



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FÁRMACIA ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA
CURSO DE ODONTOLOGIA**

ARYANE DE AZEVEDO PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CALCOGENOÉSTERES EM CÉLULAS
PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE ESTREPTOCOCOS ORAIS**

FORTALEZA

2017

ARYANE DE AZEVEDO PINHEIRO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CALCOGENOÉSTERES EM CÉLULAS
PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE ESTREPTOCOCOS ORAIS

Monografia apresentada ao curso de Odontologia do Departamento de Clínica Odontológica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Nascimento Neto.

Coorientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

- P718a Pinheiro, Aryane de Azevedo.
Avaliação da atividade de calcogenoésteres em células planctônicas e biofilmes de *Streptococos* orais / Aryane de Azevedo Pinheiro. – 2017.
46 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Odontologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Nascimento Neto.
Coorientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.
1. Biofilme bacteriano. 2. *Streptococos* orais. 3. Cárie dentária. 4. Calcogenoésteres. I. Título.
CDD 617.6
-

ARYANE DE AZEVEDO PINHEIRO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CALCOGENOÉSTERES EM CÉLULAS
PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE ESTREPTOCOCOS ORAIS

Monografia apresentada ao curso de Odontologia do Departamento de Clínica Odontológica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Odontologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Nascimento Neto (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof. Dr. Ricardo de Sousa Martins
Universidade Federa do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Arieuda e Aldecir.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por toda a força e coragem que me concedeu, durante essa trajetória.

Aos meus amados pais Arieuda e Aldecir por todo o amor, apoio, incentivo e esforço para realização deste sonho. Aos meus irmãos Aryson e Álvaro pelo carinho e amizade, que a pesar da distância física estão sempre ao meu lado.

Aos meus avós. Em especial, meu avô José (*in memoriam*) pela torcida e apoio constante.

À minha tia Arineuza pela ajuda prestada em todas as áreas que necessitei.

Ao casal Ivanice e Evandro, minha “família postiça”, que não mediram esforços para me ajudar na fase de adaptação à outra cidade.

À minha querida amiga Késia Batista, pelo carinho ofertado e cujas palavras de ânimo foram úteis nos diversos contextos vivenciados durante essa trajetória.

À minha amiga e colega de curso Fátima Saboia, pela paciência e disponibilidade em ajudar, por transmitir tanta alegria nos momentos que precisei.

Ao Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira, exemplo de orientador, professor e pesquisador, pela oportunidade ímpar de integrar o grupo LIBS (Laboratório Integrado de Biomoléculas) e a equipe ImunoEnsina-UFC.

Aos mestres e doutores do grupo LIBS. Em especial, à doutoranda Louise Helena por sempre estar disposta a ajudar, pela contribuição com seus conhecimentos e pela convivência tão agradável. Uma pessoa extraordinária!

Ao Dr. Luiz Gonzaga por sua orientação, sugestões e discussões que contribuíram para meu crescimento científico e pessoal.

Ao Pós-Dr. Mayron Alves, pela coorientação e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de iniciação científica e extensão do LIBS, Denise Montenegro, João Victor Bezerra, Leonardo Barbosa e Letícia Brígido, pela convivência harmoniosa e troca de experiências, bem como por todos os momentos em que nos apoiamos mutuamente.

Aos professores participantes da banca examinadora, Luiz Gonzaga do Nascimento Neto, Edson Holanda Teixeira e Ricardo de Sousa Martins, pelo tempo, valiosas colaborações e sugestões.

Aos professores e funcionários do curso de Odontologia, por contribuírem com minha formação acadêmica. E a todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

“[...] e esta é a vitória que vence o mundo: a
nossa fé.” (1 Jo 5:4)

RESUMO

A cavidade oral é um ambiente composto por diferentes estruturas anatômicas que proporcionam um ambiente diversificado para a colonização bacteriana. Essas bactérias encontram-se na forma de biofilmes. Os biofilmes podem ser definidos como comunidades microbianas complexas, composta por células ligadas a um substrato ou entre si, incorporadas a uma matriz de substâncias polimérica extracelular (SPE) derivada do metabolismo dos próprios micro-organismos. O gênero *Streptococcus* é comumente encontrado na cavidade oral humana, entre esses, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus parasanguinis* que estão envolvidas em patologias bucais como a cárie e doença periodontal. Diante disso, a busca por novas moléculas capazes de prevenir ou erradicar biofilmes se intensificou. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de quatro calcogenoésteres sintéticos (C01, C02, C03 e C04) sobre *S. mutans* ATCC 25175 e *S. parasanguinis* ATCC 903. Para avaliação da atividade do composto em células planctônicas analisou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). No que diz respeito à formação de biofilme, a quantificação da biomassa total foi realizada por meio de coloração com violeta de cristal, e o número de células viáveis, expressa como log CFU/mL. Os resultados mostraram que os calcogenoésteres C03 e C04 apresentaram CIM de 125 e 250 µg/mL, respectivamente, para *S. mutans* e C02 apresentou CIM de 31,25 µg/mL para *S. parasanguinis*. O único calcogenoéster que apresentou CBM foi o C02 na concentração de 250 µg/mL para *S. parasanguinis*. No que diz respeito à formação de biofilme para *S. parasanguinis*, a biomassa foi reduzida na presença de C01, C03 e C04 e completamente inibida com C02 a partir da concentração de 31,25 µg/mL. Para *S. mutans* houve uma redução de biomassa na maioria das concentrações de C03 e C04 enquanto os demais só tiveram ação nas duas maiores concentrações. Na análise das células viáveis para *S. mutans* apenas C01 e C03 mostraram uma considerável redução em relação aos demais compostos testados. Para *S. parasanguinis* o valor da redução do número de células viáveis foi bem aproximado entre as concentrações testadas, para C01 e C02 a redução foi muito semelhante, inclusive a redução foi a mesma para todas as concentrações entre 7,8 e 250 µg/mL. Nesse estudo *S. parasanguinis* mostrou-se mais sensível aos quatro calcogenoésteres testados. Conclui-se que os calcogenoésteres avaliados podem representar uma alternativa para a prevenção de biofilmes orais envolvendo *S. mutans* e *S. parasanguinis*, porém outros estudos devem ser realizados para que os mecanismos de ação dos compostos em questão possam ser elucidados.

