



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

LEONARDO SILVA DE SOUSA

EFEITO DE CALCOGENOL ESTERES EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E
BIOFILMES DE BACTÉRIAS ORAIS

FORTALEZA
2015

LEONARDO SILVA DE SOUSA

EFEITO DE CALCOGENOL ESTERES EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E
BIOFILMES DE BACTÉRIAS ORAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Recursos Naturais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de Concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S697e Sousa, Leonardo Silva de.
Efeito de calcogenol esterres em células planctônicas e biofilmes de bactérias orais /
Leonardo Silva de Sousa. – 2015.
55 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.

1. S. parasanguinis. 2. S. mutans. 3. Bactérias orais. 4. Calcogenol ésteres. 5. Biofilmes. I.
Título.

CDD 660.6

LEONARDO SILVA DE SOUSA

EFEITO DE CALCOGENOL ESTERES EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E
BIOFILMES DE BACTÉRIAS ORAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Recursos Naturais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de Concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em 27/08/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

A todos os meus professores e a vida!

AGRADECIMENTOS

À Maria Kercia Calixto Brito, pelo amor, companheirismo, suporte e encorajamento.

Aos meus pais pelo suporte oferecido.

Aos meus orientadores Edson Holanda, Mayron Vasconcelos e Vassiliepe Arruda pela oportunidade de me desenvolver na área de biofilmes, por serem sempre acessíveis nos momentos difíceis e pelos ensinamentos de vida.

Aos amigos que fizeram parte dessa caminhada e a todos os bolsistas do LIBS, principalmente Lidice, Jamile, Alison, Camila, Bruno, dentre outros.

A todos os professores do Programa de Biotecnologia de Recursos Naturais da UFC que contribuíram para minha formação acadêmica e que modificaram minha visão do mundo através da biotecnologia, assim como todos os professores que foram inspiradores.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e a Universidade Federal do Ceará (UFC) pelo apoio financeiro e bolsas concedidas durante o decorrer do projeto.

Aos amigos de longa data que fizeram parte dessa caminhada pelos momentos: Agena Câmara de Paula, Lyndervan Alcantara, Eirilany Moraes, Lucas Barbosa, Thamyres Rats, Patrícia Maria Diniz Dias, Poliana de Oliveira Cavalcante, Samara Oliveira, Vanessa de Abreu.

"Deus concedeu-nos o dom de viver;
compete-nos a nós viver bem"

Voltaire

RESUMO

As bactérias têm uma tendência natural para desenvolver comunidades de células rodeadas por uma matriz de polissacarídeo chamada de biofilme. Biofilmes são formados nas superfícies dos dentes (placa dentária) e são o principal fator etiológico para a maioria dos problemas dentários como a cárie, gengivite e periodontite. A placa dental é constituída por múltiplas espécies de bactérias que participam nos ecossistemas complexos da cavidade oral humana. O gênero *Streptococcus* é comumente encontrado na cavidade oral, destacando-se as espécies *S. mutans* e *S. parasanguinis*. Neste contexto, a pesquisa de novos compostos capazes de prevenir ou erradicar biofilmes orais foi intensificada junto a essas bactérias. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de 5 calcogenol ésteres sintéticos (S501, S502, S503, S505, S506) em *S. mutans* ATCC 25175 e *S. parasanguinis* ATCC 903. O efeito dos calcogenol ésteres em culturas planctônicas foi determinada por concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (MBC). No que diz respeito a formação de biofilme, os compostos foram adicionados a bactérias em diferentes concentrações (7,80 a 250 µg/mL) em placas de micro titulação. As placas foram incubadas durante 24 h a 37° C num agitador orbital a 120 rpm sob pressão atmosférica, com 5% de CO₂. A formação de biofilmes foi caracterizada por biomassa total, por meio de coloração com violeta de cristal, e o número de células viáveis foi expresso como log UFC/mL. Também foram realizados ensaios com biofilmes pré-formados com os calcogenol ésteres. Os resultados mostraram que os calcogenol ésteres S505 e S506 apresentaram CIM de 125 e 62,50 µg/mL, respectivamente, para *S. mutans*, já S501, S502 e S506 apresentaram CIM de 62.50, 31.25 e 250 µg/ml para *S. parasanguinis*. No que diz respeito a formação de biofilme, em geral, todos os compostos reduziram eficazmente a formação de biomassa e o número de células viáveis, principalmente em *S. parasanguinis* e interferiram no biofilme pré-formado de ambas as espécies. Concluiu-se que os calcogenol ésteres testados têm potencial para serem uma alternativa eficaz contra biofilmes orais envolvendo as espécies *S. mutans* e *S. parasanguinis*.

Palavras-chave: *S. parasanguinis*; *S. mutans*; bactérias orais; calcogenol ésteres; biofilmes.

RESUMEN

Las bacterias tienen una tendencia natural a desarrollar comunidades de células rodeadas por una matriz de polisacárido llamada biopelícula. Las biopelículas se forman en la superficie de los dientes (placa dental) y son el principal factor etiológico de la mayoría de problemas dentales como caries, gingivitis y periodontitis. La placa dental está formada por múltiples especies de bacterias que participan en los complejos ecosistemas de la cavidad bucal humana. El género *Streptococcus* se encuentra comúnmente en la cavidad bucal, destacando las especies *S. mutans* y *S. parasanguinis*. En este contexto, se intensificó la búsqueda de nuevos compuestos capaces de prevenir o erradicar las biopelículas bucales con estas bacterias. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antibacteriana y antibiopelícula de 5 ésteres de calcogenol sintéticos (S501, S502, S503, S505, S506) en *S. mutans* ATCC 25175 y *S. parasanguinis* ATCC 903. El efecto de los ésteres de calcogenol en cultivos planctónicos se determinó mediante concentración mínima inhibitoria (CIM) y concentración mínima bactericida (CBM). Con respecto a la formación de biopelículas, los compuestos se agregaron a las bacterias en diferentes concentraciones (7,80 a 250 µg/mL) en placas de microtitulación. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C en un agitador orbital a 120 rpm bajo presión atmosférica, con 5% de CO₂. La formación de biopelículas se caracterizó por la biomasa total, utilizando tinción con violeta cristal, y el número de células viables se expresó como log UFC/mL. También se realizaron pruebas con biopelículas preformadas con ésteres de calcogenol. Los resultados mostraron que los ésteres de calcogenol S505 y S506 tenían una MIC de 125 y 62,50 µg/ml, respectivamente, para *S. mutans*, mientras que S501, S502 y S506 tenían una MIC de 62,50, 31,25 y 250 µg/ml para *S. parasanguinis*. Con respecto a la formación de biopelículas, en general, todos los compuestos redujeron efectivamente la formación de biomasa y el número de células viables, principalmente en *S. parasanguinis*, e interfirieron en la biopelícula preformada de ambas especies. Se concluyó que los ésteres de calcogenol probados tienen el potencial de ser una alternativa eficaz contra las biopelículas orales que involucran especies de *S. mutans* y *S. parasanguinis*.

Palabras clave: *S. parasanguinis*; *S. mutans*; bacterias orales; ésteres de calcogenol; biopelículas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Enzima humana glutathione peroxidase I.....	17
Figura 2 -	Estrutura química do princípio ativo do (a) Tripanavir e do (b) <i>Nelfinavir</i>	17
Figura 3 -	Grupo funcional dos Selenoésteres. R e R' representam cadeias carbônicas alifáticas, cíclicas ou aromáticas.....	18
Figura 4 -	Grupo funcional dos Tioésteres. R e R' representam cadeias carbônicas alifáticas, cíclicas ou aromáticas.....	18
Figura 5 -	Esquema dos estágios de desenvolvimento dos biofilmes.....	21
Figura 6 -	Fatores etiológicos primários da cárie dentária.....	24
Figura 7 -	Aspecto da cárie dentária em um estágio grave.....	24
Figura 8 -	Diagrama dos fatores etiológicos do desenvolvimento da cárie dentária.....	25
Figura 9 -	Média do CEO/CPO e respectivos componentes, segundo o grupo etário.....	26
Figura 10 -	Estrutura química dos Calcogenol ésteres.....	31
Figura 11 -	Avaliação quantitativa de biofilmes <i>S. parasanguinis</i> ATCC 903.....	33
Figura 12 -	Avaliação quantitativa de biofilmes de <i>S. mutans</i> ATCC 25175.....	34
Figura 13 -	Avaliação das unidades formadoras de colônias de <i>S. parasanguinis</i> ATCC 903.....	36
Figura 14 -	Avaliação das unidades formadoras de colônias de <i>S. mutans</i> ATCC 25175.....	37
Figura 15 -	Avaliação quantitativa de biofilmes pré-formados <i>S. parasanguinis</i> ATCC 903 e <i>S. mutans</i> ATCC 25175.....	38
Figura 16 -	Avaliação das unidades formadoras de colônias de <i>S. parasanguinis</i> ATCC 903 e <i>S. mutans</i> ATCC 25175 em biofilme pré-formado.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CEO-D	Índice de Dentes Decíduos Cariados, com Indicação de E
CG/EM	Cromatografia Gasosa-Espectroscopia de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPO-D	Índice de Dentes Cariados, Perdidos e Obturados
Des-re	Processo de desmineralização/remineralização
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
EPS	Substância polimérica extracelular
g	Gramas
min	Minutos
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
µL	Microlitro
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UFC	Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1	Organocalcogênios	16
3.2	Calcogenol ésteres.....	18
3.3	Biofilmes bacterianos	19
3.4	Cárie dentária.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Estirpes bacterianas e condições de cultivo	27
4.2	Síntese e caracterização de calcogenol ésteres.....	27
4.3	Ensaio de atividade antimicrobiana.....	28
4.4	Ensaio de atividade antibiofilme	28
4.4.1	<i>Quantificação de biomassa</i>	28
4.4.2	<i>Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)</i>	29
4.5	<i>Biofilme pré-formado</i>	29
4.6	Análise estatística	30
5	RESULTADOS.....	31
5.1	Síntese de calcogenol ésteres	31
5.2	Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) .	31
5.3	Atividade antibiofilme e quantificação da biomassa.....	32
5.4	Contagem de células viáveis.....	35
5.5	Quantificação de biomassa de biofilmes pré-formados	38
5.6	Número de células viáveis de biofilmes pré-formados.....	39
7	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS.....	44
	ANEXO A - RESSONANCIA MAGNÉTICA DE NUCLEAR DE CARBONO 13 E HIDROGÊNIO DOS CALCOPENOL ÉSTERES	50

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é definida como uma destruição localizada de tecidos duros dentários causada por subprodutos ácidos provenientes da fermentação bacteriana de carboidratos, geralmente a sacarose. Os sinais da desmineralização são vistos nos tecidos dentários rígidos, no entanto o processo da doença é iniciado no biofilme bacteriano. A doença é inicialmente reversível e pode ser interrompida em qualquer estágio, mesmo quando o esmalte e a dentina são destruídos, desde que seja possível remover o biofilme bacteriano que cobre a superfície do dente (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). Ela é considerada como uma das principais doenças crônicas infecciosas em pacientes pediátricos que podem ser preveníveis, no entanto se faz necessário a utilização de boas práticas de saúde para se evitar que os indivíduos possam ser acometidos por tal doença ao longo de toda a vida (WANG, 2012). A cárie dentária e a doença periodontal são consideradas infecções bacterianas e juntas afetam cerca de 60-90% da população mundial, vale ressaltar que a epidemiologia dessa doença varia de acordo com a região e as condições socioeconômicas a qual a população está submetida (AIMUTIS, 2012).

O gênero *Streptococcus* está relacionado diretamente com processos importantes no que diz respeito a evolução da cárie dentária (WU *et al.*, 2009). *Streptococcus parasanguinis* são bactérias sem motilidade, sendo consideradas colonizadores iniciais da superfície dentária (AJDIC, 2002). *Streptococcus mutans*, por sua vez, são bactérias acidogênicas que atuam na dissolução mineral da superfície dentária, sendo esta a espécie mais consistentemente associada com a cárie dentária. Vale ressaltar, também, que que *S. mutans* é encontrada em placas de ateroma e está relacionada com a endocardite, infecção que atinge parte da membrana mais interna do coração (NAKANO *et al.*, 2006, AJDIC *et al.*, 2002).

As bactérias raramente existem sob a forma planctônicas, preferindo formar biofilmes (SANTOS *et al.*, 2002). Biofilmes são conceituados como comunidades microbianas complexas que aderem em uma grande variedade de superfícies e são geralmente associadas com uma matriz extracelular composta por diferentes polímeros (FLEMMING, WINGENDER, 2010). Vale salientar que bactérias em um biofilme são mais resistentes a ação de agentes antibacterianos, devido à barreira física formada pela matriz extracelular bem como à fatores de comunicação bacteriana

que induzem a produção de enzimas e proteínas importantes para a adaptação do biofilme as novas condições do meio (CATALDI *et al.*, 2014; CORBIN *et al.*, 2011).

Nesse contexto, existe uma grande preocupação em buscar novas alternativas capazes de prevenir ou ainda de controlar os biofilmes bacterianos. Os organocalgenóis são um grupo de substâncias que têm demonstrado diversas atividades biológicas na literatura, dentre elas, podem-se destacar as propriedades: antimicrobianas, antioxidantes, antitumorais e de inibição de compostos enzimáticos (NARAYANAPERUMAL, 2010). Dentro dessa classe de organocalgenóis, pode-se destacar os calcogenol ésteres que são intermediários importantes em várias transformações orgânicas.

