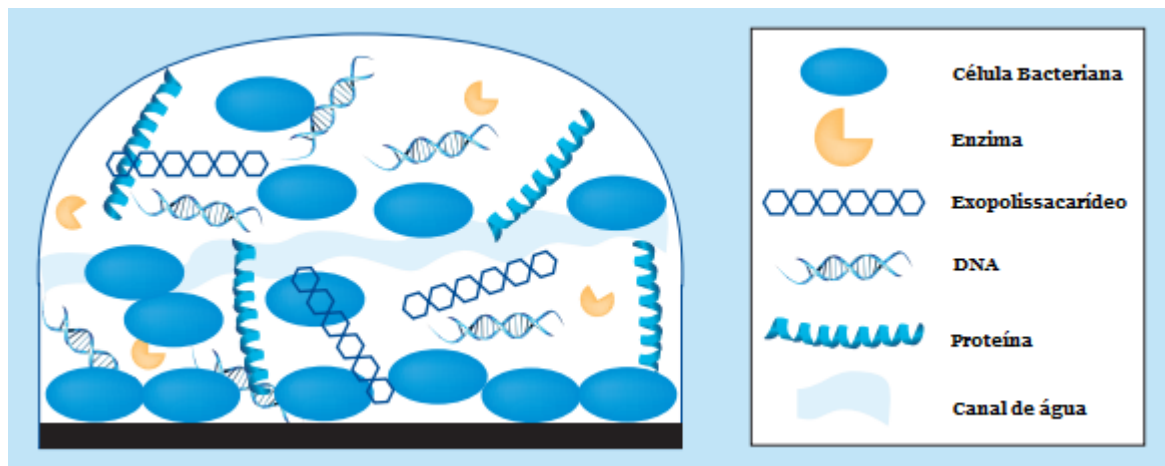
Tabela 2 - Funções de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) no biofilme bacteriano

Função das EPS	Relevância para os biofilmes
Adesão	Permite os passos iniciais da colonização de superfícies pelas células planctônicas e a fixação dos biofilmes as superfícies.
Agregação de células bacterianas	Permite comunicação entre as células, a imobilização temporária de populações bacterianas, o desenvolvimento de densidades celulares elevadas e reconhecimento de célula a célula.
Coesão dos biofilmes	Forma uma rede de polímero, mediando a estabilidade mecânica do biofilme e, através da estrutura das EPS, determina a arquitetura do biofilme e permite a comunicação célula a célula.
Retenção de água	Mantém um microambiente altamente hidratado em torno dos microrganismos do biofilme, levando à tolerância à dessecação em ambientes deficientes em água.
Barreira protetora	Confere resistência às defesas do hospedeiro durante infecções e confere tolerância a vários agentes antimicrobianos, como desinfetantes e antimicrobianos.
Atividade enzimática	Permite a digestão de macromoléculas exógenas para aquisição de nutriente e a degradação de EPS estruturais, permitindo a liberação de células dos biofilmes.
Fonte de nutrientes	Fornece suprimento de carbono, nitrogênio e fósforo para utilização pelo biofilme.
Troca de informação genética	Facilita a transferência horizontal de genes entre as células do biofilme.
Exportação de componentes celulares	Libera material celular como resultado da atividade metabólica.

Fonte: Adaptado de Flemming e Wingender (2010).

A presença da matriz polimérica extracelular torna difícil para os antimicrobianos agirem sobre os biofilmes bacterianos, o que torna as bactérias sésseis tolerantes a medicamentos com ação antibacteriana (GUPTA et al., 2016). Dessa forma, os microrganismos presentes em biofilmes representam um risco significativo para a saúde devido à sua menor suscetibilidade aos antimicrobianos convencionais e, também, à sua resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e (GERITS et al., 2017).

Figura 4 - Estrutura do Biofilme



A estrutura da matriz de EPS dos biofilmes é composta por um ou mais polissacarídeos extracelulares, DNA e proteína. Os canais no biofilme permitem que água, ar e nutrientes cheguem a todas as partes da estrutura. Exopolissacarídeos são sintetizados de forma extracelular e intracelular e segregados para o ambiente externo (Adaptado de RABIN et al., 2015).

No caso de biofilmes formados por micobactérias, a matriz extracelular é rica em ácidos micólicos livres, que abriga as populações de bactérias, conferindo uma maior resistência do biofilme aos fármacos nocivos às micobactérias, apesar da exposição a altos níveis de antimicrobianos (OJHA et al., 2008).

4.6.2 Processos envolvidos na formação de biofilmes

O desenvolvimento do biofilme é um processo complexo, dinâmico e multiestágio (GERITS et al., 2017). Os biofilmes podem formar-se nas mais diversas superfícies, nos quais se incluem os tecidos vivos, equipamentos hospitalares, nos sistemas de água potável ou industrial, ou ainda em sistemas aquáticos naturais (DONLAN, 2002). No caso das micobactérias, também podem formar-se em interfaces ar-líquido (OJHA; HATFULL, 2007).

O desenvolvimento de biofilmes microbianos envolve cinco etapas consecutivas: (1) adesão reversível, (2) adesão irreversível, (3) formação de microcolônias, (4) maturação de biofilme e (5) dispersão (MA et al., 2017). Ainda assim, o processo da formação do biofilme depende do tipo de microrganismo, da composição da superfície e das influências do meio ambiente. A presença de uma

espécie de microrganismo sobre a superfície poderá promover a adesão de outra espécie (DUNE, 2002).

A formação de biofilmes bacterianos (Figura 5) começa quando uma bactéria planctônica encontra o caminho para uma superfície exposta, condicionada e revestida por película através de um movimento browniano ou flagelar. Em seguida, supera as forças repulsivas eletrostáticas entre o substrato e a superfície celular bacteriana, e faz a adesão inicial a essa superfície. Diferentes tipos de biofilmes podem então se formar, dependendo do ambiente, incluindo as películas que se formam nas interfaces ar-líquido e biofilmes submersos associados à superfície sólida (OMAR et al., 2017).

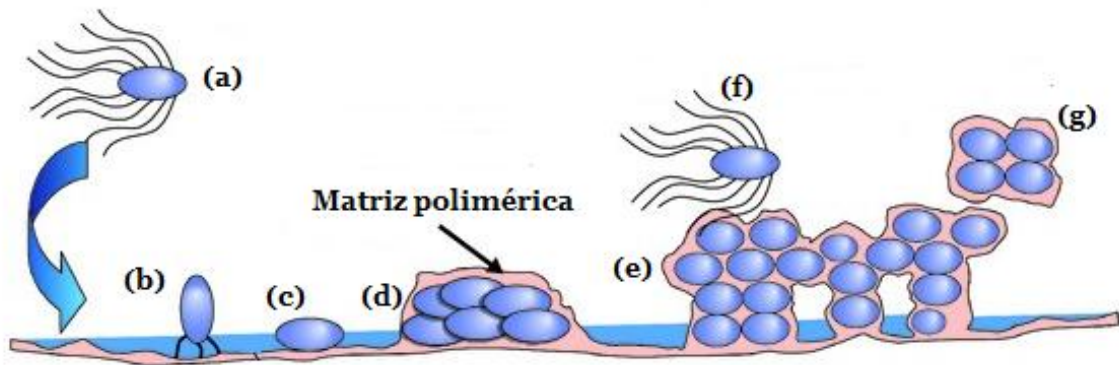
À medida que a população bacteriana aumenta, os microrganismos se organizam em microcolônias, dispostas em monocamadas. Durante as etapas de contato, adesão e formação de microcolônias, cada bactéria passa a produzir moléculas sinalizadoras que desencadeiam a ativação de genes específicos alterando do fenótipo de bactérias planctônicas para o fenótipo de biofilme. Esse processo de intensa comunicação celular mediado por moléculas sinalizadoras é conhecido como *quorum sensing* (TUTTLEBEE et al., 2002; TATEDA et al., 2007). O *quorum sensing* é um fator relevante na formação do biofilme e é dependente da densidade da população no biofilme (BHARATI; CHATTERJI, 2013).

A ativação de genes envolvidos com o fenótipo do biofilme leva a produção de matriz extracelular, crescimento e agrupamento tridimensional das bactérias, aumento da aderência com a superfície e a formação de canais de água para a troca de água e nutrientes com o meio externo (RICKARD et al., 2003).

Durante o desenvolvimento do biofilme, o ambiente rico em nutrientes promove o crescimento rápido de microrganismos que resulta na estrutura 3D do biofilme, que aumenta substancialmente a espessura do mesmo. À medida que a espessura do filme aumenta, a fase de maturação é atingida e é esta fase do desenvolvimento do biofilme que está associada à resistência a antimicrobianos (RAMASAMY; LEE, 2016).

Uma vez formado, o biofilme pode permanecer aderido à superfície por um longo período ou se desprender, servindo como uma fonte perpetuadora do ciclo ao liberar formas planctônicas e agregados celulares para colonização de novos sítios (RICKARD et al., 2003).

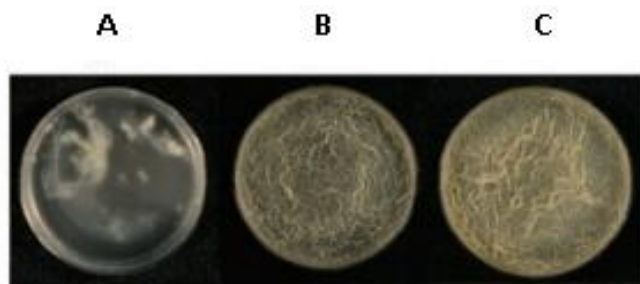
Figura 5 - Desenvolvimento do processo de formação do biofilme



Os diferentes estágios da formação do biofilme incluem (a) célula planctônica de forma livre no ambiente, (b) adesão reversível do microrganismo a superfície, (c) adesão irreversível a superfície, (d) formação de microcolônias através da divisão celular e da produção de matriz extracelular e (e) a formação de uma arquitetura matricial de biofilme tridimensional. As células podem se desintegrar ativamente do biofilme (f) ou passivamente serem desintegradas através de ruptura mecânica (g) (Adaptado de RÖMLING; BALSALOBRE, 2014).

A capacidade de algumas bactérias de colonizar a interface ar-líquido (Figura 6) se deve ao nicho favorável criado, onde nutrientes e oxigênio são gradientes, opondo-se. Nesta interface, os microrganismos encontram acesso ao oxigênio abundante do ar acima e nutrientes em solução abaixo. A colonização da interface ar-líquido forma um biofilme flutuante com a fixação a superfícies sólidas (KOZA et al., 2009).

Figura 6 - Biofilme de *Mycobacterium smegmatis* cultivado em meio de cultura M63



Formação de biofilme em superfície ar-líquido com (a) 3 dias, (b) 4 dias e (c) 5 dias de cultivo (Adaptado de Ojha e Hatfull, 2007).

Alguns estudos genéticos forneceram uma visão sobre alguns dos principais fatores necessários para 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 lipídicos glicosilados presentes na camada exterior do envelope celular das micobactérias e estão intimamente ligados a motilidade das micobactérias, já que estas não possuem flagelos para a movimentação celular (RECHT et al., 2000).

Outro fator preponderante no processo de formação do biofilme em micobactérias pode ser citado na etapa de maturação do biofilme, onde é necessário que o gás carbônico produzido pelas bactérias não se acumule e o oxigênio esteja em abundância. Além disso, nas fases finais de maturação de biofilmes de micobactérias, o nível de ácidos micólicos também está intimamente relacionado com o processo (OJHA et al., 2008).

4.6.3 Resistência associada à presença de biofilmes

A formação de biofilme é uma estratégia altamente eficaz para o patógeno proliferar como uma comunidade tolerante a situações de estresse em nichos protegidos e com invasão limitada do sistema imunitário. Assim, as infecções que apresentam como causa um biofilme podem constituir diagnósticos significativos e desafios terapêuticos em contextos clínicos (ISLAM et al., 2012). O biofilme bacteriano aumenta a resistência aos antimicrobianos e provoca muitas doenças persistentes. Dentro do biofilme, vários mecanismos conferem a resistência multifatorial aos agentes antimicrobianos (Figura 7) (SINGH et al., 2017).

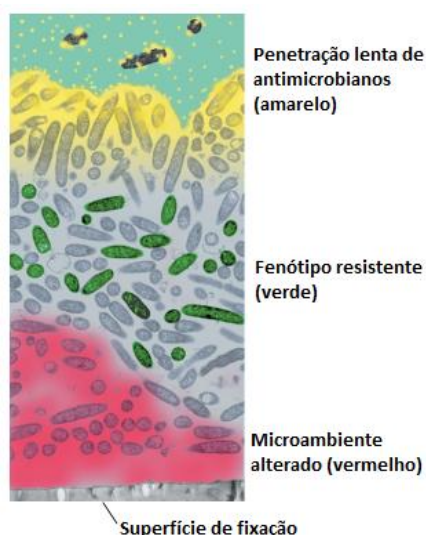
A organização dos biofilmes bacterianos permite que uma diversidade de microrganismos interaja, em estreita proximidade. Isso permite a troca de metabólitos, moléculas de sinalização, material genético e compostos defensivos. Além disso, a heterogeneidade, tal como na forma de células com diferentes capacidades metabólicas ou gradientes fisiológicos, oferece oportunidades de cooperação entre os microrganismos (FLEMMING et al., 2016).

Independentemente do biofilme ser formado por uma população única de bactérias ou ser polimicrobiano, os microrganismos ficam protegidos do ambiente externo. Dentro do biofilme as bactérias se comunicam através de caminhos de

transdução de sinal (por exemplo, *quorum sensing*), levando a mudanças globais na expressão de genes, aumentando a virulência e acelerando a aquisição de resistência a antimicrobianos (SCHROEDER et al., 2017).

As bactérias no biofilme são mais propensas a trocar genes horizontalmente devido à proximidade máxima entre elas. Esta transmissão de genes é uma das principais causas de sobrevivência de bactérias e pode representar uma alta frequência de mutações responsáveis pela resistência antimicrobiana. Essas mutações podem desencadear a produção enzimática, a modificação do objetivo antibiótico ou a formação de bombas de efluxo (SOUSA et al., 2015).

Figura 7 - Mecanismos de resistência a antimicrobianos em biofilmes



A superfície de ligação à superfície é mostrada na parte inferior e, no topo, a fase aquosa contendo o antimicrobiano. Em amarelo, é demonstrado que o antimicrobiano pode fracassar na penetração para além das camadas superficiais do biofilme. Em verde, a representação de que algumas bactérias podem diferenciar-se em um estado fenotípico protegido. Na zona vermelha, é mostrado um microambiente alterado, no qual pode ocorrer esgotamento de nutrientes ou acumulação de resíduos e, assim, a ação antimicrobiana poderá ser antagonizada (Adaptado de STEWART; COSTERTON, 2001).

Uma vez que um biofilme aderente à superfície tenha sido estabelecido, as terapias projetadas para matar bactérias planctônicas são ineficazes (SCHMIDT et al., 2015). Em um biofilme, as bactérias podem ser até mil vezes mais resistentes a um agente antimicrobiano quando comparadas às células planctônicas. Já se propôs que o mecanismo de resistência dos biofilmes aos antimicrobianos inclui a baixa

taxa de crescimento populacional, a produção de matriz polimérica - que pode formar uma barreira aos antimicrobianos - e os padrões únicos de expressão de genes (SCHINABECK; GHANNOUM, 2003).

As subpopulações de microrganismos que compõem os biofilmes podem variar em seu grau de suscetibilidade a antimicrobianos e pelo mecanismo pelo qual eles conseguem seus estados de resistência (KESTER; FORTUNE, 2013). Certas subpopulações de bactérias de biofilme podem produzir enzimas que degradam agentes antimicrobianos enquanto outras subpopulações podem possuir bombas de efluxo (SCHROEDER et al., 2017).

Além de ser capaz de adquirir rapidamente um fenótipo resistente a múltiplos fármacos, a combinação de mecanismos de resistência levou os pesquisadores a descrever os biofilmes como tendo resistência para uma vasta gama de classes de antimicrobianos (CAMPOCCIA et al., 2010). Subpopulações também podem ser metabolicamente distintas, fato que tem implicações críticas para o tratamento clínico (SCHROEDER et al., 2017).

As estruturas altamente hidratadas dos biofilmes contêm canais que permitem a difusão interna de nutrientes e oxigênio e também conferem proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e a entrada de antimicrobianos, dificultando a difusão do fármaco nos tecidos (DONLAN, 2002).