Palavras-chave: Biofilme bacteriano. Estreptococos orais. Cárie dentária. Calcogenoésteres.

ABSTRACT

The oral cavity is an environment composed to different anatomical structures that provide a diversified environment for bacterial colonization. These bacteria are in the form of biofilms. Biofilms can be defined as complex microbial communities, composed of cells attached to a substrate or one another, incorporated into a matrix of extracellular polymer substances (SPE) derived from the metabolism of the microorganisms themselves. The genus *Streptococcus* is commonly found in the human oral cavity, among them, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus parasanguinis* that are involved in oral pathologies such as caries and periodontal disease. Faced with this, the search for new molecules capable of preventing or eradicating biofilms has intensified. The objective of this study was to evaluate the antibacterial and antibiofilm activity of four synthetic calcogenoesters (C01, C02, C03 and C04) on *S. mutans* ATCC 25175 and *S. parasanguinis* ATCC 903. To evaluate the activity of the compound in planktonic cells, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bacterial concentration (MBC). With regard to biofilm formation, total biomass quantification was performed by crystal violet staining, and the number of viable cells, expressed as log CFU / mL. The results showed that C03 and C04 calcogenoesters presented MICs of 125 and 250 µg / mL, respectively, for *S. mutans* and C02 presented MIC of 31.25 µg / mL for *S. parasanguinis*. The only calcogenoester that presented CBM was C02 in the concentration of 250 µg / mL for *S. parasanguinis*. Regarding biofilm formation for *S. parasanguinis*, the biomass was reduced in the presence of C01, C03 and C04 and completely inhibited with C02 from the concentration of 31.25 µg / mL. For *S. mutans* there was a reduction of biomass in the majority of the concentrations of C03 and C04 while the others only had action in the two highest concentrations. In the analysis of the viable cells for *S. mutans* only C01 and C03 showed a considerable reduction in relation to the other compounds tested. For *S. parasanguinis* the reduction in the number of viable cells was well approximated among the concentrations tested, for C01 and C02 the reduction was very similar, even the reduction was the same for all concentrations between 7.8 and 250 µg / mL . In this study, *S. parasanguinis* was more sensitive to the four calcogenoesters tested. It is concluded that the calcogenoesters evaluated may represent an alternative for the prevention of oral biofilms involving *S. mutans* and *S. parasanguinis*, but other studies should be performed so that the mechanisms of action of the compounds in question can be elucidated.

Keywords: Bacterial biofilm. Oral Streptococcus. Dental caries. Chalcogenoesters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Etapas do desenvolvimento do biofilme bacteriano.....	19
Figura 2 – Colonização bacteriana da película adquirida.....	23
Figura 3 – Complexos microbianos.....	24
Figura 4 – Exemplos de organocalcogênios.....	26
Figura 5 – Fórmula estrutural dos calcogenoésteres.....	28

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Quantificação da biomassa de <i>S. mutans</i> ATCC 25175.....	33
Gráfico 2 – Quantificação da biomassa de <i>S. parasanguinis</i> ATCC 903.....	34
Gráfico 3 – Quantificação das unidades formadoras de colônias de <i>S. mutans</i> ATCC 25175.....	35
Gráfico 4 Quantificação das unidades formadoras de colônias de <i>S. parasanguinis</i> ATCC 903.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NIH	National Institutes of Health
CPOD	Dentes Cariados, Perdidos e Obturados
ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
BHI	Brain Heart Infusion
UFC	Unidade Formadora de Colônias
CV	Cristal Violeta
SPE	Substâncias Poliméricas Extracelulares
ERRO	Espécie Reativa de Oxigenio
GPx	Glatationa Peroxidase

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
Log	Logaritmo
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	Biofilmes bacterianos	17
2.1.1	<i>Aspecto histórico</i>	17
2.1.2	<i>Formação do biofilme</i>	18
2.1.3	<i>Biofilmes e patologias associadas</i>	20
2.2	Cárie dentária e doença periodontal	21
2.3	Organocalcogênicos e calcogenoésteres	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Obtenção dos calcogenoésteres	28
4.2	Micro-organismos e condições de cultivo	28
4.3	Ensaio de atividade sobre o crescimento planctônico dos micro-organismos	29
4.4	Ensaio de atividade sobre a formação de biofilme	29
4.4.1	<i>Quantificação da biomassa</i>	30
4.4.2	<i>Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)</i>	30
4.5	Análise estatística	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1	Efeito dos calcogenoésteres sobre o crescimento planctônico	31
5.2	Atividade antibiofilme	32
5.3	Contagem do número de células viáveis	34
6	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38
	ANEXOS	46

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é considerada a doença bacteriana humana mais prevalente, afetando 80-90% da população mundial (HASIBUL *et al.*, 2017). É uma das principais doenças infecciosas evitáveis em pacientes pediátricos, através de intervenções apropriadas principalmente nos estágios iniciais de vida do indivíduo (PITTS *et al.*, 2005; GURAV; JADHAV, 2011). O levantamento epidemiológico realizado no Brasil em 2010 revela que o índice CPOD (dentes cariados, perdidos e obturados) na faixa etária de 12 anos, apresentou uma média de 2,07, de 15 a 19 anos foi 4,25, de 35 a 44 anos foi 16,75 e de 65 a 74 anos foi 27,53 (BRASIL, 2012). A cárie é considerada um problema de saúde pública por possuir um custo para tratamento e por afetar a qualidade de vida da população (BOING *et al.*, 2014). Sua etiologia está relacionada a fatores físicos, biológicos, ambientais, educacionais, comportamentais e socioeconômicos (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007).

O desenvolvimento da lesão cariosa se inicia com a colonização da superfície dental por bactérias acidogênicas, como o *Streptococcus mutans*, que metabolizam carboidratos, resultando na produção de ácidos que reduzem o nível de pH e resultam na perda de cálcio e íons fosfato da estrutura de hidroxiapatita do esmalte do dente (SOET; NYVAD; KILIAN, 2000; TAKAHASHI; NYVAD, 2008; CUMMINS, 2013). *S. mutans* é uma bactéria acidogênica, por produzir ácidos a partir da fermentação de carboidratos e acidúrica por ser tolerante ao meio ácido (BANAS, 2009).