A classe dos calcogenol ésteres são categorizadas em selenoésteres e tioésteres. Os tioésteres possuem grande valor na indústria farmacêutica devido as suas atividades biológicas, como por exemplo na supressão de tumores *in vivo* e são agentes anti-HIV, enquanto que os selenoésteres são precursores de radicais acila e de ânions e têm atraído a atenção para a síntese de novos materiais moleculares (NARAYANAPERUMAL, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Avaliar o potencial de calcogenol ésteres no controle de crescimento microbiano e na formação de biofilmes monoespécie de bactérias cariogênicas de cavidade oral.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Sintetizar e caracterizar calcogenol ésteres de selênio e enxofre;
- ✓ Estabelecer o efeito de calcogenol ésteres sobre o crescimento planctônico de *S. parasanguinis* ATCC 903 e *S. mutans* ATCC 25175;
- ✓ Avaliar o efeito de calcogenol ésteres sobre a formação de biomassa das estirpes monoespécies supracitadas;
- ✓ Verificar viabilidade de células incrustadas no biofilme das estirpes monoespécies supracitadas;
- ✓ Averiguar o efeito dos calcogenol éteres sobre biofilmes pré-formados das estirpes monoespécies supracitadas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

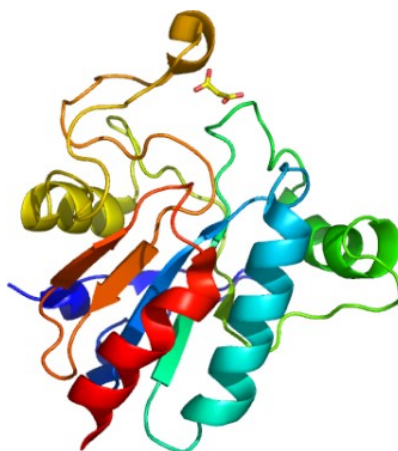
3.1 Organocalcogênios

Os primeiros estudos a respeito dos compostos organocalcogênios datam da de 1840 e foram realizados por Whöler, no entanto devido à suas propriedades organolépticas, em especial seu odor gerado, por essas substâncias, a química dessas substâncias caiu em esquecimento e apenas na segunda metade do século XX essas substâncias voltaram a ser pesquisadas (FREDGA, 1973). Os organocalcogênios apresentam em sua estrutura átomos do grupo 16 da tabela periódica como heteroátomos e uma cadeia orgânica, sendo que estes, por sua vez, podem utilizados na síntese de várias sequências sintéticas de novos componentes da classe dos organocalcogênios (BACK, 2009).

Estes compostos possuem relativa importância biológica e apresentam propriedades medicinais, sendo geralmente considerados antioxidantes, anti-inflamatórios, possuem efeitos neuroprotetores e convulsionantes, também participação em eventos apoptóticos, são antitumorais e alguns de seus componentes apresentam também propriedades antimicrobianas, sendo inibidores competitivos para algumas proteínas (DANIEL; HOFFMANN *et al.*, 2009).

Vias sintéticas para aminoácidos de enxofre e selênio substituídos têm atraído a atenção de vários grupos de pesquisa, uma vez que desempenham um papel importante nos processos metabólicos (MORODER *et al.*, 2005), uma vez que alguns tipos de organocalcogênios podem atuar como mimetizadores de glutationa peroxidase (GPxs) que são famílias de enzimas antioxidantes combatendo as espécies reativas oxidativas (EROs), nas células animais subprodutos do metabolismo celular gerados na redução de O_2 no processo de transferência de elétrons, tais como o oxigênio singleto (O_2^-), radical hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HERBETTE; ROECKEL-DREVET; DREVET, 2007). Abaixo se encontra um tipo de GPxs que ocorre no citoplasma e mitocôndria celular (Figura 1). A capacidade em reduzir as EROs está relacionada ao potencial de redução do selênio presente na forma de selenol no sítio ativo da enzima.

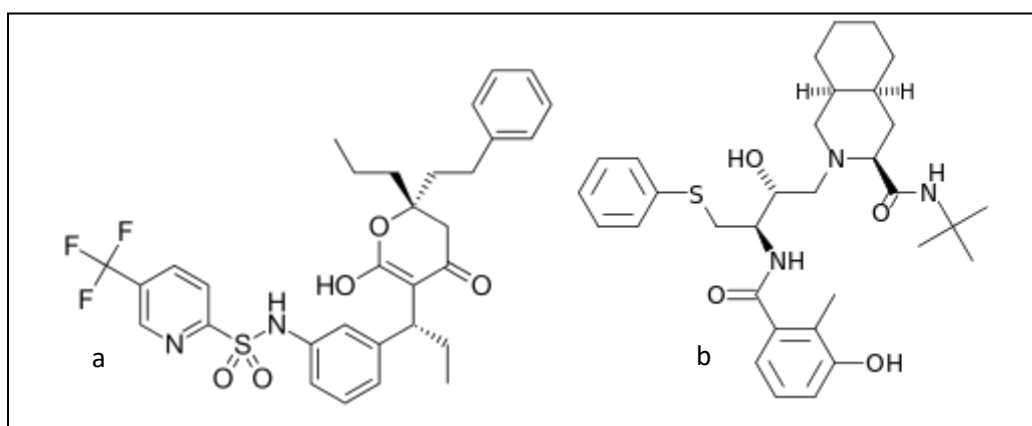
Figura 1 - Enzima humana glutaciona peroxidase I.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A química de organosulfurados tem se destacado nos últimos anos por sua ampla variedade de aplicações em diferentes áreas da biologia. Essas substâncias, que possuem uma ligação entre carbono e enxofre, são usadas como modelos para o desenvolvimento de novos medicamentos organosulfurados. Alguns exemplos são o Nelfinavir e o Tripanovir, que são eficazes contra a protease do HIV. No entanto, a literatura sobre esses compostos ainda é escassa, havendo poucos estudos e publicações sobre eles.

Figura 2 – Estrutura química do princípio ativo do (a) Tripanavir e do (b) Nelfinavir.

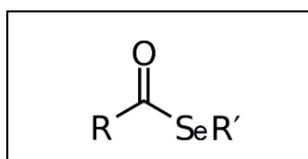


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Calcogenol ésteres

Os calcogenol ésteres possuem um grupo carbonila ligado a um elemento do grupo 16 da tabela periódica, pertencem a classe dos organocalcogênios e são considerados intermediários importantes em várias transformações orgânicas. Os Selenoésteres, integrantes dos calcogenol ésteres são considerados uma subclassificação e têm sido utilizados como precursores de radicais acila e de anions, atraindo a atenção para a síntese de novos materiais moleculares, especialmente materiais supercondutores e cristais líquidos (VIEIRA *et al.*, 2009). Também são utilizados para a síntese de proteínas por ligação química de ésteres calcogenol, e na síntese de produtos naturais tais como: Crinipellin A, (+) - Geissoschizine, e (-)Ácido Pseudolarico B (PATTENDEN *et al.*, 2009).

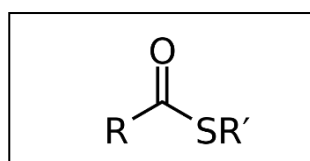
Figura 3 – Grupo funcional dos Selenoésteres. R e R' representam cadeias carbônicas alifáticas, cíclicas ou aromáticas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 4 representa a estrutura de um tioéster que também são considerados organocalcogênios e estão relacionados com diversas atividades biológicas como supressão dos tumores e agentes anti-HIV. Eles são considerados intermediários cruciais para uma variedade de transformações orgânicas e na síntese de compostos carbonilas, incluindo a formação e degradação de ácidos gordos e de mevalonato, o precursor de esteroides (PROKOPCOVÁ *et al.*, 2008).

Figura 4 – Grupo funcional dos Tioésteres. R e R' representam cadeias carbônicas alifáticas, cíclicas ou aromáticas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Biofilmes bacterianos

Biofilmes foram observados pela primeira vez no século XVII quando van Leeuwenhoek descreveu pequenos “animálculos” da placa dental. Mas, tornaram-se amplamente conhecidos em 1978, quando Costerton e colaboradores relataram que em sistemas aquáticos as comunidades de bactérias encontravam-se envolvidas numa matriz de natureza polissacarídica, capaz de mediar o processo de adesão celular. Era criada a Teoria dos Biofilmes, que alavancou os estudos nesta área (ERRIU *et al.*, 2014).

Atualmente biofilmes são definidos como comunidades microbianas complexas, caracterizadas por células ligadas aos mais diversos tipos de superfícies e envolvidas por uma matriz extracelular de biopolímeros derivados do próprio metabolismo bacteriano (BATONI, 2011).

Estima-se que cerca de 99% dos micro-organismos que habitam o planeta vivam nestas comunidades microbianas. Biofilmes são ubíquos, estando distribuídos em ambientes como o solo, em tecidos vivos, dispositivos médicos e/ou industriais, sistemas de tubulação de água ou até mesmo ambientes marinhos (WILLCOX, 2013).

Os biofilmes são um exemplo de adaptação fisiológica e uma das fontes mais importantes de resistência bacteriana aos antibióticos (SIMÕES, 2011). Bactérias incorporadas em biofilmes podem apresentar níveis de resistência mais elevados aos produtos antimicrobianos do que suas formas planctônicas. Isso devido a capacidade de bactérias inseridas nos biofilmes passarem a exibir características fenotípicas distintas de suas formas planctônicas, com relação a taxa de crescimento e a transcrição de genes (MAH; O`TOOLE, 2001).

Outra particularidade do biofilme bacteriano é a presença da matriz polimérica extracelular, que pode ser constituída por proteínas, ácidos nucléicos, lipídeos, substâncias húmicas e heteropolímeros, tais como glicoproteínas (FLEMMING, WINGENDER, 2010). A matriz polimérica é responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional dos biofilmes, a sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes (ALLISON, 2003). Independentemente da sua composição, as substâncias poliméricas extracelulares são consideradas elementos-chave da matriz de um biofilme (ALLISON, 2003). Estas substâncias permitem a adesão célula-célula e às

superfícies, conferindo estabilidade mecânica à estrutura dos biofilmes. Assegurando também, um ambiente altamente hidratado, que permite não só a sobrevivência dos micro-organismos que integram os biofilmes, mas também a manutenção da atividade de enzimas, capazes de degradar compostos a serem utilizados como nutrientes e compostos tóxicos que coloquem em risco a integridade celular (JEFFERSON, 2004).

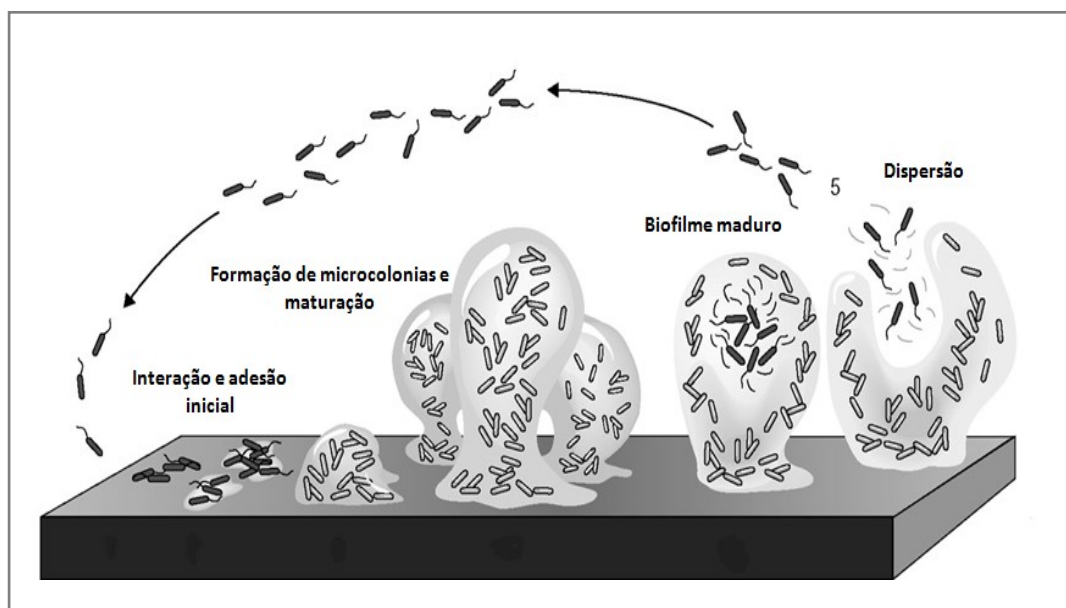
Biofilmes ainda contam com um sistema de comunicação de grande importância, haja vista que a adaptação bem sucedida de bactérias às mudanças nas condições naturais é dependente da sua capacidade de detectar e responder de acordo ao ambiente externo e a expressão gênica modulada (DANIELS *et al.*, 2004).

Esse mecanismo de comunicação entre espécies bacterianas denominado de quorum sensing, caracteriza-se pela liberação de sinais químicos (auto-indutores) secretados pelas células bacterianas, capazes de induzir diversas alterações como por exemplo a regulação da expressão de genes em resposta à densidade populacional (KELLER; SURETTE, 2006). Assim, altas densidades celulares resultarão em concentrações elevadas de sinal, que irá induzir a expressão de certos os genes e/ou de alterações fisiológicas em células vizinhas (PARSEK; GREENBERG, 2005). Este mecanismo de comunicação célula-célula em bactérias (*quorum sensing*) controla um grande número de processos de desenvolvimento, incluindo os relacionados com a formação de biofilme (CAMILLI; BASSLER, 2006).

A formação de biofilmes pode ser considerada um mecanismo de proteção para a comunidade bacteriana contra stress externos. O desenvolvimento de biofilmes consiste em mecanismos complexos e altamente regulados, que envolve uma cronologia bastante criteriosa (BATONI, 2011). Na Figura 5 estão esquematizados os estágios de desenvolvimento de um biofilme.

O primeiro passo na formação de um biofilme é a adesão dos micro-organismos a uma superfície. Esta adesão inicial pode ocorrer através de forças fracas, do tipo interações eletrostáticas ou de Van der Waals, e/ou através de moléculas de adesão celular (adesinas, pili, fímbrias) pelas quais se estabelece uma ancoragem mais permanente (SINGH; PAUL; JAIN, 2006).

Figura 5 - Esquema dos estágios de desenvolvimento dos biofilmes.



Fonte: (SAUER, 2003).

À medida que o biofilme se desenvolve, colonizadores secundários se ligam aos receptores das bactérias já aderidas, por processos denominados coadesão ou coagregação (KOLENBRANDER *et al.*, 2010). As bactérias já estabelecidas produzem polímeros extracelulares (matriz) que consolidam a fixação do biofilme. Nesta etapa, ocorre a maturação do biofilme, e microcolônias desenvolvem-se em um biofilme maduro adquirindo uma arquitetura típica, com canais para o transporte de água, oxigênio e nutrientes para as células formadoras do biofilme (BATONI, 2011; DONLAN, 2002).