Existem evidências de que diferentes espécies possam se associar nos biofilmes e provocar uma maior resistência a antimicrobianos. Por exemplo, a associação de uma espécie capaz de degradar ou inativar um tipo de antimicrobiano que é eficiente contra outra espécie que compõe o biofilme. As populações sésseis se proliferam mais lentamente do que as formas planctônicas, prejudicando, portanto, sua resposta a muitos antimicrobianos que agem essencialmente quando as células se replicam. No biofilme, os microrganismos estão mais protegidos da ação dos antimicrobianos, que encontram dificuldades em transpor a barreira polimérica e ter acesso aos nichos onde as bactérias estão. Em relação à resposta do hospedeiro, as células de defesa como os neutrófilos têm maior dificuldade de entrar na matriz dos biofilmes para fagocitá-las (PASTERNAK, 2009).

As principais características de biofilmes *in vivo* são bactérias agregadas, que toleram a defesa do hospedeiro e concentrações elevadas de agentes antimicrobianos (BJARNSHOLT et al., 2013). Mesmo em indivíduos que possuem o sistema imune competente, infecções que apresentam biofilmes como a base são

raramente resolvidas apenas com intervenção medicamentosa. Os tecidos adjacentes ao biofilme podem sofrer danos colaterais por complexos imunes e pela atividade de neutrófilos. Testes de suscetibilidade em modelos de biofilme *in vitro* demonstraram a sobrevivência das bactérias de biofilmes após o tratamento com antimicrobianos em concentrações centenas ou mesmo milhares de vezes maiores que a CIM em populações planctônicas (STEWART; COSTERTON, 2001).

In vivo, os antimicrobianos podem suprimir sintomas de infecção por erradicar as bactérias de livre flutuação, que são liberadas pela população séssil, mas não conseguem erradicar as células bacterianas ainda incorporadas aos biofilmes. No momento em que se suspende a quimioterapia antimicrobiana, o biofilme pode agir como um nicho para a recorrência da infecção (STEWART; COSTERTON, 2001). Por esta razão, as infecções causadas por biofilmes tipicamente mostram sintomas recorrentes, após ciclos repetidos de tratamento com antimicrobianos, até que a população séssil seja removida cirurgicamente do corpo (GHOSH et al., 2017).

4.6.4 Biofilmes formados por micobactérias

As MNT organizadas em biofilmes são difíceis de erradicar com práticas comuns de descontaminação e são relativamente resistentes aos desinfetantes padrões como cloro, organomercúrios e glutaraldeídos alcalinos (SOUSA et al., 2015). A formação de biofilmes sobre superfícies sólidas, em tubulações de sistemas de distribuição de água, piscinas e esgotos favorece às MNT a persistirem no ambiente, apesar de seu crescimento lento. Além disso, em função da parede rica em ácidos micólicos e ácidos graxos, fica dificultada a penetração de desinfetantes na matriz extracelular (SENNA et al., 2008; PITOMBO et al., 2009).

As micobactérias estão presentes em fontes de águas naturais e artificiais, incluindo-se o encanamento de residências domésticas. A hidrofobicidade de MNT permite a aderência das células e posterior formação de biofilmes nas superfícies dos sistemas de distribuição de água (MULLIS; FALKINHAM, 2013). A presença de micobactérias ambientais em biofilmes pode causar impactos na saúde humana e podem ser responsáveis por infecções e surtos de doenças, devido a problemas de contaminação (SENNA et al., 2008). A liberação desses microrganismos dos

biofilmes pode servir como um mecanismo para a disseminação de novas infecções, representando um risco significativo para a saúde (MULLIS; FALKINHAM, 2013).

Infecções causadas por micobactérias são notoriamente problemáticas na implementação de um tratamento com antimicrobianos eficaz e o envolvimento do papel dos biofilmes na tolerância aos fármacos deve ser considerado (OJHA; HATFULL, 2007; TENG; DICK, 2003). Diferentes estudos *in vitro* comprovam a resistência de biofilmes formados por MCR contra desinfetantes e antimicrobianos, incluindo resistência à amicacina e à claritromicina (PÉREZ, 2011).

Falkinham (2007) demonstrou que células de *M. avium* cultivadas em superfícies de cateteres são significativamente mais resistentes aos antimicrobianos do que as células cultivadas em suspensão. Neste trabalho, o autor enfatizou que as concentrações de antimicrobianos, com base nos resultados da suscetibilidade de células cultivadas em suspensão, podem ser muito baixas para matar ou inibir o crescimento de micobactérias dispostas em biofilme. Como conclusão, ressaltou-se a necessidade de se desenvolver métodos para avaliar CIM de micobactérias que crescem em biofilmes.

Entre MCR, alguns estudos têm demonstrado a resistência a um largo espectro de antimicrobianos que são normalmente utilizados para o tratamento de infecções causadas por estes microrganismos (PÉREZ, 2011). O biofilme de *M. smegmatis* apresentou resistência à isoniazida e supõe-se que as características de permeabilidade e/ou outros mecanismos desconhecidos foram responsáveis por essa resistência (TENG; DICK, 2003). Biofilmes de *M. abscessus* foram também resistentes à cefoxitina, amicacina e claritromicina (GREENDYKE; BYRD, 2008).

Um grupo de infecções associadas à saúde com relevância crescente está relacionado com infecções associadas a dispositivos médicos. O exame microscópico de uma válvula aórtica protética retirada de um paciente permitiu a identificação de uma estrutura composta por MCR, uma fina camada de matriz de fibrina associada a macrófagos CD38 e um baixo número de plaquetas, consistentes em um biofilme. Neste caso, a endocardite da válvula protética teve como agente etiológico *M. fortuitum* (BOSIO et al., 2012).

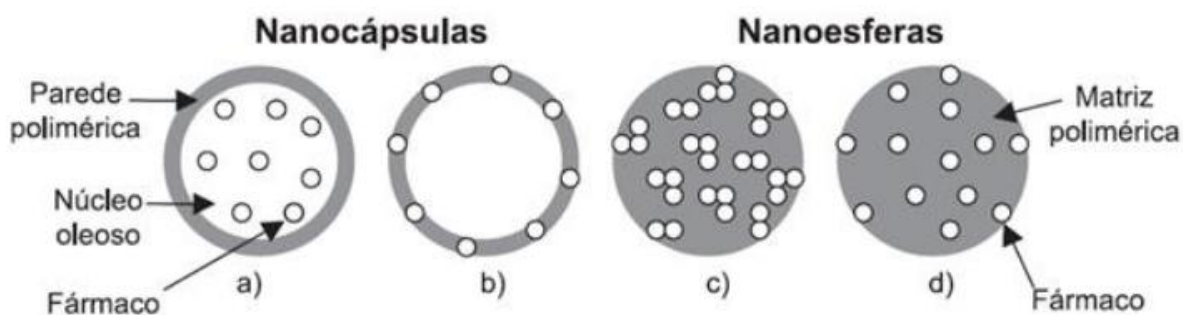
Em um caso de implante mamário estético, onde foi isolado *M. massiliense*, a paciente teve uma infecção simultânea da região glútea direita, sendo um exemplo de contaminação do local cirúrgico por MNT (RÜEGG et al., 2015). Além disso, a

capacidade das MNT de formar biofilmes também contribui para a patogênese das infecções sanguíneas relacionadas ao uso de cateter (EL HELOU et al., 2013).

4.7 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanopartículas são estruturas esféricas e sólidas em uma escala de tamanho de 10 a 1000 nm de diâmetro e referem-se a dois tipos de estruturas diferentes: nanoesferas e nanocápsulas. As duas estruturas possuem características as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (Figura 8) (SOPPIMATH et al., 2001; KUMARI et al., 2010).

Figura 8 - Representação esquemática das nanopartículas poliméricas



a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

As nanopartículas apresentam atividade diferenciada devido a sua escala reduzida. Elas têm sido estudadas para veiculação de vários agentes antimicrobianos e têm obtido bons resultados em aumentar a eficácia terapêutica no combate de várias doenças infecciosas (HUH; KWON, 2011).

Dentre as áreas mais promissoras para aplicações terapêuticas das nanopartículas, está a vetorização de fármacos anticancerígenos e antimicrobianos. Devido ao seu tamanho, as nanopartículas podem penetrar profundamente nos tecidos através de capilares finos, atravessando o revestimento epitelial e tomando de forma eficiente as células (PANYAM; LABHASETWAR, 2003; WU et al., 2014). Os fármacos antimicrobianos associados a nanopartículas poliméricas têm a capacidade de potencializar o efeito antimicrobiano, melhorando o seu índice terapêutico em relação a forma livre (PINTO-ALPHANDARY et al., 2000).

As aplicações da nanotecnologia na medicina resultaram em um novo campo chamado "nanomedicina", que já forneceu novos tratamentos contra uma ampla gama de doenças. As nanopartículas encapsuladas com antimicrobianos possuem efeitos antimicrobianos e causam danos mínimos ao hospedeiro. Além disso, as nanopartículas carregadas com fármacos podem ultrapassar as limitações dos tratamentos com antimicrobianos convencionais (RAMASAMY; LEE, 2016).

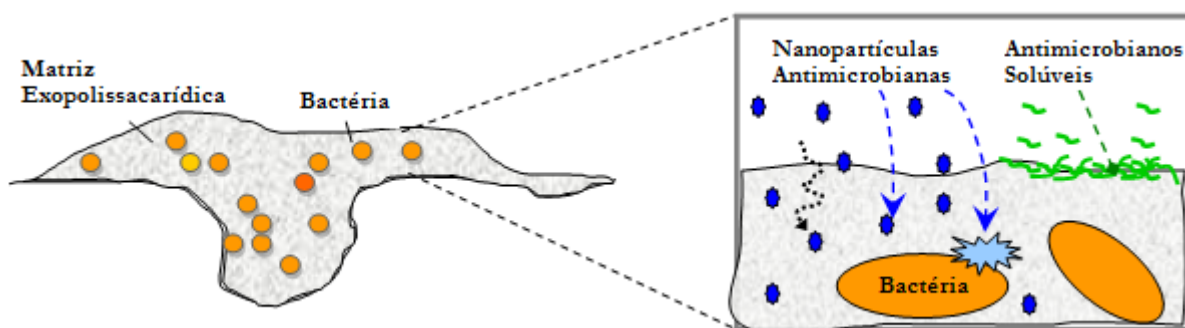
A principal razão pela qual as nanopartículas estão sendo consideradas como uma alternativa aos antimicrobianos está no fato de que elas podem efetivamente prevenir a resistência a medicamentos microbianos em certos casos. O uso desenfreado de antimicrobianos tem levado ao surgimento de inúmeros perigos para a saúde pública, como as superbactérias, que apresentam resistência a múltiplos antimicrobianos. A busca por novos materiais bactericidas eficazes é significativa para combater a resistência aos fármacos. Nesse contexto, as nanopartículas foram estabelecidas como uma abordagem promissora para resolver esse problema (WANG et al., 2017).

Os nanoantibióticos são nanopartículas que demonstram atividade antimicrobiana por si só ou que elevam a eficácia e segurança da administração dos antimicrobianos (LI et al., 2008; RAI et al., 2009). Com o fracasso das estratégias terapêuticas já existentes para obtenção de níveis adequados de antimicrobianos dentro do biofilme, aumentou-se a atenção para o uso de nanopartículas nos sistemas de liberação dos antimicrobianos (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013).

Diversas classes de antimicrobianos em sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos têm provado sua eficácia para o tratamento de doenças infecciosas, incluindo aquelas resistentes *in vitro* aos antimicrobianos convencionais. As nanopartículas apresentam tamanho ultrapequeno controlável, grande superfície em relação à massa, elevadas interações com microrganismos e células

hospedeiras, além de versatilidade estrutural. Além disso, as vantagens de um sistema carreador de antimicrobianos baseado em nanocápsulas incluem a melhoria da solubilidade dos fármacos pouco solúveis em água (Figura 9), o prolongamento da meia-vida do fármaco e do seu tempo na circulação sistêmica e sua liberação sustentada, o que colabora para reduzir a frequência de administração de doses (ZHANG et al., 2010).

Figura 9 - Interações do biofilme com antimicrobianos solúveis e antimicrobianos incorporados em nanopartículas



A matriz de polissacarídeos que envolve o biofilme impede que os antimicrobianos solúveis cheguem às células bacterianas. No entanto, os antimicrobianos incorporados a nanopartículas penetram mais eficientemente na matriz, atingindo as células e, potencialmente, destruindo-as (Adaptado de DECHO; BENECEWICZ, 2017).

Os métodos de preparação das nanocápsulas são classificados, de maneira geral, em métodos baseados na polimerização de monômeros dispersos *in situ* e em polímeros pré-formados (SCHAFFAZICK et al., 2003). A nanoprecipitação tem demonstrado maior interesse dos estudiosos por apresentar vantagens frente à outra técnica, como simplicidade, eficiência, reprodutibilidade em relação ao tamanho manométrico das partículas e alta taxa de encapsulação dos fármacos (JIMÉNEZ et al., 2004).

As nanopartículas como carreadoras de fármaco proporcionam um modo diferente de carrear e distribuir as substâncias ativas, oferecendo vantagens: 1) elevada área superficial, que proporciona uma liberação homogênea e, na maioria das vezes, controlada do fármaco; 2) melhor distribuição das substâncias ativas no alvo da ação e o direcionamento desta ao seu sítio, reduzindo a sua toxicidade,

superando a resistência oferecida pelas barreiras fisiológicas do organismo; 3) aumento da estabilidade dos agentes terapêuticos, aumentando sua estabilidade no meio, protegendo-o da luz, oxidação e hidrólise (PANYAM; LABHASETWAR, 2003; RAWAT et al., 2006; KARAVELIDIS et al., 2010).

5 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis

Vanessa da Costa Flores^a, Fallon dos Santos Siqueira^a, Caren Rigon Mizdal^a, Pauline Cordenonsi Bonez^a, Vanessa Albertina Agertt^a, Sílvio Terra Stefanello^a, Grazielle Guidolin Rossi^a, Marli Matiko Anraku de Campos^a

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

Publicado em 20 de agosto de 2016 no periódico:

Microbial Pathogenesis 99 (2016) 229-235
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.017>



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mjcpath

Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis



Vanessa da Costa Flores^a, Fallon dos Santos Siqueira^a, Caren Rigon Mizdal^a,
Pauline Cordenonsi Bonez^a, Vanessa Albertina Agertt^a, Sílvia Terra Stefanello^b,
Grazielle Guidolin Rossi^a, Marli Matiko Anraku de Campos^{a,*}

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2016
Received in revised form
3 August 2016
Accepted 18 August 2016
Available online 20 August 2016

Keywords:

Rapidly growing mycobacteria
Mycobacteriosis
Susceptibility
Biofilm

ABSTRACT

Rapidly growing mycobacteria (RGM) are opportunistic pathogens found in the environment. When in biofilms, mycobacteria is highly resistant to antibacterial treatments. The purpose of this study is to evaluate the antibiofilm activity of antimicrobials commonly used in therapy against mycobacteria. The antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium massiliense* was determined in planktonic and sessile populations. The antimicrobials amikacin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, imipenem and sulfamethoxazole were tested. For each drug, it was evaluated the susceptibility of the pathogen, the ability to inhibit biofilm formation and the resistance of biofilms to antimicrobial activity. Results showed although, the antimicrobials tested are used as an alternative therapy for RGM, *M. abscessus* proved to be resistant to clarithromycin, beside that, *M. massiliense* showed a resistant profile to clarithromycin and sulfamethoxazole. Moreover, the inhibition of biofilm formation and its destruction have not been fully met. Considering that the biofilms are a known form of bacterial resistance, the failure of alternatives to inhibit or destroy biofilms can trigger the recurrence of infections. In RGM, besides causing treatment failures, biofilms are a factor of pathogenic risk, since these microorganisms are found in environmental sources and can cause infections easily.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Rapidly growing mycobacteria (RGM) is a group of opportunistic bacteria that are found naturally in the environment. Infections caused by these organisms are acquired from environmental resources such as water and soil [1,2]. Among the RGM, there are species *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium massiliense* that cause a wide spectrum of diseases, such as lung disease, lymphadenopathy and soft tissue infections [3].