As bactérias no interior da cavidade oral encontram-se organizadas na forma de biofilmes (KOLENBRANDER *et al.*, 2010). Biofilmes podem ser definidos como comunidades microbianas complexas, composta por células irreversivelmente ligadas a um substrato ou entre si, incorporadas a uma matriz de substâncias polimérica extracelular (SPE) derivada do metabolismo dos próprios micro-organismos, estes se apresentam fenotipicamente diferenciados quando comparados as suas variantes planctônicas no que diz respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes (XU; MCFETERS; STEWART, 2000; FLEMMING; WINGENDER, 2010; ABEE *et al.*, 2011; ERRIU *et al.*, 2014). As espécies bacterianas orais do gênero *Streptococcus* são em sua maioria colonizadoras iniciais do biofilme dentário, ou seja, ligam-se inicialmente a película adquirida e posteriormente facilitam a ligação de colonizadores secundários ao biofilme dental (ZANATTA; RÖSING, 2007).

O controle mecânico do biofilme dentário através da escovação e uso do fio dental é uma medida importante para a prevenção da cárie e das doenças periodontais (CUMMINS,

2013). Existe no mercado uma série de compostos bactericidas que visam erradicar as bactérias cariogênicas (MARSH; HEAD; DEVINE, 2015). Muitos desses agentes bactericidas podem vir incorporados a enxaguatórios e dentifrícios utilizados como adjuvantes para remoção mecânica do biofilme dental, porém esses compostos podem desregular a microbiota oral saudável inclusive selecionar bactérias resistentes a múltiplos fármacos. (BAEHNI; TAKEUCHI, 2003).

Os organocalcogênios apresentam em sua estrutura átomos do grupo 16 da tabela periódica como heteroátomos e uma cadeia orgânica, que podem ser utilizados na síntese de várias sequências sintéticas de novos componentes da classe dos organocalcogênios (NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004). Os elementos selênio e enxofre estão envolvidos em importantes processos metabólicos no organismo de animais. Alguns tipos de organocalcogênios podem atuar como mimetizadores de glutationa peroxidase (GPx) que são famílias de enzimas antioxidantes, combatendo as espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células animais (HERBETTE; ROECKEL-DREVET; DREVET, 2007).

Nesse contexto, buscam-se novas alternativas capazes de prevenir e/ou controlar a formação dos biofilmes por bactérias envolvidas em patologias orais, em especial a cárie e doença periodontal. Os calcogenoésteres (ésteres de selenol, tiol e telurol), um grupo de organocalcogênio, são intermediários importantes em várias transformações orgânicas (RAMPON *et al.*, 2010). Organosselênios são exemplos de calcogenoésteres reconhecidos pela sua atividade antioxidante, antitumorais e antimicrobiana (MUGESH; SINGH, 2000; VARGAS, 2012). Estudos recentes demonstraram marcante atividade antimicrobiana e antibiofilme de selenoésteres e tioésteres contra as cepas de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 11733, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19675, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903 (CAMARA-LEIMBACH, 2015; SOUSA *et al.*, 2017).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biofilmes bacterianos

2.1.1 *Aspecto histórico*

A primeira observação relacionada à organização das bactérias nos diferentes meios em que habitam, remonta ao século XVII quando Anton Van Leeuwenhoek (1632 – 1723) munido de um microscópio rudimentar de lentes simples examinou sua própria placa dentária, onde provavelmente visualizou um maior número de bactérias agregadas do que na forma planctônica. Organizações semelhantes foram observadas nos cascos de navios e em diversas outras superfícies em que bactérias marinhas encontravam-se fortemente aderidas, demonstrando relação direta com o processo de corrosão dos materiais submersos (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; COSTERTON; WILSON, 2004). Em 1978, pesquisadores buscavam elaborar hipóteses sobre os mecanismos de adesão das bactérias a superfícies vivas e não vivas quando foi utilizado pela primeira vez o termo biofilmes para denominar essa interação (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978).

No início da década de 1980 já estava bem estabelecido que 95% a 99% dos microorganismos em ambientes naturais encontravam-se organizados formando verdadeiros agregados mergulhados em um meio que funcionava como uma matriz, porém ainda prevalecia a ideia que a formação do biofilme se dava por acréscimo de células de forma aleatória nesse material da matriz (COSTERTON; WILSON, 2004). Somente nos anos 90, com o advento da microscopia confocal de varredura a laser, o conhecimento no campo dos biofilmes passou por modificações principalmente em relação à concepção que se tinha da sua morfologia (COSTERTON; WILSON, 2004; POST *et al.*, 2011).

Logo após os avanços na caracterização morfológica e bioquímica dos biofilmes, foi possível associá-los a muitas das patologias que afetam o homem. Essa relação foi marcante nas infecções crônicas e nos casos de resistência bacteriana aos antibióticos (COSTERTON; WILSON, 2004; SIMÕES, 2011). Na década de 1990 muitas das infecções crônicas puderam ser avaliadas quanto a sua etiologia, prognóstico e eficácia das estratégias de tratamento baseando-se no desenvolvimento de biofilmes, já que de certa forma os biofilmes relacionados ao surgimento de patologias no organismo humano possuíam uma estrutura semelhante aos biofilmes de outros ecossistemas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; COSTERTON; WILSON, 2004). Apesar da semelhança estrutural básica, cada biofilme é considerado único, pois suas características físicas, químicas e

biológicas dependem diretamente dos micro-organismos que o compõe (DAVEY; OTOOLE, 2000).

Atualmente, os biofilmes podem ser definidos como comunidades microbianas complexas, composta por células irreversivelmente ligadas a um substrato ou entre si, incorporadas a uma matriz de substâncias polimérica extracelular (SPE) derivada do metabolismo dos próprios micro-organismos. Tais micro-organismos apresentam-se fenotipicamente diferenciados quanto à taxa de crescimento e transcrição de genes quando comparados aos micro-organismos em sua forma planctônica (XU; MCFETERS; STEWART, 2000; FLEMMING; WINGENDER, 2010; ABEE *et al.*, 2011; ERRIU *et al.*, 2014).