Por último, ocorre a fase de dispersão, onde porções de células do biofilme maduro se desprendem e migram para outras regiões, que ao se fixarem a um substrato, poderão dar início a um novo biofilme (LINDSAY; VON HOLY, 2006).

Biofilmes tem uma importância clínica, estando associados a uma grande quantidade de infecções. Estima-se que mais de 80% das infecções microbianas no corpo humano são mediadas por biofilmes que contribuem significativamente para a morbidade e mortalidade, especialmente em ambiente hospitalar (COGAN, 2006).

Muitas destas infecções estão relacionadas com implantes em que as populações microbianas podem aderir a superfícies de dispositivos médicos, tais como cateteres urinários, válvulas cardíacas, dispositivos intrauterinos, lentes de contato e próteses dentais (BATONI, 2011). Causando problemas de saúde comuns

como infecções do trato urinário, otite média, placa dentária, gengivite, endocardite e fibrose cística (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Tais infecções são de difícil diagnóstico e não são tratáveis com as abordagens convencionais, pois os biofilmes tem mecanismos intrínsecos responsáveis pela sua alta resistência aos agentes antimicrobianos (COX; WRIGHT, 2013).

A Tabela 1 descreve vários exemplos de infecções clinicamente relevantes associada ao desenvolvimento de biofilme (BATONI *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Infecções humanas associadas com formação de biofilmes e micro-organismos comumente envolvidos.

Doenças associadas a biofilmes	Principais micro-organismos envolvidos
Endocardite valvular nativa	<i>Staphylococcus aureus</i>
Otite	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Infecção do trato urinário	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Fibrose cística	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i>
Doenças periodontais	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Bacteroides forsythus</i> , <i>Treponema denticola</i>
Cárie	<i>Streptococcus mutans</i>
Artrite séptica aguda	<i>S. aureus</i>
Prostatite bacteriana crônica	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>

Fonte: (BATONI *et al.*, 2011)

3.4 Cárie dentária

A cárie dentária é uma doença crônica, infecciosa e de caráter multifatorial. A sua etiologia é atribuída a fatores como microbiota cariogênica, dieta inadequada, hospedeiro susceptível e o tempo (Figura 6, p. 24). Caracteriza-se por dissolução localizada dos tecidos duros do dente, devido à produção de ácidos a partir do metabolismo bacteriano na placa dental, a cárie prevalece como a principal causa de dor orofacial e perda dentária em populações em todo o mundo (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Trata-se de uma doença com alta prevalência na espécie humana, atingindo quase 100% da população mundial adulta, e 60-90% de crianças em idade escolar (AIMUTIS, 2012). Considerada um grave problema de saúde pública não apenas para países em desenvolvimento, mas também para países desenvolvidos dente (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007)

Durante o século XX, dentre todos os organismos associados a aparição da cárie dental, os estreptococos do grupo mutans despertaram grande interesse por parte dos pesquisadores ao redor do mundo (AL-DAJANI; LIMEBACK, 2012). Tal período de pesquisas chegou ao seu auge quando pesquisadores recolheram estirpes de *Streptococcus mutans* isoladas inicialmente de lesões cáries humanas e as utilizaram em modelos cariogênicos murinos, estabelecendo-se o papel crucial dessa espécie no processo de formação da cárie. Contudo, deve-se ressaltar que a cárie é uma doença de cunho microbiano, mas que só ocorre quando da alteração em proporção da microbiota residente/patogênica associada a fatores ambientais (ZERO *et al.*, 2009). Os principais traços virulentos inerentes a micro-organismos associados à cárie incluem acidogênese e aciduricidade, reservas intracelulares de polissacarídeos e formação de glicanos extracelulares que permitam a adesão celular de outros organismos (ZERO *et al.*, 2009). Embora o *S. mutans* seja um dos micro-organismos cariogênicos mais amplamente pesquisados, estudos ressaltam que ele é apenas um dentre mais de 1000 outras espécies encontradas no biofilme oral (WADE, 2013). Em estudos realizados através de identificação molecular bacteriana, pesquisadores relatam que comunidades bacterianas distintas, inclusive algumas novas espécies, estão associadas com o processo cariogênico e que *S. mutans* não é detectável em 10 - 20% dos indivíduos com cáries extensas (BERGER; BEIER; QUIVEY, 2012). Evidências recentes também elucidaram o papel de algumas leveduras, como a *Candida albicans*, como um membro da microbiota mista envolvida no aparecimento da cárie (KLINKE *et al.*, 2009).

Como já referido, a cárie não é um evento singular, mas sim o resultado de uma acumulação de eventos, que se propaga por um período de tempo (LIMA, 2007). O processo cariioso é a dinâmica do fenômeno de desmineralização-rem mineralização resultante do metabolismo microbiano na superfície dentária que, com o passar do tempo, pode resultar em perda de mineral e, possivelmente, conduzirá a cavitação.

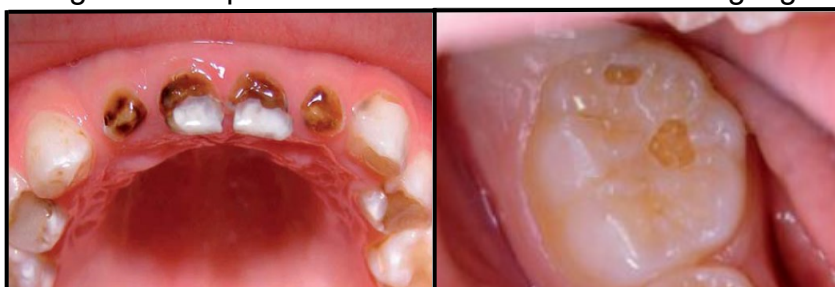
Figura 6 – Fatores etiológicos primários da cárie dentária.



Fonte: (LIMA, 2007).

A placa dental (biofilme) aparece como um fator etiológico fundamental na cárie dentária (MARSH *et al.*, 2010). As bactérias no biofilme são metabolicamente ativas, causando flutuações no pH. Essas flutuações podem causar uma perda de minerais do dente quando o pH está baixo ou um ganho de mineral quando o pH aumenta (MANJI *et al.*, 1991). O resultado cumulativo destes processos pode ser uma perda líquida de mineral, conduzindo a dissolução dos tecidos duros dentários e à formação de uma lesão de cárie (Figura 7, p. 25).

Figura 7 - Aspecto da cárie dentária em um estágio grave.

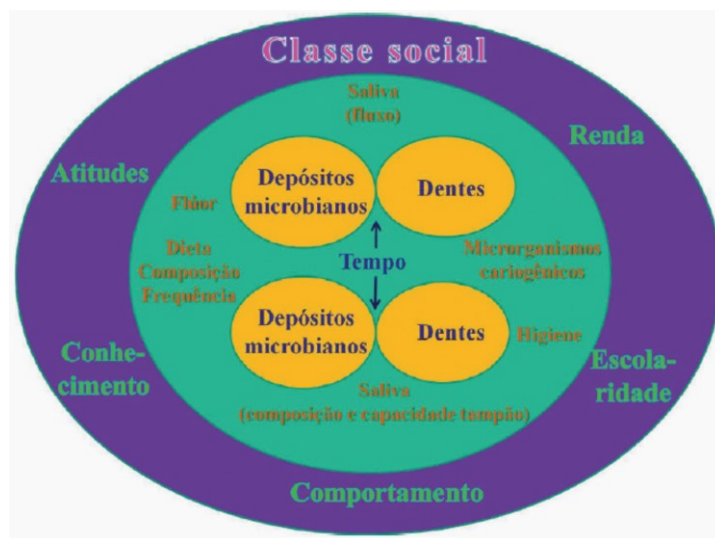


Fonte: (MELO, 2008).

Outro aspecto relevante na epidemiologia da cárie é a influência de fatores socioeconômicos e comportamentais, para a prevalência e severidade da doença. Principalmente no que diz respeito à renda familiar e a escolaridade do chefe da família. Neste âmbito, diversos autores demonstram a importância de variáveis como:

renda, educação, fatores comportamentais, conhecimento, escolaridade e atitudes, no desenvolvimento da cárie dentária (Figura 8) (CORTELLAZZI *et al.*, 2009).

Figura 8 - Diagrama dos fatores etiológicos do desenvolvimento da cárie dentária.

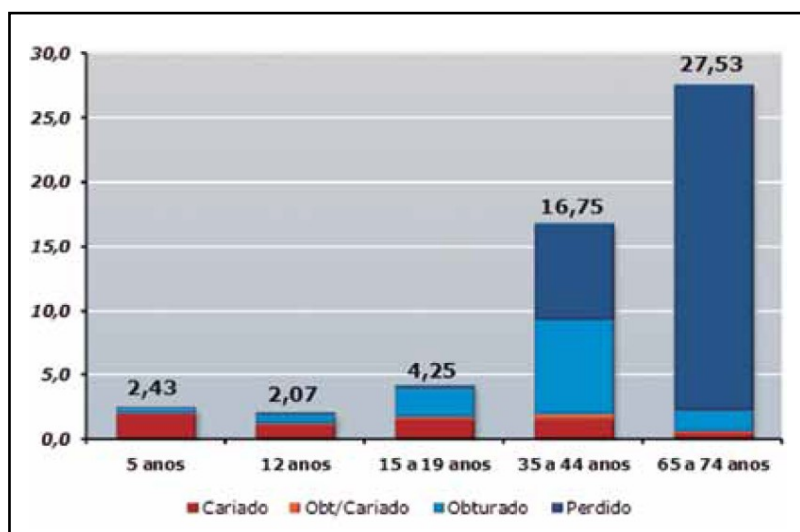


Fonte: (CERQUEIRA, 2010).

O conhecimento da epidemiologia da doença cárie é essencial para determinar o programa de prevenção e tratamento da doença. A experiência da doença cárie pode ser expressa pela severidade das suas lesões, mensurada por índices como o CPO-D (número de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados) e o CEO-D (número de dentes decíduos, com indicação de extração e obturados) (CERQUEIRA, 2010).

Levantamentos epidemiológicos nacionais em saúde bucal foram realizados nos anos de 1986, 1996, 2003 e 2010. Comparando os achados dos referidos estudos, percebe-se um expressivo declínio na prevalência de cárie em crianças de 12 anos, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Os dados também mostram uma tendência de crescimento na prevalência da doença em função da idade (Figura 9) (COIMBRA, 2012).

Figura 9 – Média do CEO/CPO e respectivos componentes, segundo o grupo etário.



Fonte: (MOREIRA, 2011).

Os últimos dados oficiais mostram que entre 2007 e 2010, o Ministério da Saúde investiu R\$ 2,7 bilhões para melhorar a saúde bucal da população do país. As principais ações foram delimitadas por meio da execução do programa Brasil Sorridente (MOREIRA, 2011). Através desse programa, a saúde bucal passou a ser ofertada de forma integral. Houve a inserção de procedimentos, laboratórios de próteses dentárias, a distribuição de *kits* de escova e pasta dentária, e a ampliação do acesso à água tratada e fluoretada. O programa proporcionou que diversos brasileiros tivessem pela primeira vez uma consulta odontológica e ajudou a diminuir a incidência de doenças bucais entre os brasileiros (MOREIRA, 2011).

Apesar das consideráveis melhoras nas condições da saúde bucal nas últimas décadas, a cárie dentária continua a afetar milhões de pessoas, tanto no Brasil como em grande parte do mundo. Prevalendo ainda como a maior causa das perdas dentárias (GIACAMAN *et al.*, 2010).

A chave para a prevenção e tratamento desta doença oral, está no controle efetivo dos patógenos e biofilmes orais. Até agora, muitos agentes antimicrobianos, tais como clorexidina, hexetidina, delmopinol e os compostos fenólicos, pôde inibir o desenvolvimento de biofilme e afetar o metabolismo bacteriano. No entanto, eles podem ocasionar efeitos colaterais, como vômitos, interferência gustativa, pigmentação dos dentes, podendo induzir a resistência de micro-organismos quando o uso for prolongado (WANG *et al.*, 2012)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estirpes bacterianas e condições de cultivo

As estirpes bacterianas utilizadas foram *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903, ambas pertencentes a American Type Culture Collection. A suspensão estoque dos microrganismos foi mantida a -80°C em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Himedia, Mumbai, Índia) com 20% de glicerol. Cada microrganismo foi estriado em BHI – ágar estéril e incubadas durante 24 horas a 37°C em 5,0% de CO_2 . Após a ativação inicial, ocorreu a transferência de cerca de 5 colônias para 10 mL de caldo BHI caldo estéril e cultivadas sob as mesmas condições, descritas anteriormente.

Posteriormente, as células bacterianas em fase de crescimento exponencial de acordo com curva de crescimento previamente realizada, foram diluídas às concentrações de 2×10^6 UFC.mL⁻¹ em meio BHI suplementado com 1% de sacarose para os experimentos referentes a determinação da CIM, e de 2×10^6 UFC.mL⁻¹ para os experimentos referentes a biofilmes e para 1×10^6 UFC.mL⁻¹ para o ensaio de biofilme pré-formado sob as mesmas condições anteriores.

4.2 Síntese e caracterização de calcogenol ésteres

Foi preparada uma mistura de pó de Zn (0,5 mmol) e difenil disselenideo (PhSeSePh) ou difenil disulfideo (PhSSPh) (0,5 mmol) e hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM-PF6 - 0,5 mL) em temperatura ambiente e na presença de nitrogênio. Posteriormente, foi adicionado lentamente vários análogos de cloreto de acila (1 mmol). A Mistura de reacional foi agitada durante 2 ou 3 minutos (e foi monitorada para cromatografia em camada delgada). A mistura foi extraída com éter etílico (3 × 15 ml), e esse extrato etílico foi lavado com salmoura, seca com MgSO_4 deixando-se evaporar todos os vestígios de éter etílico. A Purificação ocorreu em coluna de sílica gel tendo como eluente um gradiente de concentração de hexano e acetato de etila.

A elucidação estrutural dos calcogenol ésteres foi realizada por ressonância magnética nuclear de carbono 13 e hidrogênio.

