Marcio David Bocelli

ESTUDO DA ATIVIDADE DE CHALCONAS NO CONTROLE DE BIOFILMES BACTERIANOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da
Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Nitschke

São Carlos

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre esteve no controle de tudo.

À minha família que sempre me ensinou que trabalhar honestamente é a melhor maneira de mudar as coisas, além de ser uma dádiva divina; incluindo meus irmãos Júnior, Rebeca e Érica.

Ao meu irmão Júnior Bocelli que, desde que iniciei meus estudos foi minha inspiração pra fazer Ciência.

À minha eterna namorada e esposa Lorena, que sempre me apoiou; independente da direção que eu quis seguir.

À Professora Dr^a Marcia Nitschke que aceitou me orientar e compartilhar comigo do seu conhecimento.

Aos alunos de Iniciação Científica Vinícius Lima e Gabriela Carrega por aceitarem o desafio de trabalhar no projeto.

Aos técnicos Marília Peret e João Pedro por toda ajuda, esforço e compreensão durante minha jornada no laboratório.

A todos os amigos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana pelos anos de companheirismo, amizade, diversão, desabafos e cumplicidade.

Ao Professor Dr. André Porto e a todo o pessoal do seu laboratório, os quais estiveram envolvidos direta e indiretamente neste trabalho.

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Química de São Carlos pela minha vida acadêmica.

Porque o fim da lei é Cristo para justiça de todo aquele que crê.

Romanos 10:4

Resumo

Os biofilmes constituem uma forma de crescimento que permite a maior sobrevivência e resistência de microrganismos a agentes de controle como antibióticos e desinfetantes. Apesar da grande disponibilidade de agentes antimicrobianos no mercado, há escassez de produtos específicos e efetivos na erradicação/inibição de biofilmes. Existe atualmente grande interesse na seleção de moléculas capazes de inibir o crescimento dos biofilmes ou removê-los quando já estabelecidos. Doenças como fibrose cística (*P. aeruginosa*) e cárie dentária (*S. mutans*), são patologias intrinsecamente ligadas à formação de biofilmes. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de chalconas sintéticas e derivados no controle e erradicação de biofilmes. As chalconas foram testadas quanto à capacidade de inibir a formação de biofilme e de remover biofilmes pré-estabelecidos. Inicialmente foi realizada uma triagem com 21 moléculas, utilizando a técnica de cristal violeta para quantificação de biomassa e resazurina para quantificação da viabilidade celular. Os biofilmes de *P. aeruginosa* foram inibidos pela presença da molécula (E)-1-(3-hidroxinaftalen-2-il)-3-fenilprop-2-en-1-ona (11), mostrando redução de 48,8% na biomassa e 60,2% na viabilidade. A redução máxima na biomassa atingiu 70,9%. Já para o tratamento de biofilmes pré-estabelecidos, a molécula (1E,4E)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona (10) mostrou redução de 53,5% na biomassa do biofilme de *P. aeruginosa*. Na formação do biofilme de *S. mutans*, a presença da molécula (1E, 4E)-1,5-bis(4-bromofenil)penta-1,4-dien-3-ona (15) reduziu a biomassa em 67,4%. Em concentrações elevadas essa redução chegou a 95,1%. Em biofilmes pré-estabelecidos de *S. mutans*, o tratamento com a molécula (2E,4E)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona (12) reduziu a biomassa celular em 62,7%, e a viabilidade celular em 58,4%. Já a molécula (E)-3-(2-hidroxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (21), quando utilizada no tratamento de biofilmes pré-estabelecidos, mostrou redução de 26,4% na biomassa e 91,6% na viabilidade de *S. mutans*; além de evidenciar danos à estrutura celular do microrganismo. Todas as moléculas supracitadas promoveram redução na espessura dos biofilmes. Os antibióticos ampicilina e polimixina foram menos eficientes na remoção de biofilmes comparativamente às moléculas testadas. As moléculas não apresentaram CIM nas concentrações testadas para nenhuma das bactérias, porém pôde-se verificar que estas afetaram a viabilidade celular. O

tratamento da superfície de poliestireno com as chalconas não impediu a adesão das bactérias, e resultou na redução da hidrofobicidade do material. A superfície celular de *S. mutans* apresentou predomínio de cargas negativas e forte caráter hidrofóbico enquanto que *P. aeruginosa* apresentou baixa hidrofobicidade além de caráter básico. Os resultados evidenciam a potencialidade do uso das chalconas e seus derivados para o controle e erradicação de biofilmes *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: biofilmes, *P. aeruginosa*, *S. mutans*, chalconas

Abstract

Biofilms constitute a growth mode which allows greatest survival and resistance of microorganisms to antibiotics and disinfectants. Despite the wide availability of antimicrobial agents in the market, there are few specific and effective products to the eradication / inhibition of biofilms. Thus, there is a great interest in the search of molecules able to inhibit biofilms or remove them once established. Diseases such as cystic fibrosis (*P. aeruginosa*) and dental caries (*S. mutans*), are intrinsically linked to the formation of biofilms. The aim of this study was to evaluate the potential of chalcones and their synthetic derivatives to the control and eradication of biofilms. The chalcones were tested for the ability to inhibit biofilm formation and also to remove pre-established biofilms. Initially, a screening of 21 molecules was performed using the crystal violet technique for quantification of biomass and resazurin for quantification of cell viability. Biofilms of *P. aeruginosa* was inhibited by the presence of the molecule (E) -1- (3-hydroxynaphthalen-2-yl) -3-phenylprop-2-en-1-one (**11**) showing reduction of 48.8% biomass and 60.2% viability. The maximum reduction in biomass reached 70.9%. For the treatment of pre-established biofilms, the molecule (1E, 4E) -1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-one (**10**) showed a 53.5% reduction in biomass of *P. aeruginosa* biofilm. Biofilms of *S. mutans*, growing in the the presence of the molecule (1E, 4E) -1,5-bis (4-bromophenyl) penta-1,4-dien-3-one (**15**) showed a biomass reduction of 67.4 %. At higher concentrations this reduction reached 95.1%. In pre-established biofilms of *S. mutans*, treatment with the molecule (2E, 4E) -1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-one (**12**) reduced cell biomass in 62.7%, and cell viability by 58.4%. The molecule (E) -3- (2-hydroxyphenyl) -1-phenylprop-2-en-1-one (**21**), when used in the treatment of pre-established biofilms, showed 26.4% reduction in biomass and 91.6% in the viability of *S. mutans*; furthermore, the chalcone **21** caused damage to the cellular structure of the microorganism. All the aforementioned molecules promoted a reduction in the thickness of biofilms. The antibiotics polymyxin and ampicillin were less efficient on removing biofilms comparatively to the chalcones. The molecules did not present MIC at the concentrations tested for any of the bacteria, but it was verified that these affected the cellular viability. The molecules affected cell viability however, no MIC was

observed under the range of concentrations evaluated. The treatment of the polystyrene surface with chalcones did not prevent bacterial adhesion moreover, hydrophobicity of the material was reduced. *S. mutans* cell surface showed a predominance of negative charges and strong hydrophobic character while *P. aeruginosa* showed low hydrophobicity and basic character. The results demonstrate that synthetic chalcones and derivatives are potential candidates to the control and eradication of *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.

Key-words: biofilms, *P. aeruginosa*, *S. mutans*, chalcones

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
	2.1 Características dos Biofilmes	17
	2.2 Biofilmes – Formação	19
	2.3 Mecanismos de resistência em biofilmes	21
	2.4 Chalconas	22
	2.5 Mecanismos de ação anti-biofilme	24
	2.6 Métodos de avaliação da ação anti-biofilme	25
	2.7 Microrganismos	27
	2.7.1 Streptococcus mutans	27
	2.7.2 Pseudomonas aeruginosa	28
3	OBJETIVOS.....	30
	3.1 Geral	30
	3.2 Específicos.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
	4.1 Microrganismos.....	31
	4.2 Meios de cultivo	31
	4.3 Chalconas e derivados.....	31
	4.4 Formação biofilme.....	35
	4.4.1 Preparo das culturas e condições de cultivo.....	35
	4.4.2 Ação sobre a formação de biofilmes.....	36
	4.4.3 Ação sobre biofilmes pré-formados	36
	4.5 Quantificação dos biofilmes	36
	4.5.1 Biomassa celular.....	36
	4.5.2 Viabilidade das células	37
	4.6 Efeito da concentração das moléculas na atividade anti-biofilme	37
	4.6.1 Curvas de crescimento	38
	4.7 Atividade anti-adesiva	38
	4.8 Determinação da hidrofobicidade do biofilme e do poliestireno tratado	38
	4.9 Determinação da hidrofobicidade celular (células planctônicas).....	39
	4.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	39
	4.11 Microscopia confocal.....	40

4.12	Análise estatística	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
5.1	Efeito das moléculas na formação de biofilmes e em biofilmes pré-formados.....	41
5.1.1	Triagem inicial na formação e remoção de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
5.1.2	Triagem inicial na formação e remoção de biofilme de <i>Streptococcus mutans</i>	47
5.1.3	Considerações sobre a triagem inicial	50
5.2	Efeito da concentração das moléculas sobre os biofilmes	51
5.2.1	Efeito da variação de concentração das moléculas na atividade antibiofilme frente à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
5.2.2	Efeito da variação de concentração das chalconas na atividade antibiofilme frente à <i>S. mutans</i>	57
5.2.3	Considerações sobre o efeito da concentração das moléculas no biofilme	62
5.3	Atividade anti-adesiva do poliestireno tratado com as chalconas e seus derivados	63
5.4	Determinação da hidrofobicidade do biofilme e do poliestireno tratado com as chalconas e seus derivados	65
5.5	Determinação da hidrofobicidade celular	68
5.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	69
5.6.1	Microscopia de <i>P. aeruginosa</i>	70
5.6.2	Microscopia de <i>S. mutans</i>	71
5.7	Microscopia Confocal	76
5.7.1	Microscopia Confocal para <i>P. aeruginosa</i>	76
5.7.2	Microscopia Confocal para <i>S. mutans</i>	78
5.8	Principais resultados	80
6	CONCLUSÕES.....	81
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	82
8	REFERÊNCIAS	83

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Moléculas utilizadas no projeto	32
Tabela 2 - Percentual de redução da biomassa total e viabilidade celular de <i>P. aeruginosa</i>	46
Tabela 3 - Percentual de redução da biomassa total e viabilidade celular de <i>S. mutans</i>	50
Tabela 4 - Efeito da concentração da molécula 11 na inibição da formação de biofilme de <i>P. aeruginosa</i>	53
Tabela 5 - Efeito da concentração da molécula 10 na remoção de biofilme de <i>P. aeruginosa</i>	55
Tabela 6 - Efeito da concentração da molécula 15 na formação de biofilme de <i>S. mutans</i>	58
Tabela 7 - Efeito da concentração das moléculas 12 e 21 na remoção de biofilme de <i>S. mutans</i>	62
Tabela 8 - Ângulo de contato das diversas superfícies tratadas com as moléculas..	66
Tabela 9 - Teste de adesão microbiana à solventes.	68
Tabela 10 - Espessura dos biofilmes de <i>P. aeruginosa</i>	78
Tabela 11 - Espessura dos biofilmes de <i>S. mutans</i>	79

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação das etapas de formação de biofilme em uma superfície. Bactéria na forma planctônica (livre) em contato inicial (1), adesão inicial (2), crescimento e divisão das microcolônias (3), biofilme maduro (4), desprendimento de célula.....	20
Figura 2 - Estrutura básica de uma chalcona.....	22
Figura 3 - Micrografia eletrônica de <i>Streptococcus mutans</i>	28
Figura 4 - Micrografia eletrônica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
Figura 5 - Quantificação da massa total dos biofilmes formados por <i>P. aeruginosa</i> em superfícies de poliestireno na presença das chalconas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).	42
Figura 6 - Viabilidade celular nos biofilmes formados por <i>P. aeruginosa</i> em superfícies de poliestireno na presença das chalconas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).	43
Figura 7 - Quantificação da massa de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> pré-estabelecido em superfície de poliestireno, após tratamento com chalconas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).	44
Figura 8 - Viabilidade celular de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> pré-estabelecido em superfície de poliestireno após tratamento com chalconas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).	45
Figura 9 - Quantificação da massa total dos biofilmes formados por <i>S. mutans</i> em superfícies de poliestireno na presença das chalconas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).	47
Figura 10 - Viabilidade celular nos biofilmes formados por <i>S. mutans</i> em superfícies de poliestireno na presença das chalconas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).....	48
Figura 11 - Quantificação da massa de biofilme de <i>S. mutans</i> pré-estabelecido em superfície de poliestireno após tratamento com chalconas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).	48
Figura 12 - Viabilidade celular de biofilme de <i>S. mutans</i> pré-estabelecido em superfície de poliestireno após tratamento com chalconas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).	49
Figura 13 - Percentual de redução da formação do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> na presença de diferentes concentrações da molécula 11.	52

Figura 14 - Cinética de crescimento celular de <i>P. aeruginosa</i> na presença da molécula 11.....	53
Figura 15 - Percentual de remoção do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> na presença de diferentes concentrações da molécula 10.	54
Figura 16 - Cinética de crescimento celular de <i>P. aeruginosa</i> na presença da molécula 10.....	55
Figura 17 - Percentual de redução da formação do biofilme de <i>S. mutans</i> na presença de diferentes concentrações da molécula 15.	57
Figura 18 - Cinética de crescimento celular de <i>S. mutans</i> na presença da molécula 15.	58
Figura 19 - Efeito da concentração da molécula 12 na remoção de biofilme de <i>S. mutans</i>	59
Figura 20 - Cinética de crescimento celular de <i>S. mutans</i> na presença da molécula 12.	59
Figura 21 - Efeito da concentração da molécula 21 na remoção de biofilme de <i>S. mutans</i>	60
Figura 22 - Cinética de crescimento celular de <i>S. mutans</i> na presença da molécula 21.	61
Figura 23 - Cinética de adesão para <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. mutans</i> em poliestireno	64
Figura 24 - Placa de poliestireno utilizada nos ensaios do ângulo de contato.	65
Figura 25 - Placa de poliestireno utilizada na MEV.	70
Figura 26 - MEV do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> formado na ausência (a) e na presença da molécula 11 na concentração de 500 μ M (b).....	70
Figura 27 - MEV do biofilme pré-formado de <i>P. aeruginosa</i> sem tratamento (a) e após tratamento com a molécula 10 na concentração de 500 μ M (b).....	71
Figura 28 - MEV do biofilme de <i>S. mutans</i> formado na ausência (a) e na presença da molécula 15 na concentração de 500 μ M (b).	72
Figura 29 - MEV do biofilme pré-formado de <i>S. mutans</i> sem tratamento (a) e após tratamento com a molécula 12 na concentração de 500 μ M (b). Aumento de 2000X(acima) e aumento de 10000X(abaixo).	73
Figura 30 - Imagens de MEV de células do biofilme de <i>S. mutans</i> estabelecido em superfície de poliestireno. a) Controle e b) biofilme após tratamento com molécula 21 na concentração de 500 μ M (aumento 40.000X) c) células de <i>S. mutans</i> apresentando alterações morfológicas indicadas pelas setas em vermelho (aumento 80.000X).....	74
Figura 31 - Molécula utilizada por WALLOCK-RICHARDS et al. (2015) para inibição da formação de biofilme de <i>S. mutans</i>	75
Figura 32 - Estrutura da molécula 21.	76
Figura 33 - Microscopia confocal do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> formado na ausência (a) e na presença da molécula 11 na concentração de 500 μ M (b).	77
Figura 34 - Microscopia confocal do biofilme de <i>S. mutans</i> estabelecido em superfície de poliestireno. a) Controle e b) biofilme após tratamento com molécula 12 na concentração de 500 μ M.	77

Figura 35 - Microscopia confocal do biofilme de <i>S. mutans</i> formado na ausência (a) e na presença da molécula 15 na concentração de 500 μ M (b).....	78
Figura 36 - Microscopia confocal do biofilme de <i>S. mutans</i> estabelecido em superfície de poliestireno. a) Controle e b) biofilme após tratamento com molécula 12 na concentração de 500 μ M e c) biofilme após tratamento com a molécula 21 na concentração de 500 μ M.....	79

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se hoje que a maioria dos microrganismos, em especial as bactérias, são encontrados fixados à superfícies, em comunidades complexas denominadas biofilmes. Quando associados à biofilmes, os microrganismos apresentam maior resistência à agentes antimicrobianos, desinfetantes e sistemas de defesa do hospedeiro se comparados à células livres (planctônicas), devido principalmente à presença da matriz polimérica que confere maior proteção as células microbianas (BRIDIER et al., 2011).