2.1.2 Formação do biofilme

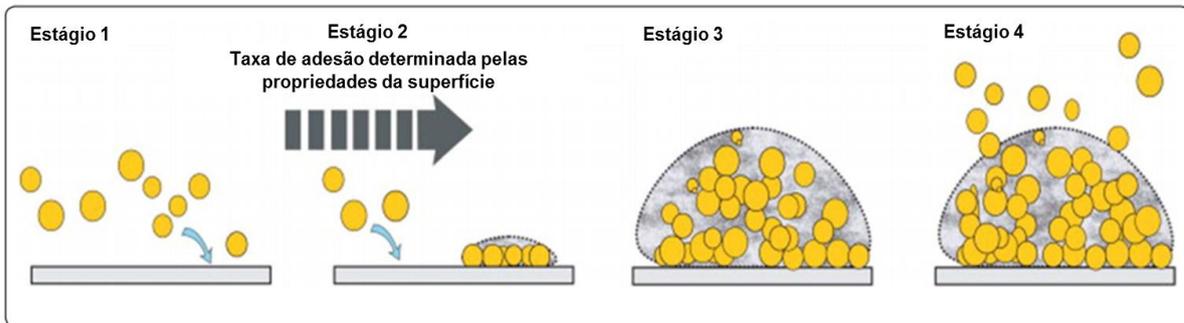
Células bacterianas que se encontram aderidas formando biofilmes são denominadas de sésseis, enquanto aquelas que se encontram dispersas no meio são designadas planctônicas. Na natureza a forma sésstil de comunidades microbianas é a organização mais recorrente. Estima-se que 99% dos micro-organismos que habitam o planeta vivam nessas comunidades (DONLAN, 2002; COSTERTON; WILSON, 2004; COGAN, 2006).

A formação do biofilme bacteriano é marcada por quatro estágios bem definidos que obedecem as seguintes sequências: Estágio 1: Adesão à superfície (relacionada à interação físico-química do micro-organismo com a superfície). Estágio 2: Formação de microcolônias (a multiplicação de células somada à agregação célula-célula e produção de mais matriz polimérica extracelular resulta na formação de colônias organizadas em multicamadas). Estágio 3: Formação de macrocolônias (é a fase onde se verifica a espessura máxima do biofilme com toda sua organização estrutural). Estágio 4: Dispersão (onde as células ou microcolônias do biofilme são liberadas a partir do biofilme maduro) (SALWICZEK *et al.*, 2014; DAVIES, 2003) (Figura 1).

O processo de adesão do micro-organismo à superfície é um passo crucial para a formação do biofilme (DUNNE, 2002). Sendo a natureza da superfície é um fator importante no processo de adesão inicial tendo em vista que superfícies sólidas com maior rugosidade aumentam a extensão da colonização microbiana, isso ocorre devido a maior superfície de contato de áreas irregulares que também possuem forças de cisalhamento diminuídas (CHARACKLIS; MCFETERS; MARSHALL, 1990; DONLAN, 2002). No meio aquoso, fatores como pH, temperatura, interações iônicas e disponibilidade de nutrientes

relacionam-se diretamente com a taxa de ligação microbiana ao substrato (COWAN; WARREN; FLETCHER, 1991; DONLAN; PIPES; YOHE, 1994).

Figura 1 – Etapas do desenvolvimento do biofilme bacteriano



Fonte: Adaptado de Zhang *et al.* (2017). Sequência de desenvolvimento do biofilme bacteriano. Estágio 1: Adesão à superfície; Estágio 2: Formação de microcolônias; Estágio 3: Formação de macrocolônias; Estágio 4: Dispersão.

Fatores físico-químicos também possuem participação na fase de adesão. Ao ligar-se a uma superfície abiótica, o micro-organismo estará exercendo uma interação do tipo inespecífica por meio de ligações eletrostáticas ou de Van der Waals. Enquanto na adesão às superfícies bióticas predominam mecanismos moleculares específicos por meio de moléculas de adesão celular como adesinas, pili ou fímbrias (DUNNE, 2002; DONLAN, 2002; AGARWAL; SINGH; JAIN, 2010).

Após a adesão inicial a tendência é que as células bacterianas se agrupem e comecem a produzir uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares hidratadas que podem variar em propriedades físicas e químicas, sendo composta principalmente por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (DONLAN, 2002; BATONI *et al.*, 2011; FLEMMING; WINGENDER, 2010). A função da matriz extracelular será proporcionar estabilidade mecânica e proteção para os micro-organismos que compõem o biofilme. Além de conferir um meio hidratado para o transporte de nutrientes feito pelos canais de água presentes no interior do biofilme e ação de enzimas para degradação de compostos tóxicos que possam afetar negativamente os micro-organismos que compõem o biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010; HOURY *et al.*, 2012; WILKING *et al.*, 2013).

À medida que o biofilme se desenvolve outros micro-organismos vão aderindo secundariamente àqueles já aderidos, por meio da coadesão ou coagregação. Algumas vezes o colonizador secundário poderá ser de outra espécie o que originará um biofilme multiespécie, um bom exemplo são os biofilmes da cavidade oral (RICKARD *et al.*, 2006;

KOLENBRANDER, 2010; ELIAS; BANIN, 2012; RØDER; SØRENSEN; BURMØLLE, 2016). A interação entre as diferentes espécies em um biofilme pode proporcionar vantagens, como o aumento da resistência a antimicrobianos e aumento da virulência (MAH; O'TOOLE, 2001; ELIAS; BANIN, 2012; PASTAR *et al.*, 2013; RØDER; SØRENSEN; BURMØLLE, 2016).

Durante o processo de formação do biofilme as bactérias mantêm um sistema de comunicação com atuação intra e intercelular, conhecido como *quorum sensing* (KELLER; SURETTE, 2006). A comunicação é regida por moléculas químicas denominadas de autoindutores que proporcionam a comunicação célula a célula, quando os autoindutores atingem um limiar crítico, as bactérias alterem a expressão gênica como resposta ao sinal (READING; SPERANDIO, 2006; KELLER; SURETE, 2006). De acordo com Reading e Esperanto (2006) existem três vias principais de sinalização entre as bactérias, uma usada por bactérias Gram-positivas, outra por Gram-negativas e uma terceira que seria universal.