4.3 Ensaio de atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana dos calcogenol ésteres foi avaliada através do teste de microdiluição em placas de 96 poços de poliestireno. Em síntese, os poços foram preenchidos com 100 µL de uma suspensão de bactérias ajustadas a 2×10^6 CFU / mL. Em seguida, com 100 µL de cada calcogenol éster foi adicionado em diferentes concentrações que variavam de 250 - 7.8 µg/mL, obtendo-se um volume final de 200 µL por poço. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C com 5,0 % de CO₂ sob agitação constante. Após incubação foi feita a análise visual das placas e a medida de turbidez de cada poço com o auxílio do espectrofotômetro (Spectramax) à 620 nm. Foi considerado CIM (Concentração Mínima Inibitória) a menor concentração de calcogenol éster capaz de inibir o crescimento visual das bactérias.

Para determinação da CBM (Concentração Bactericida Mínima) 10 µL da suspensão contida nos poços em que não houve um crescimento microbiano visível, foi inoculado em placas de petri com meio BHI ágar. Foi considerada CBM a menor concentração da substância-teste capaz de inibir completamente o crescimento microbiano nas placas de petri.

4.4 Ensaio de atividade antibiofilme

O ensaio de formação de biofilme microbiano foi realizado segundo a metodologia descrita por Stepanovic e colaboradores (2000). As placas de poliestireno de fundo “chato” foram preparadas da mesma forma do ensaio de atividade antimicrobiana. Contudo, para cada ensaio, duas placas eram utilizadas, uma para quantificação da biomassa e outra para contagem de UFC's (Unidades Formadoras de Colônias) aderidas à placa.

4.4.1 Quantificação de biomassa

Placas estéreis de 96 poços foram preparadas utilizando um procedimento semelhante ao utilizado nos ensaios de atividade antimicrobiana, com a mesma concentração de células e substâncias. Após 24h, o sobrenadante de cada poço foi removido e os biofilmes formados foram lavados três vezes com 200 µl de água

esterilizada/poço para remover as células fracamente aderidas. A biomassa de biofilme foi quantificada utilizando a coloração violeta de cristal (CV)¹². Resumidamente, as placas contendo os biofilmes foram secas durante cerca de 15 minutos e 200 µL de metanol de grau analítico foi transferido para cada poço por 15 minutos para fixar as células. Em seguida, o metanol foi removido e adicionado 200 µL de 1% CV poço durante 5 minutos. Posteriormente, o processo de lavagem foi repetido com água estéril e as placas foram deixadas à temperatura ambiente. Para a dissolução do corante preso ao biofilme, foram adicionados 200 µL de ácido acético 33% por 5 minutos. Em seguida, a absorbância obtida foi medida com o auxílio do espectrofotômetro (Spectramax) à 590nm.

4.4.2 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Foram preparadas placas estéreis de 96 poços utilizando um procedimento semelhante ao utilizado nos ensaios de atividade antimicrobiana, com a mesma concentração de células e substâncias. Após as 24 horas de incubação à 37 °C em 5,0 % de CO₂, as placas foram lavadas três vezes com água destilada estéril para remoção das células fracamente aderidas. Em seguida, em cada poço da placa foram adicionados 200 µL de solução de H₂O estéril e levado para o banho de ultrassônico (Sonicor/SC-52) por 6 minutos para a liberação das células. O volume de cinco poços de cada concentração foi removido e reunido em um eppendorf estéril perfazendo um volume final de 1 mL. Em uma nova placa de 96 poços foi realizada a diluição na base dez da suspensão de células para posterior plaqueamento em BHI ágar. Em seguida as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas com 5,0 % de CO₂. Após a contagem do número de colônias crescidas em cada placa, o valor foi expresso em número de Log UFC/mL.

4.5 Biofilme pré-formado

Os ensaios foram também realizados em placas de 96 poços (200 µL com 106 UFC / ml) e foram incubadas durante 24 h a 37°C em 5,0 % de CO₂ sob agitação constante. Após 24 h, 200 µL de meio foi removido e um volume igual de calcogenol ésteres em concentrações variando de 250 a 7.8 µg / mL foi adicionado. Após 24 h, o

sobrenadante novamente foi retirado e todos os poços foram lavados três vezes com água destilada estéril para remoção das células fracamente aderidas. Em seguida, os biofilmes foram avaliados quanto a formação de biomassa e número de células viáveis como descrito anteriormente.

4.6 Análise estatística

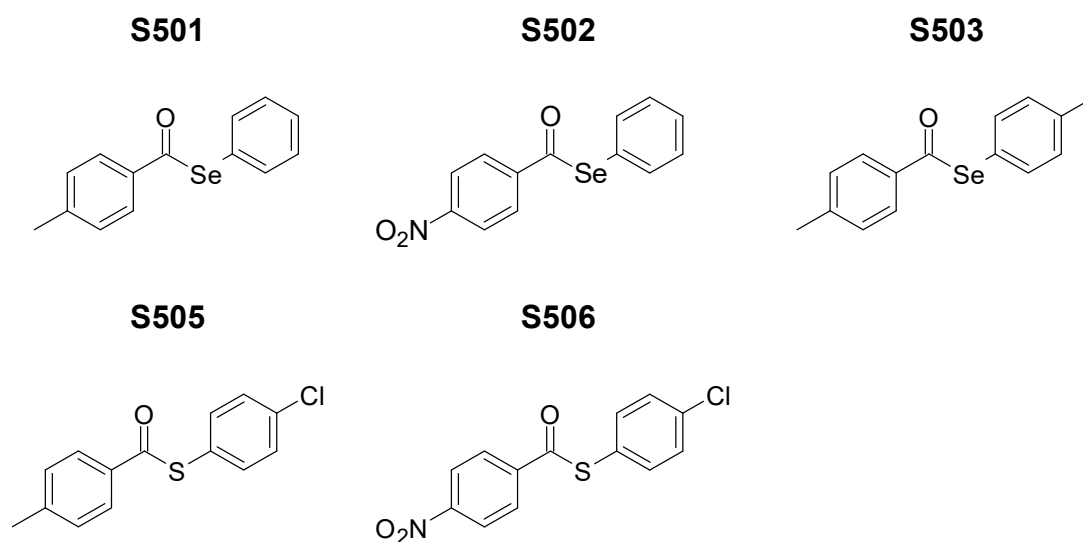
Todos os experimentos foram realizados em triplicata com os respectivos resultados categorizados em Microsoft Excel (Versão 2013 para Windows) e posterior análise estatística no software GraphPad Prism (Versão 6.0 para Windows). Para a análise de diferenças inter-grupos foi realizado teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni e nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Síntese de calcogenol ésteres

Foram sintetizados 5 análogos de calcogenol ésteres (S501, S502, S503, S505 e S506) e foram elucidados através de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C e ^1H . As suas estruturas químicas estão descritas na figura 10 e seus deslocamentos químicos dos espectros de ressonância nuclear estão descritos logo abaixo.

Figura 10 - Estrutura química dos Calcogenol ésteres.



Forte: Elaborado pelo autor.

5.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM)

Os resultados mostraram que calcogenol ésteres S505 e S506 apresentaram CIM de 125 e 62.50 $\mu\text{g/ml}$ para *S. mutans* e S501; S502 e S506 com valores de CIM de 62.50; 31.25 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para *S. parasanguinis*. Os demais calcogenol ésteres apenas interferiram no crescimento de ambas as bactérias (dados não mostrados). Curiosamente, nenhum calcogenol éster apresentou CBM (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) de Calcogenol ésteres e a concentração bactericida mínima (CBM) contra agentes patogênicos orais.

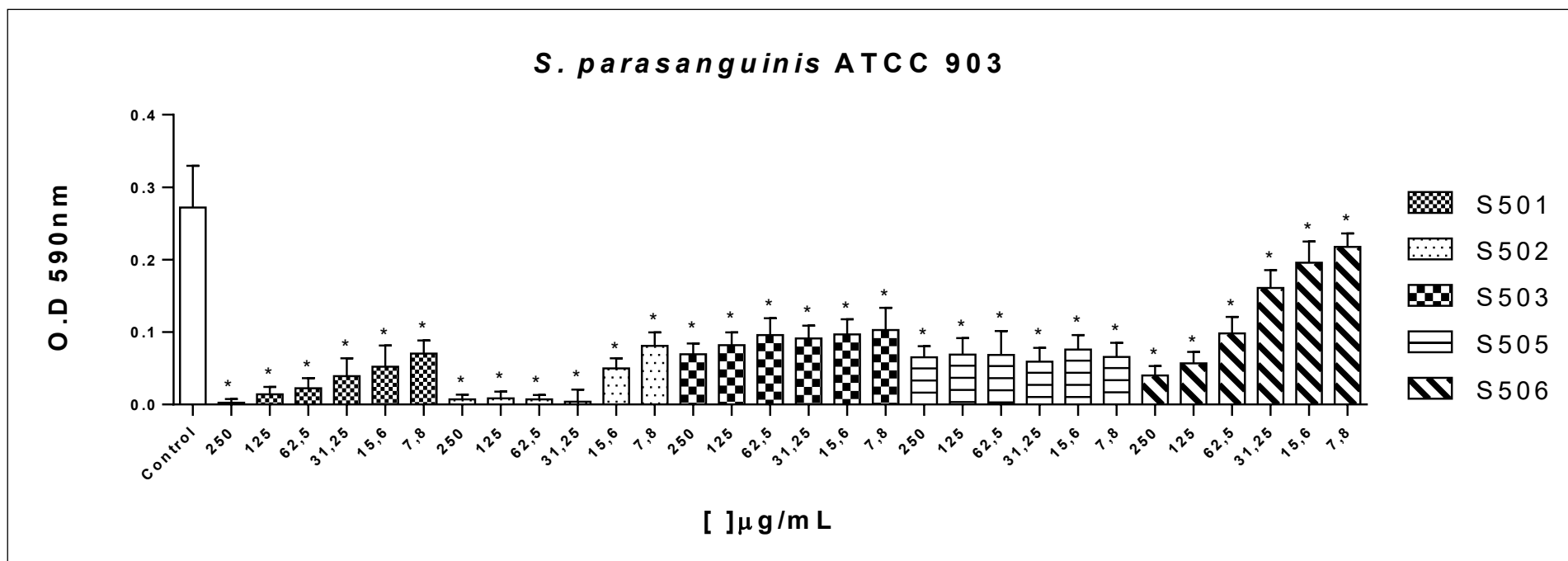
Bactéria	CIM ($\mu\text{g/mL}$)					CBM ($\mu\text{g/mL}$)
	S501	S502	S503	S505	S506	
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	-	-	-	250	62,5	-
<i>S. parasanguinis</i> ATCC 903	62,5	31,25	-	-	250	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

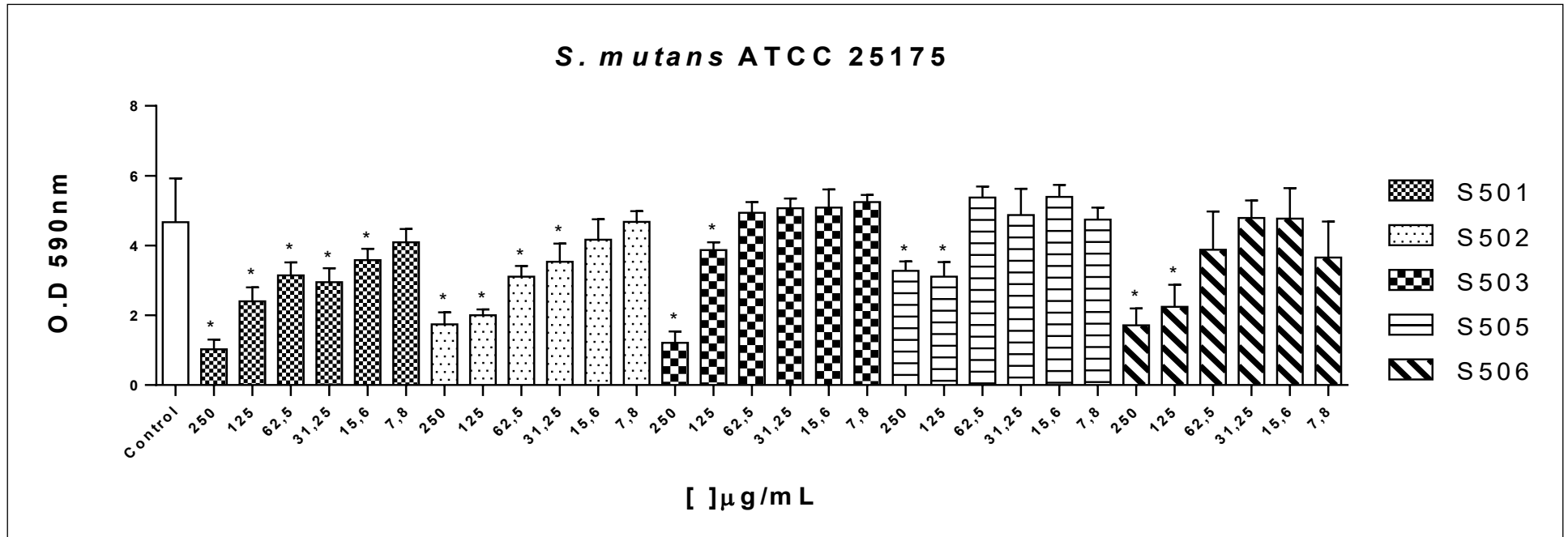
5.3 Atividade antibiofilme e quantificação da biomassa

No que diz respeito a formação de biofilme para *S. parasanguinis*, a formação de biomassa foi reduzida na presença de S503, S505 e S506 e completamente inibida com S501 (250,00 $\mu\text{g/mL}$) e 502 (31,25 $\mu\text{g/mL}$). Para *S. mutans* houve uma redução de biomassa na maioria das concentrações de S501 e S502 enquanto os demais só tiveram ação nas duas maiores concentrações (Figura 11 e 12).

Figura 11 - Avaliação quantitativa de biofilmes *S. parasanguinis* ATCC 903.



Fonte: Elaborado pelo autor.