Mycobacteriosis are diseases caused by nontuberculous mycobacteria, notoriously problematic in choosing an effective antimicrobial treatment due to antimicrobial resistance [5–7]. The RGM

require individualized treatment that must be selected based on the results obtained from *in vitro* susceptibility tests for amikacin, ceftazidime, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, imipenem and sulfamethoxazole [8,9].

The capacity for biofilm development is related to virulence, pathogenicity in humans, resistance to antimicrobial agents and environmental survival [10,11]. Biofilms are biological communities with a high degree of organization, where bacteria and other microorganisms and functional community, coordinated and structured [12,13]. Biofilms can be formed in several different surfaces which include: living tissue, hospital equipment, drinking or industrial water systems, natural aquatic systems [14] and, in the case of mycobacteria, they can be formed at air-liquid surfaces [8].

The hydrophobicity of mycobacteria allows adhesion of cells and subsequent formation of biofilms on surfaces of water distribution systems. The release of these microorganisms from existing biofilms can serve as a mechanism to spread new infections, representing a significant health risk [15]. The common presence of RGM

* Corresponding author. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), nº 1000, Roraima Avenue, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.
E-mail address: marlimatiko@yahoo.com (M.M.A. Campos).

in hospital tap water, the resistance to agents such as glutaraldehyde and chlorine, the capacity to survive and grow in distilled water and ability to form biofilms of these microorganisms are facts that allow this group of mycobacteria to remain a threat in hospital settings [16].

Thus, is important to investigate the effectiveness of antimicrobials commonly used for RGM against biofilms formed by these microorganisms. The understanding of physiological factors that cause the failure in the treatment of mycobacteriosis, such as biofilm formation, contributes to the elucidation of the pathogenic potential and drug resistance presented by these microorganisms.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms and antimicrobial agents

The strains used in this study were *M. abscessus* (ATCC 19977), *M. fortuitum* (ATCC 6841) and *M. massiliense* (ATCC 48898). Colonies were isolated on Löwesten-Jensen solid medium (HiMedia Laboratories) and then cultured in Middlebrook 7H9 broth medium (Difco Laboratories) containing 0.2% (vol/vol) glycerol and 10% (vol/vol) OADC (oleic acid-albumin-dextrose-catalase) [17]. The antibiotics tested include amikacin (Fluka), ciprofloxacin (Fluka), Clarithromycin (Sigma), doxycycline (Sigma), imipenem (Fluka) and sulfamethoxazole (Fluka).

2.2. Susceptibility tests

The susceptibility tests were evaluated by broth microdilution method according to the standard protocol CLSI M24-A2. The antimicrobial agents were evaluated at the following concentrations: amikacin (1–128 µg/mL), ciprofloxacin (0.125–16 µg/mL), clarithromycin (0.06–64 µg/mL), doxycycline (0.25–32 µg/mL), imipenem (1–64 µg/mL) and sulfamethoxazole (1–128 µg/mL). The inoculum was standardized according to the McFarland 0.5 scale. For the preparation of the final inoculum (5×10^5 CFU/mL) it was transferred the amount of 50 µL from the bacterial suspension to a tube containing 10 mL of Mueller-Hinton broth (Merck). On sterile titration microplates it was added 100 µL from the antimicrobial dilution and the inoculum in equal volume. After incubation for 72 h at 30 °C, it was done the readings of the plates and it was determined the minimum inhibitory concentrations (MIC). The breakpoints for the interpretation of susceptibility of microorganisms to antimicrobial agents can be seen in Table 1 [9].

2.3. Biofilm formation inhibition test

The antimicrobial agents were tested individually by their ability to inhibit biofilm formation of a mycobacterial species. The concentrations of the antibiotics used were equal and lower than the MICs. The biofilm formation was adapted to macro-technique from the work described by Carter et al. (2003), maintaining the

proportions of medium, antibacterial and inoculum. In polystyrene test tubes with a 5 mL capacity were added 1 mL of Middlebrook 7H9 medium containing 1×10^7 CFU/mL of each bacterial species to be tested and 1 mL of the dilution of the antimicrobial to be evaluated. The tubes were covered with parafilm® and incubated at 30 °C for 7 days [18].

2.4. Biofilm destruction test

Using the adapted technique of Carter et al. (2003), in polystyrene test tubes were added 1 mL of Middlebrook 7H9 medium containing 1×10^7 CFU/ml of the bacterial species, which were covered with parafilm® and incubated at 30 °C for 7 days [18]. After biofilm formation, 1 mL of antimicrobial, in the MICs' concentration and higher than MIC, was added to each tube. The tubes were covered with parafilm® and they were incubated at 30 °C for 24 more hours.

2.5. Quantification of biofilms

The biofilm was quantified as described by Bonez et al. (2013), adapted to macro-technique. The cells that were weakly adhered to the biofilm were removed by the rinsing with saline and the remainder was dried at room temperature for a few minutes. After, it was added 2 mL of a suspension of 0.1% crystal violet, and the tubes were kept at least for 10 min. A rinsing with saline was done to remove remaining planktonic cells and the excess dye. 2 mL of 95% ethanol were added to each test tube, kept for 15 min, and transferred to disposable cuvettes for a later reading in optical density (OD) of 570 nm [12]. The biofilm formation was determined by the significant difference between the averages of absorbance obtained in the positive control (culture medium and bacteria) and the average obtained by the negative control (culture medium only). The experiment was performed in three independent test times.

2.6. Statistical analysis

The optical density readings obtained in the tests of biofilm formation were expressed as mean \pm standard deviation. We used one-way ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test, considering statistical difference at $p < 0.05$. For the realization of graphs, the GraphPad Prism version 5.01 software was used.

3. Results

3.1. Susceptibility tests

The susceptibility profile of strains are shown in Table 2. According to the breakpoints displayed in Table 1, *M. massiliense* was classified as resistant to clarithromycin and sulfamethoxazole and *M. abscessus* as resistant to clarithromycin.

3.2. Biofilm formation inhibition test and biofilm destruction test

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

Amikacin, in concentrations lower than its respective MIC, was capable of reducing biofilm production of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense*. In the test of biofilm destruction the effectiveness was not satisfactory and the antimicrobial agent was able to present a small anti-biofilm effect only for *M. massiliense* biofilm at the concentration of 64 µg/mL. These results are represented graphically in Fig. 1.

Table 1
Breakpoints for the rapidly growing mycobacteria.

Antimicrobial agent	Minimal inhibitory concentrations (µg/mL), by category		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Amikacin	≤16	32	≥64
Ciprofloxacin	≤1	2	≥4
Clarithromycin	≤2	4	≥8
Doxycycline	≤1	2–4	≥8
Imipenem	≤4	8–16	≥32
Sulfamethoxazole	≤38	–	≥76

Table 2
Susceptibility profile in vitro of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense*.

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

^a Resistance index.

Subinhibitory concentrations of ciprofloxacin resulted in decreased production of the biofilms of *M. abscessus* and *M. massiliense* at different tested concentrations. In addition, ciprofloxacin showed little destructive action on biofilms formed by *M. massiliense* at concentrations of 2, 4 and 8 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 2).

Clarithromycin caused reduction in production and slight destruction of biofilms of *M. abscessus* and *M. massiliense* at different concentrations, ranging from 2 to 16 $\mu\text{g/ml}$ in the inhibition test and from 16 to 1024 $\mu\text{g/ml}$ in the biofilm destruction test. In action against *M. fortuitum* biofilms, clarithromycin showed no difference between microbial growth in the positive control and the growth obtained at the tested concentrations (Fig. 3).

As showing in Fig. 4, doxycycline attenuated biofilm production of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense*. When applied on formed biofilms of the same microorganisms, doxycycline at concentrations of 2 and 4 $\mu\text{g/ml}$ was able to discreetly destroy the films formed by *M. abscessus* and, at the concentration of 32 $\mu\text{g/ml}$, the biofilm from *M. massiliense*.

In concentrations lower than the MIC, imipenem showed a slight ability to decrease the production of biofilms of *M. fortuitum* and *M. massiliense*. On the antibiofilm assay, imipenem only showed significant difference compared to the positive control for the biofilm of *M. massiliense* when used at the concentration of 64 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 5).

The sulfamethoxazole showed an attenuation effect in the production of biofilms by *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense* in various subinhibitory concentrations tested. On the biofilm destruction assay, the antibiotic, in concentrations ranging from 32 to 1024 $\mu\text{g/ml}$, showed antibiofilm activity for *M. fortuitum* (Fig. 6).

4. Discussion

The advantages attributed to the lifestyle of microorganisms in biofilms are numerous, especially in relation to the protection against aggressive agents [11]. When in biofilms, bacteria can be up to a thousand times more resistant to an antimicrobial agent if compared to their planktonic cells [19] and their formation is usually associated with persistent infections [20]. Infections caused by microorganisms in a biofilm can mean serious therapeutic challenges in certain clinical situations [21].

In our study, in the susceptibility test, *M. abscessus* and *M. massiliense* showed to be resistant to clarithromycin, similar profiles to those reported by Kim et al. (2010) that can be assigned to the presence of inducible RNA methylases and the mechanism of induced resistance to macrolides encoded by the *erm* gene [4] in *M. abscessus* species [9,22,23]. *M. massiliense* also showed a resistance profile to sulfamethoxazole, a result also reported by Cardoso et al. (2011) [24]. The different susceptibility profiles found in our study reinforce the need for determining the drug sensitivity profiles in order to provide adequate treatment for mycobacteriosis.

The formation of biofilms is the result of several processes of physical and biological nature. These processes involve the transportation of free cells from the liquid medium to a solid surface, production of extracellular polymeric substances and the consequent adherence [14,25]. The microorganism capable of producing extracellular polymers, as well as the hydrophobicity of the surface of microorganisms, contribute to adhesion and colonization of surfaces, whether inert or alive.

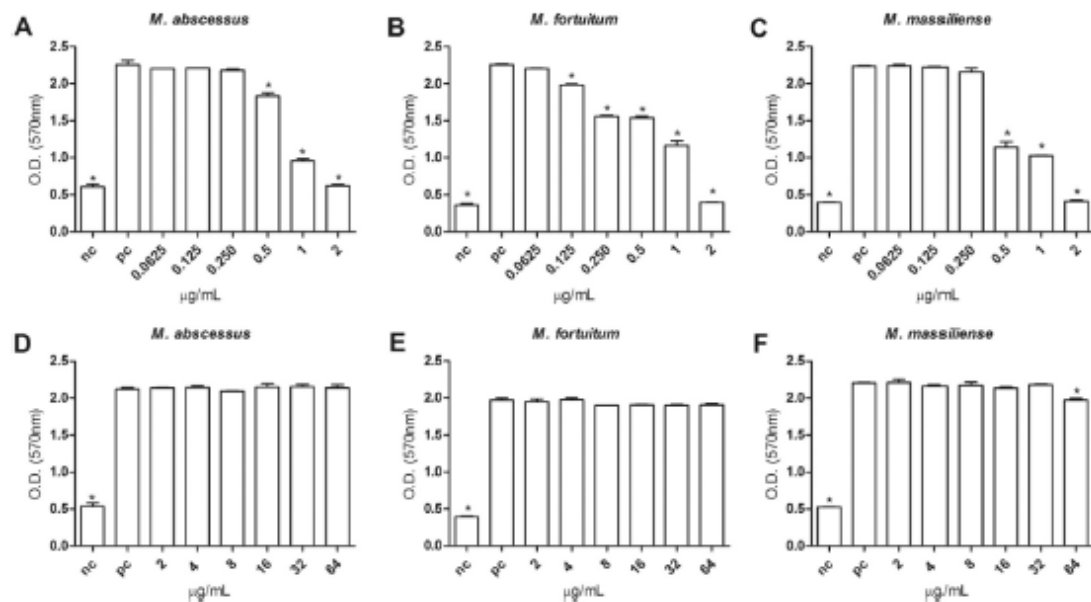


Fig. 1. Effect of different concentrations of amikacin on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium massiliense*. * Represents significant difference between the concentration tested and the positive control (PC). The tests were subjected to analysis of variance (one way ANOVA) followed by multiple comparison test Bonferroni test ($n = 3$), considering significant difference when $p < 0.05$.

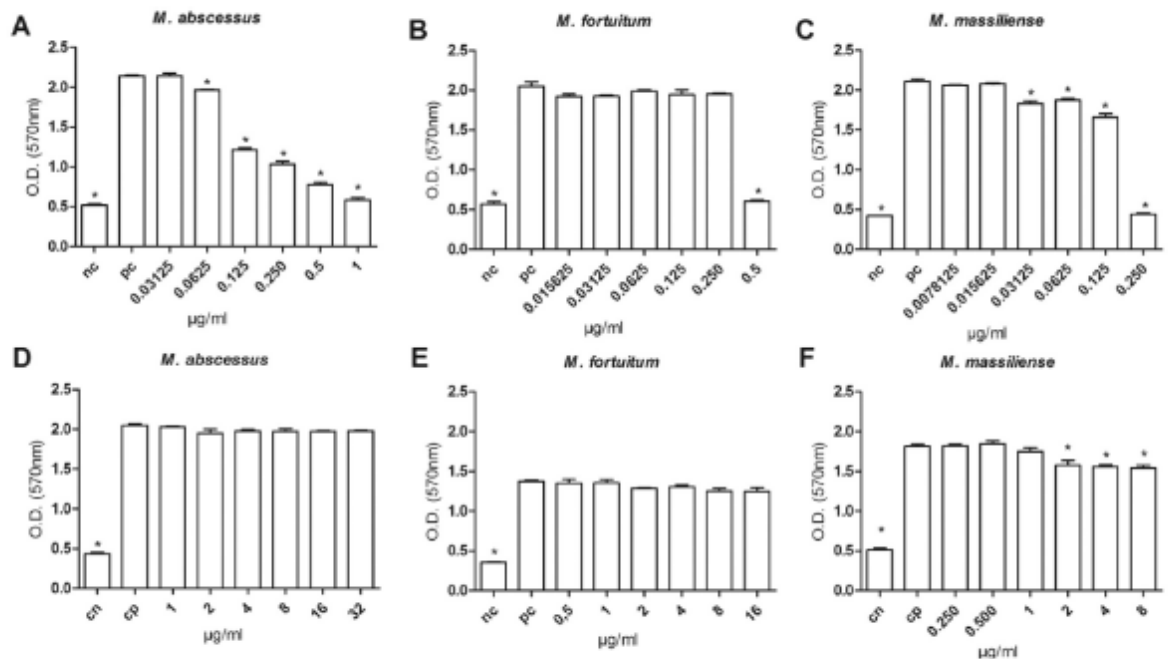


Fig. 2. Effect of different concentrations of ciprofloxacin on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium massiliense*. * Represents significant difference between the concentration tested and the positive control (PC). The tests were subjected to analysis of variance (one way ANOVA) followed by multiple comparison test Bonferroni test ($n = 3$), considering significant difference when $p < 0.05$.

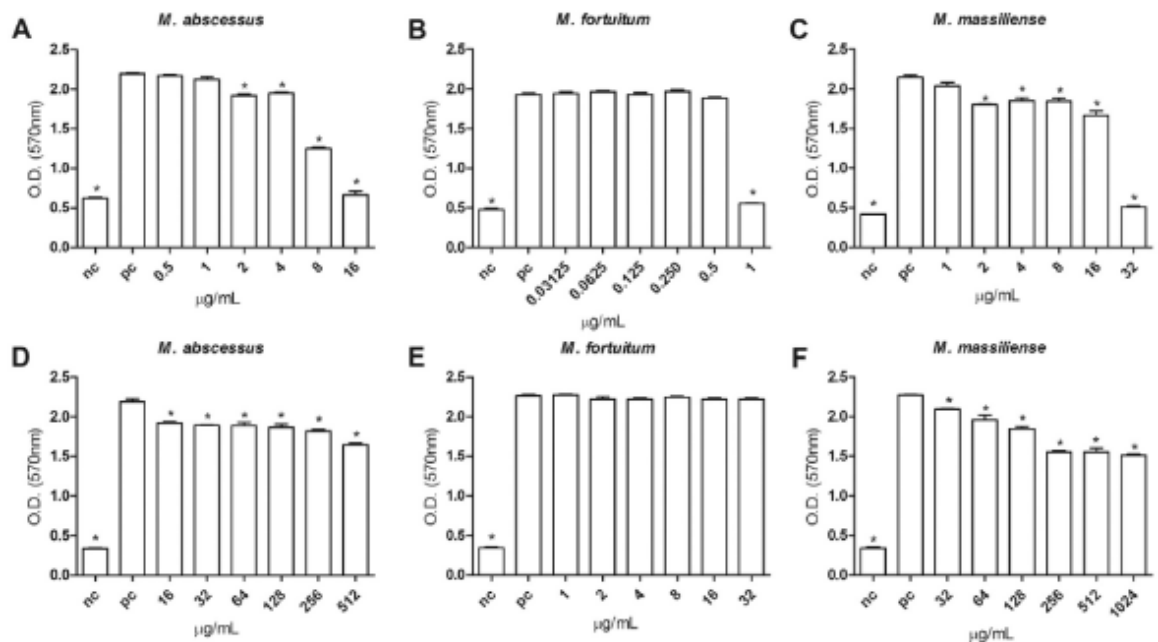


Fig. 3. Effect of different concentrations of clarithromycin on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium massiliense*. * Represents significant difference between the concentration tested and the positive control (PC). The tests were subjected to analysis of variance (one way ANOVA) followed by multiple comparison test Bonferroni test ($n = 3$), considering significant difference when $p < 0.05$.