Na medicina, estima-se que os biofilmes estejam envolvidos em 65% dos casos de infecções humanas de origem bacteriana. Além disso, doenças como a fibrose cística (*Pseudomonas aeruginosa*) e a cárie dentária (*Streptococcus mutans*) estão diretamente relacionadas à formação de biofilmes (HALL-STOODLEY et al., 2004).

Desta forma, é fácil imaginar que muitos dos problemas de contaminação na indústria; bem como dos problemas de infecções bacterianas, são causadas por biofilmes que podem estar aderidos à superfícies bióticas e abióticas (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010).

Sendo assim, fazem-se necessários métodos de controle de infecções que levem em consideração o fato de que as bactérias vivem nessas comunidades. Esses métodos podem incluir tratamento de superfícies para dificultar o contato inicial das bactérias, assim como também o tratamento de biofilmes já instalados; suprimindo ou mitigando o poder de infecção das espécies em questão.

Apesar da diversidade de agentes antimicrobianos disponíveis no mercado, há uma grande escassez de agentes considerados efetivos na erradicação de biofilmes. Além disso, a maioria dos antibióticos interfere no crescimento microbiano, o que leva ao surgimento de linhagens multirresistentes e de difícil tratamento.

Neste contexto, as chalconas naturais e seus derivados sintéticos se mostraram promissores como compostos protótipos visando o controle de biofilmes. Em estudo recente, chalconas e flavonas foram apontadas como moléculas com

potencial atividade anti-biofilme, através de estudos de modelagem *in silico* (MANNER et al., 2013). À partir destas considerações este projeto propõe avaliar o potencial de chalconas sintéticas e derivados no controle de biofilmes das bactérias *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características dos Biofilmes

Há muito tempo sabe-se que microrganismos como as bactérias podem aderir à superfícies sólidas formando complexo sistema microbiológico. Os biofilmes bacterianos são predominantes na maioria das superfícies úmidas na natureza. Em 1674, Anton van Leeuwenhoek observou sua própria placa dentária e descreveu uma comunidade de “animáculos” (COSTERTON et al., 1999). Entretanto, mais de 60 anos após o primeiro artigo descrevendo um biofilme propriamente dito; estes representam uma preocupação constante, mais especificamente nas áreas de alimentos, ambiental e médica (MAUKONEN et al., 2003).

A maior parte do conhecimento sobre biofilmes foi obtida somente nos últimos 30 anos. O desenvolvimento de técnicas espectroscópicas mais modernas e com maior poder de resolução, custos mais baixos dessas técnicas e a enorme capacidade de geração e tratamento de dados por computadores mais eficientes, revolucionaram o estudo da microbiologia (MEDINI et al., 2008).

As bactérias possuem praticamente dois modos de vida: a forma planctônica ou livre e a forma sésil, na qual estão aderidas umas às outras e também à uma superfície sólida (MEHOTRA, 2007). Biofilme é um termo utilizado para descrever a forma sésil dos microrganismos, ou seja; quando estes estão fixos a uma superfície na forma de agregados multicelulares e envoltos por uma matriz polimérica (DONLAN, 2002).

Essa vida em comunidade é muito vantajosa, já que os microrganismos estão menos suscetíveis a fatores externos como desidratação, radiação UV, variação de temperatura, variação de pH, variação osmótica, fagocitose, antibióticos e agentes antimicrobianos (HALL-STOODLEY et al., 2004).

A matriz do biofilme é composta de aproximadamente 97% de água (SUTHERLAND, 2001). Essa característica permite a difusão de diversos outros componentes do biofilme como polissacarídeos, nutrientes, células, metabólitos, produtos de lise celular e detritos circundantes do ambiente. Assim, podem ser observadas dentro de um biofilme todas as classes de macromoléculas:

carboidratos, proteínas, ácidos nucléicos e lipídeos (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Os biofilmes são estruturas de características espaciais e metabólicas peculiares. Dentre os principais fatores envolvidos na formação de um biofilme podem-se considerar: as características físico-químicas da superfície e do microrganismo, a expressão de certas proteínas (adesinas), a sinalização celular, fatores de virulência como produção de cápsulas e fímbrias e a produção de polissacarídeos pelos microrganismos (SIMÕES et al., 2010).

Essas comunidades microbianas podem ser constituídas por múltiplas espécies ou por apenas uma espécie de microrganismo. Nos casos de infecções patológicas ao homem, por vezes um biofilme multi-espécie apresenta um sinergismo que reflete tanto na distribuição bacteriana aderida no biofilme quanto na quantidade de biomassa produzida. Essas interações entre diferentes bactérias na comunidade podem afetar tanto a fisiologia como o próprio ambiente físico da bactéria, levando a um aumento da resistência e virulência bacteriana e mudança na degradação e geração de substratos. Assim, não são quaisquer espécies bacterianas que podem conviver num mesmo biofilme, ou seja; tanto a competição por nutrientes quanto o acúmulo de produtos tóxicos excretados por uma determinada espécie podem limitar a diversidade de microrganismos em um biofilme (RENDUELES; GHIGO, 2012). É muito comum ainda que nos biofilmes sejam encontrados também outros tipos de microrganismos, como fungos e algas; principalmente em ambientes mais úmidos (PALMER, 1997).

De fato, a grande capacidade de adaptação, a alta taxa de reprodução e a capacidade de produção de substâncias extracelulares fazem das bactérias os organismos com grande capacidade de produção de biofilmes (SUTHERLAND, 2001).

O principal componente dos biofilmes são exopolissacarídeos (EPS) produzidos pelas bactérias. Essas substâncias variam muito na sua composição e, portanto; nas suas características físico-químicas. Algumas dessas macromoléculas são neutras, mas a maioria são polianiónicas devido à presença de ácidos urônicos, sendo o ácido D-glucourônico o mais comum; embora também sejam encontrados os ácidos D-galactourônico e D-manourônico. Resíduos inorgânicos como fosfato ou

raramente sulfato, podem também conferir ao EPS caráter aniônico (SUTHERLAND, 1990). Ainda, de acordo com (DONLAN, 2008), bactérias Gram-negativas apresentam exopolissacarídeos neutros ou aniônicos. Essa característica permite que se associem cátions divalentes de cálcio e magnésio, permitindo a formação de ligações cruzadas com o polímero e consequente aumento da força de ligação; conferindo ao biofilme maior rigidez. Já no caso de bactérias Gram-positivas, esses exopolissacarídeos podem ter caráter catiônico.

2.2 Biofilmes – Formação

Os biofilmes são sistemas heterogêneos, tanto química como fisiologicamente, pois o modo de difusão do oxigênio, água e nutrientes gera um gradiente de concentração desses componentes. Assim, as bactérias se adaptam às condições físico-químicas e nutricionais impostas pelo biofilme (STEWART, 2008).

Bactérias se comunicam através de um mecanismo chamado *quorum sensing*. Esta habilidade se dá através da produção, secreção e detecção de moléculas sinalizadoras chamadas de autoindutores. A concentração dessas moléculas torna-se então dependente da quantidade de células e, quando atingem uma concentração limite; a população como um todo responde coordenadamente, podendo modular uma série de comportamentos fenotípicos que dependem da população como um todo. Isso pode significar a produção de exopolissacarídeos, a produção de biossurfactantes, esporulação, produção de antibióticos, expressão de genes de virulência entre outros. Assim, o *quorum sensing* é um mecanismo fortemente ligado à colonização bacteriana e consequente formação de biofilme (NADELL, 2008).

Outra característica importante quando se trata de biofilmes, é que eles podem ser considerados sistemas auto-regulatórios. À medida em que vão crescendo, partes vão se desprendendo para colonizar novas superfícies e novas células podem se fixar ao biofilme original (HOOD, 1995).

Muitas teorias têm sido propostas com relação à dinâmica de formação de um biofilme, porém algumas etapas fundamentais são concordantes em todas elas (Figura1): contato, adesão, formação de micro-colônias, maturação e desprendimento; sendo que estas etapas são dependentes da influência do meio

ambiente e das características genéticas das bactérias envolvidas (STOODLEY et al., 2002).

A primeira etapa é chamada fase de contato ou adesão reversível. Nesta etapa, os microrganismos denominados colonizadores primários utilizam uma variedade de organelas extracelulares e proteínas para detecção e fixação de superfícies; incluindo pili, flagelos, fímbrias e proteínas de membrana chamadas adesinas. Na segunda etapa, também chamada de adesão irreversível; essas bactérias iniciam a adesão entre si e à superfície, que geralmente está imersa ou em contato com fluidos contendo eletrólitos e macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, ácidos húmicos, entre outros). Na terceira etapa, as células passam a se desenvolver e originar microcolônias, as quais sintetizam os exopolissacarídeos que formam a matriz polimérica extracelular (MPE); que passa a atuar como substrato para a adesão de microrganismos secundários (RENNER, 2011). Os colonizadores secundários podem aderir diretamente aos primários ou promover a formação de co-agregados com outros microrganismos (SUTHERLAND, 2001). Na quarta etapa o biofilme cresce tridimensionalmente, replicando as células e produzindo mais EPS; o que confere maior resistência física ao biofilme. É chamado de biofilme “maduro”. Na quinta etapa, o biofilme pode desprender e algumas células planctônicas colonizam outras superfícies (STOODLEY, 2004). Assim, os biofilmes compreendem um processo de transição de uma forma livre planctônica, onde os microrganismos comportam-se de forma independente; para uma forma de vida sésil, onde vivem em uma comunidade multicelular (MOLOBELA; LLUNGA, 2011).

Em relação à topografia, as bactérias formam microcolônias dispostas em pilares, compostas por uma camada com cerca de 10 µm de espessura, podendo se estender em até 200 µm acima da superfície. A forma de crescimento em pilares favorece a fisiologia do biofilme como um todo, pois os pilares de biofilmes apresentam canais por onde a água transporta os nutrientes para as células e também os resíduos que delas saem, constituindo um tipo de sistema circulatório simples (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Figura 1 - Representação das etapas de formação de biofilme em uma superfície. Bactéria na forma planctônica (livre) em contato inicial (1), adesão inicial (2),

crescimento e divisão das microcolônias (3), biofilme maduro (4), desprendimento de célula.

Fonte – Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Nat Rev Microbiol. 2004; 2(2):95. [PubMed:15040259]

2.3 Mecanismos de resistência em biofilmes

Bactérias são seres hábeis em se adaptar às condições ambientais. Esse fato tornou possível a elas se estabelecerem em quase todos os habitats na biosfera, incluindo os seres humanos. Para sobreviver às condições diversas e variações do ambiente externo, as células desenvolveram mecanismos de fixação às superfícies e a convivência em comunidade; incluindo os biofilmes (RENNER, 2011). Desta forma, as comunidades microbianas ficam protegidas de predadores e do sistema imunológico, dividem certas funções específicas entre as espécies, possuem uma barreira estrutural contra estímulos físicos e mecânicos e promovem a conservação do genótipo. De fato, essas comunidades são persistentes e de difícil remoção uma vez formados, o que torna o biofilme um mecanismo de resistência que atrai esforços para sua compreensão nos campos da medicina, odontologia, ecologia, agricultura e processamento industrial (DUNNE, 2002).

É importante salientar que alguns biofilmes são benéficos para os humanos, pois têm impacto direto na fisiologia do corpo humano. Entretanto, são conhecidas hoje muitas patologias às quais o biofilme bacteriano está diretamente ligado. Ainda, a fixação de bactérias em dispositivos médicos, como por exemplo, implantes cirúrgicos, cateteres ou lentes de contato; resultam em um foco para infecções clínicas e o desenvolvimento de diversas enfermidades (BRYERS, 2008).

A capacidade de formar biofilmes é considerada um fator de virulência que está diretamente relacionado à resistência das bactérias; pois se tornam menos suscetíveis a tratamentos com antibióticos e outros agentes antimicrobianos, em relação às células planctônicas (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007). Além disso, as células aderidas dispõem de um sistema de defesa coletivo (originada da comunidade microbiana) contra fatores antagonicos.

O mecanismo de resistência aos biofilmes não é ainda totalmente compreendido, entretanto; estudos mais recentes têm utilizado vários sistemas modelo para elucidar como e por que os biofilmes são resistentes à agentes antimicrobianos. Vale enfatizar que existem vários mecanismos, os quais variam com a espécie de bactéria presente no biofilme e o agente antimicrobiano aplicado. Estes mecanismos incluem barreiras físicas e químicas de difusão do antimicrobiano no biofilme, crescimento lento do biofilme devido à limitação de nutrientes e adaptação genética (O'TOOLE; THIEN-FAH; 2001).

2.4 Chalconas

As chalconas (Figura 2) são um grupo de substâncias naturais chamadas de cetonas α , β -insaturadas, precursoras da biossíntese dos flavonóides e isoflavonóides. São largamente encontradas em frutos, folhas, raízes de vegetais e pétalas de flores. Possuem dois grupamentos aromáticos, um ligado à carbonila outro ligado à porção olefínica, comumente designados como anel A e anel B, provenientes da reação de condensação aldólica (NOWAKOWSKA, 2007).

Figura 2 - Estrutura básica de uma chalcona

Fonte: NOWAKOWSKA, 2007

A existência de um grupo cetona α,β -insaturada é uma característica estrutural encontrada em um número muito grande de compostos biologicamente ativos. Assim, derivados de chalconas tanto de origem natural como sintética; podem exibir diversas propriedades farmacológicas como: antitumoral, anticancerígena, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antioxidante e inibidor da topoisomerase (SUWITO et al., 2014). Sendo assim, reações de substituição no anel A e/ou B podem resultar em compostos com propriedades totalmente distintas. Portanto, as propriedades e possíveis efeitos desses substituintes têm despertado grande interesse em estudos de atividade biológica (CHIRADIA et al., 2008).