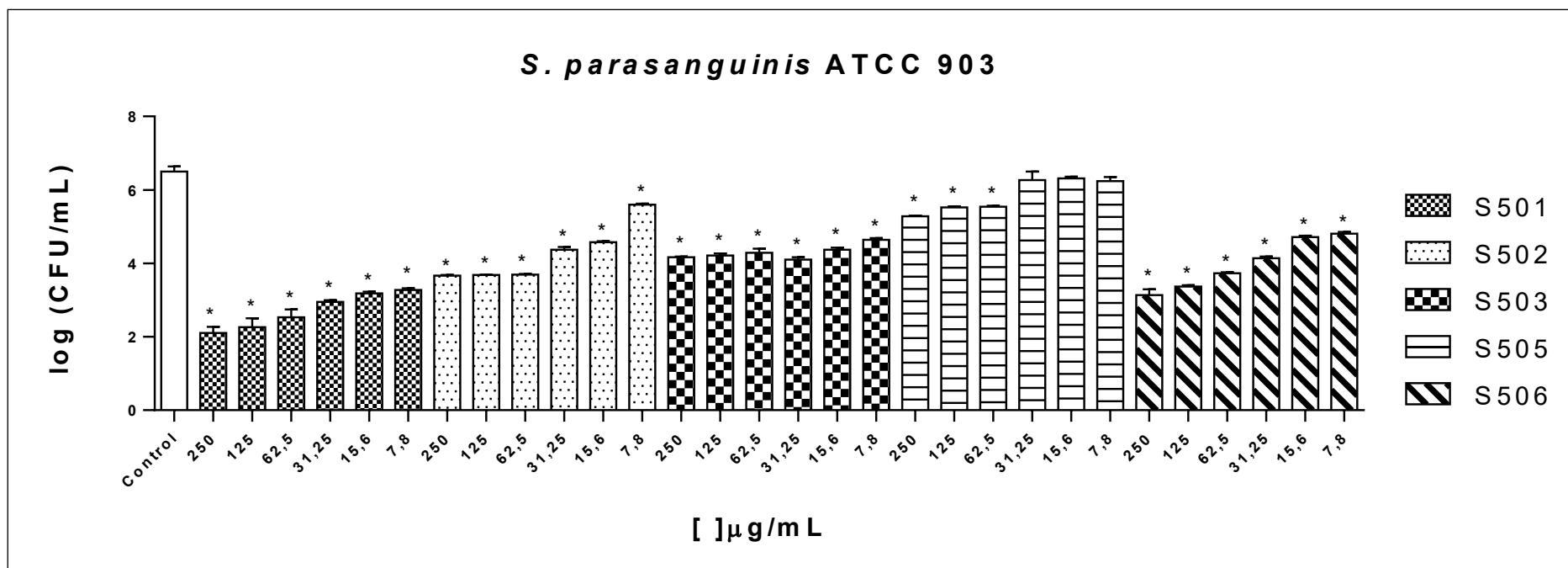
Figura 12 - Avaliação quantitativa de biofilmes de *S. mutans* ATCC 25175.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Contagem de células viáveis

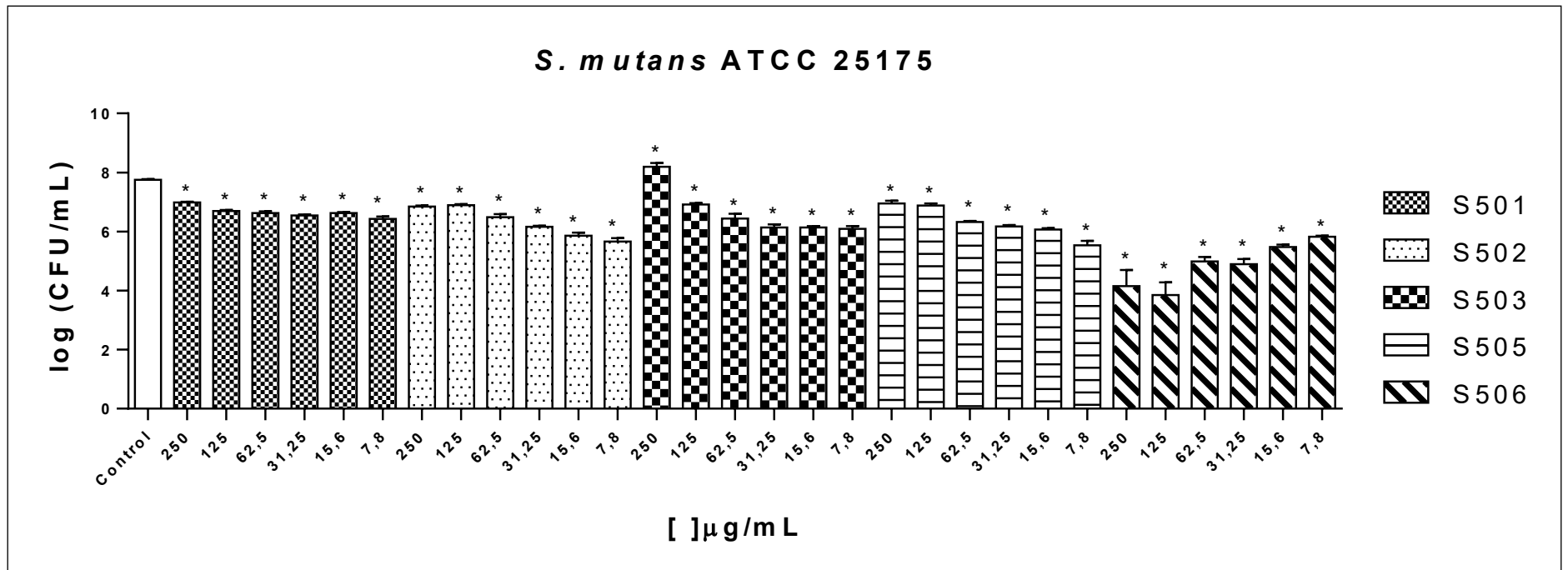
Com relação ao número de células viáveis, os calcogenol ésteres exerceram atividades sobre as espécies bacterianas testadas. A figura 13 mostra que *S. parasanguinis* apresentou maior susceptibilidade a todos agentes do teste e os resultados mostraram que os compostos S501; S502 e S506 em concentrações de 250 µg/mL foram capazes de reduzir a quantidade de células bacterianas viáveis em cerca de 4,4 log₁₀; 2,9 log₁₀ e 2,2 log₁₀. Houve pouca variância nesses resultados para essas substâncias. As substâncias S503 e S505 também reduziram o número de células na menor concentração testada em cerca de 1,9 log₁₀ e 0,3 log₁₀, muito embora S505 seja mais efetivo em concentrações maiores de 31,25 µg/mL. *S. mutans*, figura 14, teve a sua quantidade de células viáveis diminuída. Em concentrações maiores de S501; S503 e S505 houve um aumento do número de células, no entanto à medida que a concentração diminuiu ocorreu uma redução. No entanto, o composto S506 foi bastante efetivo no que se refere ao número de células viáveis, reduzindo em cerca de 3,7 log₁₀ (250 µg/mL); 3,9 log₁₀ (125 µg/mL); 2,7 log₁₀ (62,5 µg/mL); 2,8 log₁₀ (31,25 µg/mL); 2,3 log₁₀ (15,6 µg/mL) e 1,9 log₁₀ (7,8 µg/mL). Vale salientar que o seu análogo, S505, substituído por um grupamento metil na posição para-dirigente em um dos seus anéis benzênicos, se mostrou menos efetivo, reduzindo cerca de 0,8 log₁₀ na concentração de 250 µg/mL e cerca de 2,0 log₁₀ na concentração de 7,8 µg/mL (Figura 13 e 14).

Figura 13 - Avaliação das unidades formadoras de colônias de *S. parasanguinis* ATCC 903.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 - Avaliação das unidades formadoras de colônias de *S. mutans* ATCC 25175.

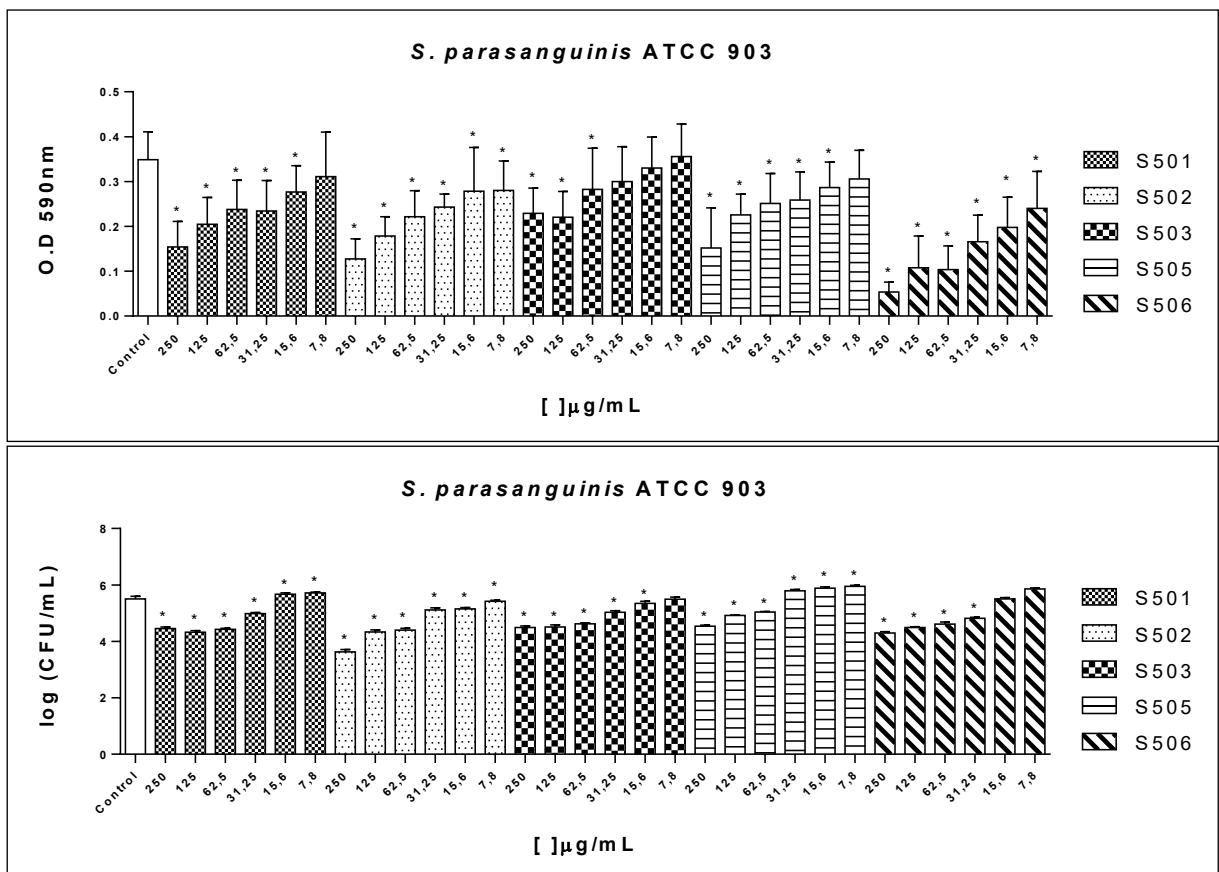


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Quantificação de biomassa de biofilmes pré-formados

Os resultados do ensaio estão descritos na figura 15 e mostraram que todos os compostos foram efetivos no que se refere a redução de biomassa para *S. parasanguinis*. Destacando-se a atividade do S506 que reduziu a biomassa em cerca de 85% na concentração de 250µg/mL e na menor concentração de 7.8 µg/mL reduziu cerca de 31%, no entanto os compostos S501 e S502 e S505 foram também bastantes significativos reduzindo a biomassa na concentração de 250µg/mL em cerca de 55%, 63% e 56%, respectivamente. Para a *S. mutans* os resultados das substâncias foram pouco significativos em relação ao grupo controle.

Figura 15 - Avaliação quantitativa de biofilmes pré-formados *S. parasanguinis* ATCC 903 e *S. mutans* ATCC 25175.

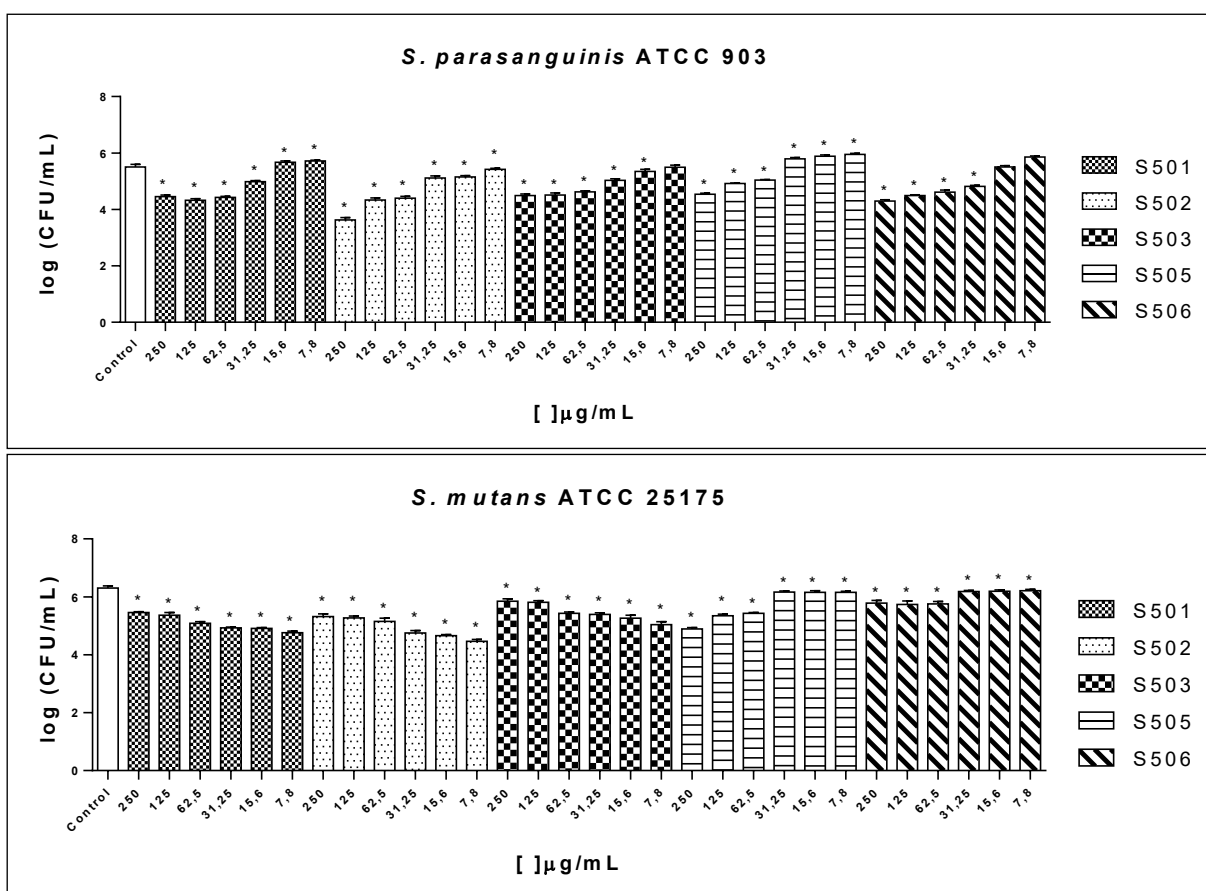


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 Número de células viáveis de biofilmes pré-formados

Os resultados da avaliação do número de células viáveis do biofilme pré-formados estão descritos na figura 16. Para *S. parasanguinis*, todas as substâncias reduziram o número de células viáveis, mas apenas nas maiores concentrações. A substância S502 se destacou nesse ensaio reduziu cerca de 1.9, 1.2, 1.1 log₁₀ nas concentrações 250, 125, 62.5 e 31.25 µg/mL, mas foi pouco efetivo em concentrações de 15.6 e 7.8 µg/mL. Para *S. mutans* houve pouca redução no que diz respeito ao número de células nas maiores concentrações de S501, S502 e S503, no entanto à medida que a concentração foi diminuindo houve uma queda na diminuição do número de células, porem o mesmo não foi observado nas substancias S505 e S506.