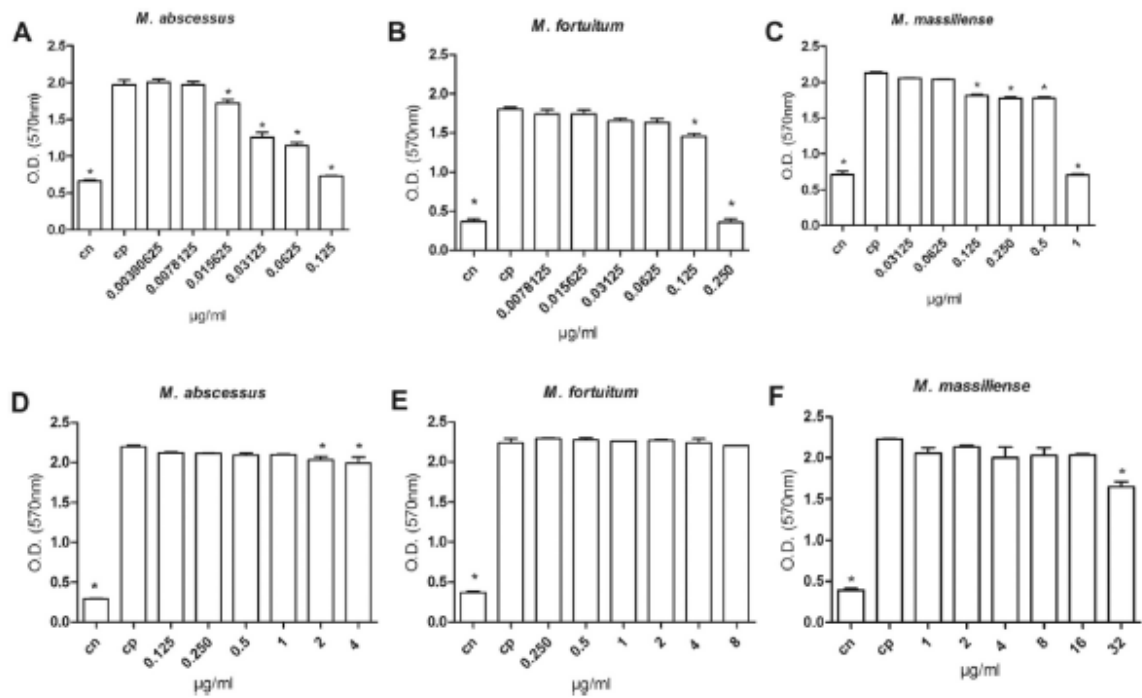


Fig. 4. Effect of different concentrations of doxycycline on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium massiliense*. * Represents significant difference between the concentration tested and the positive control (PC). The tests were subjected to analysis of variance (one way ANOVA) followed by multiple comparison test Bonferroni test ($n = 3$), considering significant difference when $p < 0.05$.

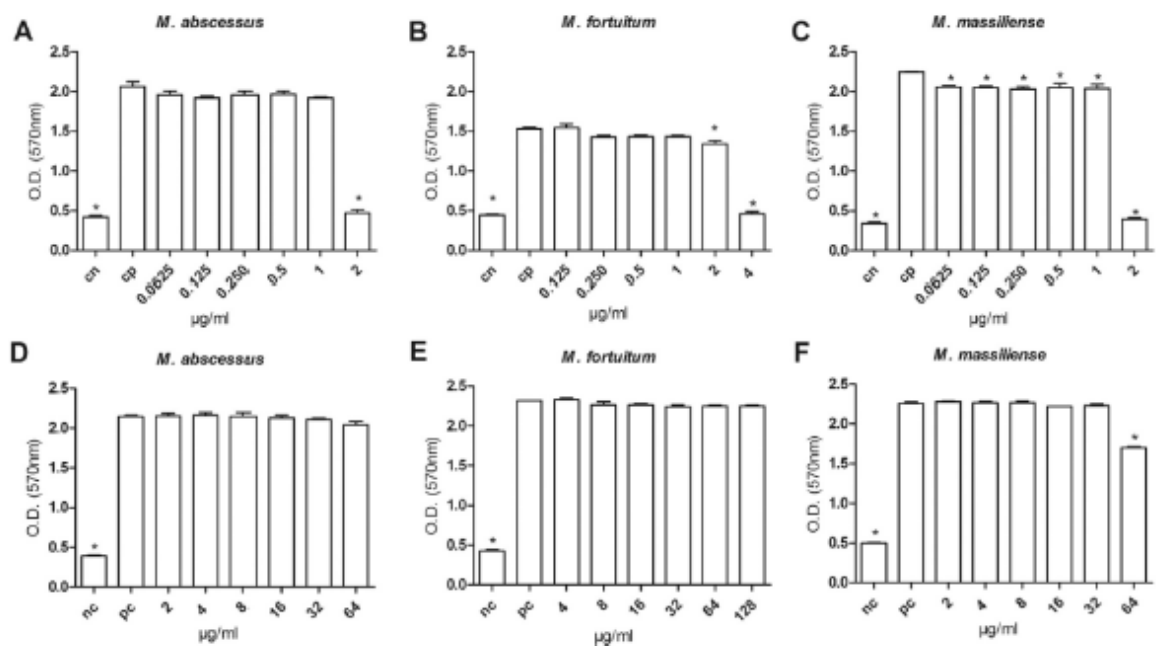


Fig. 5. Effect of different concentrations of imipenem on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium massiliense*. * Represents significant difference between the concentration tested and the positive control (PC). The tests were subjected to analysis of variance (one way ANOVA) followed by multiple comparison test Bonferroni test ($n = 3$), considering significant difference when $p < 0.05$.

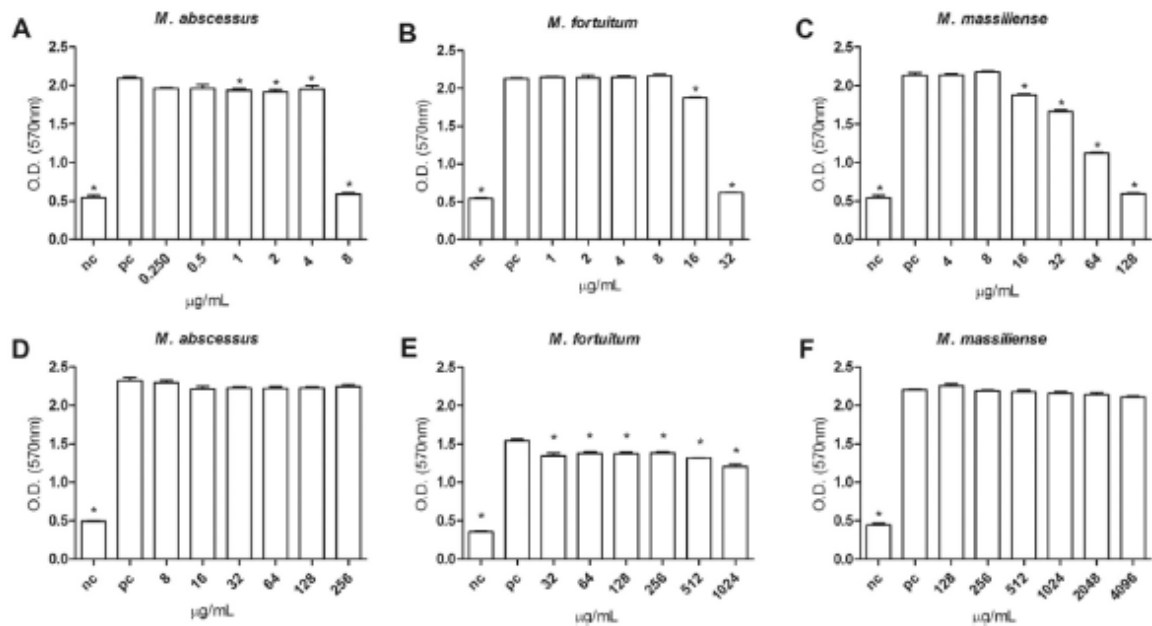


Fig. 6. Effect of different concentrations of sulfamethoxazole on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium massiliense*. * Represents significant difference between the concentration tested and the positive control (PC). The tests were subjected to analysis of variance (one way ANOVA) followed by multiple comparison test Bonferroni test ($n = 3$), considering significant difference when $p < 0.05$.

In the biofilm inhibition test, all antimicrobials tested against *M. massiliense* showed inhibitory results in some concentrations. The biofilm formation of *M. abscessus* was reduced when exposed to amikacin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline and sulfamethoxazole. *M. fortuitum*, in general, was the microorganism that showed greater resistance to inhibitory action of the applied antimicrobial agents. Among the agents tested, amikacin has shown greater efficacy in the inhibition of the films formation with sub-inhibitory concentration of 1 µg/mL. None of the antimicrobial agents can, in concentrations lower than the MIC, completely prevent biofilm formation by these microorganisms. This happens because the agents tested did not interfere effectively in essential processes for the formation of bacterial biofilms.

The microorganisms associated in biofilms exhibit a different behavior from microorganisms in planktonic form [20]. The mechanism of resistance of biofilms to antibiotics includes the low growth rate of sessile populations and the production of polymer matrix. The extracellular polymeric substances protects microorganisms against the action of antibiotics that have difficulty in transposing the polymer barrier and have access to the bacterial cells [19,27].

The biofilm destruction test revealed that antimicrobials used empirically in micobacteriores therapy are a dubious strategy to eradicate RGM biofilms. Among the microorganisms tested, biofilms of *M. fortuitum* showed low susceptibility in the polymer matrix after exposed to antibiotics. For these species, the partial reduction of biofilm was achieved only after addition of sulfamethoxazole on the biofilm. Biofilms of *M. abscessus* also showed resistance when exposed to antimicrobial agents and a small decrease in bacterial biofilm was achieved only by clarithromycin and doxycycline. Thus, as in the inhibition test of biofilm formation, *M. massiliense* biofilms showed to be more sensitive to the action of the drugs tested, and only the use of sulfamethoxazole was not effective. Although the biofilm decreased in some situations, none of the antimicrobials

could completely eradicate the bacterial films. This is because biofilm matrix prevents physical access of antimicrobial agents, restricting its diffusion into the biofilm. Furthermore, mycobacterial biofilms contain the extracellular matrix rich in free mycolic acids which provide a greater biofilm resistance to harmful drugs, despite the exposure to high levels of antibiotics [28].

In vivo, antibiotics may suppress symptoms of infection, eradicating the free bacteria that are released by the sessile population, but can not eradicate the bacterial cells still embedded in biofilms [29]. Biofilms are, thus, a known form of bacterial resistance and the failure in trying to inhibit or destroy the already formed biofilms can cause recurrent infections.

5. Conclusion

In summary, the results showed the development of biofilms is an important pathogenic risk factor once that cause failures in drug treatments. Besides, these microorganisms are abundantly found in environmental sources and can easily cause infection due to contamination problems. Considering that antibiotics did not present a good antibiofilm activity, these results have impactful, once warning to the clinical and scientific community. So, it is promising to invest in testing to elucidate the mechanisms involved in biofilm formation to find new targets for action and combat infection caused by RGM biofilms.

References

- [1] C.R. Esther Jr., S. Hoberman, J. Fine, S. Allen, K. Culbreath, K. Rodino, Detection of rapidly growing mycobacteria in routine cultures of samples from patients with cystic fibrosis, *J. Clin. Microbiol.* 49 (2011) 1421–1425, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02379-10>.
- [2] J.L. Cook, Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts, *Br. Med. Bull.* 96 (2010) 45–59, <http://dx.doi.org/10.1093/bmb/ldq035>.

- [3] C.W. Huang, J.H. Chen, S.T. Hu, W.C. Huang, Y.C. Lee, C.C. Huang, G.H. Shen, Synergistic activities of tigecycline with clarithromycin or amikacin against rapidly growing mycobacteria in Taiwan, *Int. J. Antimicrob. Agents* 41 (2013) 218–223, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.10.021>.
- [4] R. Nessar, E. Cambau, J.M. Reynat, A. Murray, B. Gicquel, *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare, *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (2012) 810–818, <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks578>.
- [5] G. Redelman-Sidi, K.A. Sepkowitz, Rapidly growing mycobacteria infection in patients with cancer, *Clin. Infect. Dis.* 51 (2010) 422–434, <http://dx.doi.org/10.1086/655140>.
- [6] R. Teng, T. Dick, Isoniazid resistance of exponentially growing *Mycobacterium smegmatis* biofilm culture, *FEMS Microbiol. Lett.* 227 (2003) 171–174, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00584-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00584-6).
- [7] A. Ojha, G.F. Hatfull, The role of iron in *Mycobacterium smegmatis* biofilm formation: the exochelinsiderophore is essential in limiting iron conditions for biofilm formation but not for planktonic growth, *Mol. Microbiol.* 66 (2007) 468–483, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05935.x>.
- [8] R. Fernández-Roblas, N.Z. Martín-de-Hijas, A.I. Fernández-Martínez, D. García-Almeida, I. Gadea, J. Esteban, *Vitro* activities of tigecycline and 10 other antimicrobials against nonpigmented rapidly growing mycobacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) 4184–4186, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00695-08>.
- [9] CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 22th informational supplement, M24 – A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2011.
- [10] M.C. Muñoz-Egea, M. García-Pedraza, I. Mahillo, M.J. García, J. Esteban, Autofluorescence as a tool for structural analysis of biofilms formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (2013) 1065–1067, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03149-12>.
- [11] M. Arai, H. Niihara, M. Kobayashi, Marine-derived fungal sesquiterpenes, ophiobolins, inhibit biofilm formation of *Mycobacterium* species, *J. Nat. Med.* 67 (2013) 271–275, <http://dx.doi.org/10.1007/s11418-012-0676-5>.
- [12] P.C. Bonez, C.F.S. Alves, T.V. Dalmolin, V.A. Agertt, C.R. Mizdal, V.C. Flores, J.B. Marques, R.C. Santos, M.M.A. Campos, Chlorhexidine activity against bacterial biofilms, *Am. J. Infect. Control* 41 (2013) 119–122, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2013.05.002>.
- [13] R.M. Donlan, Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process, *Healthc. Epidemiol.* 33 (2001) 1387–1392, <http://dx.doi.org/10.1086/322972>.
- [14] R.M. Donlan, Biofilms: microbial life on surfaces, *Emerg. Infect. Dis.* 8 (2002) 881–890.
- [15] S.N. Mullis, J.O. Falkinham, Adherence and biofilm formation of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium abscessus* to household plumbing materials, *Journal of Applied Microbiology* 115 (2013) 908–914, <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12272>.
- [16] S.C. Leão, C. Viana-Niero, C.K. Matsumoto, K.V. Lima, M.L. Lopes, M. Palaci, D.J. Hadad, S. Vinhas, R.S. Duarte, M.C. Lourenço, A. Kipnis, Z.C. das Neves, B.M. Gahardo, M.O. Ribeiro, L. Baethgen, D.B. de Assis, G. Madalosso, E. Chimara, M.P. Dalcolmo, Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in Brazil, *Future Microbiol.* 5 (2010) 971–980, <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.10.49>.
- [17] J.O. Falkinham III, Factors influencing the chlorine Susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 5685–5689, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.9.5685-5689.2003>.
- [18] G. Carter, M. Wu, D.C. Drummond, L.E. Bermudez, Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*, *J. Med. Microbiol.* 52 (2003) 747–752, <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.05224-0>.
- [19] M.K. Schinabeck, M.A. Ghannoum, Catheter-related infections - diagnosis, treatment and prevention, *Clin. Microbiol. NewsL* 25 (2003) 113–118, [http://dx.doi.org/10.1016/S0196-4399\(03\)80036-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0196-4399(03)80036-3).
- [20] R.M. Donlan, J.W. Costerton, Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (2002) 167–193, <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>.
- [21] M.S. Islam, J.P. Richards, A.K. Ojha, Targeting drug tolerance in mycobacteria: a perspective from mycobacterial biofilms, *Expert Rev. Anti-Infective Ther.* 10 (2012) 1055–1106, <http://dx.doi.org/10.1586/eri.12.88>.
- [22] H.Y. Kim, B.J. Kim, Y. Kook, Y.J. Yun, J.H. Shin, B.J. Kim, Y.H. Kook, *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium boletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns, *Microbiol. Immunol.* 54 (2010) 347–353, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00221.x>.
- [23] G.E. Choi, S.J. Shin, C.J. Won, K.N. Min, T. Oh, M.Y. Hahn, K. Lee, S.H. Lee, C.L. Daley, S. Kim, B.H. Jeong, K. Jeon, W.J. Koh, Macrolide treatment for *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* infection and inducible resistance, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186 (2012) 917–925, <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201111-2005OC>.
- [24] A.M. Cardoso, A.P. Junqueira-Kipnis, A. Kipnis, *Vitro* antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium massiliense* Recovered from wound samples of patients submitted to arthroscopic and laparoscopic surgeries, *Minim. Invasive Surg.* 2011 (2011) 1–4, <http://dx.doi.org/10.1155/2011/724635>.
- [25] H.C. Flemming, J. Wingender, The biofilm matrix, *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 623–633, <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
- [26] J. Pasternak, Biofilmes: um inimigo (in) visível, *Soc. Bras. de Controle de Contam.* 39 (2009) 36–39.
- [27] A.K. Ojha, A.D. Baughn, D. Sambandan, T. Hsu, X. Trivelli, Y. Guerardel, A. Alahari, L. Kremer, W.R.J. Jacobs, G.R. Hatfull, Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria, *Mol. Microbiol.* 69 (2008) 164–174, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06274.x>.
- [28] P.S. Stewart, J.W. Costerton, Antibiotic Resist. Bact. biofilms, *The Lancet* 358 (2001) 135–138, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1).