Existem inúmeros relatos na literatura acerca da atividade antimicrobiana das chalconas (NOWAKOWSKA, 2007; TRAN et al., 2012; SAHU et al., 2012), muitos envolvendo microrganismos capazes de formar biofilme (SIVAKUMAR et al., 2010). Entretanto, poucos trabalhos exploram de fato sua ação anti-biofilme. Como exemplo, YANTI & HWANG (2010) relataram que a chalcona panduratina A foi eficaz como agente antibiofilme eliminando a colonização inicial das bactérias formadoras de placa dentária *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces viscosus*. A di-hidro chalcona denominada floretina, encontrada em maçãs e morangos, foi capaz de inibir a formação de biofilmes do patógeno alimentar *Escherichia coli* O157:H7 sem entretanto, afetar o crescimento da bactéria (LEE et al., 2011).

BOŽIĆ et al. (2014) testaram a ação de 3 chalconas sintéticas sobre 19 cepas isoladas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e uma cepa de controle ATCC 43300. Foi investigado o sinergismo dessas chalconas com antibióticos β -lactâmicos: cefotaxima, ceftriaxona; e com os antibióticos não β -lactâmicos: ciprofloxacino, gentamicina e trimetropina/sulfametoxazol. Como resultado, todas as chalconas testadas exibiram significativa ação antimicrobiana. Além disso, foi evidenciado sinergismo com todos os antibióticos não β -lactâmicos testados.

Em outro trabalho relacionado à atividade de chalconas no controle do crescimento microbiano, estudos demonstraram que a inclusão de grupos carboxila na posição 4 do anel A em lugar da hidroxila aumentou a solubilidade em água (NIELSEN et al., 2004) e a inclusão do grupamentos mais ácidos como 3,5-dibromo e 3,5-di (trifluorometil) aumentaram a atividade da chalcona frente a bactéria Gram

positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. AVILA et al. (2008) avaliaram a ação antimicrobiana de 31 chalconas substituídas frente a *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e concluíram que a presença de hidroxilação do anel A na posição 2 assim como presença substituinte oxigenado na posição 4 além de grupo isoprenóide na posição 3 favorecia a ação. No anel B a presença de hidroxila na posição 4 também promoveu maior atividade. Vale ressaltar que os autores observaram ação antimicrobiana significativa apenas frente às bactérias Gram positivas. A ação antibacteriana de flavonoides em geral é alvo de muitos trabalhos na literatura e os possíveis mecanismos de ação foram revisados por CUSHNIE; LAMB (2011).

Em relação à ação anti-biofilme das chalconas, MANNER et al. (2013a) relataram que chalconas que apresentaram hidroxila na posição 2 e 4 do anel A reduziram a formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus* quando adicionadas ao meio de cultura; os autores atribuíram estes efeitos à ação antimicrobiana já previamente relatada. Na posição 4 do anel B a hidroxilação e metoxilação também parecem estar relacionadas à ação anti-biofilme, mas sempre em conjunto com as alterações descritas para o anel A. Além de chalconas, outros produtos relacionados têm sido alvo de estudos visando o controle de biofilmes tais como flavonas e flavonóis; que demonstraram resultados promissores frente a biofilmes de *Staphylococcus aureus* (MANNER et al., 2013 a).

Recentemente 498 plantas asiáticas foram avaliadas quanto à capacidade de inibir biofilmes de *Staphylococcus aureus*. O estudo selecionou o extrato de *Alnus japonica* como o mais ativo sendo atribuída sua atividade anti-biofilme à presença de quercetina e ácido tânico (LEE et al., 2013).

2.5 Mecanismos de ação anti-biofilme

Os mecanismos envolvidos na inibição ou erradicação de biofilmes por moléculas ativas que não atuam sobre o crescimento microbiano propriamente dito, envolvem em geral um dos seguintes mecanismos (RENDUELES & GHIGO, 2012):

a) degradação de componentes da matriz polimérica: devido à ação de enzimas como proteases, carbohidrases e nucleases específicas aos componentes da MPE,

b) moléculas anti-adesivas: biossurfatantes, polissacarídeos e outras moléculas capazes de alterar a interação das células com a superfície,

c) inibição de moléculas regulatórias de *quorum sensing* envolvidas no estabelecimento de biofilmes,

d) inibição da síntese de fatores de virulência/adesão como pili, flagelos, adesinas e componentes do MPE.

A Apigenina (4,5,7-trihidroxiflavona) encontrada em frutas e vegetais e o α -farnesol (3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol), sesquiterpeno encontrado em óleos essenciais de frutas cítricas; foram capazes de inibir a formação de biofilme de *Streptococcus mutans* (KOO & JEON, 2009). O mecanismo de ação antibiofilme da apigenina envolve a inibição da enzima glicosiltransferase (responsável pela síntese de glucanas) presentes no EPS da bactéria e diretamente envolvidos na aderência e colonização da superfície dentária (KOO et al., 2002). A ação do farnesol está relacionada à alterações na permeabilidade da membrana devido à suas propriedades lipofílicas e, além disto; pode aumentar a permeabilidade a prótons gerando maior acidificação do citoplasma (KOO et al., 2005) e reduzindo a secreção de glucanas (KOO & JEON, 2009).

As catequinas presentes no extrato de *Combretum albiflorum* inibiram moléculas de *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 responsáveis por fatores de virulência associados à formação de biofilmes, resultando na redução da adesão bacteriana e formação de biofilmes (VANDEPUTTE et al., 2010). A di-hidro chalcona floretina reprimiu a expressão de diferentes genes envolvidos na virulência de *E. coli* 0157:H7 além de reduzir a produção de fímbrias, resultando na inibição da formação do biofilme (LEE et al., 2011).

2.6 Métodos de avaliação da ação anti-biofilme

Existem várias metodologias para análise de ação antimicrobiana de compostos frente às células planctônicas tais como difusão em ágar, difusão em disco, micro e macrodiluição. Entretanto, existem poucas tentativas de padronização de ensaios anti-biofilmes. Muitas metodologias são descritas na literatura e podem ser divididas em três grandes grupos (PEETERS et al., 2008):

- 1) quantificação da biomassa: quantificação da matriz, células totais (vivas e mortas),
- 2) quantificação da viabilidade: apenas células viáveis presentes,
- 3) quantificação da matriz: medida específica dos componentes do MPE.

Em relação à medida total de biomassa o ensaio mais utilizado é o cristal violeta (STEPANOVIC et al., 2000), um corante básico que se liga às moléculas negativamente carregadas na superfície da célula e nos polissacarídeos da matriz. Devido à facilidade de execução e custos reduzidos, este é um método muito utilizado. Porém como não diferencia células viáveis de células mortas, é em geral associado à outras metodologias.

Para quantificação da viabilidade celular são utilizados métodos como os sais de tetrazólio, tais como o XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida) que é reduzido ao composto corado formazan quando na presença de atividade enzimática no meio reacional (PEETERS et al., 2008). Outro ensaio de viabilidade envolve o corante redox resazurina (azul), também reduzido através de enzimas microbianas à sua forma resofurina (rosa) que é fluorescente (O'BRIEN ET AL., 2000). A transformação de (FDA) fluoresceína diacetato (não fluorescente) até fluoresceína (fluorescente), por esterases intracelulares; também é utilizado como método para determinar viabilidade em biofilmes (PRIETO et al., 2004).

Medidas para a quantificação da matriz envolvem o uso do corante DMMB (1,9 dimetil metilene blue), cujo princípio se baseia na formação de complexos insolúveis com polissacarídeos sulfatados da matriz polimérica do biofilme. Este teste foi adaptado para medida de biofilmes de *Staphylococcus aureus* (TOTÉ et al., 2007). Outro método utilizado é o WGA (Wheat germ agglutinin – Alexa flúor 488 conjugado), que se baseia na ligação específica da lectina conjugada e marcada com a N-acetilglicosamina presente nos biofilmes de algumas bactérias. O método proposto apresentou alta correlação com o método do cristal violeta para biofilmes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis* (BURTON et al., 2007). Devido à diversidade de metodologias disponíveis, a busca por moléculas com potencial atividade anti-biofilme deve envolver o uso combinado destas técnicas de

quantificação, permitindo assim maior abrangência na varredura (SKOGMAN et al., 2012) .

Paralelo aos testes de quantificação, técnicas de microscopia tais como microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (MFA), microscopia à laser confocal (MLC), microscopia confocal raman (MCR) e microscopia de (epi)fluorescência entre outras, são exemplos de técnicas utilizadas para avaliação dos biofilmes (PANTANELLA et al., 2013).

Visto que a adesão bacteriana é o primeiro estágio da formação de biofilmes, as moléculas capazes de impedir ou reduzir essa adesão podem, consequentemente; reduzir a formação de biofilmes e são comumente chamadas de moléculas anti-adesivas. O tratamento de superfícies com moléculas anti-adesivas antes da exposição do material aos microrganismos é a principal estratégia utilizada para avaliar esta atividade. O condicionamento de superfícies sólidas com moléculas tensoativas (GOMES & NITSCHKE, 2012), polissacarídeos (SAYEN et al., 2011), a incorporação de moléculas anti-adesivas na formulação de materiais (NOWATZKI et al., 2012), em tintas (SIVAKUMAR et al., 2010a) e filmes poliméricos (SIVAKUMAR et al., 2010b) são exemplos citados na literatura. Nestes casos, são utilizados para análise de superfícies métodos tais como ângulo de contato, hidrofobicidade celular, microscopia eletrônica de varredura e difração de raios-x; visando caracterizar a superfície do material antes e após o tratamento com as moléculas anti-adesivas de modo a elucidar os prováveis mecanismos envolvidos na redução da adesão.

2.7 Microrganismos

2.7.1 Streptococcus mutans

Streptococcus mutans é uma bactéria Gram-positiva com formato normalmente esférico ou oval, com diâmetro um pouco menor que 2 µm. Apresentam arranjo característico em cadeias, não formam endósporos e seu metabolismo é anaeróbio facultativo, com bom crescimento em ambiente com presença em torno de 5% de CO₂ na atmosfera de crescimento. São quimiorganotróficas fermentativas, onde carboidratos presentes no meio são fermentados produzindo principalmente ácido láctico. Sua temperatura comum de

crescimento é de 37°C e convivem como parasitas em homens e animais, sendo uma bactéria patogênica formadora de biofilme (RYAN; KLEINBERG, 1995).

A microbiota oral presente nos humanos representa um biofilme muito diversificado, visto que 25 espécies do gênero *Streptococcus* habitam esse biofilme. Nessa perspectiva, a bactéria *Streptococcus mutans* é a espécie mais fortemente associada à cárie dentária, e essa patologia está diretamente ligada ao fato de sua capacidade de adesão e formação de biofilme (NICOLAS; LAVOIE, 2011).

Figura 3 - Micrografia eletrônica de *Streptococcus mutans*.

FONTE: adaptado de KORMENDY; WAYMAN (1971)

2.7.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa com formato de bacilo reto ou levemente curvado, que se locomove por meio de flagelos. Seu comprimento varia entre 1,5 e 5 µm e não são formadoras de endósporos. São comumente encontradas em uma diversidade muito grande de ambientes como solo, água, plantas e animais. Crescem muito bem nos meios NA (*Nutrient Agar*) e TSYEA (*Tryptic Soy Yeast Extract Agar*) e seu metabolismo é estritamente aeróbio, exceto na presença de nitrato no meio e não são fermentativas. Sua temperatura ótima de crescimento varia de 30 à 37°C, mas pode crescer em temperaturas de até 44°C (POLLACK, 1995).

Biofilmes formados por *Pseudomonas aeruginosa* também têm sido extensivamente estudados devido à sua importância etiológica e o fato de facilmente

aderir às superfícies nas condições mais variadas. É o terceiro patógeno mais comum associado às infecções hospitalares, principalmente como patógeno oportunista. A fibrose cística é uma patologia que está intrinsicamente ligada à sua capacidade de colonizar superfícies e consequentemente se estabelecer formando biofilmes (KAYSER et al, 2005).

Figura 4 - Micrografia eletrônica de *Pseudomonas aeruginosa*.

FONTE: adaptado de MU et al, (2016)

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar a ação de chalconas e derivados sintéticos no controle de biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa*

3.2 Específicos

- Avaliar a atividade de chalconas e derivados sobre a formação e dispersão de biofilmes de *S. mutans* formados em superfícies de poliestireno
- Avaliar a atividade de chalconas e derivados sobre a formação e dispersão de biofilmes de *P. aeruginosa* formados em superfícies de poliestireno
- Determinar o efeito da concentração das moléculas na ação anti-biofilme
- Determinar a ação anti-adesiva e propriedades superficiais do poliestireno e biofilmes tratados com chalconas e derivados
- Relacionar a estrutura das moléculas testadas com a atividade anti-biofilme

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Como modelo de estudo foram selecionadas duas bactérias envolvidas na formação de biofilmes cujo controle é de grande importância. A bactéria Gram positiva *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e a bactéria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

4.2 Meios de cultivo

Para a bactéria *P. aeruginosa*, o meio sólido utilizado foi o AN (Ágar Nutriente) e o meio líquido foi o CN (Caldo Nutriente); ambos da Accumedica (VICKERY et al., 2009).

Para a bactéria *S. mutans*, o meio sólido utilizado foi o TSYEA (*Tryptic Soy Yeast Extract Agar*) e o meio líquido foi o TSYEBS (*Tryptic Soy Yeast Extract Broth – 0,5% sucrose*); ambos da HiMedia (NASSAR; LI; GREGORY, 2012).

4.3 Chalconas e derivados

As chalconas e derivados listadas na Tabela 2 foram fornecidas pelo grupo de Química Orgânica e Biocatálise – IQSC, dirigido pelo Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto; que tem como foco a triagem de enzimas de microrganismos marinhos visando reações de síntese orgânica. As chalconas sintéticas são utilizadas como ferramenta para identificação de enoato redutases através de reduções quimiosseletivas da ligação dupla C-C das chalconas. As moléculas foram obtidas pela reação mais simples e comum: a condensação de Claisen-Schmidt, em que um derivado escolhido da acetofenona reage com os aldeídos aromáticos apropriados, usando metanol ou etanol como solvente e hidróxido de sódio ou de potássio como catalisador (VOGEL, 2004). Essa metodologia é considerada muito simples e versátil, embora em alguns casos resulte em baixos rendimentos (GO; WU; LIU, 2005). Importante frisar que a massa molar de cada molécula foi corrigida segundo a pureza determinada através da técnica de cromatografia líquida.