Dessa forma, é notória a organização do processo de formação do biofilme e como diversos fatores físico-químicos atuam de forma conjunta para regular cada fase de seu desenvolvimento. Quando o biofilme atinge seu clímax, ocorrerá dispersão, caracterizada pelo desprendimento dos micro-organismos mais superficiais que ficarão em sua forma planctônica e aptas a colonizar outras superfícies e forma novos biofilmes (DUNNE, 2002; DAVIES, 2003).

2.1.3 Biofilmes e patologias associadas

Biofilmes podem ser encontrados nos mais variados habitats, formando-se em uma ampla variedade de superfície, como tecidos vivos, superfície dental, prótese dentárias, dispositivos médicos e/ou industriais, sistemas de tubulação de água e até mesmo ambientes marinhos (AKCALI *et al.*, 2013; O'DONNELL *et al.*, 2015; WILLCOX, 2013; LOPÉZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010). Devido sua capacidade de colonizar o organismo humano, os biofilmes podem estar relacionados a diversas patologias como infecções do trato urinário, otite média, cárie, gengivite, periodontite, estomatite causada por prótese dental, peri-implantite, endocardite microbiana e fibrose cística, dentre outras (DONLAN; COSTERTON, 2002; DAVIES, 2003; KOLENBRANDER *et al.*, 2010; YASSIN *et al.*, 2016; ZHENG *et al.*, 2015). Devido sua relação com diversas infecções, os biofilmes possuem grande importância clínica (HØIBY, 2011).

De acordo com National Institutes of Health (NIH), mais de 80% das infecções microbianas estão relacionadas com biofilmes, dessas uma parcela significativa são infecções nosocomiais (COGAN, 2006; WIDGEROW, 2008; HØIBY, 2011; MURPHY *et al.*, 2013). Os dispositivos médicos como os cateteres, válvulas cardíacas, dispositivos intrauterinos, lentes de contato, próteses dentais e aparelhos ortodônticos fixos, são as principais fontes de infecções associadas a biofilmes (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010; BATONI *et al.*, 2011; KHOROUSHI; KACHUIE, 2017).

Muitos desses biofilmes são multiespécie e os micro-organismos que os compõem estão em sinergismo o que favorece o aparecimento de mecanismos intrínsecos de resistência aos agentes antimicrobianos, tornando as infecções de difícil diagnóstico e não tratáveis com as abordagens convencionais (BURMOLLE *et al.*, 2006; BENNETT, 2009; COX; WRIGTH, 2013). A bactéria agregada no biofilme torna-se de 10-1000 vezes menos susceptíveis aos antimicrobianos quando comparadas com a sua forma planctônica (LUPPENS *et al.*, 2002). Dentre os mecanismos sugeridos para explicar o desenvolvimento da resistência das bactérias associadas ao biofilme está a reduzida taxa metabólica e crescimento bacteriano (DUNNE, 2002; DAVIES, 2003).

2.2 Cárie dentária e doença periodontal

A cavidade oral humana é colonizada por bactérias de diversas espécies. São aproximadamente 700 espécies das quais 100 a 200 dessas estão presentes na cavidade oral de todos os indivíduos saudáveis e outra parcela está relacionada a doenças bucais como cárie dentária e periodontite (AAS *et al.*, 2005; ZAURA *et al.*, 2009; CAUFIELD *et al.*, 2015). O interior da cavidade oral é um ambiente composto por diferentes estruturas anatômicas, como dentes, sulco gengival, língua, bochechas, palato duro e mole e amígdalas, que proporcionam um ambiente diversificado para a colonização bacteriana (KOLENBRANDER *et al.*, 2010; DEWHIRST *et al.*, 2010).

As bactérias no interior da cavidade oral encontram-se na forma de biofilmes, o que configura um importante fator de virulência, pois a forma planctônica é facilmente deglutida devido o fluxo constante de saliva (KOLENBRANDER *et al.*, 2010). Por meio de interações específicas célula-célula, diferentes espécies bacterianas aderem secundariamente a outras bactérias inicialmente presentes no biofilme por meio da coadesão ou coagregação, tornando comum o fato dos biofilmes serem formados por diferentes espécies de micro-organismos (LOESCHE, 1986; BOS; MEI; BUSSCHER, 1996; KOLENBRANDER *et al.*, 2010).

Algumas das bactérias que habitam a cavidade oral estão envolvidas em patologias, como a cárie dental, considerada uma doença humana de alta prevalência, afeta 80-90% da população mundial tendo como agente etiológico bactérias sacarolíticas fermentativas, como o *Streptococcus mutans* (SIMÓN-SORO; MIRA, 2015; HASIBUL *et al.*, 2017). Apesar de ser uma preocupação de saúde mundial, a cárie é evitável através de intervenções apropriadas principalmente nos estágios iniciais de vida do indivíduo (GURAV; JADHAV, 2011).

A cárie dentária pode ser entendida como um processo dinâmico e multifatorial que envolve a interação entre o biofilme formado na superfície dental, uma dieta cariogênica, um hospedeiro susceptível e o tempo. O processo se inicia com o metabolismo de carboidratos por bactérias acidogênicas, resultando na produção de ácidos que reduz o nível de pH e resultam na perda de cálcio e íons fosfato da estrutura de hidroxiapatita do esmalte do dente, gerando lesões cariosas (SOET; NYVAD; KILIAN, 2000; TAKAHASHI; NYVAD, 2008; CUMMINS, 2013).