5.2 MANUSCRITO

Use of clarithromycin nanocapsules as a strategy to combat and eradicate rapidly growing mycobacteria biofilms

Vanessa da Costa Flores^a, Fallon dos Santos Siqueira^a, Pauline Cordenonsi Bonez^a, Grazielle Guidolin Rossi^a, Caren Rigon Mizdal^a, Vanessa Albertina Agertt^a, Mariana Motta^a, Aline Coling Schneider^a, Cristiane de Bona da Silva^a, Marli Matiko Anraku de Campos^a

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

Enviado para publicação no periódico: Biofouling

Use of clarithromycin nanocapsules as a strategy to fight and eradicate rapidly growing mycobacteria biofilms

ABSTRACT

The environmental nature of Rapidly growing mycobacteria (RGM) and their ability to assemble biofilms on different surfaces play a key role in their pathogenesis. Nanoparticle-based therapies are viable approaches when it comes to treating biofilm-associated infections due to chemical and physical properties of such nanostructured systems, granted by a high superficial area to volume ratio. The main objective of this study is to prepare nanoparticles loaded with clarithromycin (NC-CLA) and investigate their antibacterial properties regarding the formation and destruction of biofilms of rapidly growing mycobacteria. The ability of NC-CLA to reduce the formation of RGM biofilm in the minimal inhibitory concentration and all sub-inhibitory concentrations tested was proportional to the dose, except for *M. massiliense*. Also, NC-CLA were capable to destroy, to some extent, the mycobacterial biofilm which was already formed. Thus, NC-CLA have shown a great antibiofilm potential, configuring an important strategy to fight these structures.

Key-words: Rapidly growing mycobacteria; biofilm; clarithromycin; resistance; resistance.

Introduction

Rapidly growing mycobacteria (RGM) are important pathogens that can cause a wide spectrum of infections in humans (Kannaiyan et al. 2015; Groote and Huitt 2006), including lung, skin and soft tissue, bone, as well as disseminated infections. Difficult-to-treat infections caused by RGM are increasingly observed in clinical environments (Hatakeyama et al. 2017).

Clarithromycin is the key drug to treat infections caused by RGM and is one of the drugs recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for antimicrobial susceptibility tests in RGM (CLSI 2011; Nie et al. 2015). However, the antimicrobial treatment for mycobacteriosis caused by RGM is still problematic. The role of cell wall, the biotransformation of drugs in the intracellular environment, acquired genetic mutations, efflux pumps, and biofilm formation (Van Ingen et al. 2012) are among the mechanisms of resistance to drugs in mycobacteria.

Several studies have shown that RGM have the ability to assemble biofilms on different surfaces of medical implants and surgical instruments, as well as living tissues such as lungs, wounds and bones (Sousa et al. 2015; Esteban et al. 2008). Biofilms are organized colonies of microorganisms which form heterogeneous in both biotic and abiotic surfaces, secreting extracellular polymeric substances (EPS). These substances protect individual cells from hostile factors such as immune defence systems and nutrients limitation (Ramasamy and Lee 2016; Whitchurch et al. 2002). Thus, biofilm formation is a public health concern since infections caused by microorganisms in biofilms are serious and persistent because antimicrobials and biocides have difficulties penetrating the compact and dense structure of the biofilm to exert their action (Stewart and Costerton 2001).

The conventional therapeutic strategies often do not provide adequate levels of antimicrobials within the biofilm (Li et al. 2008). Therefore, the use of nanoparticles as antimicrobial liberation systems can increase antimicrobial activity (Rai et al. 2009), outweighing the existent mechanisms of resistance to drugs, including biofilm formation (Li et al. 2008). This technology increases drug absorption, decreases antimicrobial efflux, and has a greater performance over the formed biofilm, thus providing a way to transverse the common mechanisms of resistance to antibiotics (Pelgrift and Friedman 2013; Ribeiro et al. 2016; Sans-Serramitjana et al. 2016).

Nanotechnology has been widely studied as an alternative against infections due to its properties (Ribeiro et al. 2016). Its size in nanoscale makes it compatible with biomolecules and bacterial cellular systems, supplying the nanostructure interactions with microorganisms. Still in this context, its reduced size results in an increased superficial area, rendering a high load of therapeutic agents (Gupta et al. 2016)

Materials and methods

Microorganisms, culture media and reagents

The study has been performed with the strains *M. abscessus* (ATCC 19977), *M. fortuitum* (ATCC 6841) and *M. massiliense* (ATCC 48898). Colonies were isolated in Löwesten-Jensen solid medium (HiMedia Laboratories, Mumbai, India) and cultivated in Middlebrook 7H9 broth medium (BD Difco, Franklin Lakes, United States) containing 10% (vol/vol) Middlebrook OADC Growth Supplement (Sigma-Aldrich, Saint Louis, United States) and 0,2% (vol/vol) glycerol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, United States). The culture media and reagents were prepared according to the manufacturers' specifications. Clarithromycin (Sigma, Saint Louis, United States) was diluted based on the guidelines of the CLSI (2011).

Nanosuspension preparation

Clarithromycin nanocapsules suspensions (NC-CLA) and free nanocapsules (NC-F) were prepared through the method of interfacial deposition of the pre-formed polymer, also known as nanoprecipitation (Fessi et al. 1989). The organic phase consisted of Span 80 (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), a low hydrophilic-lipophilic balance (HLB) surfactant, the polymer poly(ϵ -caprolactone) (PCL, Mn = 70,000 – 90,000, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), caprylic/capric triglycerides (MCT) (Delaware, Porto Alegre, Brazil), and, for the NC-CLA, the drug was incorporated. The organic phase was kept under agitation for one hour and heated at 40°C.

Following the established time under heating, the organic phase was injected in an aqueous phase consisting of a high HLB surfactant (Tween® 80) (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), under constant magnetic agitation for ten more minutes. The

formulation was placed in the rotary evaporator (Fisatom, São Paulo, Brazil) to eliminate the solvent and adjust to a concentration of 3mg/mL of clarithromycin. The formulation was prepared in triplicate and stored in amber flask for further analysis.

Physico-chemical characterization of colloidal suspensions

NC-F and NC-CLA were assessed for their physicochemical properties. The determination of the mean diameter of particles and the polydispersity index (PDI) were performed through photon correlation spectroscopy (Zetasizer Nanoseries®, Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom) at 25 ± 2 °C. samples were diluted in ultrapure water in the proportion 1:500 (v/v). the determination of zeta potential was performed by electrophoretic mobility with the same equipment after dilution of samples in 10 mM NaCl solution. The pH was determined directly in the suspensions, using a potentiometer previously calibrated (Seven Easy, Mettler Toledo, Columbus, Ohio, United States) with tampon solutions of pH 4,0 e 7,0. Analysis were performed in triplicate.

Susceptibility tests

The tests that determined the minimal inhibitory concentration (MIC) of NC-CLA and NC-F were performed by the broth microdilution method (CLSI 2011). The bacterial suspensions used to perform the susceptibility tests of each studied strain were prepared from colonies in Löwesten-Jensen (HiMedia Laboratories, Mumbai, India). The tested concentrations were obtained from two-fold serial dilutions.

The inoculum was transferred to sterile microplates added with nano-antimicrobial. The final volume of each reservoir corresponded to 200 μ L (100 μ L inoculum + 100 μ L nano-antimicrobial). Plates reading was performed after incubation at 37°C for 72 hours. When bacterial growth was observed (turbidity or cell deposit at the bottom of the plate), it was considered positive reading.

To ensure the detection of inducible resistance to macrolides in the microorganisms tested, the plate was re-incubated after the 72-hour reading, for a new reading to be performed after 14 days of incubation. The determination of the susceptibility profile (susceptible, intermediate or resistant) was based on the cut-off values determined by the CLSI (2011).

Inhibition of biofilm formation

Clarithromycin nanocapsules were tested regarding their capacity to inhibit RGM biofilm formation. Biofilm formation was performed in 5 mL polystyrene test tubes with 1 mL Middlebrook 7H9 broth medium (BD Difco, Franklin Lakes, United States) containing 1×10^7 UFC/mL of each bacterial species to be tested, as well as 1 mL of nanocapsules concentration dilute to be assessed. The concentrations used were equal to or lower than the MIC. The tubes were covered with parafilm (Bemis North America, Oshkosh, Wisconsin, United States) and incubated at 30°C for 7 days (Flores et al. 2016).

Assay of biofilm destruction

The assay of biofilm destruction was performed in polystyrene test tubes where 1 mL Middlebrook 7H9 broth medium containing 1×10^7 CFU/mL of the bacterial species were added, covered with parafilm (Bemis North America, Oshkosh, Wisconsin, United States) and incubated at 30°C for seven days. After biofilm formation, 1 mL of the antimicrobial was added to each tube in equal concentrations and higher than the MIC. The test tubes were covered with parafilm (Bemis North America, Oshkosh, Wisconsin, United States) and incubated at 30°C for 24 hours (Flores et al. 2016).

Biofilm quantification

Biofilm was quantified according to Bonez et al. (2013), adapted to a macro-technique. Cells which were weakly adhered to the formed biofilm were removed through washing with physiological solution, and the others dried at room temperature for a few minutes. Subsequently, 2 mL of Crystal Violet 0.1% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, United States) were added. The tubes were kept at rest for 10 minutes and then washed with physiological solution for the removal of remaining planktonic cells and excess dye. Also, 2 mL of 95% ethanol (Synth, Diadema, São Paulo, Brazil) were added to each test tube, kept for 15 minutes and transferred to trays for posterior reading in optical density (OD) of 570 nm.

Statistical analysis

Experiments and biofilm quantification were performed through three independent tests. The readings of optical density obtained from the assays of biofilm formation were assessed for data normality and expressed as mean \pm standard deviation. One-way ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test were used considering the statistical difference $p < 0,05$. The software GraphPadPrism version 5.01 was used for the development of graphs. Biofilm formation was determined by the significant difference between the average absorbance obtained in the positive control (culture and bacteria media) and the average obtained in the negative control (culture medium only).

Results

Nanocapsules characterization

The determination of the mean diameter of particles, polydispersity index, zeta potential, and pH of nanocapsules suspensions are described in Table 1.

Susceptibility test

The susceptibility profile of the RGM strains against NC-CLA is described in Table 2. NC-CLA showed inhibitory activity against the strains tested, with MIC values varying between 1 and 32 $\mu\text{g/mL}$. NC-F did not show antimicrobial activity.

Inhibition of biofilm formation

The ability of NC-CLA to reduce biofilm formation in *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense* in the MIC and all sub-inhibitory concentrations tested is shown in Figure 1. Except for *M. massiliense*, all strains were inhibited proportionally to the tested dose.

Biofilm destruction

The results of the action of NC-CLA on the three studied strains are represented in Figure 2. The MIC and all NC-CLA concentrations tested above were able to destroy, to some extent, the mycobacterial biofilm which was already formed.

Discussion

NC-CLA showed mean diameter within the nanometric range and low polydispersity index ($0,11 \pm 0,016$). This indicates a unimodal particle size distribution in the suspension, evidencing homogeneity where particles show diameter within a small size range. The analysis of these parameters in NC-F showed very close results (size $187,6 \pm 8,4$ e PDI $0,10 \pm 0,016$). In this sense, Flores and colleagues (2011) have shown in their study that the polymer used in nanocapsules formulation is a determining factor for the size of the particles formed.

The zeta potential reflects the electric potential of nanoparticles surface. This potential is influenced by changes in the interface with the external environment, resulting from factors such as dissociation of functional groups from the surface, or adsorption of ionic species from the dispersity environment (Florence and Attwood, 2016; Domingues 2008). This property is provided by the organization and chemical composition of the formulation compounds in the interface particle/aqueous phase, by factors such as the presence of polymer, surfactants, and the drug itself. Thus, the zeta potential can be used as a tool to control the behaviour of nanoparticles, since it indicates changes in the surface potential and the repulsion force between them (Pereira 2008).

The zeta potential indicates greater stability the more distant it is from zero, in module. This is due to the repulsion between particles, what hinders their aggregation, and the occurrence of an undesired increase in size (Schaffazick et al. 2002). NC-CLA and NC-F showed negative zeta potential values ($-8,6 \pm 0,9$ mV and $-8,3 \pm 0,3$ mV, respectively). The negative value for the zeta potential of NC-CLA suspensions prepared with PCL is in accordance with the literature, which describes negative values for this polymer due to the presence of ester clusters in its molecular structure (Muller et al. 2001; Cattani et al. 2010).

The pH measurement is an important indicative parameter of stability of colloidal systems. The alteration of pH values can be associated to the degradation of the polymer or any other compound of the formulation (Domingues 2008). NC-F showed lower pH ($6,28 \pm 0,38$) when compared to clarithromycin nanocapsules ($8,13 \pm 0,12$). This may have occurred due to the basic characteristics of clarithromycin, indicating that part of it is probably adsorbed to the polymeric wall of the nanostructure. In the study by Ribeiro (2016), nanocapsules added with tioconazole showed an increase in pH in relation to white nanostructures, also due to the basic characteristics of this drug.

In the susceptibility test, *M. abscessus* and *M. massiliense* showed resistance to clarithromycin, similar to the profiles observed by Kim et al. (2010), what can be attributed to the presence of inducible RNA-methylases and the mechanism of induced resistance to macrolides codified by the *erm(41)* gene in *M. abscessus* (Kim et al. 2010; Choi et al. 2012). These susceptibility profiles reinforce the need for a triage of susceptibility to drugs, in order to provide adequate treatment to carriers of diseases caused by RGM.

By assuming that it would be ideal to prevent the formation of biofilm before treating biofilm-related infections and that isolated treatment with antibiotics only results in the elimination of planktonic cells, we highlight the importance to develop strategies to prevent and fight the formation of microbial biofilm (Simões et al. 2011). The use of nanoparticles with incorporated antimicrobials can be considered anovel approach among the different methods used in the prophylactic treatment of the formation as well as the elimination of biofilm (Shakibaie et al. 2015).