Figura 16 – Avaliação das unidades formadoras de colônias de *S. parasanguinis* ATCC 903 e *S. mutans* ATCC 25175 em biofilme pré-formado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Shaaban e colaboradores (2014) relataram que uma série de organocalcogênios possuem toxicidade contra *Mycobacterium phlei*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, tipos de bactérias, e contra *Aspergillus niger*, um tipo de fungo, no entanto não determinou seus CIM e MBC. No entanto, El-Shamy e colaboradores (2015) relataram valores de CIM entre 250 e 12,5 µg/mL de 23 tipos de nucleosídeos de enxofre e selênio para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans*. Isso demonstra que esses compostos podem ser grandes promissores no que diz respeito a propriedades antimicrobianas.

S. parasanguinis desempenha papel fundamental para o processo de desenvolvimento do biofilme cariogênico, uma vez que possui uma série de genes relacionados à produção de proteínas de ligação, como o gene Fap1, que é responsável pela produção de fímbrias encarregadas da adesão do próprio micro-organismo à superfície dentárias e o gene BapA1, responsável pela ligação direta entre colonizador inicial e colonizador secundário, contribuindo para o desenvolvimento do biofilme (GARNETT *et al.*, 2012). Enquanto *S. mutans* é uma bactéria que possui características acidogênicas e acidúricas, sendo apontada como um patógeno primário e mais abundante da cárie dental em humanos (SOTO *et al.*, 2013). Biofilme orais são descritos como um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento de cárie. Remover o biofilme da superfície dentária seria uma grande alternativa no combate as cáries.

Em nosso trabalho buscou-se sintetizar e caracterizar substâncias eficazes no combate ao biofilme. Deve-se ressaltar a importância deste trabalho, pois ele é a primeira descrição do efeito de calcogenol éteres de selênio e enxofre na literatura para as estirpes que foram alvo de estudo e existem poucos relatos a respeito de organocalcogênios e bactérias do gênero *Streptococcus*.

Os valores de CIM encontrados mostraram que cada análogo de calcogenol ésteres tem uma ação específica contra as bactérias testadas, podendo agir, inclusive por alguns mecanismos diferentes, ainda não elucidados. Ainda dentro desse contexto, foi relatado na literatura que nanopartículas de selênio possuem propriedades antibacterianas contra o gênero *Staphylococcus* apresentando CIM de

250 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis* e CIM de 125 µg/mL para *Staphylococcus aureus*. Tal achado foi relatado por Stevanovića e colaboradores (2015). Ele ainda relatou que essas nanopartículas de selênio possuem CIM de 500 µg/mL para *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus subtilis*. Kim e colaboradores (2006) também descreveram o efeito antibacteriano e antifúngico de 18 compostos de enxofre sobre uma série de microrganismos, os melhores resultados foram encontrados para tiosulfatos contendo benzila como radical, apresentando CIM de 16 µg/mL para *Streptococcus agalactiae*.

A revisão da literatura não demonstrou trabalhos publicados a respeito de biofilmes e calcogenol ésteres, no entanto Shakibaie e colaboradores (2015) demonstraram que nanopartículas de selênio em concentrações abaixo de 16 µg/mL reduziram o biofilme *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* entre 34% a 55%, evidenciando, assim os compostos de selênio como fortes agentes antibiofilmes. Com relação a quantificação de biomassa do biofilme ocorreu diferenças entre o grupo controle e todos os calcogenol ésteres. Curiosamente os melhores resultados apresentaram como radical o grupamento nitro (NO₂). Acredita-se que essa porção polar possa ser um requisito para desestruturar as membranas celulares por meio de uma interação não específica com fosfolípides membranas e desestabilizar as interações não-covalentes entre os ácidos graxos da bicamada lipídica, e assim interferindo no desenvolvimento celular. Além disso, o efeito sobre a formação de biofilme parece estar diretamente relacionado com a inibição do crescimento, que mostra uma ação não específica relacionada com a atividade antibiofilme (CARNEIRO *et al.*, 2010). Sabe-se, também, que a interrupção ou mesmo a degradação da matriz polimérica extracelular dos biofilmes pode interferir diretamente na comunicação dessas comunidades, de modo a dispersá-las (SUN, 2013). A eficiência do efeito inibitório o biofilme é bem apreciável, considerando a resistência bem conhecida destas comunidades, principalmente para *S. mutans*, uma vez que esta estirpe forma uma grande quantidade de biofilme.

Shakibaie e colaboradores (2015) descrevem na literatura que nanopartículas de selênio reduzem a ligeiramente quantidade de UFC/mL de biofilmes de três isolados clínicos de *P. mirabilis*, *S. aureus* e *P. Aeruginosa*, sendo não tóxico para as mesmas. No que se refere a contagem do número de células viáveis. Em nosso trabalho, *S. parasanguinis* mostrou uma maior susceptibilidade em modelo dose-resposta a todas as substâncias citadas. No caso *S. mutans* observamos que os

calcogenol ésteres promoveram a diminuição do número de células viáveis quando comparado com o grupo controle à medida que a concentração das substâncias diminuía, no entanto para as mesmas substâncias houve um aumento da produção de matriz polimérica extracelular nas mesmas concentrações, sugerindo que o agente do teste ocasiona estresse a estirpe do estudo, aumentando a quantidade de biomassa à medida que ocorre redução no número de células. Tal achado foi encontrado por Carneiro e colaboradores (2010), assim como Liu e Burne (2009). No nosso trabalho encontramos um selenoester eficaz no que se refere a redução das estirpes estudadas, evidenciando uma maior importância para o grupamento nitro presente na estrutura química dos calcogenol ésteres.

Os resultados da quantificação de biomassa e de células bacterianas viáveis de ambas as bactérias no ensaio de biofilme pré-formado demonstram uma dessensibilização dos calcogenol ésteres em relação às estirpes avaliadas. Sabe-se que o crescimento bacteriano em biofilmes promove uma proteção à atuação de antibióticos e a fatores de estresse ambiental tanto devido à barreira física formada pela matriz extracelular o que dificulta a penetração dos agentes antimicrobianos dentro do biofilme como também devido aos mecanismos de comunicação bacteriana que estimulam as bactérias a produzir enzimas e proteínas importantes para a adaptação fisiológica do biofilme (SOTO *et al.*, 2013).

7 CONCLUSÕES

Em nosso estudo foram sintetizados por uma rota alternativa 5 tipos de análogos do calcogenol ésteres e foram realizados ensaios antimicrobianos e antibiofilmes contra as estirpes *S. mutans* ATCC 25175 e *S. parasanguinis* ATCC 903. Após elucidação e análise dos resultados, verificou-se que essas substâncias podem ser consideradas potenciais agentes de controle contra esses agentes cariogênicos, reduzindo a quantidade de biofilmes em alguns casos para ambas as estirpes. Observou-se que os compostos testados não possuem atividade bactericida, apresentando apenas atividade bacteriostática, tornando-as efetivas no controle dessas bactérias, mas sem erradicá-las.

No entanto, maiores estudos relacionados aos mecanismos de ação dessas substâncias sobre a membrana celular bacteriana precisam ser realizados, tendo em vista buscar uma maior compressão para buscar realizar possíveis modificações em sua estrutura química para aumento de atividade antimicrobiana. Também é necessário realizar estudos adicionais de citotoxicidade, a fim de autenticar a sua aplicabilidade.

REFERÊNCIAS

- AIMUTIS, W. R. Lactose cariogenicity with an emphasis on childhood dental caries. **International Dairy Journal**, Nutrition and health aspects of lactose and its derivatives. v. 22, n. 2, p. 152–158, 1 fev. 2012.
- AJDIĆ, D. et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 22, p. 14434–14439, 29 out. 2002.
- AL-DAJANI, M.; LIMEBACK, H. Emerging science in the dietary control and prevention of dental caries. **J Calif Dent Assoc.**, v. 40, n. 10, p. 799-804, out. 2012.
- ALLISON, D. G. The biofilm matrix. **Biofouling**, v. 19, n. 2, p. 139–150, abr. 2003.
- BACK, T. G. Organosulfur Chemistry in Asymmetric Synthesis. Edited by T. Toru and C. Bolm. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 12, p. 2078–2078, 2009.
- BATONI, G. *et al.* Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, p. 256-279, jun. 2011.
- BATONI, G. *et al.* Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, p. 256-279, jun. 2011.
- CAMILLI, A.; BASSLER, B. L. Bacterial small-molecule signaling pathways. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. 5764, p. 1113–1116, 24 fev. 2006.
- CARNEIRO, V. A. et al. Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 1, p. 190–201, 30 dez. 2010.
- CATALDI, M. et al. Biofilm-dependent airway infections: a role for ambroxol? **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 28, n. 2, p. 98–108, ago. 2014.
- CATALDI, M. et al. Biofilm-dependent airway infections: a role for ambroxol? **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 28, n. 2, p. 98–108, ago. 2014.

CERQUEIRA, D. F. **Etiologia e epidemiologia da cárie dentária**. Especialização em Saúde da Família-Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2010.

COGAN, N. G. Effects of persister formation on bacterial response to dosing. **J. Theor. Biol.**, v. 238, n. 3, p. 694-703, feb. 2006

COIMBRA, M. B. *et al.* Relação entre risco à cárie dentária e variáveis socioeconômicas e demográficas em usuários da Estratégia Saúde da Família no município de Amparo, SP: um estudo longitudinal. **Arq. Odontol.**, v. 48, n. 3, p. 142-150, set. 2012.

CORBIN, A. *et al.* Antimicrobial penetration and efficacy in an in vitro oral biofilm model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3338–3344, jul. 2011.

CORBIN, A. *et al.* Antimicrobial penetration and efficacy in an in vitro oral biofilm model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3338–3344, jul. 2011.

CORTELLAZZI, K. L. *et al.* Influência de variáveis socioeconômicas, clínicas e demográfica na experiência de cárie dentária em pré-escolares de Piracicaba, SP. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 12, p. 490–500, set. 2009.

COX, G.; WRIGTH, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 303, n. 6-7, p. 287-292, ago. 2013.

DANIEL-HOFFMANN, M. *et al.* A potential antimicrobial treatment against ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* using the tellurium compound AS101. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 8, p. 631–638, ago. 2009.

DANIELS, R.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 261–289, jun. 2004.

EL-SHAMY, I. E. *et al.* Synthesis and antimicrobial activities of S-nucleosides of 4-mesitylphthalazine-1-thiol and some new selenium-containing nucleoside analogues. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 10, p. 1183–1188, 4 mar. 2015.

ERRIU, M. *et al.* Microbial biofilm modulation by ultrasound: Current concepts and controversies. **Ultrason. Sonochem.**, v. 21, n. 1, p. 15-22, jan. 2014.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Santos, 2005.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, set. 2010.

FORSTER, A.; KLIMM, W. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. **Caries Res.**, v. 43, n. 2, p. 83-91, fev. 2009.

FREDGA, A. Organic Selenium Chemistry. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 192, n. 1, p. 1–9, 1 abr. 1972.

GARNETT, J. A. *et al.* Structural insight into the role of *Streptococcus parasanguinis* Fap1 within oral biofilm formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417, n. 1, p. 421–426, 6 jan. 2012.

GIACAMAN, R. A.; ARANEDA, E.; PADILLA, C. Association between biofilm-forming isolates of mutans streptococci and caries experience in adults. **Archives of Oral Biology**, v. 55, n. 8, p. 550–554, ago. 2010.

HERBETTE, S.; ROECKEL-DREVET, P.; DREVET, J. R. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. **The FEBS journal**, v. 274, n. 9, p. 2163–2180, maio 2007.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 236, n.2, p. 163-173, jul. 2004.

KELLER, L.; SURETTE, M. G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, n. 4, p. 249-258, apr. 2006.

KIM, S.; KUBECA, R.; MUSAHA, R.A. Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *Petiveria alliacea* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v.104, n.1–2, p.188–192, mar. 2006.

KLINKE, T.; KNEIST, S.; DE SOET, J. J.; KUHLISCH, E.; MAUERSBERGER, S.;

KOLENBRANDER, P. E. *et al.* Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 471-480, abr. 2010.

LIMA, J. E. O. Cárie dentária: um novo conceito. **R. Dental Press. Ortodon. Ortop. Facial.**, v. 43, n. 6, p. 119-130, dez. 2007.