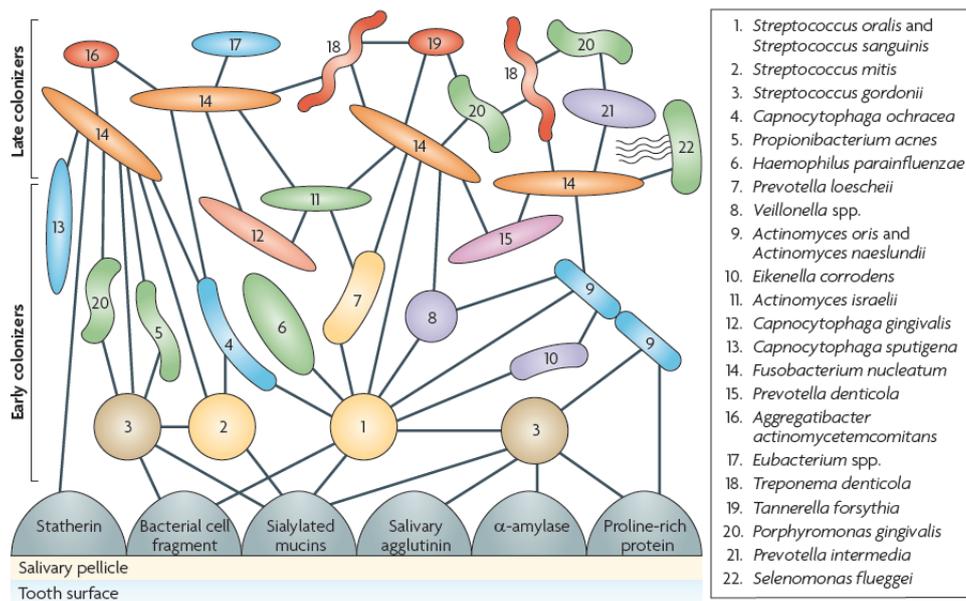
S. mutans é uma bactéria acidogênica, por produzir ácidos a partir da fermentação de carboidratos e acidúrica por ser tolerante ao meio ácido, sendo por isso considerada cariogênica (BANAS, 2009). A produção de ácido resulta na desmineralização do esmalte dentário e a tolerância ácida possibilita a sobrevivência em ambiente com baixo pH (SOET; NYVAD; KILIAN, 2000; FEJERSKOV *et al.*, 2004). Alguns estreptococos metabolizam arginina presente em peptídeos salivares, através dessa via ocorrerá a produção de íons amônia que elevará o pH no interior do biofilme e permitirá que a bactéria continue metabolicamente ativa mesmo na ausência de carboidratos (KOLENBRANDER *et al.*, 2010).

Streptococcus parasanguinis é uma espécie bacteriana colonizadora primária da cavidade oral, também é um patógeno oportunista que pode causar endocardite infecciosa (KITTEEN, 2002; PASTER *et al.*, 2001). Estudo recente sugere que *S. parasanguinis* está relacionado a casos de periodontite agressiva localizada e quando associado às espécies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Filifactor alocis* podem indicar sítios de futura reabsorção óssea (FINE *et al.*, 2013).

Imediatamente após a remoção mecânica do biofilme dentário por meio da escovação, macromoléculas hidrofóbicas são adsorvidas à superfície do esmalte dentário formando a película adquirida. Uma estrutura rica em proteínas e glicoproteínas salivares que ao aderir à superfície dental modificara a carga da mesma favorecendo a adesão bacteriana (Figura 2). Trata-se de uma interação direta entre moléculas bacterianas e receptoras da película que favorecerá uma colonização primária por cocos e bastonetes gram-positivos, envolvendo bactérias do complexo amarelo (*Streptococcus mitis*, *S. sanguinis*, *S. gordonii* e *S. oralis*),

azul (várias espécies de *Actinomyces*), verde (*Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*) e roxo (*Capnocytophaga ochracea*, *C. sputigena*, *C. gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). A tendência é que novas bactérias agreguem e formem o que se denomina biofilme (ZANATTA; RÖSING, 2007; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002) (Figura 3).

Figura 2 - Colonização bacteriana da película adquirida



Fonte: Kolenbrander *et al.* (2010). Notar as espécies consideradas colonizadoras primárias e posterior ligação das espécies bacterianas consideradas colonizadoras secundárias.

Posteriormente inicia-se uma colonização secundária por bactérias do complexo laranja (*Streptococcus constellatus*, *Campylobacter rectus*, *C. showae*, *C. gracilis*, *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum* e *F. periodonticum*) que se ligam aos receptores das gram-positivas que aderiram inicialmente. As espécies bacterianas que compõem a complexo laranja são as principais envolvidas na patogênese das doenças periodontais e também cria condições para a ligação das bactérias do complexo vermelho, formado pelas espécies *Tannerella forsythia* (MAIDEN; COHEE; TANNER, 2003), *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, aceitas como agentes etiológicos da periodontite crônica (ZANATTA; RÖSING, 2007) (Figura 3).

Figura 3 - Complexos microbianos



Fonte: Socransky *et al.* (1998). Representação das relações de espécies dentro dos complexos microbianos e entre os complexos microbianos.

A cárie é considerada um problema de saúde pública por possuir um custo para tratamento e por afetar a qualidade de vida da população (BOING *et al.*, 2014). Na epidemiologia da cárie fatores biológicos, socioeconômicos, escolaridade, comportamentais poderão apresentar um peso importante no desenvolvimento da cárie dentária (TAGLIAFERRO; PARDI, 2008; BOING *et al.*, 2014). Dados da Pesquisa Nacional de Saúde Bucal (Projeto SBBrasil 2010) revelam que aos cinco anos de idade uma criança brasileira possui índice dentes cariados, perdidos ou obturados (CPOD) médio de 2,43 esse valor representa uma redução de apenas 13,9% quando comparado aos dados do SB Brasil 2003 que foi de 2,8. Enquanto o índice CPOD aos 12 anos passou de 2,78 em 2003 para 2,07 em 2010, demonstrando redução de 26,2% em sete anos Entre 2007 e 2010 foram R\$ 2,7 bilhões investidos pelo Ministério da Saúde com objetivo de melhorar a saúde bucal da população do país (BOING *et al.*, 2014).

Mesmo com a considerável melhora nas condições da saúde bucal e a existência de métodos eficazes de prevenção e controle, a cárie ainda continua como maior causa de perda dentária (GIACAMAN; ARANEDA; PADILLA, 2010). A higiene oral, por meio do controle mecânico do biofilme dentário, como escovação e uso do fio dental, é uma medida importante para a prevenção da cárie e das doenças periodontais. Deficiências ou ausência dos métodos

de controle e prevenção do biofilme bacteriano formado por micro-organismos cariogênicos será o passo inicial para o desenvolvimento da cárie dentária (CUMMINS, 2013).