Drugs associated to nanostructured systems can outweigh some of the pre-existent mechanisms of resistance to antimicrobials, increasing their absorption capacity, decreasing their efflux by the efflux pumps of bacteria, resulting in a wider action of the antimicrobial drugs against the formed biofilm (Sans-Serramitjana et al. 2016; Abdelghany et al. 2012).

Our results, when related to the ones found by Flores and colleagues (2016), have evidenced that NC-CLA do not show difference in MIC values compared to clarithromycin when not incorporated into nanocapsules, however, they showed a greater capacity to destroy biofilm formed by RGM, and significantly increased the difference in the development of biofilm treated with NC-CLA suspensions and positive control (Figure 2). Polymer nanoparticles retain drugs in their cavity and, for

this reason, they can allow the drugs to penetrate the biofilm structure and destroy it (Qayyum and Khan 2016). We assumed that the antibiofilm effect of clarithromycin has been strengthened in the nanocapsules due to the greater transposition of this formulation by the physical barriers of the extracellular matrix of biofilm, because of its size in nanometric scale.

Several studies are described in the literature about the potential of antimicrobials such as aminoglycosides, fluoroquinolones, beta-lactams, and polymyxins incorporated into polymeric nanoparticles, in relation to free drug (Pinto-Alphandary et al. 2000). For the treatment of tuberculosis, the study by Pandey et al. (2003) has revealed a greater efficacy of rifampicin, isoniazid, and pyrazinamide associated to nanocapsules, when assessed in guinea pigs.

Colistin, from the class of polymyxins, has been associated to nanostructured lipid carriers for the analysis of its antibiofilm effect against susceptible and resistant *Pseudomonas aeruginosas*. Concentrations between 0 and 2,560 µg/mL of free and structured colistin were tested in all isolates, and a significant and expressive enhancement of the antibiofilm activity of colistin associated to nanostructured lipid carriers was observed. In the aforementioned study, although both colistin formulations show the same antimicrobial in vitro activity against planktonic bacteria, nanostructured colistin has been extremely more efficient to eradicate biofilm (Sans-Serramitjana et al. 2016).

Conclusion

The present study has shown the improvement of the antibiofilm potential of Clarithromycin when it is incorporated into nanocapsules. Considering that biofilm formation is a characteristic that gives microorganisms a high tolerance to adversities, this study provides an important strategy to fight these structures. Nanoencapsulation of this antimicrobial emerges as an alternative to overcome the frequent cases of resistance, as well as to improve permeability of this drug and enable the reduction of the concentration of drug used.

Thus, these results can have an impact on the use of a new pharmaceutical formulation attributed to Clarithromycin aiming mainly to the antibiofilm therapy. Although this study provides robust results, more detailed research is still needed to

explain the influence exerted by NC-CLA on the genetic and physiological factors associated to biofilm formation.

References

Abdelghany SM, Quinn DJ, Ingram RJ, Gilmore BF, Donnelly RF, Taggart CC, Scott CJ. Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards *Pseudomonas aeruginosa* infection. 2012. *Int J Nanomedicine*7(40):53-63. DOI: [10.2147/IJN.S34341](https://doi.org/10.2147/IJN.S34341)

Bonez PC, Alves CFS, Dalmolin TV, Agertt VA, Mizdal CR, Flores VC, Marques JB, Santos RC, Campos MMA. 2013. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. *Am J Infect Control*41(12):119-122. DOI: [10.1016/j.ajic.2013.05.002](https://doi.org/10.1016/j.ajic.2013.05.002)

Cattani VB, Fiel LA, Jäger A, Jäger E, Colomé LM, Uchoa F, Stefani V, Dalla Costa T, Guterres SS, Pohlmann AR. 2010. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. *Eur J Pharm Sci*39(1-3):116-124. DOI: [10.1016/j.ejps.2009.11.004](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.11.004)

Choi GE, Shin SJ, Won CJ, Min KN, Oh T, Hahn MY, Lee K, Lee SH, Daley CL, Kim S, Jeong BH, Jeon K, Koh WJ. 2012. Macrolide Treatment for *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* Infection and Inducible Resistance. *Am J Respir Crit Care Med*186(9):917-925. DOI: [10.1164/rccm.201111-2005OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201111-2005OC)

[CLSI]. Clinical and Laboratory Standards Institute 2011. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard – Second edition.31(5).

Groote MAD, Huitt G. 2006. Infections Due to Rapidly Growing Mycobacteria. *Clin Infect Dis*42(12):1756-63. DOI: [10.1086/504381](https://doi.org/10.1086/504381)

Domingues GS, Guterres SS, Beck RCR, Pohlmann AR. 2008. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. [Nanocapsule-coated microparticles prepared in one step: characterization and in vitro drug release profiles evaluation]. *Quím Nova*31(8):1966-1972. DOI: [10.1590/S0100-40422008000800009](https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000800009)

Esteban J, Martín-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Ayala G, Fernández-Roblas R, Gadea I. 2008. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *BMC Microbiol*8:184. DOI: [10.1186/1471-2180-8-184](https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-184)

Fessi H, Puisieux F, Devissaguet J Ph, Ammoury N, Benita S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm*(1):R1-R4. DOI: [10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0)

Florence A T; Attwood D. 2016. Physicochemical Principles of Pharmacy: In Manufacture, Formulation and Clinical Use. London: Pharmaceutical Press.

Flores FC, Ribeiro RF, Ourique AF, Rolim CMB, Silva CBS, Pohlmann AR, Beck RCR, Guterres SS. 2011. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. *Quím Nova*34(6):968-972. DOI: [10.1590/S0100-40422011000600010](https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600010)

Flores VC, Siqueira FS, Mizdal CR, Bonez PC, Agertt VA, Stefanello ST, Rossi GG, Campos, MMA. 2016. Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis. *Microb Pathog*99(2016):229-235. DOI:[10.1016/j.micpath.2016.08.017](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.017)

Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. 2016. Biofilm, pathogenesis and prevention - a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol*198(1):1-15. DOI: [10.1007/s00203-015-1148-6](https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6)

Hatakeyama S, Ohama Y, Okazaki M, Nukui Y, Moriya K. 2017. Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria isolated in Japan. *BMC Infectious Diseases*17: 197. DOI: [10.1186/s12879-017-2298-8](https://doi.org/10.1186/s12879-017-2298-8)

Kannaiyan K, Ragunathan L, Sakthivel S, Sasidar AR, Muralidaran, Venkatachalam, GK. 2015. Surgical Site Infections Due to Rapidly Growing Mycobacteria in Puducherry, India. *J Clin Diagn Res*9(3): DC05-DC08. DOI: [10.7860/JCDR/2015/10572.5638](https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10572.5638)

Kim EH, Kim BJ, Kook Y, Yun YJ, Shin JH, Kim BJ, Kook YH. 2010. *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns. *Microbiol Immunol*54(6):347-353. DOI: [10.1111/j.1348-0421.2010.00221.x](https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00221.x)

Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga MV, Li D, Alvarez PJJ. 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Res*42(18):4591-4602. DOI: [10.1016/j.watres.2008.08.015](https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.015)

Müller CR, Schaffazick SR, Pohlmann AR, de Lucca Freitas L, Pesce da Silveira N, Dalla Costa T, Guterres SS. 2001. Spray-dried diclofenac-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. *Pharmazie*56(11):864-867. DOI: [10.1007/978-3-642-19792-5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-19792-5)

Nie W, Duan H, Huang H, Lu Y, Chu N. 2015. Species Identification and Clarithromycin Susceptibility Testing of 278 Clinical Nontuberculosis Mycobacteria Isolates. *BioMed Research International*2015. DOI: [10.1155/2015/506598](https://doi.org/10.1155/2015/506598)

Pandey R, Zahoor A, Sharma S, Khuller GK. 2003. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. *Tuberculosis*83(6):373-378. DOI: [10.1016/j.tube.2003.07.001](https://doi.org/10.1016/j.tube.2003.07.001)

Pelgrift RY, Friedman AJ. 2013. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev*65(13-14):1803-1815. DOI: [10.1016/j.addr.2013.07.011](https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.011)

Pereira MA, Mosqueira VCF, Vilela JMC, Andrade MS, Ramaldes GA, Cardoso VN. 2008. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with ^{99m}Techneium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. *Eur J Pharm Sci*33(1):42-51. DOI: [10.1016/j.ejps.2007.09.007](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2007.09.007)

Pinto- Alphandary H, Andremona A, Couvreur P. 2000. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *Int J Antimicrob Agents*13(3):155–168. DOI: [10.1016/S0924-8579\(99\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00121-1)

Qayyum S, Khan AU. 2016. Nanoparticles vs. biofilms: a battle against another paradigm of antibiotic resistance. *Med Chem Commun*7: 1479-1498. DOI: [10.1039/c6md00124f](https://doi.org/10.1039/c6md00124f)

Rai M, Yadav A, Gade A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*21(1):76-83. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2008.09.002](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002)

Ramasamy M, Lee J. 2016. Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm - Associated Infections on Medical Devices. *Biomed Res Int*2016. DOI: [10.1155/2016/1851242](https://doi.org/10.1155/2016/1851242)

Ribeiro RF, Motta HM, Härter APG, Flores FC, Beck RCR, Schaffazick SR, Silva CB. 2016. Spray-dried powders improve the controlled release of antifungal tioconazole-loaded polymeric nanocapsules compared to with lyophilized products. *Mater Sci Eng*59:875-884. DOI: [10.1016/j.msec.2015.10.035](https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.035)

Ribeiro SM, Felício MR, Boas EV, Gonçalves S, Costa FF, Samy RP, Santos NC, Franco OL. 2016. New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacol Ther*160:133-144. DOI: [10.1016/j.pharmthera.2016.02.006](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.02.006)

Sans-Serramitjana E, Fusté E, Martínez-Garriga B, Merlos A, Pastor M, Pedraz JL, Esquisabel A, Bachiller D, Vinuesa T, Viñas M. 2015. Killing effect of nanoencapsulated colistin sulfate on *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*15(5):611-618. DOI: [10.1016/j.jcf.2015.12.005](https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.12.005)

Schaffazick SR, Pohlmann AR, Freitas LL, Guterres SS. 2002. Caracterização e estudo de estabilidade de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. [Characterization and stability evaluation of diclofenac-loaded polymeric nanocapsules and nanospheres]. *Acta Farm Bonaerense*21(2): 99-106.

Simões, M. Antimicrobial Strategies Effective Against Infectious Bacterial Biofilms. *Curr Med Chem*18(14):2129-2145. DOI: [10.2174/092986711795656216](https://doi.org/10.2174/092986711795656216)

Shakibaie M, Forootanfar H, Golkari Y, Mohammadi-Khorsand T, Shakibaie MR Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*,

and *Proteus mirabilis*. *J Trace Elem Med Biol*29:235-241. DOI: [10.1016/j.jtemb.2014.07.020](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.07.020)

Sousa S, Bandeira M, Carvalho PA, Duarte A, Jordao L.2015. Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. *Int J Mycobacteriol*4(1):36-43. DOI: [10.1016/j.ijmyco.2014.11.065](https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.11.065)

Stewart PS.; Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*358(9276):135-138. DOI: [10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)

Tomihama T, Nishi Y, Arai K. 2007. Biofilm formation and resistance to bactericides of *Pseudomonas syringae* pv. *theae*. *Journal Of General Plant Pathology*73(3):193-196. DOI:[10.1007/s10327-007-0006-z](https://doi.org/10.1007/s10327-007-0006-z)

Van Ingen J, Boeree MJ, Van Soolingen D, Mouton JW. 2012. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resist Updat*15(3):149– 161. DOI: [10.1016/j.drug.2012.04.001](https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.04.001)

Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*295(5559):1487. DOI: [10.1126/science.295.5559.1487](https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487)

Table 1 – Physicochemical characteristics of suspensions of polymeric nanocapsules of clarithromycin (NC-CLA) and their respective formulation without the drug (NC-F) (n=3, mean ± standard deviation).

Formulation	Particle size (nm)	IPD	Potential Zeta (mV)	pH
NC-CLA	176,5 ± 0,5	0,11 ± 0,016	-8,6 ± 0,9	8,13 ± 0,12
NC-F	187,6 ± 8,4	0,10 ± 0,016	-8,3 ± 0,3	6,28 ± 0,38

Table 2 –In vitro susceptibility of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense*

	Minimal Inhibitory Concentration (µg/mL)		
	<i>M. abscessus</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. massiliense</i>
NC-CLA	16*	1	32*

*Clarithromycin-resistant microorganism.

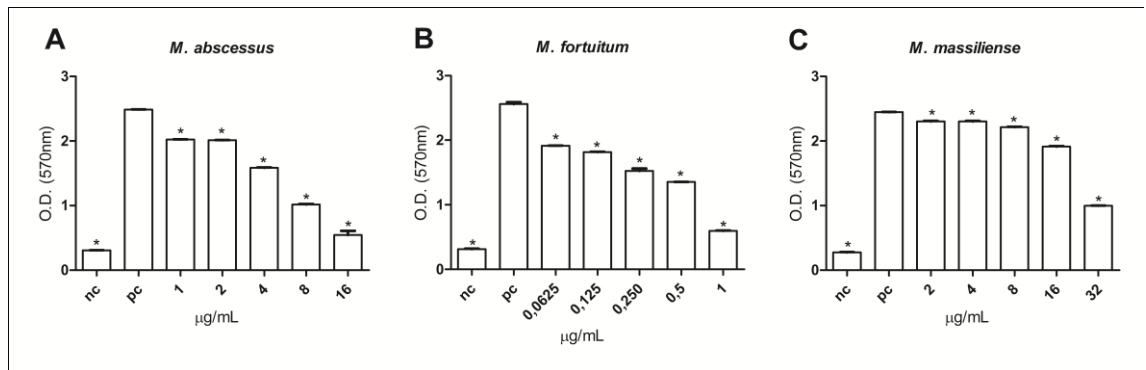


Figure 1. Graphical representation of NC-CLA action on biofilm formation of *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. massiliense* * Statistical difference when compared to positive control. One-way ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test (n=3).

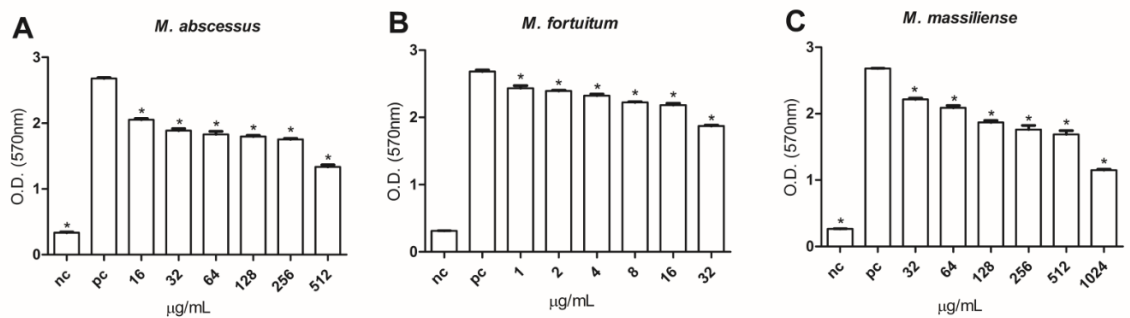


Figure 2. Graphical representation of NC-CLA action on biofilm destruction of *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. massiliense* * Statistical difference when compared to positive control. One-way ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test (n=3).

6 DISCUSSÃO

As MNT são bactérias com uma membrana externa impermeável e rica em lipídios que resulta em crescimento lento e resistência a antimicrobianos e desinfetantes (FALKINHAM et al., 2008). A capacidade de MNT para evadir a resposta imune do hospedeiro e a capacidade de aderir e formar biofilmes em substratos biológicos e sintéticos contribuem para a dificuldade de manejo de infecções causadas por esses microrganismos (AUNG et al., 2016).

As infecções causadas por MCR, além de serem de difícil diagnóstico, são um grande desafio devido as particularidades de resistência a antimicrobianos desse grupo de micobactérias (COLOMBO; OLIVIER, 2008; HELOU et al., 2013). As MCR são resistentes aos medicamentos tuberculostáticos convencionais e suas suscetibilidades a outros antimicrobianos variam entre as espécies (YANG et al., 2003).