Tabela 1 - Moléculas utilizadas no projeto

Código	Estrutura/Nome	Massa molar/pureza
1	3-(3-fluorofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona	242,07/91%
2	3-(4-fluorofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona	242,07/88%
3	3-(3-bromofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona	301,99/80%
4	3-(4-bromofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona	301,99/91%
5	(E)-3-(4-bromofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona	286,90/98%
6	1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona	254,09/96%
7	(E)-3-(4-fluorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona	226,09/95%

(E)-3-(3-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

(E)-3-(4-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

(1E,4E)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona

(E)-1-(3-hidroxinaftalen-2-il)-3-fenilprop-2-em-1-ona

(2E,4E)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona

(2E,4E)-5-fenil-1-(tiofen-2-il)penta-2,4-dien-1-ona

(2E, 4E)-5-fenil-1-(p-toluidil)penta-2,4-dien-1-ona

15		389,93/99,5%
	<i>(1E, 4E)-1,5-bis(4-bromofenil)penta-1,4-dien-3-ona</i>	
16		224,25/99%
	<i>2-fenilcroman-4-ona</i>	
17		254,28/99%
	<i>2-(4-metoxifenil)croman-4-ona</i>	
18		214,28/100%
	<i>(E)-3-fenil-1-(tiofen-3il)prop-2-en-1-ona</i>	
19		226,27/98%
	<i>2-fenilcroman-4-ol</i>	
20		330,22/90%
	<i>(E)-3-(2-(trifluor-metilfenil)-1-(2,4,5-trifluor-fenil)prop-2-en-1-ona</i>	
21		224,25/85%
	<i>(E)-3-(2-hidroxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona</i>	

4.4 Formação biofilme

4.4.1 Preparo das culturas e condições de cultivo

As culturas de *S. mutans* e *P. aeruginosa* foram mantidas em estoques à - 20°C e transferidas para placas contendo o respectivo meio sólido. Em seguida foram incubadas em estufa a 37°C por 24 h repetindo-se a incubação novamente por mais 24h. Posteriormente, nas placas foram adicionados 5 mL de solução salina (NaCl 0,86%) esterilizada e as colônias removidas com auxílio de alça de inoculação. A suspensão bacteriana obtida foi submetida a diluições sucessivas e o número de células viáveis foi determinado pelo método da gota. O número de células viáveis foi relacionado com a medida de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro UV-Vis (modelo Genesys 10UV da Thermo Scientific) à 610 nm visando padronizar o inóculo. A concentração celular foi ajustada para 10^8 UFC/mL estabelecendo-se a DO correspondente a este valor para proceder os testes de formação de biofilmes. Este procedimento foi realizado com cada uma das bactérias a serem testadas. A DO correspondente para *P. aeruginosa* foi de 0,25 e para *S. mutans* foi de 0,85.

Foi realizado um teste prévio com os microrganismos para saber qual seria concentração de DMSO utilizada para solubilizar as moléculas, visando usar uma concentração segura a ponto de não afetar o crescimento bacteriano. Assim, depois de padronizado os inóculos; estes foram crescidos em meio de cultura líquido com várias concentrações de DMSO e posteriormente realizada contagem para comparação com crescimento sem DMSO. Assim, a concentração que não afetou o crescimento das duas bactérias foi a de 1%. Portanto essa foi a concentração de DMSO final utilizada nos testes, sendo esse o controle de crescimento para comparação com o teste utilizando as moléculas.

A estratégia do estudo avaliou as moléculas em duas situações distintas:

- 1) efeito das moléculas na formação de biofilmes;
- 2) efeito das moléculas na destruição de biofilmes pré-formados.

As metodologias para formação de biofilme foram adaptadas segundo GOMES; NITSCHKE (2012).

4.4.2 Ação sobre a formação de biofilmes

As moléculas obtidas foram dissolvidas em DMSO (1%) e posteriormente no meio de cultura correspondente à cada bactéria, na concentração inicial de 500 μ M. Preencheu-se então os orifícios da microplaca com 180 μ L do respectivo caldo de cultivo contendo chalcona e 20 μ L de inóculo bacteriano, procedendo-se então a formação do biofilme em presença das moléculas no meio de cultura. Assim, após as 24h de incubação o meio foi removido e o biofilme lavado duas vezes com solução salina para posteriormente ser quantificado.

4.4.3 Ação sobre biofilmes pré-formados

O biofilme foi formado conforme descrito no item **4.4.2**. Após as 24 horas de crescimento o meio de cultura foi removido e o biofilme lavado duas vezes com solução salina para remover as células não aderidas. Posteriormente, foi adicionado à microplaca 200 μ L de caldo de cultivo contendo 500 μ M de cada molécula a ser testada e a placa foi incubada novamente por 24h à 37°C. Após o período de incubação o meio foi removido e lavado duas vezes com solução salina para posterior quantificação.

4.5 Quantificação dos biofilmes

4.5.1 Biomassa celular

Foi avaliada segundo metodologia descrita por MIRELES et al. (2001). O biofilme aderido foi fixado com 200 μ L de metanol por 15 minutos. Após esse tempo, o metanol foi retirado e os poços da microplaca preenchidos com 200 μ L de solução aquosa de cristal violeta 0,5%. Após duas lavagens com água destilada para remover o excesso de cristal violeta, o corante foi extraído com 200 μ L com ácido acético glacial (33%). Procedeu-se então a leitura da densidade ótica da solução a 630nm em leitora automática de microplacas (Enspire 2300 – Perkin Elmer). A quantidade de biofilme foi comparada com ensaio controle sem adição das moléculas, controle contendo DMSO 1% além de controle positivo com antibiótico: Polimixina B (INLAB) para *P. aeruginosa* e Ampicilina (Sigma-Aldrich) para *S. mutans*. A concentração de cada antibiótico utilizada também foi de 500 μ M. Foram então obtidos gráficos de barras expressos em DO (Densidade Óptica).

4.5.2 Viabilidade das células

Para a quantificação das células viáveis no biofilme foi utilizado o ensaio do corante redox resazurina (Sigma-Aldrich) como indicador da atividade metabólica segundo metodologia descrita por SANDBERG et al. (2009). Após crescimento do biofilme (ou tratamento para remoção) os orifícios da microplaca foram lavados com água destilada para remoção de células não aderentes e adicionados de 190 μL de água destilada e 10 μL de solução de resazurina ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$). A placa foi incubada no escuro por 30 minutos à 37°C . A leitura da fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}}$: 570 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$: 590 nm) foi realizada em leitora automática de microplacas comparando-se com controle sem adição de moléculas, controle contendo DMSO 1% e controle positivo (antibiótico). Assim, pode-se obter gráficos de barras expressos em RFU (*Reference Fluorescence Unit*).

4.6 Efeito da concentração das moléculas na atividade anti-biofilme

O ensaio do efeito da concentração foi realizado apenas para as chalconas e derivados que apresentaram redução de biomassa e/ou viabilidade celular nos ensaios de formação e/ou remoção de biofilmes (adaptado de BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2012). A partir do ensaio inicial de triagem, as moléculas que apresentaram maior atividade foram avaliadas em diferentes concentrações. A solução inicial de 2000 μM foi diluída sucessivamente em microplaca de poliestireno variando-se a concentração de 2000 μM até 15,6 μM . Após 24h de incubação à 37°C foi realizada a leitura e determinada a concentração mínima necessária para inibir/remover os biofilmes através da técnica do cristal violeta. Este dado foi também comparado com a CIM necessária para inibir as células planctônicas.

A CIM de células planctônicas foi realizada do mesmo modo, ou seja; variando-se a concentração de cada chalcona de 2000 μM até 15,6 μM . Porém, após as 24h de incubação a 37°C , foi feita leitura visual para determinar se houve crescimento celular. O controle positivo dos ensaios foi realizado com cada respectivo antibiótico à partir da concentração de 500 μM .

Os ensaios para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das chalconas e derivados foram adaptados segundo metodologia estabelecida pelo Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI M7-A6 2005.

4.6.1 Curvas de crescimento

Para avaliar o efeito da concentração das chalconas no crescimento celular, foi realizada cinética de viabilidade variando-se a concentração de cada molécula que, na triagem inicial; apresentou redução da viabilidade. Assim, em uma microplaca diluiu-se a chalcona variando sua concentração de 2000 μM até 15,6 μM . Após inoculação da microplaca, essa foi coberta com um filme de poliéster esterilizado (Platemax), o qual permitiu incubar a microplaca na própria leitora e fazer leituras sucessivas variando-se o tempo de 0 à 24h, com intervalo de 1 hora entre cada leitura. Assim, pôde-se construir um gráfico de crescimento x tempo; o qual permitiu avaliar mais profundamente a influência das chalconas na morte celular observada nos ensaios com resazurina. (Adaptado de VERMA, 2007)

4.7 Atividade anti-adesiva

A presença de atividade anti-adesiva foi avaliada a partir do tratamento (condicionamento) prévio da superfície de poliestireno com as moléculas e posterior contato com suspensão das bactérias seguindo-se a metodologia descrita por SAITO et al. (2012). As moléculas selecionadas após a triagem inicial foram diluídas em etanol na concentração de 500 μL . Foram então adicionados 200 μL à microplaca e mantidas por aproximadamente 4h em câmara de fluxo laminar para evaporação do solvente. Suspensões de *P. aeruginosa* e *S. mutans* foram preparadas conforme padronização já descrita e adicionadas (200 μL) nos orifícios da microplaca previamente tratados com as chalconas, deixando-se em contato por 2 horas à 37 °C para ocorrer a adesão celular. O material foi então removido dos orifícios e estes lavados duas vezes com solução salina. As células aderidas foram quantificadas pela metodologia do cristal violeta. Como controle foram utilizados orifícios tratados previamente apenas com etanol puro (efeito residual do solvente) e também orifícios sem tratamento.

4.8 Determinação da hidrofobicidade do biofilme e do poliestireno tratado

Para evidenciar se as moléculas modificaram a hidrofobicidade do material (ensaio anti-adesivo) e dos biofilmes (ensaio de formação e remoção) foram realizadas medidas de ângulo de contato da água, no poliestireno condicionado com chalconas e nos biofilmes pré-estabelecidos (antes e após o tratamento). (Adaptação da técnica descrita por RODRIGUES et al. 2006). Neste caso, tanto o tratamento prévio do poliestireno com as moléculas quanto os ensaios com biofilmes

foram realizados em placas retangulares (40 mm X 20 mm) de poliestireno. O tratamento das placas de poliestireno com as chalconas foi realizado da mesma maneira como descrito no item **4.6**, ou seja; utilizando-se as chalconas em solução de etanol na concentração de 500 µM. Já os ensaios de formação e remoção de biofilmes, foram realizados como descrito nos itens **4.3.3** e **4.3.4**; porém nas placas de poliestireno retangulares. Após remoção do meio de cultura as placas foram lavadas duas vezes com solução salina (0,86%) para remover as células não aderidas e então foram levadas à estufa para secagem por 40 minutos (40°C). Assim, tanto para os biofilmes quanto para as placas tratadas com as chalconas, foram realizadas medidas do ângulo de contato da água em goniômetro (modelo CAM 200 - KSV- Finlândia) pela técnica da gota séssil utilizando gotas de 4,0 µL a 25°C. Os resultados foram expressos como a média de pelo menos nove gotas em três amostras de poliestireno.

4.9 Determinação da hidrofobicidade celular (células planctônicas)

Com o objetivo de caracterizar a natureza hidrofílica/ hidrofóbica da superfície celular das bactérias foi realizado teste de adesão a solventes (MATS), que consiste na avaliação da afinidade das células bacterianas a solventes polares e apolares (MEYLHEUC et al., 2001). Foram utilizados quatro solventes: clorofórmio (polar eceptor de elétrons), hexadecano (apolar), acetato de etila (polar e doador de elétrons) e decano (apolar). Aliquotas de 2,4 mL de suspensão bacteriana (10^9 UFC/mL em NaCl 0,86%) foram adicionadas de 0,4 mL de cada solvente. A mistura então foi submetida a agitador tipo vortex (modelo Vortex 1 – IKA) por 2 minutos e deixada em repouso por 15 minutos para separação de fases. A leitura de absorbância da fase aquosa foi realizada a 400 nm e a percentagem de células aderidas, calculada conforme a equação abaixo: $\% Adh = 1 - (A/A_0) \times 100$, onde A_0 = absorbância da suspensão bacteriana antes da mistura e A = absorbância da fase aquosa depois da mistura.

4.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para avaliar qualitativamente a arquitetura e a presença de MPE (SIMÕES et al., 2006) antes e após o tratamento com as chalconas, os biofilmes foram observados em microscópio eletrônico de varredura. Placas retangulares (5 mm X 5 mm) de poliestireno foram utilizadas para a formação e tratamento dos biofilmes pré-formados conforme metodologia descrita anteriormente no item **4.3.3** e **4.3.4**. As

placas contendo os biofilmes foram removidas do meio de cultivo, lavadas duas vezes com solução salina para remoção de células não aderidas e submetidas à desidratação com concentrações crescentes de etanol, 10%, 25%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90% e 95%; deixando os biofilmes por 15 minutos em cada solução. Em seguida as amostras foram mantidas em dessecador. As amostras foram então visualizadas após metalização com ouro em microscópio eletrônico modelo 440 LEO (Zeiss).

4.11 Microscopia confocal

Com o intuito de observar a arquitetura dos biofilmes e verificar possíveis diferenças entre os controles e os biofilmes tratados com chalconas, foi realizada análise por CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscopy*). Os controles e tratamentos de biofilmes, tanto na formação quanto remoção; foram feitos em placas retangulares de poliestireno do mesmo modo descrito no item 4.7. As medidas foram realizadas em duplicata.

Após as 24h horas de incubação, o biofilme foi retirado do meio de cultivo em câmara de fluxo laminar e lavado com 200 μ M de solução salina para remover as células não aderidas. Em seguida, em cada placa com biofilme foi adicionada 200 μ M de solução do corante preparado através do kit LIVE/DEAD *Biofilm Viability* (Thermofisher). Nessa solução preparada através do kit há uma mistura com dois marcadores: o marcador verde fluorescente SYTO 9 ($\lambda_{\text{excitação}}$ 480 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$: 500 nm) e o marcador vermelho fluorescente iodeto de propídeo ($\lambda_{\text{excitação}}$: 490 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$: 635 nm). O corante SYTO 9 marca todas as células bacterianas presentes no biofilme, tanto as viáveis como as não viáveis. Já o corante iodeto de propídeo, penetra apenas as bactérias cuja membrana celular está danificada (inviáveis), causando a redução do corante SYTO 9 quando ambos os corantes estão presentes. Assim, quando há uma mistura adequada dos dois marcadores, as bactérias que apresentam membrana celular intacta (viáveis) são marcadas em verde fluorescente, enquanto que as células que apresentam danos na membrana celular (não viáveis) são marcadas em vermelho fluorescente.

Após a adição do corante, o biofilme foi colocado em repouso na estufa à 37°C por 30 minutos no escuro. Em seguida, foram obtidas as imagens das amostras em microscópio invertido modelo LSM 780 (Zeiss), do Instituto de Física de

São Carlos da Universidade de São Paulo; microscópio obtido através do projeto FAPESP 2009/54035-4. A região espectral utilizada para o canal 1 (verde) foi de 499 nm à 602 nm e para o canal 2 (vermelho) foi de 605nm à 735 nm (metodologia adaptada de DRAGO et al. 2016).

4.12 Análise estatística

Os ensaios de formação e remoção de biofilmes em microplaca foram realizados em quintuplicata e expressos como a média de no mínimo três repetições independentes. Os dados obtidos foram comparados através de análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95% utilizando o software Origin 9.0 (*Origin Lab Corporation*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Efeito das moléculas na formação de biofilmes e em biofilmes pré-formados

A triagem inicial foi realizada com 21 moléculas de chalconas e seus derivados, as quais estão listadas na Tabela 2. A partir desta triagem preliminar, pretendeu-se escolher somente as moléculas que mostraram melhores resultados frente aos ensaios de formação e/ou remoção de biofilme, exibindo atividade na redução de biomassa e/ou na viabilidade celular; tornando possível que outros testes posteriores permitissem investigar mais com maior profundidade a ação das moléculas frente às bactérias selecionadas. Cada molécula recebeu um número para sua identificação, objetivando maior facilidade na sua identificação.