Existe no mercado uma série de compostos bactericidas que visam erradicar as bactérias cariogênicas, porém esses compostos podem desregular a microbiota oral saudável inclusive selecionar bactérias resistentes a múltiplos fármacos. (MARSH; HEAD; DEVINE, 2015). Muitos desses agentes bactericidas podem vir incorporados a enxaguatórios e dentifrícios utilizados como adjuvantes para remoção mecânica do biofilme dental (BAEHNI; TAKEUCHI, 2003).

O digluconato de clorexidina é utilizado na Odontologia clínica como agente antimicrobiano para limpar campos operatórios, desinfetar canais radiculares, inibir a formação do biofilme oral, cáries e gengivite. Sendo considerado como padrão-ouro no controle químico do biofilme bacteriano (ZANATTA; RÖSING, 2007; HORTENSE *et al.*, 2010; PARWANI *et al.*, 2013). Porém não é rara a ocorrência de efeitos adversos, como pigmentação dentária e as reações de hipersensibilidade (PARWANI *et al.*, 2013), o que motiva a busca por novas moléculas que possam agir no controle tanto do patógeno em sua forma planctônica quanto em biofilmes orais.

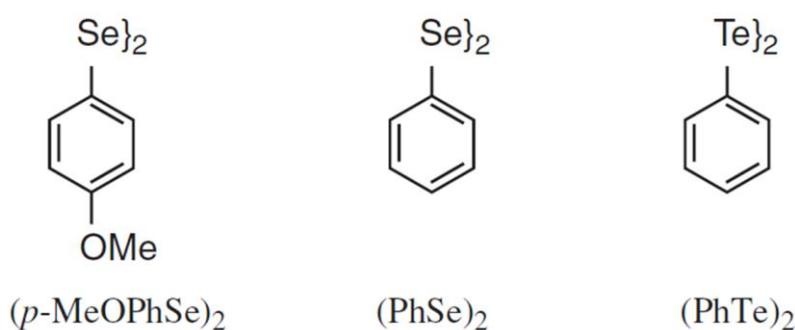
2.3 Organocalcogênios e Calcogenoésteres

Organocalcogênios são compostos que apresentam como heteroátomo os elementos do grupo dos calcogênios, grupo 16 da tabela periódica (oxigênio, enxofre, selênio, telúrio e o polônio) e uma cadeia orgânica, que podem ser utilizados na síntese de várias sequências sintéticas de novos componentes da classe dos organocalcogênios. Tais compostos são amplamente utilizados na indústria química, tanto como reagentes, como intermediários de reação em processos de síntese orgânica (NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004).

Os compostos organocalcogênios têm sido alvo de interesse devido sua importância biológica e farmacológica. Dentro da classe dos organocalcogênios, os organosselênios são um grupo de compostos orgânicos que têm se mostrado promissores por demonstrarem diversas atividades biológicas, dentre elas, atividades antioxidantes, antitumorais e antimicrobianas, sendo muitos destes compostos efetivos na inibição de algumas enzimas (MUGESH; SINGH, 2000; NARAYANAPERUMAL, 2010; ROSA *et al.*, 2007; GHISLENI *et al.*, 2008). O elemento selênio está envolvido em alguns processos biológicos nos organismos vivos na forma de aminiácidos selenocisteína (HOLBEN; SMITH, 1999).

Rosseti *et al.* (2010) demonstrou que os compostos p-metoxi-difenil disselenídeo ($(\text{MeOPhSe})_2$), difenil disselenídeo ($(\text{PhSe})_2$), e difenil ditelurídeo ($(\text{PhTe})_2$) são capazes de inibir o crescimento e formação de tubos germinativos por *Candida albicans* produzindo dano permanente nas células por meio da seu efeito pró-oxidante. Também se verificou que o difenil disselenídeo ($(\text{PhSe})_2$) apresentou atividades antioxidantes e neuroprotetoras (FLOHE; GUNZLER; SCHOCK, 1973). Em relação ao difenil ditelureto ($(\text{PhTe})_2$), existem estudos que também mostram seu efeito antioxidante e antifúngico (ROSSETI *et al.*, 2010) (Figura 4).

Figura 4 – Exemplos de organocalcogênios



Fonte: Rosseti *et al.* (2010). Estruturas químicas dos compostos organocalcogênios p-metoxi-difenil disselenídeo ($(\text{p-MeOPhSe})_2$); difenil disselenídeo ($(\text{PhSe})_2$) e difenil ditelurídeo ($(\text{PhTe})_2$).

Os calcogenoésteres (ésteres de selenol, tiol e telurol) são intermediários importantes em várias transformações orgânicas (RAMPON *et al.*, 2010). Os selenoésteres estão descritos como precursores de radicais acila e ânions e os tioésteres possuem grande valor na indústria farmacêutica devido as suas atividades biológicas (VARGAS *et al.*, 2012; NARAYANAPERUMAL, 2010). Apesar de alguns organocalcogênios terem mostrado resultados promissores em relação à atividade antimicrobiana, poucos são os estudos que abordam especificamente os calcogenoésteres e o sua atividade biológica. Dentre os escassos estudos destacam-se resultados como, marcante atividade antimicrobiana e antibiofilme contra as cepas de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 11733 e *Streptococcus pyogenes* ATCC 19675 (CAMARA-LEIMBACH, 2015; SOUSA, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de quatro calcogenoésteres contra o crescimento de células planctônicas e o desenvolvimento de biofilmes de estreptococos orais.