LIU, Y.; BURNE, R. A. Multiple two-component systems of *Streptococcus mutans* regulate agmatine deiminase gene expression and stress tolerance. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 23, p. 7363–7366, dez. 2009.

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

MANJI, F. *et al.* A random effects model for some epidemiological features of dental caries. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 19, n. 6, p. 324-328, dez. 1991.

MARSH, P. D. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. **Dent. Clin. North Am.**, v. 54, n. 3, p. 441-454, jul. 2010.

MOREIRA, Z. Ministério da Saúde. **Portal da saúde- SUS**, 2011. Disponível em: <[http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/3935/162/ministerio-investe-r\\$-27-bilhoes-em-saude-bucal.html](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/3935/162/ministerio-investe-r$-27-bilhoes-em-saude-bucal.html)>. Acesso em: 21 jan 2014.

MORODER, L. Isosteric replacement of sulfur with other chalcogens in peptides and proteins. **Journal of Peptide Science**, v. 11, n. 4, p. 187–214, 2005.

NAKANO, K. *et al.* Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3313–3317, set. 2006.

NARAYANAPERUMAL, S. *et al.* Synthesis of Diorganyl Selenides Mediated by Zinc in Ionic Liquid. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 75, n. 11, p. 3886–3889, 4 jun. 2010.

PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends in Microbiol.**, v. 13, n. 1, p. 27-33, jan. 2005.

PATTENDEN, G.; WINNE, J. M. An intramolecular [4+3]-cycloaddition approach to rameswaralide inspired by biosynthesis speculation. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 52, p. 7310–7313, 30 dez. 2009.

PROKOPCOVÁ, H.; KAPPE, C. O. Copper-Catalyzed C–C Coupling of Thiol Esters and Boronic Acids under Aerobic Conditions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 20, p. 3674–3676, 2008.

SANTOS, R. P. et al. Correlation between *Enterococcus faecalis* Biofilms Development Stage and Quantitative Surface Roughness Using Atomic Force Microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, v. 14, n. 2, p. 150–158, abr. 2008.

SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **Lancet (London, England)**, v. 369, n. 9555, p. 51–59, 6 jan. 2007.

SHAABANA, S.; SASSEB, F.; BURKHOLZC, T.; JACOBC, C. Sulfur, selenium and tellurium pseudopeptides: Synthesis and biological evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.22, n.14, p.3610–3619, Jul. 2014.

SIMÕES, L. C.; SIMÕES, M.; VIEIRA, M. J. The effects of metabolite molecules produced by drinking water-isolated bacteria on their single and multispecies biofilms. **Biofouling.**, v. 27, n. 7, p. 685-699, ago. 2011.

SIMÕES, M. Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. **Curr. Med. Chem.**, v.18, n. 14, p. 2129-2145, maio. 2011.

SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. K. Biofilms: implications in bioremediation. **Trends Microbiol.**, v. 14, n. 9, p. 389-97, set. 2006.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 223–229, 1 abr. 2013.

VIEIRA, A. A. et al. 1,3-Dipolar cycloaddition reaction applied to synthesis of new unsymmetric liquid crystal compounds-based isoxazole. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 8, p. 905–908, 25 fev. 2009.

WADE, W. G. The oral microbiome in health and disease. **Pharmacol Res.**, v. 69, n. 1, p. 137-143, mar. 2013.

WANG, W. et al. Effect of a novel antimicrobial peptide chrysopsin-1 on oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilms. **Peptides**, v. 33, n. 2, p. 212–219, fev. 2012.

WILLCOX, M. D. Microbial adhesion to silicone hydrogel lenses: a review. **Eye Contact Lens.**, v. 39, n. 1, p. 60-65, jan. 2013.

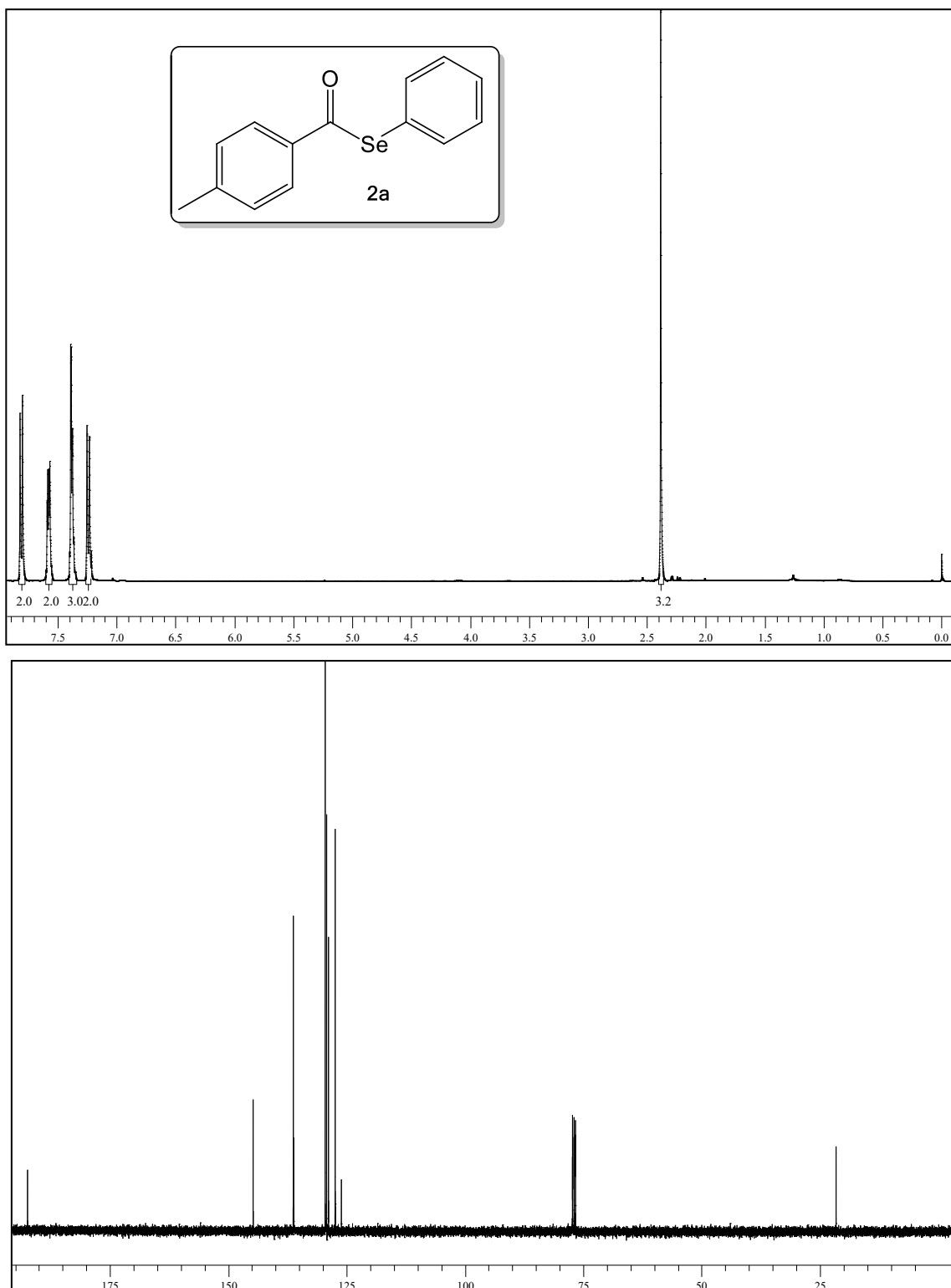
WILLCOX, M. D. Microbial adhesion to silicone hydrogel lenses: a review. **Eye Contact Lens.**, v. 39, n. 1, p. 60-65, jan. 2013.

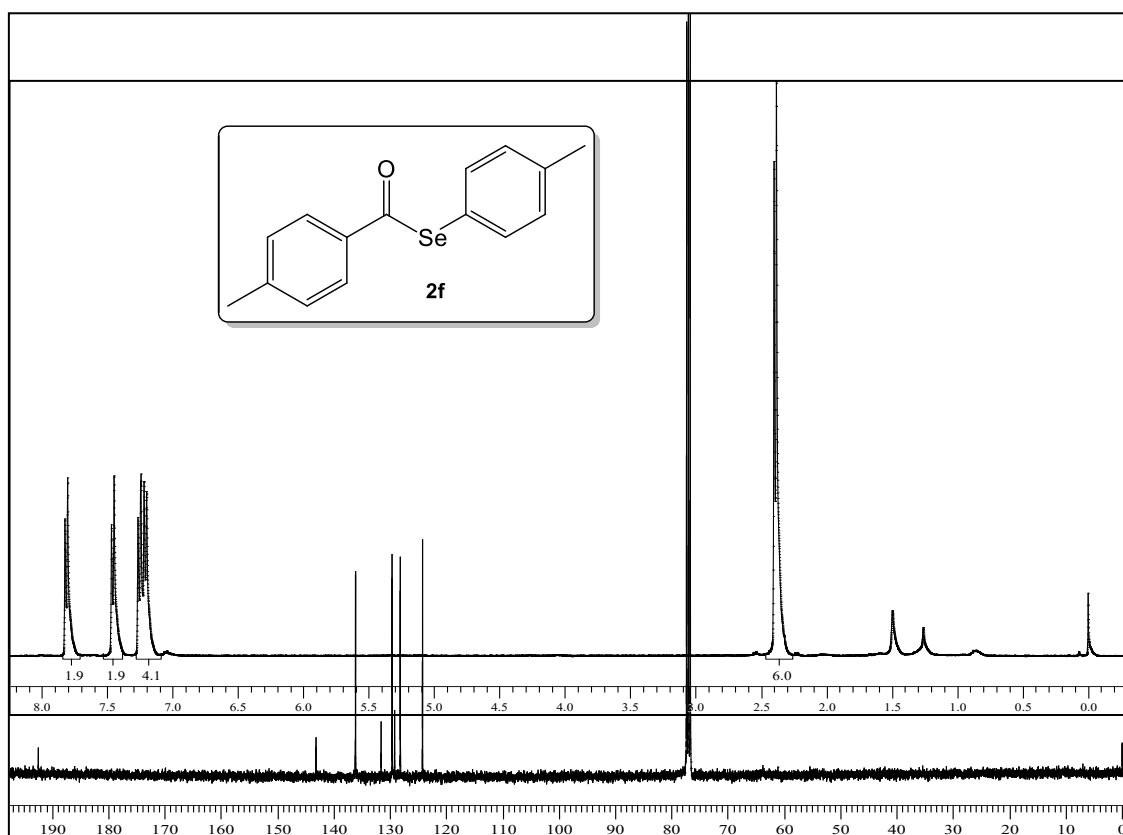
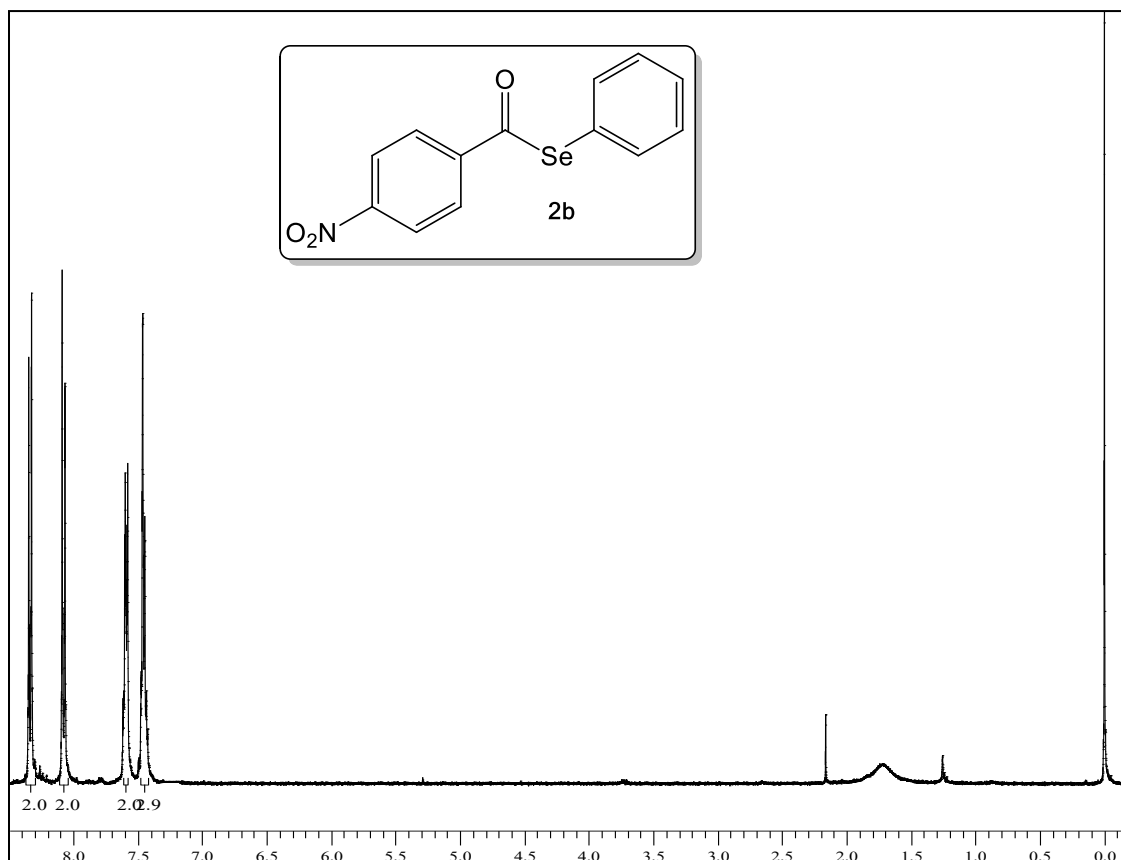
WU, C. D.; WEI, G.-X. Tea as a functional food for oral health. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 18, n. 5, p. 443–444, maio 2002.