A seguir, são mostrados os resultados da triagem inicial com as 21 moléculas na concentração de 500 μ M, onde C representa o controle de crescimento na presença de DMSO, P representa o crescimento na presença do antibiótico polimixina B e A o crescimento na presença do antibiótico ampicilina. Os dados marcados com * foram os que mostraram diferença significativa em relação ao controle (ANOVA confiabilidade de 95%). Seja na formação ou remoção de biofilmes pré-formados, é importante lembrar que nesta fase inicial de triagem foram

consideradas aptas para a próxima fase somente moléculas que apresentaram resultado significativo em relação ao controle.

5.1.1 Triagem inicial na formação e remoção de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*

Como se pode observar na Figura 5, para a formação de biofilme de *P. aeruginosa* na presença das moléculas, os ensaios de quantificação da biomassa através da coloração do cristal violeta indicaram que os melhores resultados foram obtidos com as moléculas 10 e 11 e 12, onde a redução da biomassa total em relação ao controle foi de 54,4%, 48% e 71,1% respectivamente.

Figura 5 - Quantificação da massa total dos biofilmes formados por *P. aeruginosa* em superfícies de poliestireno na presença das moléculas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).

Figura 6 - Viabilidade celular nos biofilmes formados por *P. aeruginosa* em superfícies de poliestireno na presença das moléculas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).

Na Figura 6, o ensaio de formação de biofilmes para quantificação de células viáveis com a resazurina mostrou que o melhor resultado foi obtido com a molécula 11, indicando uma redução de células viáveis em relação ao controle de 60,2%.

Figura 7 - Quantificação da massa de biofilme de *P. aeruginosa* pré-estabelecido em superfície de poliestireno, após tratamento com as moléculas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).

Para os ensaios de remoção de biofilmes pré-formados de *P. aeruginosa*, observa-se na Figura 7 que os melhores resultados obtidos foram com as moléculas 2, 10 e 21, sendo que a redução de biomassa em relação ao controle foi de 34,4%, 53,5% e 35% respectivamente.

Figura 8 - Viabilidade celular de biofilme de *P. aeruginosa* pré-estabelecido em superfície de poliestireno após tratamento com as moléculas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).

Para os ensaios de remoção onde se avaliou a redução do número de células viáveis após tratamento do biofilme pré-formado com as moléculas; observou-se que o melhor resultado obtido foi com a molécula 4, indicando uma redução em relação ao controle de 39,3% (Figura 8).

Para melhor visualização dos resultados obtidos nos ensaios de triagem para *P. aeruginosa*, os dados obtidos foram expressos em termos de porcentagem e são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Percentual de redução da biomassa total e viabilidade celular de *P. aeruginosa*.

Moléculas	Formação		Remoção	
	Biomassa (%)	Viabilidade (%)	Biomassa (%)	Viabilidade (%)
1	10,6	-	12,8	15,4
2	24,8	-	34,4	0,3
3	4,3	-	-	5,9
4	28,5	-	7,1	39,3
5	4,7	-	4,5	12,9
6	9,8	-	-	0
7	-	-	10,9	5,1
8	34,2	-	11,4	-
9	26,3	-	-	-
10	54,4	3,1	53,5	9,7
11	48,9	60,2	-	9,7
12	71,1	3,6	12,2	-
13	45,5	3,0	15,5	12,3
14	51,3	1,1	11,8	12,6
15	1,0	5,0	9,0	-
16	-	1,3	27,7	-
17	18,6	7,5	7,1	-
18	26,6	-	13,5	-
19	16,6	5,7	-	12,5
20	17,2	0,2	3,0	14,3
21	16,0	9,6	35,0	4,4
Antibiótico	94,9	97,9	0,0	15,4

Assim, para os próximos ensaios foram selecionadas para o tratamento na formação de biofilmes as moléculas 11 e 12. A molécula 11 apresentou redução tanto na biomassa quanto na viabilidade do biofilme de *P. aeruginosa*. Já a molécula 12 apresentou boa redução somente na biomassa do biofilme.

Já para a remoção de biofilme, a quantificação de biomassa mostrou que a melhor atividade ocorreu com a molécula 10; e nos ensaios de viabilidade celular a molécula 4. Assim, estas foram selecionadas para as próximas etapas.

5.1.2 Triagem inicial na formação e remoção de biofilme de *Streptococcus mutans*

Os ensaios de formação de biofilmes de *S. mutans* na presença das moléculas (Figura 9), indicam que os melhores resultados foram obtidos com as moléculas 2 e 15; as quais apresentaram uma redução na biomassa total de 60% e 67,4% respectivamente.

Figura 9 - Quantificação da massa total dos biofilmes formados por *S. mutans* em superfícies de poliestireno na presença das moléculas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).

Para a quantificação de células viáveis no biofilme de *S. mutans*, o melhor resultado obtido foi com a molécula 2, como mostra o gráfico da Figura 10. A redução em relação ao controle foi de 77,2%.

Figura 10 - Viabilidade celular nos biofilmes formados por *S. mutans* em superfícies de poliestireno na presença das moléculas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).

Figura 11 - Quantificação da massa de biofilme de *S. mutans* pré-estabelecido em superfície de poliestireno após tratamento com as moléculas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).

Já para a remoção de biofilme, a Figura 11 mostra que os melhores resultados obtidos foram com as moléculas 11, 12 e 15; onde a redução da biomassa total em relação ao controle foi de 47%, 42,5% e 49%, respectivamente.

Figura 12 - Viabilidade celular de biofilme de *S. mutans* pré-estabelecido em superfície de poliestireno após tratamento com as moléculas. As barras de erro representam o desvio padrão. * redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (sem chalcona).

Para os ensaios de viabilidade celular dos biofilmes após tratamento com as moléculas (Figura 12) observa-se que os melhores resultados foram obtidos com as moléculas 11, 12 e 21. A redução em relação ao controle foi de 66,8%, 58,4 e 91,6% respectivamente.

Para melhor visualização dos resultados obtidos nos ensaios de triagem para *S. mutans*, os dados obtidos foram expressos em termos de porcentagem e são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Percentual de redução da biomassa total e viabilidade celular de *S. mutans*.

Moléculas	Formação		Remoção	
	Biomassa (%)	Viabilidade (%)	Biomassa (%)	Viabilidade (%)
1	-	4,8	-	6,1
2	60,0	77,2	-	3,7
3	-	10,4	7,1	-
4	22,1	13,2	4,4	3,5
5	26,3	46,7	-	30,4
6	11,3	57,4	-	7,9
7	26,1	-	-	58,8
8	0,0	-	-	66,3
9	-	6,2	-	62,3
10	-	12,9	-	25,9
11	6,0	58,5	47,0	66,8
12	-	52,4	42,5	58,4
13	-	0,8	-	-
14	5,9	-	43,3	-
15	67,4	-	49,0	-
16	5,1	9,7	16,2	-
17	-	-	20,5	9,1
18	13,7	13,3	36,7	-
19	18,1	8,1	31,2	6,3
20	38,4	-	37,2	18,9
21	-	26,4	26,4	91,6
Antibiótico	92,5	95,3	8,3	84,1

Para a próxima etapa, no tratamento da formação do biofilme de *S. mutans* foram escolhidas as moléculas 2 e 15. A molécula 2 apresentou, nos ensaios de formação, boa redução tanto na formação de biomassa quanto na viabilidade celular. Em relação ao controle de crescimento, essa redução foi de 60% e 77,2%, respectivamente. A molécula 15 apresentou redução somente na biomassa, a qual foi de 67,4%.

Já para os ensaios de remoção de biofilme, as moléculas 11, 12 e 21 apresentaram redução na biomassa celular cerca de 47%, 42,5% e 26,4%, respectivamente. Nos ensaios de viabilidade celular, essas mesmas moléculas apresentaram uma redução de 66,8%, 58,4% e 91,6%, respectivamente.

5.1.3 Considerações sobre a triagem inicial

Importante frisar que quanto à viabilidade celular nos ensaios de remoção de biofilme, quando comparadas aos antibióticos polimixina B e ampicilina; as

moléculas testadas mostraram menor efeito bactericida sobre as células no biofilme; exceto pela molécula 21 no ensaio de remoção de *S. mutans*. As moléculas escolhidas para a próxima etapa mostraram-se efetivas tanto reduzindo a formação do biofilme quanto na destruição do biofilme pré-formado. Mais especificamente nos ensaios sobre biofilmes pré-formados, observa-se que o antibiótico não mostrou o efeito de remoção comparativamente às moléculas testadas. É importante utilizar moléculas capazes de interferir na estabilidade do biofilme sem promover a morte celular do microrganismo, pois esta característica reduz a possibilidade do surgimento de resistência bacteriana (ROGERS et al., 2009).

5.2 Efeito da concentração das moléculas sobre os biofilmes

Primeiramente, as moléculas selecionadas para esta fase foram diluídas sucessivamente em microplaca a partir da concentração de 2000 μM até a concentração de 3,9 μM e posteriormente adicionado o inóculo. Após 24h de incubação a 37°C foi realizada leitura visual para determinação da CIM de cada molécula para cada respectiva bactéria testada e também seus respectivos antibióticos. A CIM de polimixina B encontrada para *P. aeruginosa* foi de 0,39 μM . Este valor está em concordância com o descrito na literatura, pois; segundo GALES et al (2001) a CIM para a cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa* é $< 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Já para a *S. mutans*, o valor de CIM para ampicilina foi de 0,49 μM em conformidade com CHA et al (2013) que descreveram que a CIM para a cepa 25175 de *S. mutans* é de 0,125 $\mu\text{g/mL}$. Tanto para *S. mutans* quanto para *P. aeruginosa*, não foi observada CIM para as 21 moléculas testadas. Embora não se tenha observado CIM, notou-se que algumas moléculas reduziram o crescimento das células planctônicas quando em presença dessas moléculas. Este dado sugere que provavelmente o mecanismo de ação antibiofilme das moléculas não esteja somente relacionado à ação antimicrobiana.

Para verificar o efeito da concentração das moléculas na formação e remoção do biofilme foram realizados os mesmos testes à partir da concentração de 2000 μM das moléculas que foram diluídas sucessivamente, porém visando a verificação da biomassa celular através da técnica do cristal violeta.

5.2.1 Efeito da variação de concentração das moléculas na atividade antibiofilme frente à *Pseudomonas aeruginosa*

Para *P. aeruginosa*, foram testadas as moléculas 11 e 12 na formação de biofilme e 4 e 10 na remoção de biofilme.

Figura 13 - Percentual de redução da formação do biofilme de *P. aeruginosa* na presença de diferentes concentrações da molécula 11.

A Figura 13 mostra que a molécula promoveu redução na formação de biomassa celular e seu efeito em geral aumentou de acordo com o aumento da concentração. À partir da concentração de 1000 μM houve redução do efeito possivelmente devido a saturação e insolubilidade da molécula no meio. REJINIEMON et al (2014), também testaram a ação antibiofilme e antimicrobiana de uma quinona, um metabólito extraído de uma planta medicinal chamada *Aegle marmelos*. As atividades foram testadas para as bactérias *E. coli*, *S. typhii* e *P. aeruginosa*. Além de mostrar efeito antibiofilme e antimicrobiano, os autores também verificaram que a ação antibiofilme é dependente da concentração, ou seja; aumentando-se a concentração da quinona de 2 à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o efeito antibiofilme também aumentou. VELOZ et al (2015) obtiveram um resultado semelhante, testando a ação antibiofilme de uma amostra de própolis. Sabe-se que a própolis é um composto com muitas moléculas bioativas como terpenos, flavonoides e polifenóis. Os autores evidenciaram inibição da formação do biofilme de *S. mutans*.

Tabela 4 - Efeito da concentração da molécula 11 na inibição da formação de biofilme de *P. aeruginosa*.

Concentração (μM)	Molécula 11
	Redução (%)
2000	51,2
1000	70,9
500	52,8
250	21,6
125	33,4
62,5	21,0
31,2	12,5
15,6	8,4
7,8	4,8
3,9	6,9

A Figura 14 mostra o crescimento celular de células planctônicas de *P. aeruginosa* na presença de diferentes concentrações da molécula 11.

Figura 14 - Cinética de crescimento celular de *P. aeruginosa* na presença da molécula 11.

Pode-se observar na Figura 14, que a viabilidade celular foi reduzida principalmente nas concentrações de entre 500 μM e 2000 μM . Assim, a redução da biomassa mostrada pela molécula 11 pode estar relacionada com a morte celular do microrganismo, o qual diminui a taxa de reprodução celular resultando em um biofilme menos denso tanto em número de células quanto em MPE. Porém, para a molécula 12, não foi observado efeito de redução da biomassa e da viabilidade dependente da concentração.

Figura 15 - Percentual de remoção do biofilme de *P. aeruginosa* na presença de diferentes concentrações da molécula 10.

A Figura 15 mostra que dentro de certo intervalo de concentrações, o efeito antibiofilme da molécula 10 mostrou ser dependente da concentração. Novamente, observa-se uma diminuição do efeito antibiofilme da molécula em maiores concentrações. Provavelmente, acima de 500 μM pode ocorrer redução da solubilidade da molécula, o que diminui o seu efeito na remoção do biofilme.

Tabela 5 - Efeito da concentração da molécula 10 na remoção de biofilme de *P. aeruginosa*.

Concentração (μM)	Molécula 10
	Redução (%)
2000	-
1000	40,1
500	51,2
250	24,5
125	25,0
62,5	7,1
31,2	-
15,6	-
7,8	-
3,9	-

Figura 16 - Cinética de crescimento celular de *P. aeruginosa* na presença da molécula 10.

Como mostrado na Figura 16, o crescimento celular também é afetado pela molécula 10. Porém no gráfico, é mostrada como concentração máxima a de 500

μM , já que as curvas para 1000 μM e 2000 μM foram omitidas porque apresentaram sinal de leitura mais alto que o controle provavelmente devido à insolubilidade da molécula 10 nessas concentrações. Inclusive por esse mesmo motivo é provável que em concentrações maiores que 500 μM , a molécula 10 não tenha apresentado maior efeito de remoção sobre o biofilme. Pela estrutura da molécula 10 não é surpreendente que esta apresente insolubilidade; já que não há nenhum substituinte presente nos anéis da molécula. Alguns autores, como JORNADA et al (2015); relataram que certos substituintes aumentam a solubilidade de chalconas. Contudo, nota-se pelo perfil das curvas que apesar de a DO final do controle ser praticamente a mesma do tratamento com a molécula 10; a curva do tratamento exibe um pico máximo mais baixo. Neste caso, é possível que a molécula 10 cause certo atraso na multiplicação celular das bactérias. Assim, uma hipótese é a de que com menos células presentes se forma menos MPE; justificando a remoção da biomassa verificada na triagem inicial. A molécula 10 pode também ter penetrado e agido diretamente na desestruturação da arquitetura do biofilme, causando rompimento de ligações e desprendimento celular; ocasionando assim a redução de biomassa.