No primeiro artigo científico demonstramos a atividade de antimicrobianos normalmente empregados no tratamento de micobacterioses causadas por MCR (amicacina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem e sulfametoxazol) em células planctônicas e sésseis. No teste de suscetibilidade, *M. abscessus* e *M. massiliense* demonstraram ser resistentes à claritromicina e, além disso, *M. massiliense* também apresentou perfil de resistência ao sulfametoxazol. Os diferentes perfis de suscetibilidade encontrados em nosso estudo reforçam a necessidade de triagem da sensibilidade aos medicamentos, a fim de proporcionar tratamento adequado a portadores de doenças causadas por MCR.

A partir do primeiro artigo também constatamos que nenhum dos agentes antimicrobianos testados conseguiu bloquear totalmente a produção ou destruir completamente os biofilmes de MCR. Sugerimos que, no caso da formação dos biofilmes, isso se deve ao fato de que os agentes testados não obtiveram sucesso no bloqueio dos processos essenciais a formação dos biofilmes bacterianos, como a adesão das células bacterianas às superfícies. No caso do ensaio em que testamos o poder de destruição de antimicrobianos, sugerimos que os resultados obtidos se devem ao fato de que a matriz do biofilme tem o potencial de prevenir o acesso físico dos agentes antimicrobianos, restringindo a difusão destes para o interior dos biofilmes.

No segundo artigo, que ainda encontra-se como manuscrito, desenvolvemos suspensões de nanocápsulas de claritromicina, um dos medicamentos recomendados pelo CLSI para testes de suscetibilidade a antimicrobianos em MCR e considerado o pilar do tratamento de infecções causadas por MCR (CLSI 2011; NIE et al., 2015). Pelo fato das nanocápsulas poderem prevenir ou contornar a resistência a antimicrobianos em alguns casos (WANG et al., 2017), a nanoencapsulação da claritromicina foi utilizada como estratégia para aumentar a permeabilidade do antimicrobiano na matriz do biofilme e de diminuir a resistência apresentada pelas células planctônicas.

O método de deposição interfacial do polímero pré-formado foi adequado para obter suspensões de nanocápsulas de PCL contendo claritromicina, resultando em nanocápsulas com diâmetros em escala nanométrica, baixo índice de polidispersividade e potencial zeta negativo. O polímero PCL pode ser utilizado para preparar diferentes tipos de nanocápsulas, apresentando flexibilidade diversa de acordo com a natureza química do núcleo. Essas nanocápsulas são capazes de controlar a liberação de fármacos e melhorar a estabilidade fotoquímica. Além disso, eles podem modular a penetração / permeação de fármacos. Considerando o ponto de vista farmacêutico, as nanocápsulas com PCL são formulações versáteis, uma vez que podem ser utilizadas na forma líquida, bem como incorporadas em formas de dosagem semi-sólidas ou sólidas (POHLMANN et al., 2013).

A suspensão de NC-B não apresentou atividade antimicrobiana. Isso era esperado, pois não há estudos relatando a atividade antimicrobiana do polímero PCL, utilizado no processo de desenvolvimento das nanocápsulas. No caso das suspensões de NC-CLA, a suscetibilidade apresentada pelas três cepas de micobactérias testadas foi a mesma detectada no primeiro artigo para a claritromicina livre. Nesse caso, a nanoencapsulação da claritromicina não conseguiu contornar a resistência a claritromicina apresentada pelas cepas de *M. abscessus* e *M. massiliense*.

Através dos ensaios de inibição da formação e destruição da formação do biofilme, pode-se observar que a atividade antibiofilme da claritromicina melhorou com o desenvolvimento de nanocápsulas do medicamento. Aumentou de forma expressiva a diferença do biofilme tratado com as suspensão de NC-CLA e o controle positivo. As nanocápsulas poliméricas retêm drogas dentro de sua cavidade e, com isso, podem permitir que as drogas penetrem na estrutura do biofilme para

destruí-lo (QAYYUM; KHAN, 2016). Supõe-se que o efeito antibiofilme da claritromicina tenha sido potencializado, na forma de nanocápsulas, pela maior transposição dessa formulação pelas barreiras físicas da matriz extracelular do biofilme, devido ao seu tamanho em escala nanométrica.

Nossos resultados vão ao encontro dos demonstrados por Sans-Serramitjana e colaboradores (2015). Os pesquisadores associaram colistina a carreadores lipídicos nanoestruturados e avaliaram o seu efeito antibiofilme frente a *Pseudomonas aeruginosas* sensíveis e resistentes. No estudo em questão, apesar de a colistina livre e a colistina nanoestruturada apresentarem a mesma atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias planctônicas, a formulação em escala nanométrica foi extremamente mais eficaz na erradicação de biofilmes.

A tendência atual tem sido direcionada à pesquisa de novos compostos e à utilização de novos sistemas de liberação dos fármacos, utilizando principalmente nanopartículas. O emprego de ações que previnam a formação de biofilme, bem como o uso de antimicrobianos que através de sua permeabilidade melhorada degradam a matriz exopolimérica, configuram como importantes estratégias de combate aos biofilmes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho centrou-se na avaliação da suscetibilidade de células planctônicas e do efeito antibiofilme de antimicrobianos normalmente utilizados no tratamento de micobacterioses causadas por MCR (amicacina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem e sulfametoxazol). Além disso, pelo fato de a claritromicina ser amplamente utilizada em esquemas terapêuticos contra infecções causadas por diversas espécies de micobactérias, buscou-se aperfeiçoar suas propriedades antibiofilme com o desenvolvimento de nanocápsulas. Em função dos objetivos propostos neste trabalho e considerando os resultados experimentais obtidos, pode-se concluir que:

- A suscetibilidade a antimicrobianos pode variar de acordo com a espécie de MCR e, por isso, configura-se fundamental realizar a triagem de suscetibilidade a fármacos para o estabelecimento de regimes terapêuticos adequados em infecções causadas por esse grupo de micobactérias;

- Embora a diminuição da produção de biofilme tenha sido alcançada em algumas concentrações subinibitórias dos agentes antimicrobianos testados na forma livre, nenhum deles conseguiu inibir totalmente a produção de biofilmes pelos microrganismos avaliados;

- Mesmo com a indicação para a realização de testes de suscetibilidade e serem medicamentos de escolha em regimes terapêuticos contra micobacterioses, os antimicrobianos na forma livre testados não erradicaram totalmente os filmes bacterianos de MCR, e podem ser uma estratégia duvidosa para erradicar biofilmes desse grupo de bactérias;

- As NC-CLA desenvolvidas com o polímero PCL apresentaram caracterização físico-química adequada, com diâmetros em escala nanométrica, baixo índice de polidispersividade e potencial zeta negativo;

- A claritromicina nanoencapsulada teve um desempenho antibiofilme superior a claritromicina livre e demonstrou ser uma alternativa promissora para o combate e prevenção de biofilmes de MCR.

REFERENCIAS

- ABDALLAH, A. M.; et al. Type VII secretion-mycobacteria show the way. **Nature**. v. 5, n. 11, p. 883-891, 2007.
- 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.
- AITKEN, M;L.; et al. Respiratory outbreak of *Mycobacterium abscessus* subspecies *massiliense* in a lung transplant and cystic fibrosis center. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 185, p. 231-232, 2012.
- AMIR, M.; et al. Enhancement of Oral Uptake of Amikacin Using Copolymers. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**. v. 7, n. 3 p. 44-49, 2017.
- ANDREU, V.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 26, n. 6, p. 534-556, 2007.
- ANVISA. Bulário Eletrônico. **Cloridrato de Ciprofloxacino EMS SIGMA PHARMA LTDA**. 2013a. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9115802013&pIdAnexo=1844097. Acesso em: 01 abr 2017.
- ANVISA. Bulário Eletrônico. **Cloridrato De Doxiciclina EMS S/A**. 2013b. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=5907632013&pIdAnexo=1707177. Acesso em: 01 abr 2017.
- ANVISA. Bulário Eletrônico. **Imipenem + Cilastatina sódica Rambaxy Farmacêutica Ltda**. 2013c. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7570562013&pIdAnexo=1780382. Acesso em: 31 mar 2017.
- ARAI, M.; NIIKAWA, H.; KOBAYASHI, M. Marine-derived fungal sesterterpenes, ophiobolins, inhibit biofilm formation of *Mycobacterium* species. **Journal of Natural Medicines**. v. 67, p. 271-275, 2013.
- ARBEX, M.A.; et al. Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: Second line drugs. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 36, n. 5, p. 641-656, 2010.
- AUNG, T.T.; et al. Biofilms of Pathogenic Nontuberculous Mycobacteria Targeted by New Therapeutic Approaches. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 60, n. 1, p. 24-35, 2016.
- BHARATI, B.K.; CHATTERJI, D. Quorum sensing and pathogenesis: role of small signalling molecules in bacterial persistence. **Current Science**. v. 105, n. 5, 2013.

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

BINDER, A.M.; et al. Epidemiology of Nontuberculous Mycobacterial Infections and Associated Chronic Macrolide Use among Persons with Cystic Fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 188, p. 807-812, 2013.

BJARNSHOLT, T.; et al. The in vivo biofilm. **Trends in Microbiology**. v. 21, n. 2, 2013.

BONEZ, P.C. et al. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. **American Journal of Infection Control**. v. 41, p. 119-122, 2013.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica**. Módulo VI, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica Conjunta N° 01/2009- SVS/MS e ANVISA**. Infecções por micobactérias de crescimento rápido: fluxo de notificações, diagnósticos clínico, microbiológico e tratamento, 2009.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica Conjunta N° 01/2007- Divisão de Vigilância Sanitária e Divisão de Vigilância Epidemiológica**. Prevenção e controle de infecções por micobactéria não tuberculosa relacionadas a vídeo-cirurgia e outros procedimentos invasivos, 2007.

BRYANT, J.M.; et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. **Lancet**. v. 381, p. 1551-1560, 2013.

CAMPOCCIA, D.; et al. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. **Biomaterials**. v. 31, p. 6363-6377, 2010.

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

CHEN, J.M.; et al. Roles of Lsr2 in Colony Morphology and Biofilm Formation of *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Bacteriology**. v. 188, n. 2, p. 633-641, 2006.

CHERNG, B. A Prospective Registry For Non Tuberculous Mycobacterial (NTM) Infections. **Clinical Trials**. fev. 2017. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02355015>. Acesso em: 03 jun. 2017.

CLSI. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard – Second edition. **CLSI document M24-A2**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2011.

COLOMBO, R.E.; OLIVIER, K.N. Diagnosis and treatment of infections caused by rapidly growing mycobacteria. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 29, n. 5, p. 577–588, 2008.

COSMA, C.L.; SHERMAN, D.R.; RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annual Reviews of Microbiology**. v. 57, p. 641-676, 2003.

COWMAN, S.; WILSON, R.; LOEBINGE, M.R. Opportunistic mycobacterial diseases. **Infection**. v. 40, n. 6, p. 346-348, 2012.

COWAN, T. Biofilms and their management: From concept to clinical reality. **Journal of Wound Care**. v. 20, p. 222-226, 2011.

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.

DAVIDSON, R.M.; et al. Genome Sequencing of Mycobacterium abscessus Isolates from Patients in the United States and Comparisons to Globally Diverse Clinical Strains. **Clinical Microbiology**. v. 52, n. 3, p. 3573-3582, 2014.

DECHO, A.; BENICEWICZ, B. Microbial Biofilm Interactions with Nanoparticles. **Nanocenter**. Disponível em <http://www.nano.sc.edu/research/nanoenvironment/researchactivities.aspx>.

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

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DUARTE, R.S. et al. Epidemic of postsurgical infections caused by *M. massiliense*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 7, p. 2149-2155, 2009.

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

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

- FALKINHAM, J.O. Growth in catheter biofilms and antibiotic resistance of *Mycobacterium avium*. **Journal of Medical Microbiology**. v. 56, p. 250-254, 2007.
- FALKINHAM, J.O.; et al. *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. **Journal of Water and Health**. v. 6, n. 2, p. 209-213, 2008.
- FARIA, S.; JOAO, I.; JORDAO, L. General Overview on Nontuberculous Mycobacteria, Biofilms, and Human Infection. **Journal of Pathogens**. v. 2015, p. 1-10. 2015.
- FEDRIZZI, T.; et al. Genomic characterization of Nontuberculous Mycobacteria. **Nature**. v. 7, 2017.
- FERREIRA, C.P.; et al. Atypical cutaneous mycobacteriosis caused by *Mycobacterium avium* complex. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 14, n. 3, 2010.
- FLEMMING, H.C.; et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews**. v.14, p. 563-575, 2016.
- FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, p. 623-633, 2010.
- FONSECA, T.L.; et al. Atividade antimicobacteriana de extratos vegetais frente a *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium malmoeense*. **Vitalle**. v. 20, n. 1, p. 65-71, 2008.
- FONTANA, R.T. The Mycobacterias of Rapid Growth and the hospital infection: a public health problem. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v. 61, n. 3, p. 371-376, 2008.
- FORGACS, P.; et al. Tuberculosis and Trimethoprim-Sulfamethoxazole. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v. 53, n. 11, p. 4789-4793, 2009.
- FREITAS, A.L.; BARTH, A.L. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 6, n. 1, p. 1-7, 2002.
- GALES, A.C.; MENDES, R.E. Comparative antimicrobial activity between meropenem and imipenem/cilastatina: does the clinical laboratory need to test both imipenem and meropenem routinely? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 38, n. 1, p. 13-20, 2002.
- GALIL, K.; et al. Abscesses due to *Mycobacterium abscessus* linked to injection of unapproved alternative medication. **Emerging Infectious Diseases**. v. 5, n. 5, p. 681-687, 1999.
- GARCÍA-GALÁN, M.J.; DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 27, n. 11, p. 1008-1022, 2008.

GEIER, H.; et al. Autoinducer-2 Triggers the Oxidative Stress Response in *Mycobacterium avium*, Leading to Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, n. 6, p. 1798-1804, 2008.

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

GHAFLI, H.A.; HAJOJ, S.A. Nontuberculous Mycobacteria in Saudi Arabia and Gulf Countries: A Review. **Canadian Respiratory Journal**. v. 2017, p. 1- 13, 2017.

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

GÓMEZ, N. A. Micobacterias no tuberculosas: una infección emergente? **Anales de Pediatría**. v. 71, p. 185-188, 2009.

GREENDYKE, R.; BYRD, T.F. Differential Antibiotic Susceptibility of *Mycobacterium abscessus* Variants in Biofilms and Macrophages Compared to That of Planktonic Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 6, p. 2019-2026, jun., 2008.

GRIFFITH, D.E.; et al. ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee; American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 175, n. 4, p. 367-416, 2007.

GRIFFITH, D.E. Microbiology of nontuberculous mycobacteria. **UpToDate**. 2016. Disponível em: <http://www.uptodate.com/contents/microbiology-of-nontuberculous-mycobacteria>. Acesso em: 01 de mai. 2017.

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

GRILLON, A.; et al. Comparative Activity of Ciprofloxacin, Levofloxacin and Moxifloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* Assessed by Minimum Inhibitory Concentrations and Time-Kill Studies. **Plos One**. v. 11, n. 6, 2016.

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

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

HAMODAT, M. Skin-nontumor / Clinical dermatology/Infectious disordersMycobacteria - atypical. **Pathology Outlines**. 2015.

HAN, L.; et al. Redox-responsive theranostic nanoplateforms based on inorganic nanomaterials. **Journal of Controlled Release**. Mar. 2017.

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

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

HERMANSEN, T.S.; et al. Non-Tuberculous Mycobacteria and the Performance of Interferon Gamma Release Assays in Denmark. **Plos One**. v. 9, n. 4, 2014.

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

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.

HUH, A.J.; KWON, Y.J. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**. v. 156, p. 128-145, 2011.

ISLAM, M.S.; RICHARDS, J.P.; OJHA, A.K. Targeting drug tolerance in mycobacteria: a perspective from mycobacterial biofilms. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. v. 10, n. 9, p.1055-1066, 2012.

JEONG, Y.J.; et al. Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Infection in Immunocompetent Patients: Comparison of Thin-section CT and Histopathologic Findings. **Radiology**. v. 231, p. 880-886, 2004.

JIMÉNEZ, M.M. et al. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 272, p. 45-55, 2004.

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

KABBARA, W.K.; NAWAS, G.T.; RAMADAN, W.H. Evaluation of the appropriateness of imipenem/cilastatin prescription and dosing in a tertiary care hospital. **Infection and Drug Resistance**. v. 8, p. 31-38, 2015.