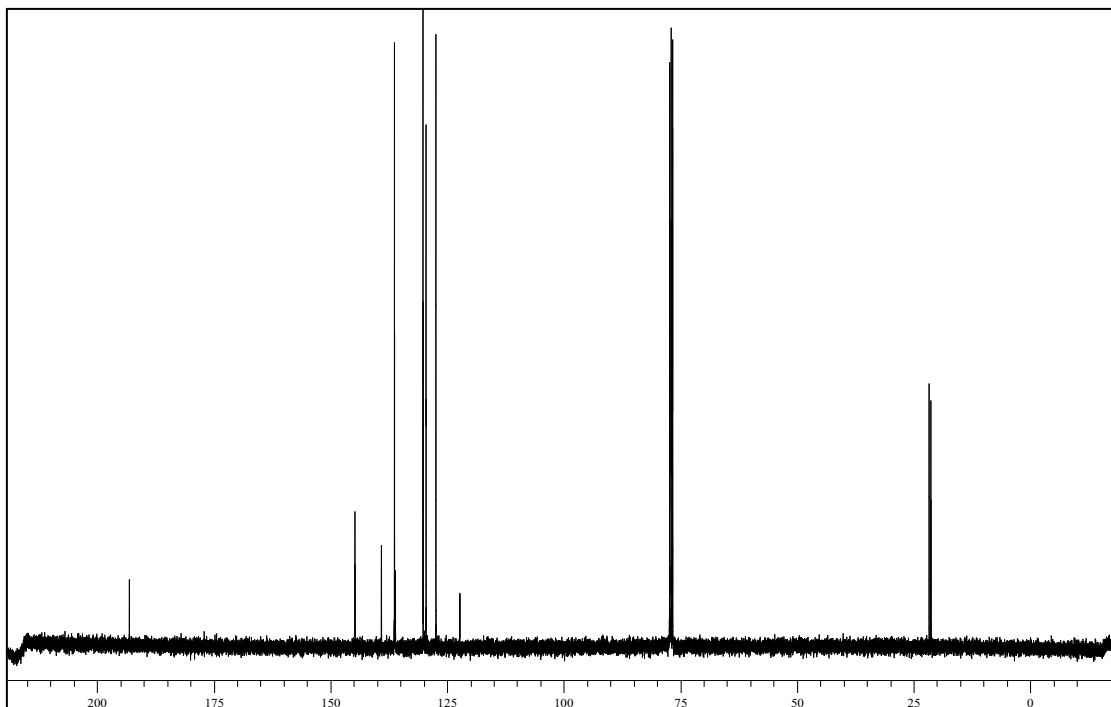
ZERO, D. T. *et al.* The biology, prevention, diagnosis and treatment of dental caries: scientific advances in the United States. **J Am Dent Assoc.**, v. 140, n. 1, p. 25-34, set. 2009.

ANEXO A - RESSONANCIA MAGNÉTICA DE NUCLEAR DE CARBONO 13 E HIDROGÊNIO DOS CALCOGENOL ÉSTERES

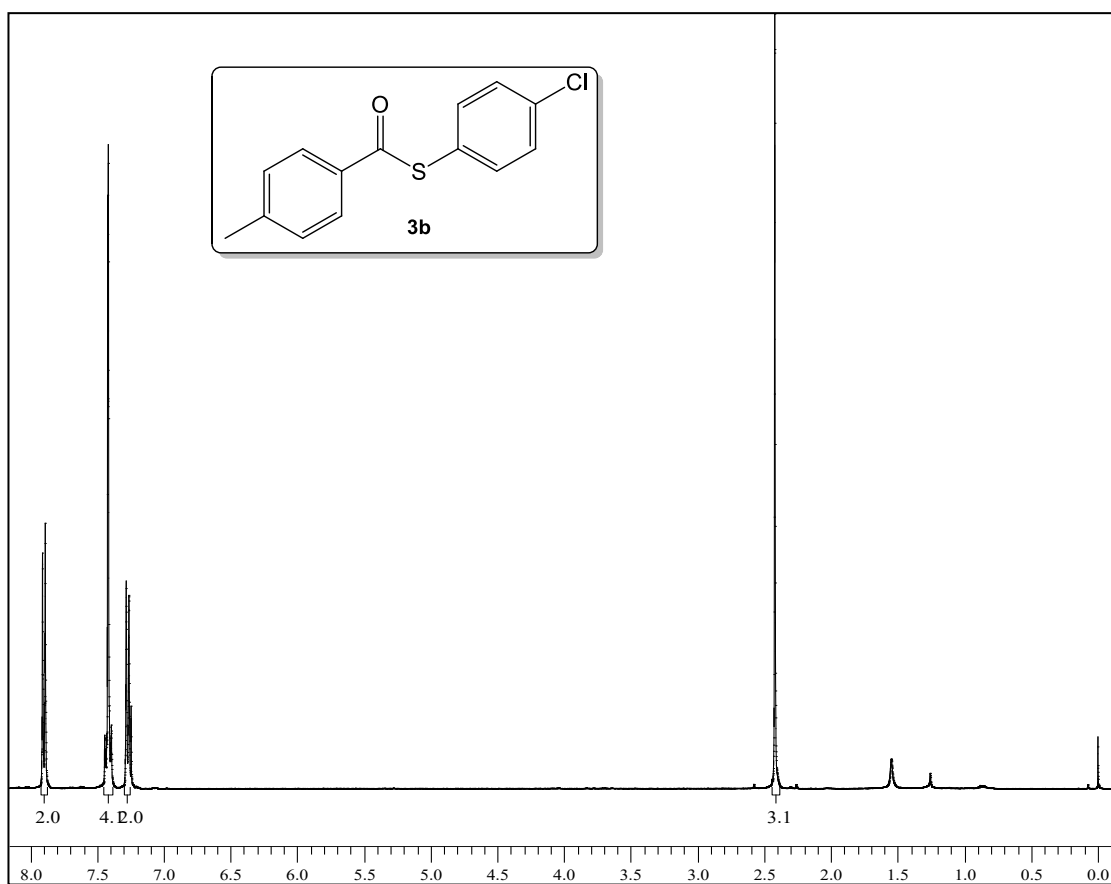
COMPOSTO S501 - 4-metilbenzoselenoato de fenila



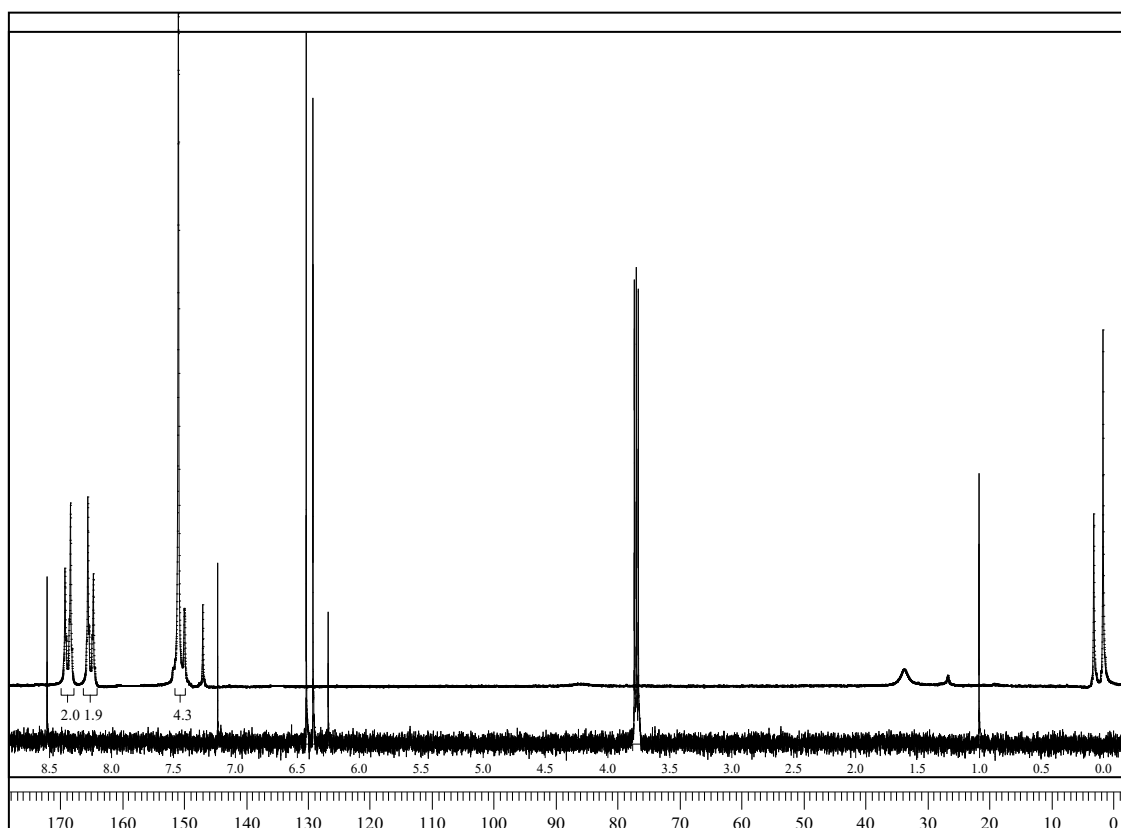
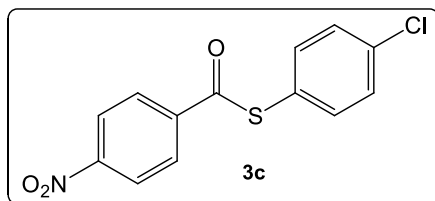
COMPOSTO S502 - 4-nitroselenoato de fenila**COMPOSTO S503 - p-metilbenzoselenoato de p-toluila**

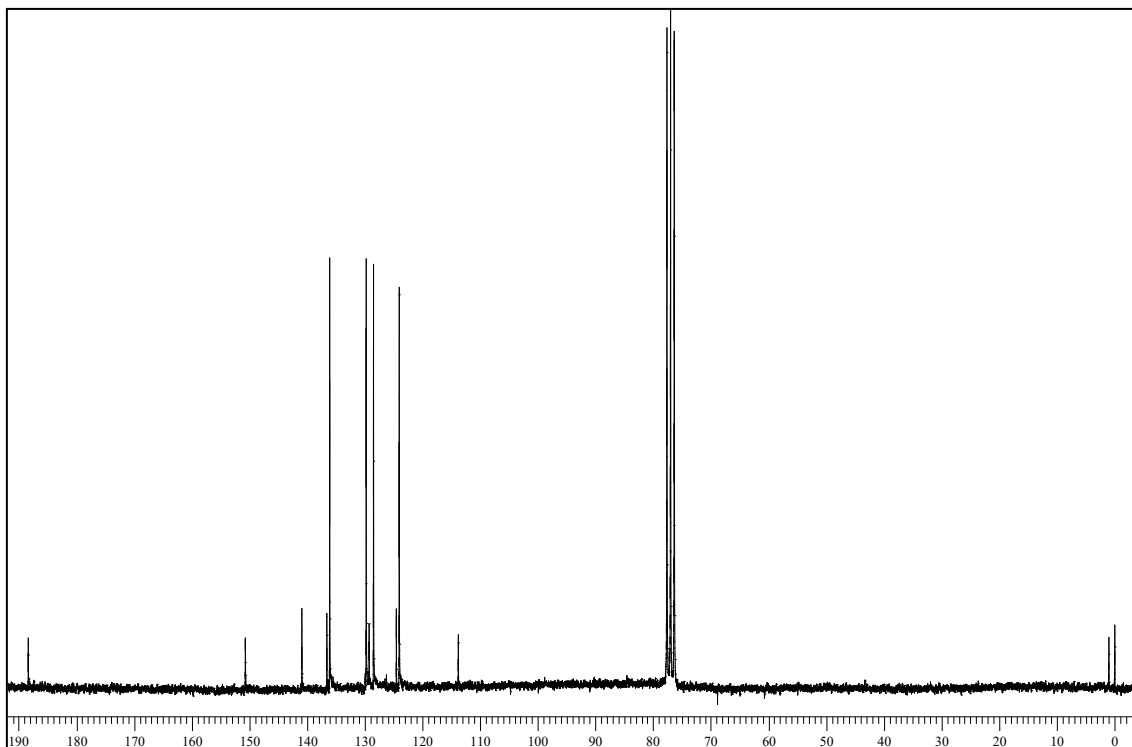


COMPOSTO S505 - p-metilbenzotioato de p-clorofenila



COMPOSTO S506 - p-nitrobenzotioato de p-clorofenila





Deslocamentos químicos

S501. 4-nitrobenzoselenoato de fenila com 89% de rendimento; ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ = 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.58 – 7.55 (m, 2H), 7.38 - 7.36 (m, 3H), 7.20 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 2.34 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ = 192.4, 144.7, 136.1, 135.8, 129.4, 129.1, 128.7, 127.2, 125.8, 21.5.

S502. 4- nitrobenzoselenoato de fenila com 72% de rendimento; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 8.35–8.33 (m, 2H), 8.17–8.00 (m, 2H), 7.66–7.40 (m, 2H), 7.30–7.23 (m, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ = 192.5, 150.6, 143.0, 136.1, 131.5, 129.6, 128.1, 124.9, 124.2.

S503. *p*-metilbenzoselenoato de *p*-toluila com 97% de Rendimento; RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), δ (ppm): 7,80 (d, J = 8,07 Hz, 2H), 7,44 (d, J = 8,07 Hz, 2H), 7,26 – 7,15 (m, 4H), 2,40 (s, 3H), 2,38 (s, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), δ (ppm): 193,13; 144,77; 139,09; 136,29; 130,17; 129,53; 127,42; 122,29; 21,71; 21,31.

S505. *p*-metilbenzotioato de *p*-clorofenila com 83% de Rendimento. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), δ (ppm): 7,89 (d, J = 8,31 Hz), 7,41 – 7,38 (m, 4H), 7,28 (d, J = 8,31 Hz),

2,42 (s, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), δ (ppm): 172,09; 144,57; 130,28; 129,19; 126,73; 21,67.

S506. *p*-nitrobenzotioato de *p*-clorofenila com 92% de Rendimento. RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz), δ (ppm): 8,34 (d, $J = 9,04$ Hz, 2H), 8,18 (d, $J = 9,04$ Hz, 2H), 7,50 – 7,38 (m, 4H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz), δ (ppm): 188,36; 150,72; 140,92; 136,59; 136,10; 129,77; 128,50; 124,54; 113,79.