Para a molécula 4, não foi observado efeito de redução da biomassa nem da viabilidade dependente da concentração.

Na Tabela 4 temos o resumo para os ensaios de formação de biofilmes de *P. aeruginosa* variando a concentração da molécula 11. Como o resultado obtido mostrou que o efeito de redução da biomassa é dependente da concentração, apenas a molécula 11 será utilizada para os próximos testes na formação do biofilme.

Para os ensaios de remoção de biofilme de *P. aeruginosa*, o resumo dos resultados obtidos com a molécula 10 foi mostrado na Tabela 5. Como se pode ver, a molécula 10 demonstrou boa correlação da concentração com a remoção de biofilme.

Assim, as moléculas 11(formação) e 10(remoção) foram escolhidas para a continuidade dos testes; na tentativa de elucidar quais os mecanismos presentes que justifiquem os resultados observados até aqui.

5.2.2 Efeito da variação de concentração das chalconas na atividade antibiofilme frente à *S. mutans*

Para *S. mutans*, foram testadas as moléculas 2 e 15 na formação e 11, 12 e 21 na remoção dos biofilmes.

Figura 17 - Percentual de redução da formação do biofilme de *S. mutans* na presença de diferentes concentrações da molécula 15.

Na Figura 17 observa-se a dependência direta entre concentração e efeito na redução da biomassa celular do biofilme de *S. mutans*. Nota-se que nas concentrações mais altas o percentual de redução após lavagem e coloração com cristal violeta aproximou-se de 100%. Para a viabilidade, o crescimento celular não foi afetado variando-se a concentração da molécula 15, como pode ser visto na Figura 18.

Figura 18 - Cinética de crescimento celular de *S. mutans* na presença da molécula 15.

Como se observa, nenhuma concentração utilizada da molécula 15 afetou significativamente o crescimento celular de *S. mutans*, apesar da presença de um átomo de bromo em cada anel em sua estrutura.

Tabela 6 - Efeito da concentração da molécula 15 na formação de biofilme de *S. mutans*.

Concentração (µM)	Molécula 15
	Redução (%)
2000	95,1
1000	94
500	77,8
250	71,9
125	65,8
62,5	24
31,2	12,8
15,6	29,8
7,8	16,7
3,9	6,8

Para a molécula 2, não foi observado efeito de redução da biomassa ou da viabilidade dependente da concentração.

Figura 19 - Efeito da concentração da molécula 12 na remoção de biofilme de *S. mutans*.

Figura 20 - Cinética de crescimento celular de *S. mutans* na presença da molécula 12.

Na Figura 19 pode-se ver a boa correlação que a molécula 12 mostrou entre variação da concentração e redução de biomassa celular. Entretanto, não foi observada alteração no crescimento celular com o aumento da concentração da molécula 12, como evidencia a Figura 20.

Como evidencia a Figura 20, o crescimento celular não é afetado pela presença da molécula 12. Assim, a hipótese mais clara é a de que a molécula 12 penetra no biofilme e causa desprendimento de biomassa; o que explicaria a redução observada tanto na viabilidade quanto na biomassa.

Figura 21 - Efeito da concentração da molécula 21 na remoção de biofilme de *S. mutans*.

A molécula 21 mostrou que sua ação sobre biofilmes pré-formados é dependente da concentração. Entretanto, observou-se na triagem inicial que ela apresentou bom efeito na viabilidade celular. Esta interferência na viabilidade foi também observada na curva de crescimento mostrada na Figura 22.

Figura 22 - Cinética de crescimento celular de *S. mutans* na presença da molécula 21.

A Figura 22 evidencia que as concentrações que mostraram maior efeito sobre o crescimento celular foram de 1000 μM e 500 μM . JIANG et al (2011) relataram alguns problemas com limite de detecção utilizando resazurina para biofilmes de duas espécies formados por *S. mutans* e *E. faecalis*. Segundo os autores, o limite de detecção foi observado entre 10^5 UFC/mL e 10^7 UFC/mL.

Assim, especificamente para a molécula 21, optou-se por realizar uma contagem no biofilme tratado e seu controle; a fim de realizar uma comparação para melhor quantificar a redução da viabilidade celular. Os resultados mostraram redução de 1 log, ou seja; o controle apresentou $3,2 \times 10^7$ UFC/mL e o biofilme tratado com a molécula 21 apresentou $2,6 \times 10^6$ UFC/mL.

Tabela 7 - Efeito da concentração das moléculas 12 e 21 na remoção de biofilme de *S. mutans*.

Concentração (µM)	Molécula 12	Molécula 21
	Redução (%)	Redução (%)
2000	62,7	47,5
1000	49,4	41,6
500	48,0	22,7
250	41,5	25,6
125	16,8	23,7
62,5	4,7	17,0
31,2	5,1	4,0
15,6	5,7	-
7,8	2,9	-
3,9	0,7	-

Na Tabela 6 é mostrado o resumo do desempenho da molécula 15 na formação do biofilme de *S. mutans*. Como evidenciado, a molécula 15 mostrou bom resultado e dependência da concentração assim, ela foi selecionada para a continuidade do trabalho.

Para a remoção do biofilme de *S. mutans*, os resultados obtidos variando a concentração das moléculas 12 e 21 estão resumidos na Tabela 7. Obteve-se bom resultado variando a concentração, confirmando os dados obtidos na triagem inicial. Assim, foram também selecionadas para dar continuidade aos próximos testes.

5.2.3 Considerações sobre o efeito da concentração das moléculas no biofilme

Até o momento, com as moléculas 11 para *P. aeruginosa* e 21 para *S. mutans*; a redução da biomassa parece estar acompanhada de interferência na viabilidade celular, como observado na Figura 14 e Figura 23 respectivamente. Semelhantemente, CHOI & LEE (2012) evidenciaram o efeito antibiofilme de um peptídeo chamado Pleurocidina, extraído da pele de peixes do gênero *Pleuronectes* com conhecida atividade antimicrobiana. Os autores verificaram também a existência de sinergismo entre o antibiótico ampicilina e a Pleurocidina frente a várias bactérias como *E. coli*, *S. aureus*, *P. acnes*, *P. aeruginosa* e *E. coli* O157: H7.

Através da técnica de citometria de fluxo, os autores mostraram que quando os compostos são usados em conjunto, aumentam a quantidade de radical hidroxila formado; o qual é conhecido por ser danoso à membrana celular dos microrganismos causando stress oxidativo. Assim, os danos aos microrganismos prejudicam a produção de MPE e consequentemente resultam em prejuízo à formação do biofilme.

A molécula 15 parece inibir a produção de MPE por *S. mutans*. KUNTHALERT et al (2014) também obtiveram um resultado semelhante, porém utilizando uma chalcona sintética chamada 3-hydroxichalcona (Figura 19) para inibir a formação de biofilme de *Haemophilus influenzae*. Através de uma curva de crescimento, os autores verificaram que a chalcona não causava efeito sobre a viabilidade celular, mas reduzia a formação de biofilme, evidenciada através da técnica de cristal violeta e por MEV. Assim, os autores sugeriram que a 3-hidroxicalcona afetava a expressão de algum fator de virulência do microrganismo. Através da comparação de vários análogos com diferentes substituintes, os autores concluíram que uma hidroxila na posição 3 do anel B da chalcona foi crucial para a atividade antibiofilme demonstrada.

A molécula 12 também parece não influenciar a viabilidade celular de *S. mutans* como mostra a Figura 21; sugerindo a hipótese de que a molécula penetra no biofilme pré-formado e desestabiliza sua arquitetura. Além disso, o efeito das moléculas selecionadas para a próxima fase demonstra ser concentração-dependente. Assim, seria uma boa estratégia a utilização das moléculas em conjunto com um antibiótico; já que o combate ao biofilme atuaria em duas frentes distintas: o antibiótico agindo na morte celular e as moléculas na sua capacidade de prejudicar o estabelecimento de biofilmes e também a remoção de biofilmes já estabelecidos.

5.3 Atividade anti-adesiva do poliestireno tratado com as chalconas e seus derivados

Inicialmente foi feita uma cinética para se chegar ao tempo adequado de contato entre a célula e o poliestireno, mostrada na Figura 23. Como já nas primeiras 2 horas houve células aderidas, esse foi o tempo de contato escolhido para os testes. Ainda, para garantir que haveria células viáveis, após 2 horas de

contato foi realizada uma contagem para se certificar da presença de células viáveis aderidas ao poliestireno. A contagem mostrou uma concentração de $4,9 \times 10^7$ UFC/mL para *P. aeruginosa* e $1,2 \times 10^7$ UFC/mL para *S. mutans*.

Figura 23 - Cinética de adesão para *P. aeruginosa* e *S. mutans* em poliestireno.

A curva obtida evidencia a diferença de adesão variando-se o tempo de contato. O tempo de 2 h foi também utilizado por outros autores visando estudo de atividade anti-adesiva para *P. aeruginosa* (ZERAUK & NITSCHKE, 2012).

A atividade anti-adesiva das moléculas foi avaliada, sendo que nenhuma das 21 moléculas testadas mostrou atividade. Sabe-se que bactérias como *P. aeruginosa* exibem preferencia em aderir à superfícies hidrofóbicas como poliestireno em comparação à superfícies mais hidrofílicas como o vidro (ZAMEER et al, 2012).

A adesão inicial é muito importante no processo de formação do biofilme e está dividida em dois processos: adesão reversível e adesão irreversível. Na adesão reversível o microrganismo pode ser facilmente removido (KUMAR; ANAND, 1998). A aproximação nessa fase ocorre a distâncias um pouco maiores que 50 nm e nela atuam apenas forças fracas de interação entre a célula e a superfície, como forças de Van der Waals e interações eletrostáticas, ou seja; são interações de longo alcance. Já na adesão irreversível, a aproximação ocorre à distâncias de 20 nm, onde ocorrem também interações de curto alcance como

ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, forças dipolo-dipolo, ligações iônicas e covalentes (PALMER; FLINT; BROOKS, 2007; DE ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013). Assim, as propriedades físico-químicas da superfície celular do microrganismo e da superfície do material são muito importantes nesta etapa; como também a disponibilidade de nutrientes (HOOD; ZOTTOLA, 1995).

Para explicar a ausência de ação anti-adesiva procedeu-se o ensaios de hidrofobicidade da superfície do poliestireno e dos biofilmes; além do estudo das características físico-químicas da superfície celular.

5.4 Determinação da hidrofobicidade do biofilme e do poliestireno tratado com as chalconas e seus derivados

Placas de poliestireno como as mostradas abaixo na Figura 24 foram utilizadas para as medidas de ângulo de contato.

Figura 24 - Placa de poliestireno utilizada nos ensaios do ângulo de contato.

Para *P. aeruginosa* as moléculas escolhidas para continuidade dos estudos foram a 10 e a 11. Já para *S. mutans*, foram as moléculas 12, 15 e 21. Assim medidas do ângulo de contato foram realizadas em placas de poliestireno sem tratamento e placas também tratadas com as moléculas selecionadas. Também foram feitas medidas em placas contendo biofilmes sem tratamento; de placas contendo biofilme formado na presença das moléculas (formação) e placas contendo biofilme tratado (remoção). Os dados do ângulo de contato estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8 - Ângulo de contato das diversas superfícies tratadas com as moléculas

Superfície	Ângulo de contato em graus
Poliestireno	84,98 ± 0,08
Biofilme de <i>S. mutans</i> em poliestireno	< 10
Biofilme de <i>P. aeruginosa</i> em poliestireno	< 10
Poliestireno tratado com molécula 10	38,73 ± 0,13
Poliestireno tratado com molécula 11	57,52 ± 0,05
Poliestireno tratado com molécula 15	61,49 ± 0,13
Poliestireno tratado com molécula 12	64,2 ± 0,11
Poliestireno tratado com molécula 21	66,75 ± 0,10
Biofilme de <i>P. aeruginosa</i> formado com molécula 11	< 10
Biofilme de <i>P. aeruginosa</i> tratado com molécula 10	< 10
Biofilme de <i>S. mutans</i> tratado com molécula 21	< 10
Biofilme de <i>S. mutans</i> tratado com molécula 12	<10
Biofilme de <i>S. mutans</i> formado com molécula 15	< 10

Segundo VOGLER (1998), medidas de ângulo de contato entre água e superfície são consideradas hidrofílicas se esse ângulo for menor que 65° e hidrofóbicas se for maior que 65°. Como se pode observar nos dados obtidos, todos os biofilmes; tanto o controle como os biofilmes formados e tratados com as respectivas moléculas; são muito hidrofílicos. Isso é evidenciado pelo ângulo de contato menor que 10° em todos eles. Sendo assim, evidencia-se que a presença das moléculas utilizadas não alterou a característica dos biofilmes em relação à sua hidrofobicidade.

Já para a superfície do poliestireno, inicialmente pode-se notar que sua característica é hidrofóbica, com ângulo de contato superior a 65°. Entretanto, todas as placas tratadas com as moléculas mostraram redução de sua hidrofobicidade, algumas inclusive mostrando ângulo de contato abaixo dos 65°; permitindo serem

caracterizados como superfície hidrofílica, ou seja, a presença das moléculas modificou a característica do material.

Mesmo que a hidrofobicidade tenha sido reduzida com o tratamento prévio; uma hipótese é que o condicionamento com as moléculas atrasou a adesão reversível das moléculas, mas não impediu que ela ocorresse. Assim é possível que, mesmo que com dificuldade; os microrganismos testados conseguiram chegar à fase de adesão irreversível.

Sabe-se também que as chalconas e seus derivados são em sua maioria hidrofóbicas, apesar da possibilidade de inserção de grupos hidrofílicos nas moléculas. Assim, o revestimento do poliestireno com esses compostos pode não ter modificado suficientemente o caráter hidrofóbico da superfície para que impedisse a adesão.

O tratamento da superfície com as moléculas não impediu a adesão inicial das células. Porém, sabe-se que após a adesão irreversível, a capacidade de formação do biofilme depende do microrganismo produzir EPS. O EPS possui polímeros adesivos; e provavelmente a interação entre esses polímeros adesivos e a superfície tenha sido prejudicada pelo tratamento com as moléculas; mas não impediu por completo o estabelecimento do biofilme.

Segundo, MAYER et al (1999), algumas das principais forças físico-químicas de coesão que podem conectar as cadeias poliméricas da matriz do biofilme são: interações eletrostáticas de cadeias poliméricas de cargas opostas, interações eletrostáticas entre contra-íons ligados às cadeias poliméricas, entrelaçamento físico dos polímeros, ligações covalentes e ligações de hidrogênio. Ainda, segundo CHEN & STEWART (2002) essas forças são muito importantes para o desenvolvimento de estratégias de ação antibiofilme, principalmente quando o objetivo é destruir o biofilme sem interferir na viabilidade celular.

Nesse sentido, ALVES et al (2012) investigaram 4 substâncias naturais: farnesol, xilitol, lactoferrina e ácido salicílico. No estudo, evidenciaram que uma combinação específica das substâncias foi eficaz em remover biofilmes de *E. faecalis* e *S. epidermidis*.