KANATANI, M.S.; GUGLIELMO, B.J. The new macrolides: Azithromycin and Clarithromycin. **Western Journal of Medicine**. v. 160, p. 31-37, 1994.

KARAVELIDIS, V.; et al. Nanoencapsulation of a water soluble drug in biocompatible polyesters. Effect of polyesters melting point and glass transition temperature on drug release behavior. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 41, n. 5, p. 636–643, 2010.

- KESTER, J.C; FORTUNE, S.M. Persists and beyond: Mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. v. 49, n. 3, p. 91-101, 2013.
- KIM, C.J.; et al. Differentiating rapid- and slow-growing mycobacteria by difference in time to growth detection in liquid media. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**. v. 75, n. 1, p. 73-76, 2013.
- 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.
- KOH, W.J. Nontuberculous Mycobacteria - Overview. **Microbiology Spectrum**. v. 5, n. 1, 2017.
- KOZA, A.; et al. Characterization of a novel air-liquid interface biofilm of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. **Microbiology**. v. 155, p. 1397-1406, 2009.
- KRAKAUER, T.; BUCKLEY, M. Doxycycline Is Anti-Inflammatory and Inhibits Staphylococcal Exotoxin-Induced Cytokines and Chemokines. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v. 47, n. 11, p. 3630-3633, 2003.
- KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 75, p. 1-18, 2010.
- LI, Q.; et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. **Water Research**. v. 42, p. 4591-4602, 2008.
- LOPES, M.L.; et al. Micobacterioses associadas a procedimentos médicos invasivos em Belém. **Revista Paraense de Medicina**. v. 19, n. 2, p. 87-89, 2005.
- LUZ, K.G.; et al. *Mycobacterium fortuitum*-related lymphadenitis associated with the varicella-zoster virus. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 47, n. 1, 2014.
- MA, W.; et al. *Bacillus subtilis* biofilm development in the presence of soil clay minerals and iron oxides. **Nature**. v. 3, n. 4, 2017.
- MACEDO, J.L.S; MAIEROVITCH, C.; HENRIQUES, C.M.P. Infecções pós-operatórias por micobactérias de crescimento rápido no Brasil. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. v. 24, n. 4, p. 544-551, 2009.
- MACHADO, S.M.O. 2005. **Avaliação do efeito antimicrobiano dosurfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - Universidade de Minho, Braga, 2005.
- MARCINKIEWICZ, J.; STRUS, M.; PASICH, E. Antibiotic resistance: a “dark side” of biofilm-associated chronic infections. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**. v. 123, n. 6, p. 309-312, 2013.

MARINHO, A.; et al. Nontuberculous mycobacteria in non-AIDS patients. **Revista Portuguesa de Pneumologia**. v. 14, n. 3, p. 323-337, jun., 2008.

MARTÍNEZ, A.; TORELLO, S.; KOLTER, R. Sliding Motility in Mycobacteria. **Journal of Bacteriology**. v. 181, n. 23, p. 7331-7338, 1999.

MARRAS, T.K.; DALEY, Epidemiology of Human Pulmonary Infection with Nontuberculous Mycobacteria. **Clinics in Chest Medicine**. v. 23, n. 3, p. 553-567, 2002.

MARTINEZ-GUTIERREZ, F. et al. Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. **Biofouling**. v. 29, n. 6, p. 651-60, 2013.

MERTANIASIH, N.M.; et al. Nontuberculous mycobacterial species and *Mycobacterium tuberculosis* complex coinfection in patients with pulmonary tuberculosis in Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia. **The International Journal of Mycobacteriology**. v. 6, n. 1, p. 9-13, 2017.

MITTELMAN, M.W. Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations. **Journal of Dairy Science**. v. 81, p. 2760-2764, 1998.

MOTA, S.P.M.S. 2011. **Isolamento e identificação molecular de micobactérias não tuberculosas**. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2011.

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.

NASH, K.A.; et al. Intrinsic Macrolide Resistance in Rapidly Growing Mycobacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, n. 10, p. 3476-3478, 2006.

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.

NIE, W.; et al. Species Identification and Clarithromycin Susceptibility Testing of 278 Clinical Nontuberculosis Mycobacteria Isolates. **BioMed Research International**. v. 2015, 2015.

OJHA, A. H. 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.; 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, n. 2, p. 468-483, 2007.

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

OMAR, A.; et al. Microbial Biofilms and Chronic Wounds. **Microorganisms**. v. 5, n.9, 2017.

PACIFICI, G.G.; MARCHINI, G. Clinical Pharmacokinetics of Amikacin in Neonates. **International Journal of Pediatrics**. v. 5, n. 2, p. 4407-4428, 2017.

PADOVEZE, M.C.; et al. Outbreak of surgical infection caused by non-tuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil. **Journal of Hospital Infection**. v. 67, n. 2, p. 161-167, 2007.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery**. v. 55, n. 3, p. 329–347, 2003.

PARIKH, R.B.; GRANT, M. *Mycobacterium goodii* endocarditis following mitral valve ring annuloplasty. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 16, n. 14, 2017.

PASTERNAK, J. Biofilmes: um inimigo (in) visível. **Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**. p. 36-39, 2009.

PELGRIFT, R.Y.; FRIEDMAN, A.J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 65, n. 13-14, p. 1803-1815, 2013.

PÉREZ, A.O.; HIJAS, N.M.; RODRÍGUEZ, N.A.; et al. Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilmformed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 29, n. 2, p. 79-84, 2011.

PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 13, p. 155–168, 2000.

PITOMBO, M.B.; LUPI, O.; DUARTE, R.S. Infections by rapidly growin mycobacteria resistant to disinfectants: a national matter? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 31, n. 11, p. 529-533, 2009.

POHLMANN, A.R.; et al. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**. v. 10, n. 5, 2013.

POOLE, K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 67, p. 2069-2089, 2012.

QAYYUM, S.; KHAN, A.U. Nanoparticles vs. biofilms: a battle against another paradigm of antibiotic resistance. **Medicinal Chemistry Communications**. v. 7, p. 1479-1498, 2016.

RABIN, N.; et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**. v. 7, n. 4, p. 493-512, 2015.

RACHID, N.R.; et al. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 87, p. 810-818, 2012.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**. v. 27, n. 1 p. 76–83, 2009.

RAMASAMY, M.; LEE, J. Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices. **BioMed Research International**. 2016.

RAMOS, D.F.; SILVA, P.E.A. Antimycobacterial activity of usnic acid against resistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria. **Pharmaceutical Biology**. v. 48, n. 3, p. 260-263, 2010.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 29, n. 9, p. 1790–1798, 2006.

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

RICKARD, A.H.; et al. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**. v. 11, n. 2, p. 94-100, 2003.

RÖMLING, U.; BALSLOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**. v. 272, n. 2, 2014.

RÜEGG, E.; et al. Multisite Infection with *Mycobacterium abscessus* after replacement of breast implants and gluteal lipofilling. **Case Reports in Infectious Diseases**. v. 2015, n. 6, 2015.

RYU, Y.J.; KOH, W.J.; DALEY, C.L. Diagnosis and Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease: Clinicians' Perspectives. **Tuberculosis & Respiratory Diseases**. v. 79, n. 2, p. 74-84, 2016.

SANS-SERRAMITJANA, E. et al. Killing effect of nanoencapsulated colistin sulfate on *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. **Journal of Cystic Fibrosis**. v. 14, n. 3, p. 1-8, 2015.

SÃO PAULO. Secretaria Estadual de Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. **Micobacterioses: Recomendações para o diagnóstico e tratamento**. 2005.

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.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova.** v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHMIDT, S.; et al. Methods to Study the Role of the Glycocalyx in the Uptake of Cell-Penetrating Peptides. **Methods in Molecular Biology.** v. 1324, p. 123-131, 2015.

SCHROEDER, M.; BROOKS, B.D.; BROOKS, A.E. The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance. **Genes.** v. 8, n.1, 2017.

SENNA, S.G.; BATTILANA, J.; COSTA, J.C.; 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.

SEXTON, P.; HARRISON, A.C. Susceptibility to nontuberculous mycobacterial lung disease. **European Respiratory Journal.** v. 31, n. 6, 2008.

SHAZLY, G.A. Ciprofloxacin Controlled-Solid Lipid Nanoparticles: Characterization, In Vitro Release, and Antibacterial Activity Assessment. **BioMed Research International.** v. 2017, 2017.

SHI, T.; FU, T.; XIE, J. Polyphosphate deficiency affects the sliding motility and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*. **Current Microbiology.** v. 63, p. 470-476, 2011.

SHINNICK, T.M.; GOOD, R.C. Mycobacterial taxonomy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.** v. 13, n. 11, p. 884-901, 1994.

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

SINGH, S.; et al. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. **The open Microbiology Journal.** v. 11, p. 53-62, 2017.

SOPPIMATH, K.S.; et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release.** v. 70, p. 1-20, 2001.

SOUSA, S.; et al. Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. **International Journal of Mycobacteriology.** v. 4, p. 36-43, 2015.

STOUT, J. E.; KOH, W.J.; YEW, W.W. Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 45, p. 123-134, 2016.

STTEWART, P.S.; COSTERTON, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**. v. 358, p. 135-138, 2001.

SUTRE, A.F.M.A. 2010. **Estudo molecular da resistência à rifampicina do complexo *Mycobacterium tuberculosis* numa população da Guiné-Bissau**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia aplicada) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

TATEDA, K.; et al. Suppression of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems by macrolides: a promising strategy or an oriental mystery? **Journal of Infection and Chemotherapy**. v. 13, n. 6, p. 357-367, 2007.

TENG, R.; DICK, T. Isoniazid resistance of exponentially growing *Mycobacterium smegmatis* biofilm culture. **FEMS Microbiology Letters**. v. 24, p. 171-174, 2003.

TORTOLI, E. The new mycobacteria: an update. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. v. 48, n. 2, p. 159-178, 2006.

TUTTLEBEE, C.M.; et al. Effective control of dental chair unit waterline biofilm and marked reduction of bacterial contamination of output water using two peroxide-based disinfectants. **Journal of Hospital Infection**. v. 52, n. 3, p. 192-205, 2002.

UEKI, S.Y.M.; et al. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2005.

VAN INGEN, J.; et al. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. **Drug Resistance Updates**. v. 15, p. 149– 161, 2012a.

VAN INGEN, J.; et al. Are phylogenetic position, virulence, drug susceptibility and in vivo response to treatment in mycobacteria interrelated? **Infection, Genetics and Evolution**. v. 12, n. 4, p. 832-837, 2012b.

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

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

VICENTE, I.C.S. 2003. **Atividade bactericida de um novo derivado 1,2,4 oxadiazol-hidrazida frente ao *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

WANG, L.; HU, C.; SHAO, L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. **International Journal of Nanomedicine**. v. 12, n. 1227-1249, 2017.

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

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

WU, J. et al. Silver nanoparticle/bacterial cellulose gel membranes for antibacterial wound dressing: investigation *in vitro* and *in vivo*. **Biomedical Materials**.v. 9, n. 3, p. 1-12, 2014.

XAVIER, J.B.; et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**. 2005.

YANG, S.C.; et al. High Prevalence of Antimicrobial Resistance in Rapidly Growing Mycobacteria in Taiwan. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v. 47, n. 6, p. 1958-1962, 2003.

ZAMARIOLI, L.A.; et al. Descriptive study of the frequency of nontuberculous mycobacteria in the Baixada Santista region of the state of São Paulo, Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 34, n. 8, p. 590-594, 2008.

ZHANG, L.; PORNATTANANANGKUL, D. HUANG, C.M. HU, C.M. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. **Current Medicinal Chemistry**. v. 17, n. 6, p. 585–594, 2010.

ZHANG, Y. Themagic Bullets And Tuberculosis Drug Targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 45, 2005.

ZHANG, Z.; et al. *In vitro* activity of clarithromycin in combination with other antimicrobial agents against *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense*. **Journal of Antimicrobial Agents**. v. 49, n. 3, p. 383-386, 2017.

ANEXO I - PERMISSÃO DO PERIÓDICO MICROBIAL PATHOGENESIS PARA REPRODUÇÃO DE ARTIGO

07/11/2017

Gmail - Share your article [YMPAT_1916] published in Microbial Pathogenesis



Laboratório Mycobacteriologia <laboratoriomycobacteriologia@gmail.com>

Share your article [YMPAT_1916] published in Microbial Pathogenesis

Elsevier - Article Status <Article_Status@elsevier.com>
Para: laboratoriomycobacteriologia@gmail.com

1 de setembro de 2016 09:55

Please note this is a system generated email from an unmanned mailbox.
If you have any queries we really want to hear from
you via our 24/7 support at <http://service.elsevier.com>

Article title: Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis
Article reference: YMPAT1916
Journal title: Microbial Pathogenesis
Corresponding author: Dr Marli Matiko Anraku de Campos
First author: Dr Vanessa da Costa Flores
Final version published online: 1-SEP-2016
Full bibliographic details: Microbial Pathogenesis (2016), pp. 229-235
DOI information: 10.1016/j.micpath.2016.08.017

Dear Dr Campos,

We are pleased to inform you that the final version of your article with full bibliographic details is now available online

To help you access and share your article, we are providing you with the following personal article link, which will provide free access to your article, and is valid for 50 days, until October 21, 2016

<http://authors.elsevier.com/a/1TeZd38ed-84Yp>

Please use this link to download a personal copy of your article for your own archive. You are also welcome to email the link to your co-authors and colleagues, or post the link on your own homepage, Facebook, Google+, Twitter or other social media profile, to tell your network about your new publication. Anyone who clicks on the link until October 21, 2016, will be taken to the final version of your article on ScienceDirect for free. No sign up or registration is needed - just click and read!

As an author, you may use your article for a wide range of scholarly, non-commercial purposes, and share and post your article online in a variety of ways. For more information, please see www.elsevier.com/copyright.

Kind regards,
Elsevier Author Support

ADVANCING WOMEN

Advancing women in science and libraries in the developing world:

Every year, the Elsevier Foundation provides grants to institutions around the world, with a focus on support for the world's libraries and for scholars in the early stages of their careers. Since 2002, The Elsevier Foundation has awarded more than 60 grants worth millions dollars to non-profit organizations focusing on helping the world's libraries, nurse faculties, and women scholars during their early and mid-careers. Maybe we can help you.

See the latest call for funding applications at: www.elsevierfoundation.org

TRACK YOUR ARTICLE

To track the status of your article throughout the publication process, please use our article tracking service:

http://authors.elsevier.com/TrackPaper.html?trk_article=YMPAT1916&trk_surname=Campos

For detailed article tracking instructions please go to:

http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/5971

HAVE QUESTION http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/5971

For further assistance, please visit our Customer Support site where you search for solutions on a range of topics and

https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=865d39555c&jsver=0gCcz6whrPg_pt_BR.&view=pt&msg=156e59a9a0fb48c2&search=sent&siml=156e... 1/2

07/11/2017

Gmail - Share your article [YMPAT_1916] published in Microbial Pathogenesis

find answers for frequently asked questions. You can also talk to our customer support team by phone 24 hours a day from Monday-Friday and 24/7 by live chat and email.

Get started at > <http://service.elsevier.com>

© 2016 Elsevier Ltd | Privacy Policy <http://www.elsevier.com/privacypolicy>

Elsevier Limited, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, United Kingdom, Registration No. 1982084. This e-mail has been sent to you from Elsevier Ltd. To ensure delivery to your inbox (not bulk or junk folders), please add article_status@elsevier.com to your address book or safe senders list.

[T-18-20150915]

ANEXO II - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO BIOFOULING

26/02/2018

Gmail - Biofouling - Manuscript ID GBIF-2018-0048



Laboratório Mycobacteriologia <laboratoriomycobacteriologia@gmail.com>

Biofouling - Manuscript ID GBIF-2018-0048

1 mensagem

Biofouling <onbehalf@manuscriptcentral.com>

16 de fevereiro de 2018 15:36

Responder a: mfbn@btinternet.com

Para: laboratoriomycobacteriologia@gmail.com

16-Feb-2018

Dear Dr de Campos:

Your manuscript entitled "Use of clarithromycin nanocapsules as a strategy to combat and eradicate rapidly growing mycobacteria biofilms" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Biofouling.

Your manuscript ID is GBIF-2018-0048.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/gbif> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/gbif>.

Thank you for submitting your manuscript to Biofouling.

Sincerely,
Biofouling Editorial Office