Então uma hipótese é que o tratamento do poliestireno com as moléculas não impede a adesão celular inicial, mas os ensaios que utilizam chalconas na formação do biofilme podem dificultar a formação da MPE. Na remoção de biofilmes a hipótese é a mesma: as chalconas penetram no biofilme já estabelecido e perturbam sua estrutura; tornando-os mais “frouxos” e consequentemente fazendo com que se desintegrem parcialmente.

5.5 Determinação da hidrofobicidade celular

O teste MATS é baseado na comparação entre a afinidade da célula microbiana por um solvente polar e a afinidade por um solvente apolar. Nesse teste, a afinidade celular do microrganismo é considerada a somatória entre interações eletrostáticas, interações ácido-base de Lewis e interações de Van der Waals (PALMER; FLINT; BROOKS, 2007). Assim, podem-se obter as propriedades hidrofóbicas e ácido-base da superfície celular dos microrganismos utilizados.

Se a afinidade pelo solvente acceptor de elétrons for maior que pelo solvente apolar, a superfície apresenta características básicas. Caso a afinidade seja maior pelo solvente doador de elétrons que pelo solvente apolar, então a superfície apresenta características ácidas. Além disso, quanto maior for a afinidade da célula pelo solvente apolar, maior será a hidrofobicidade de sua superfície (PROKOPOVICH; PERNI, 2009). No caso do presente trabalho, a comparação foi realizada entre os pares acetato de etila e decano; e clorofórmio e hexadecano. Os dados obtidos são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Teste de adesão microbiana à solventes.

	Acetato de etila (%)	Clorofórmio (%)	Hexadecano (%)	Decano (%)
<i>P. aeruginosa</i>	11,4 ± 0,03	69,7 ± 0,01	16,1 ± 0,02	30,1 ± 0,06
<i>S. mutans</i>	13,6 ± 0,03	85,7 ± 0,002	96,8 ± 0,005	93,3 ± 0,005

A bactéria *P. aeruginosa* apresentou maior afinidade pelo clorofórmio do que pelo hexadecano, sugerindo que sua superfície celular tem predominância de caráter básico, ou seja; o predomínio de cargas negativas. Também demonstrou baixa afinidade pelo acetato de etila ou seja, fraco caráter ácido. Além disso, é

possível observar baixa interação com os solventes apolares; exibindo fraca hidrofobicidade.

Já a bactéria *S. mutans*, apresentou alta afinidade pelo clorofórmio, sugerindo que sua superfície celular tem predominância de cargas negativas. Também demonstrou alta afinidade pelos solventes apolares, permitindo serem caracterizadas como fortemente hidrofóbicas.

Considerando que o tratamento com as moléculas reduziu a hidrofobicidade do material (Tabela 8) mas não impediu a adesão das bactérias, pode-se inferir que as características superficiais das células (carga negativa e caráter hidrofóbico) foram suficientes para permitir a aproximação e a adesão ao material tratado. Entretanto a redução da hidrofobicidade pode interferir nas interações hidrofóbicas, que são importantes na interação célula-superfície e assim retardar o estabelecimento do biofilme. KWIECINSKI et al (2016) mostraram que o tratamento da superfície de poliestireno com plasminogênio tecidual resultou no atraso do estabelecimento de biofilme de *S. aureus* por até 32 horas.

A atividade anti-biofilme observada neste trabalho não foi associada diretamente à ação anti-adesiva, mas pode estar também relacionada ao retardamento da adesão celular e consequente redução da biomassa.

5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com o intuito de observar como as moléculas utilizadas interferiram na estrutura física do biofilme de *S. mutans* e *P. aeruginosa*, foi utilizada a técnica de MEV dos biofilmes formados e tratados com as moléculas selecionadas assim como também dos seus respectivos controles. Para esta técnica, os biofilmes foram formados em placas de poliestireno (10 mm x 10 mm) como mostrado na Figura 25.

Figura 25 - Placa de poliestireno utilizada na MEV.

5.6.1 Microscopia de *P. aeruginosa*

Abaixo na Figura 26, é mostrada a microscopia do biofilme de *P. aeruginosa* formado na presença da molécula 11.

Figura 26 - MEV do biofilme de *P. aeruginosa* formado na ausência (a) e na presença da molécula 11 na concentração de 500 μ M (b). Aumento de 10.000X.

(a)

(b)

Nota-se que o biofilme formado em presença da molécula 11 (b) possui menor quantidade de MPE que o biofilme controle (a); conseqüentemente há também menor número de células aderidas. Estes fatos justificam os resultados obtidos na triagem inicial, onde foi evidenciada uma redução na biomassa de 48,9% e uma redução na viabilidade de 60,2%. Assim, o observado na microscopia sugere

que a molécula 11 interfere nos mecanismos de estabelecimento do biofilme de *P. aeruginosa*, provavelmente interferindo na viabilidade celular e consequente produção de MPE.

Figura 27 - MEV do biofilme pré-formado de *P. aeruginosa* sem tratamento (a) e após tratamento com a molécula 10 na concentração de 500 μ M (b). Aumento de 10.000X.

Na Figura 27 também se evidencia uma redução significativa do MPE, tornando o biofilme mais fino e também com cavidades, ou seja; a molécula 10 de fato promoveu a remoção física de parte do biofilme. A microscopia também confirma os resultados da triagem inicial, onde a molécula 10 removeu 53,5% da biomassa em relação ao controle.

5.6.2 Microscopia de *S. mutans*

Abaixo na Figura 28 é mostrada a microscopia eletrônica do biofilme de *S. mutans* formado na presença da molécula 15.

Figura 28 - MEV do biofilme de *S. mutans* formado na ausência (a) e na presença da molécula 15 na concentração de 500 μ M (b). Aumento de 10.000X.

Observa-se no controle (a) um biofilme espesso que foi inibido significativamente na presença da molécula 15 (b). Neste caso não é clara a presença de MPE se comparado ao ensaio de *P. aeruginosa* (Figura 26 e 27). A molécula 15 reduziu a biomassa total em 67,4% nos ensaios de triagem o que pode ser evidenciado na Figura 28.

A atividade da molécula 15 pode estar relacionada à inibição tanto do crescimento como na expressão de proteínas relacionadas à formação de biofilmes (BOŽIĆ et al., 2014). Como não foi evidenciada ação anti-adesiva para nenhuma molécula testada, é possível que ocorra também um retardamento na maturação do biofilme resultando em menor quantidade de MPE.

Figura 29 - MEV do biofilme pré-formado de *S. mutans* sem tratamento (a) e após tratamento com a molécula 12 na concentração de 500 μ M (b). Aumento de 2000X(acima) e aumento de 10000X(abaixo).

O perfil mostrado na Figura 29 corrobora com o evidenciado na triagem inicial, onde a molécula 12 reduziu a biomassa total em 42,5% no protocolo de remoção. É clara a redução de MPE e consequentemente das células viáveis. A redução de viabilidade na triagem inicial foi de 58,4%.

Abaixo na Figura 30 é mostrada a MEV do controle de remoção e seu tratamento utilizando a molécula 21. Para a molécula 21, vale lembrar que a triagem inicial mostrou um perfil curioso: uma redução da biomassa total de apenas 26,4%, mas uma redução de viabilidade celular de 91,6%.

Figura 30 - Imagens de MEV de células do biofilme de *S. mutans* estabelecido em superfície de poliestireno. a) Controle com aumento de 2000X (acima) e 10000X (abaixo). b) biofilme após tratamento com molécula 21 na concentração de 500 μ M com aumento de 2000X (acima) e 10000X (abaixo). c) células de *S. mutans* apresentando alterações morfológicas indicadas pelas setas em vermelho (aumento 80.000X).

Na Figura 30 observa-se também redução de biomassa total, entretanto a molécula 21 mostrou na triagem inicial grande redução na viabilidade celular. Assim, decidiu-se investigar as células de *S. mutans* para verificar possíveis danos que a molécula 21 possa ter causado à estrutura celular do microrganismo. Para isso, observaram-se as células em maior aumento.

Como se pode ver, a membrana celular do microrganismo parece não estar totalmente íntegra. Esse fato pode ser mais bem constatado na Figura 30 (c).

Em um estudo recente, WALLOCK-RICHARDS et al. (2015) mostraram que a formação de biofilme de *S. mutans* foi inibida utilizando uma chalcona natural. A molécula utilizada no estudo é mostrada abaixo na Figura 31.

Figura 31 - Molécula utilizada por WALLOCK-RICHARDS et al. (2015) para inibição da formação de biofilme de *S. mutans*.

FONTE: WALLOCK-RICHARDS et al. (2015)

Neste estudo, os autores obtiveram bons dados referentes à redução da biomassa celular do biofilme de *S. mutans* utilizando a chalcona em questão. Posteriormente, dados de espectrometria de massa evidenciaram uma interação da chalcona com a enzima Sortase A, a qual era inibida por um aduto de Michael formado entre uma região da chalcona e uma região da enzima.

No caso da molécula 21, há grande semelhança estrutural com a trans-chalcona (Figura 32). As imagens obtidas na MEV sugerem fortemente que a diminuição da biomassa se deve à danos na parede celular do microrganismo, ou seja, é possível que ocorra mecanismo semelhante ao descrito por WALLOCK-RICHARDS et al. (2015).

Figura 32 - Estrutura da molécula 21.

5.7 Microscopia Confocal

A microscopia confocal foi realizada com o intuito de ilustrar a ação das moléculas em termos de arquitetura do biofilme e viabilidade celular. Assim, foi possível principalmente observar como o tratamento com as moléculas na concentração de 500 μM afetou a viabilidade celular presente no biofilme. Também foi possível evidenciar as diferenças entre a espessura do biofilme.

5.7.1 Microscopia Confocal para *P. aeruginosa*

A Figura 33 evidencia e confirma o que foi observado na triagem inicial e na MEV. Além do fato de haver mais células mortas no biofilme formado na presença da molécula 11, esse biofilme também apresentou menor espessura em relação ao controle; o que pode ser visto na Tabela 10.

Figura 33 - Microscopia confocal do biofilme de *P. aeruginosa* formado na ausência (a) e na presença da molécula 11 na concentração de 500 μ M (b).

Na Figura 34 também se pode observar a presença de mais células mortas em relação ao controle. Como a principal ação da molécula 10 foi a de remover o biofilme, também se evidencia aqui um perfil menos espesso que o controle. A espessura pode ser comparada abaixo na Tabela 10.

Figura 34 - Microscopia confocal do biofilme de *P. aeruginosa* estabelecido em superfície de poliestireno. a) Controle e b) biofilme após tratamento com molécula 10 na concentração de 500 μ M.

Tabela 10 - Espessura dos biofilmes de *P. aeruginosa*.

Biofilme de <i>P. aeruginosa</i>	Espessura média (μm)
Controle de formação	45,7
Formação na presença da molécula 11	33,7
Controle de remoção	54
Tratamento com a molécula 10	42

5.7.2 Microscopia Confocal para *S. mutans*

A microscopia confocal observada na Figura 35 também confirma o que foi obtido com a molécula 15 para a formação do biofilme de *S. mutans*. Há menor quantidade de MPE no biofilme formado com a molécula 15 (b) do que seu controle sem tratamento (a). Os dados de espessura estão na Tabela 11.

Figura 35 - Microscopia confocal do biofilme de *S. mutans* formado na ausência (a) e na presença da molécula 15 na concentração de 500 μM (b).

Na Figura 36 é mostrado o controle sem tratamento (a), o biofilme tratado com a molécula 12(b) e o biofilme tratado com a molécula 21 (c). O biofilme tratado com a molécula 12 mostra cavidades presentes, o que resulta num biofilme menos denso e com menor número de células viáveis; o que mais uma vez justifica os resultados obtidos na triagem inicial e na MEV. Já o biofilme tratado com a molécula 21 mostra um perfil onde há um número grande células mortas, o que também foi observado na triagem inicial e posteriormente na MEV; que mostrou danos à integridade celular do microrganismo.

Figura 36 - Microscopia confocal do biofilme de *S. mutans* estabelecido em superfície de poliestireno. a) Controle e b) biofilme após tratamento com molécula 12 na concentração de 500 μM e c) biofilme após tratamento com a molécula 21 na concentração de 500 μM

Tabela 11 - Espessura dos biofilmes de *S. mutans*.

Biofilme de <i>S. mutans</i>	Espessura média (μm)
Controle de formação	60,4
Formação na presença da molécula 15	39,5
Controle de remoção	57
Tratamento com a molécula 12	45,2
Tratamento com a molécula 21	44,1

5.8 Principais resultados

- Os biofilmes formados por *P. aeruginosa* foram inibidos pela presença da molécula 11, resultando na redução de 48,8% de biomassa e 60,2% de viabilidade. Em concentrações superiores, a redução da biomassa chegou a 70,9%.
- No tratamento de biofilmes pré-estabelecidos, a molécula 10 mostrou redução de 53,5% de biomassa do biofilme de *P. aeruginosa*.
- Na formação do biofilme de *S. mutans*, a presença da molécula 15 reduziu a biomassa em 67,4%. Em concentrações superiores essa redução chegou a 95,1%.
- Em biofilmes pré-estabelecidos de *S. mutans*, o tratamento com a molécula 12 reduziu a biomassa celular em 42,5%, e a viabilidade celular em 58,4%. Em maiores concentrações a redução da biomassa foi de 62,7%.
- A molécula 21, no tratamento de biofilmes pré-estabelecidos, mostrou redução de 26,4% da biomassa e 91,6% da viabilidade de *S. mutans*.
- Os antibióticos removeram menor quantidade de biofilmes comparativamente às moléculas testadas.
- As moléculas não apresentaram CIM frente às linhagens de bactérias até a concentração máxima de 2000 μM
- As chalconas não apresentaram atividade anti-adesiva.
- O tratamento de poliestireno com as chalconas resultou na redução da hidrofobicidade do material.
- A superfície celular de *S. mutans* mostrou a presença de cargas negativas e forte caráter hidrofóbico. Já *P. aeruginosa* mostrou também a presença de cargas negativas, porém baixa hidrofobicidade.

6 CONCLUSÕES

O trabalho realizado permitiu selecionar chalconas sintéticas com potencial para o controle e erradicação de biofilmes de *P. aeruginosa* e *S. mutans*. A partir dos resultados obtidos, será possível desenvolver novas estratégias de tratamento visando futuro controle de biofilmes.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- As moléculas selecionadas podem ser testadas em conjunto para verificar a presença de sinergismo.
- É necessário testar a citotoxicidade das moléculas selecionadas para assegurar sua futura aplicação.
- Avaliar a combinação das moléculas com antibióticos já conhecidos como estratégia de controle dos biofilmes, atuando assim em duas frentes distintas.
- Combinar as moléculas com tensoativos, como os biossurfatantes.
- A partir das moléculas selecionadas, podem-se variar os grupos funcionais presentes em diferentes posições dos anéis; permitindo estudo mais profundo da relação estrutura-atividade.
- Os mesmo testes podem ser realizados em biofilmes mais maduros.

8 REFERÊNCIAS

ALVES, F. R. F.; SILVA, M. G.; RÔÇAS, I. N.; & Siqueira, J. F. Biofilm biomass disruption by natural substances with potential for endodontic use. **Brazilian Oral Research**, v. 27, n. 1, p. 20–5, 2013.

AVILA, H.P.; SMÂNIA, E.F.A.; MONACHE, F.D.; SMÂNIA, A. Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 9790-9794, 2008.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6 n. 2, p. 71–79. 2012.

BOŽIĆ, D. D.; MILENKOVIĆ, M.; IVKOVIĆ, B.; ĆIRKOVIĆ, I. Antibacterial activity of three newly-synthesized chalcones & synergism with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 140, p. 130–137, 2014.

BRIDIER, A.; R. BRIANDET, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSENET, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling**, v. 27, p. 1017-1032, 2011.

BURTON, E.; YAKANDAWALA, N.; LOVETRI, K.;MADHYASTHA, M. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, p 1-4, 2007.

BRYERS, J. D. Medical biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 1–18, 2008.

CHA, J.; JEONG, M.; CHOI, K.; PARK, J.; CHA, S.; LEE, K. Synergistic effect between cryptotanshinone and antibiotics in oral pathogenic bacteria, **Advances in Bioscience and Biotechnology**, p. 283–294, 2013.

CHEN, X.; STEWART, P. S. Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 6, p. 718–720, 2002.

CHIARADIA, L.D.; DOS SANTOS, S.; VITOR, C.E; VIEIRA, A. A.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Synthesis and pharmacological activity of chalcones derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in Raw 264.7 cells stimulated

by LPS: quantitative structure-activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 658-667, 2008.

CHOI, H.; LEE, D. G. Antimicrobial peptide pleurocidin synergizes with antibiotics through hydroxyl radical formation and membrane damage, and exerts antibiofilm activity. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 12, p. 1831–1838, 2012.

CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 99-107, 2011.

DE ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: Propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Quimica Nova**, v. 36, n. 6, p. 848–858, 2013.

DONLAN, R. M. Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? In: Romeo T, ed. Bacterial biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, p. 133–61. 2008

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

DRAGO, L.; AGRAPPI, S.; BORTOLIN, M.; TOSCANO, M.; ROMANÒ, C. L.; DE VECCHI, E. How to study biofilms after microbial colonization of materials used in orthopaedic implants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 293, 2016.

DUNNE, W. M.; DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Bio Ims Lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–166, 2002.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews**, 8: 623-633, 2010.

FURNISS B. S.; HANFORD A. J.; SMITH P. W. G.; TATCHELL A. R. **Vogel's Textbook of practical organic chemistry**, 5th ed., by Furniss B. p. 1032-1035, 2004.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELÖV, A.; KÜHN, I.; MCKENZIE, D.; MÖLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, n. 1, p. 63–73, 2002.

GALES, A. C.; REIS, A. O.; JONES, R. N. Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Polymyxin B and Colistin : Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for P. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39. N. 1, p. 183–190, 2001.

GO, M. L.; WU, X.; LIU, X. L. Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 481–499, 2005.

GOMES, M.Z.V., NITSCHKE, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food Control**, v. 25, p. 441-447, 2012.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 95-108, 2004.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, n. 1, p. 9–18, 1995.

VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117–1131, 2010.

JORNADA, D.; DOS SANTOS F. G.; CHIBA, D.; DE MELO, T.; DOS SANTOS, J.; CHUNG, M. The Prodrug Approach: A Successful Tool for Improving Drug Solubility. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 42, 2015.

KAYSER, F.H. Bacteria as Human Pathogens. In: Kayser, F.H.; Bienz, K.A.; Eckert, J.; Zinkernagel, R. M. **Medical Microbiology**. p. 229-345, 2005

KOO, H.; JEON, J.G. Naturally occurring molecules as alternative therapeutic agents against cariogenic biofilms. **Advances in Dental Research**, v. 21, p. 63-68, 2009.

KOO, H.; PEARSON, S.K.; SCOTT-ANNE, K.; ABRANCHES, J.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; PARK, Y.K.; MARQUIS, R.E., BOWEN, W.H. Effects of apigenin and *tt*-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. **Oral Microbiology & Immunology**, v. 17, p. 337-343, 2002.

KOO, H.; SCHOBEL, B.; SCOTT-ANNE, K.; WATSON, G.; BOWEN, W.H.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; PARK, Y.K. Apigenin and *tt*-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. **Journal of Dental Research**, v. 84, p. 1016-1020, 2005.

KORMENDY, A. C.; WAYMAN, M. Scanning electron microscopy of microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 3, n. 1, p. 33–47, 1971.

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 9-27, 1998.

KUNTHALERT, D.; BAOTHONG, S.; KHETKAM, P.; CHOKCHAISIRI, S.; SUKSAMRARN, A. A chalcone with potent inhibiting activity against biofilm formation by nontypeable haemophilus influenzae. **Microbiology and Immunology**, v. 58, n. 10, p. 581–589, 2014.

KWIECINSKI, J.; NA, M.; JARNEBORN, A.; JACOBSSON, G.; PEETERMANS, M.; VERHAMME, P.; JIN, T. Tissue plasminogen activator coating on surface of implants reduces *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 394-401. 2015.

LEE, J.H.; PARK, J.H.; CHO, H. S. ; JOO, S.W.; CHO, M.H.; LEE, J. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. **Biofouling**, v. 29, p. 491-499, 2013.

LEE, J.H.; REGMI, S.C.; KIM, J.; CHO, M.H.; YUN, H.; LEE, C.; LEE, J. Apple flavonoid phloretin inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats. **Infection and Immunity**, v. 79, p. 4819-4827, 2011.

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

MANNER, S. ; SKOGMAN, M.; VUORELA, P.; FALLARERO, A. Exploring flavonoids, the extensive known natural compounds class, for anti-biofilm effects utilizing high throughput screening and *in silico* modeling. In **Abstract Book -Third European Congress on Microbial Biofilms- Basic and Clinical Aspects** - Guent - Belgium, p. 65, 2013.

MANNER, S.; SKOGMAN, M.; GOERES, D.; VUORELA, P.; FALLARERO, A. Systematic exploration of natural and synthetic flavonoids for the inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 19434-19451, 2013a.

MAUKONEN, J.; MÄTTÖ, J.; WIRTANEN, G.; RAASKA, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: **A review. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n.6, p. 327–356, 2003.

MAYER, C.; MORITZ, R.; KIRSCHNER, C.; BORCHARD, W.; MAIBAUM, R.; WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, n. 1, p. 3–16, 1999.

MEDINI, D.; SERRUTO, D.; PARKHILL, J.; RELMAN, D. A.; DONATI, C.; MOXON, R.; RAPPUOLI, R. Microbiology in the post-genomic era. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 419–430, 2008.

MEYLHEUC, T.; VAN OSS, C. J.; BELLON-FONTAINE, M.N. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO 28. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 822-832, 2001.

MIRELES II, J.P.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R.M. *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5848-5854, 2001.

MOLOBELA, I. P.; LLUNGA, F. M. Impact of bacterial biofilms: The importance of quantitative biofilm studies. **Annals of Microbiology**, v. 62, p. 461-467, 2012.

MU, H.; TANG, J.; LIU, Q.; SUN, C.; WANG, T.; DUAN, J. Potent Antibacterial Nanoparticles against Biofilm and Intracellular Bacteria. **Scientific Reports**, 6(Nov. 2015), 18877, 2016.

NADELL, C. D.; XAVIER, J. B.; LEVIN, S. A.; Foster, K. R. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. **PLoS Biology**, v. 6, n. 1, p. 0171–0179, 2008.

NASSAR, H. M.; LI, M.; GREGORY, R. L. Effect of honey on *Streptococcus mutans* growth and biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 536–540, 2012.

NICOLAS, G. G.; LAVOIE, M. C. Streptococcus mutans et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 57. n. 1, p. 1–20, 2011.

NIELSEN, S.F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial chalcones-bioisosteric replacement of the 4-hydroxy group. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 12, p. 3047-3054, 2004.

NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V.K. Biofilm -“City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, v. 76, p. 149-163, 2007.

NOWAKOWSKA, Z.; WYRZYKIEWICZ, E.; KEDZIA, B. Synthesis and antimicrobial properties of N-substituted derivatives of (*E*)-azachalcones. **Il Farmaco**, v. 56, p. 325-329, 2007.

NOWATZKI, P.J.; KOEPEL, R.R.; STODLEY, P.; MIN, K.; HARPER, A.; MURATA, H.; DONFACK, J.; HORTELANO, E.R.; EHRLICH, G.D.; RUSSELL, A.J. Salicylic acid-releasing polyurethane acrylate polymers as anti-biofilm urological catheter coatings. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 1869-1880, 2012.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 577-588, 2007.

PALMER, R. J.; WHITE, D. C. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 435–440, 1997.

PANTANELLA, F.; VALENTI, P.; NATALIZI, T.D.; PASSERI, D.; BERLUTTI, F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. **Annali di Igiene**, v. 25, p. 31-42, 2013

PEETERS, E.; NELIS, H.J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, p. 157-165, 2008.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, D.; Benneths, J.; Dolin, R. (eds.). **Principles and practice of infectious diseases**, 1995.

PRIETO, B.; SILVA, B.; LANTES, O. Biofilm quantification on stone surfaces: comparison of various methods. **Science of the Total Environment**, v. 333, p. 1-7, 2004.

PROKOPOVICH, P.; PERNI, S. An investigation of microbial adhesion to natural and synthetic polysaccharide-based films and its relationship with the surface energy components. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 1, p. 195–202, 2009.

REJINIEMON, T. S.; ARASU, M. V.; DURAI PANDIYAN, V.; PONMURUGAN, K.; AL-DHABI, N. A.; AROKIYARAJ, S.; CHOI, K. C. In-vitro antimicrobial, antibiofilm, cytotoxic, antifeedant and larvicidal properties of novel quinone isolated from *Aegle marmelos* (Linn.) Correa. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 48, 2014.

RENDUELES, O.; GHIGO, J. M. Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 972-989, 2012.

RENNER, L. D.; WEIBEL, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **MRS Bulletin / Materials Research Society**, v. 36, n. 5, p. 347–355, 2011.

RODRIGUES, L. R.; BANAT, I. M.; VAN DER MEI, H. C.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 470–480, 2006.

RYAN, C.S.; KLEINBERG, I. Bacteria in human mouths involved in the production and utilization of hydrogen peroxide. **Archives of Oral Biology**, v. 40, n. 8, p.753-63, 1995.

SAHU, N.K.; BALBHADRA, S.S.; CHOUDHARY, J.; KOHLI, D.V. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p. 209-225, 2012.

SAITO, S.T.; TRENTIN, D.S.; MACEDO, A.J.; PUNGARTNIK, C.; GOSMANN, G.; SILVEIRA, J.D.; GUECHEVA, T.N.; HENRIQUES, J.A.P.; BRENDDEL, M. Bioguided fractionation shows *Cassia alata* extract to inhibit *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* growth and biofilm formation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 13, 2012.

SANDBERG, M. E.; SCHELLMANN, D.; BRUNHOFER, G.; ERKER, T.; BUSYGIN, I.; LEINO, R.; VUORELA, P. M.; FALLARERO, A. Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, p. 104-106, 2009.

SAYEM, S.M.; MANZO, E.; CIAVATTA, L.; TRAMICE, A.; CORDONE, A.; ZANFARDINO, A.; DE FELICE, M.; VARCAMONTI, M. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 74, 2011.

SIMÕES, M.; SIMÕES, C.; MACHADO, I.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. **Institute of Chemical Engineers (AIChE)**, v. 84, p. 334-345, 2006.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SIVAKUMAR, P.M.; PRABHAWATHI, V.; DOBLE, M. Antibacterial activity and QSAR of chalcones against biofilm-producing bacteria isolated from marine waters. **AR and QSAR in Environmental Research**, v. 21, p. 247-263, 2010.

SIVAKUMAR, P.M.; PRABHAWATHI, V.; DOBLE, M. 2-Methoxy-2,4-dichloro chalcone as an antimicrofoulant against marine bacterial biofilm. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, p. 439-446, 2010a.

SIVAKUMAR, P.M.; IYER, G.; NATESAN, L.; DOBLE, M. 3'-Hydroxy-4-methoxychalcone as a potential antibacterial coating on polymeric biomaterials. *Applied Surface Science*, v. 256, p. 6018–6024, 2010b.

SKOGMAN, M.E.; VUORELA, P.M.; FALLARERO, A. Combining biofilm matrix measurements with biomass and viability assays in susceptibility assessments of antimicrobials against *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of Antibiotics**, v. 65, p. 453-459, 2012.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v.40, p. 175-179, 2000.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 199–210, 2008.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

SUTHERLAND, I.W. The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 222-227, 2001.

SUWITO, H.; KRISTANTI, A. N.; NYOMAN, N.; PUSPANINGSIH, T. Review Article Chalcones : Synthesis , structure diversity and pharmacological aspects. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 5, p. 1076–1088, 2014.

TRAN,T.D.; NGUYEN,T.T.N.; DO, T.H.; HUYNH,T.N.P.; TRAN,C.D.; THAI,K.M. Synthesis and antibacterial activity of some heterocyclic chalcone analogues alone and in combination with antibiotics. **Molecules**, v. 17, p. 6684-6696, 2012.

TOTÉ, K.; VANDEN BERGHE, D.; MAES, L.; COS, P. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 249-254, 2008.

VANDEPUTTE, O.M.; KIENDREBEOGO, M.; RAJAONSON, S.; DIALLO, B.; MOL, A.; EL JAZIRI, M.; BAUCHER, M. Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 243-253, 2010.

VELOZ, J. J.; SAAVEDRA, N.; LILLO, A.; ALVEAR, M.; BARRIENTOS, L.; SALAZAR, L. A. Antibiofilm Activity of Chilean Propolis on Streptococcus mutans Is Influenced by the Year of Collection. **BioMed Research International**, p. 1–6, 2015.

VERMA, P. Methods for determining bactericidal activity and antimicrobial interactions: synergy testing, time-kill curves, and population analysis. In SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A. C. **Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2007. p. 275-299.

VICKERY, K.; NGO, Q. D.; ZOU, J.; COSSART, Y. E. The effect of multiple cycles of contamination, detergent washing, and disinfection on the development of biofilm in endoscope tubing. **American Journal of Infection Control**, v. 37, n. 6, p. 470–475, 2009.

VOGLER, E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 74, p. 69-117, 1998.

WALLOCK-RICHARDS, D. J.; MARLES-WRIGHT, J.; CLARKE, D. J.; MAITRA, A.; DODDS, M.; HANLEY, B.; CAMPOPIANO, D. J. Molecular basis of *Streptococcus mutans* sortase A inhibition by the flavonoid natural product trans-chalcone.

Chemical Communications, v.51, n. 52, p. 10483–10485, 2015.

WORTHINGTON R.J.; RICHARDS, J.J.; MELANDER, C. Small molecule control of bacterial biofilms. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p. 209-225, 2012.

YANTI, Y.; HWANG, J. Dual antibiofilm and antimetalloproteinase-9 activities of panduratin A in experimental periodontal disease models: a potent natural periodontotherapeutic. **Planta Medica**, v. 12, n. 76, p. 13, 2010.

ZAMEER, F.; MS, R.; CHAUHAN, J. B.; KHANUM, S. A. Evaluation of adhesive and anti-adhesive properties of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their inhibition by herbal plants. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 108–119, 2016.

ZERAIK, A. E.; NITSCHKE, M. Influence of growth media and temperature on bacterial adhesion to polystyrene surfaces. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 4, p. 569–576, 2012.