3.2 Objetivos Específicos

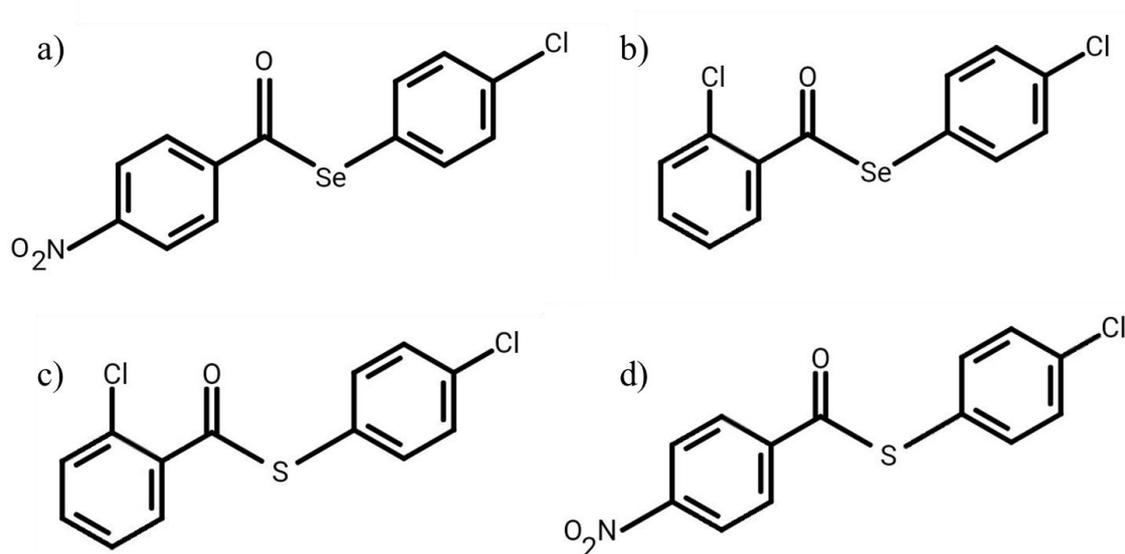
- Avaliar o efeito dos calcogenoésteres C01, C02, C03 e C04 sobre o crescimento planctônico de *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175;
- Avaliar a atividade dos calcogenoésteres C01, C02, C03 e C04 sobre a formação de biomassa do biofilme monoespécie formado pela bactéria *S. parasanguinis* ATCC 903 e pela *S. mutans* ATCC 25175;
- Verificar o potencial dos calcogenoésteres em estudo em reduzir o número de células viáveis nos biofilmes monoespécie formado por *S. parasanguinis* ATCC 903 e por *S. mutans* ATCC 25175;

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos calcogenoésteres

Os calcogenoésteres utilizados nesse estudo foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Foram utilizados os calcogenoésteres: C01 (4-Clorofenil-4-nitrobenzoselenoato) e C02 (4-Clorofenil-2-clorobenzoselenoato), dois selenoésteres e C03 (4-Clorofenil-2-clorobenzotioato) e C04 (4-Clorofenil-4-nitrobenzotioato), dois tioésteres (Figura 4).

Figura 5 – Fórmula estrutural dos calcogenoésteres



Fonte: Imagens cedidas pelo Prof. Dr. Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues – UFSM. Estrutura química dos calcogenoésteres usados no estudo: a) C01; b) C02; c) C03; d) C04.

4.2 Micro-organismos e condições de cultivo

Os micro-organismos utilizados no estudo foram: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903, obtidos da American Type Culture Collection (ATCC). A partir da suspensão estoque armazenada a -80°C em caldo Brain Heart Infusion (BHI; Himedia, Índia) com 20% de glicerol, as cepas bacterianas foram coletadas e estriadas em placas de petri contendo meio BHI Ágar e posteriormente incubadas a 37°C em 5 % de CO₂ por 24 horas.

Após o crescimento em meio sólido as colônias foram transferidas para 10 mL de caldo BHI suplementado com 1% de sacarose e incubadas novamente a 37°C em 5 % de CO₂

por 24 horas. Depois da fase de ativação, a concentração de células de cada espécie bacteriana foi ajustada para 2×10^6 células/mL através da diluição em caldo BHI suplementado com 1% de sacarose e com auxílio de um leitor de placas por análise de turbidimetria (620 nm).

4.3 Ensaio de atividade sobre o crescimento planctônico dos micro-organismos

A análise do efeito dos calcogenoésteres sobre o crescimento planctônico foi realizada por meio do teste de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato. Os calcogenoésteres foram diluídos em meio BHI suplementado com 1% de sacarose nas concentrações de 250 - 7.8 $\mu\text{g/mL}$. Cada poço da microplaca foi preenchido com 100 μL do meio de cultura contendo o calcogenoéster em suas diferentes concentrações, posteriormente foram adicionados 100 μL de uma suspensão de bactérias ajustadas a 2×10^6 células/mL obtendo um volume final em cada poço de 200 μL . Esse procedimento foi realizado para cada um dos quatro calcogenoésteres testados contra as duas espécies de bactérias em estudo. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C com 5,0 % de CO_2 .

Após incubação foi feito a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) através da análise visual das placas e a medida de turbidez de cada poço com o auxílio do leitor de microplacas (Spectramax) a 620 nm. Foi considerado CIM a menor concentração de calcogenoéster capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) 10 μL da suspensão contida nos poços em que não houve um crescimento bacteriano visível foi transferido para placas de petri com meio BHI Ágar. Foi considerada CBM a menor concentração da substância testada capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano nas placas de petri.

4.4 Ensaio de atividade sobre a formação de biofilme

A verificação da atividade dos calcogenoésteres sobre a formação de biofilmes foi realizada segundo a metodologia descrita por Stepanovic *et al.* (2000) com base no teste de placa de microtitulação. As placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato foram preparadas por meio de um procedimento semelhante ao utilizado para determinação dos efeitos dos calcogenoésteres sobre o crescimento planctônico. A formação do biofilme foi avaliada quanto à quantificação da biomassa e pela contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

4.4.1 Quantificação da biomassa

As placas foram encubadas por 24 horas a 37°C com 5,0 % de CO₂, para desenvolvimento do biofilme. Após o crescimento do biofilme, o sobrenadante dos poços foi removido e cada poço foi submetido a três lavagens com 200 µL de água destilada estéril. Para quantificar a biomassa do biofilme foi utilizado o método colorimétrico cristal violeta (CV).

Para realização da coloração por CV os poços foram secos, posteriormente adicionou-se 200 µL de metanol a 100% por 15 minutos com o objetivo de fixar o biofilme. Em seguida o metanol foi removido e adicionado 200 µL de CV a 1% em cada poço por 5 minutos. Logo após os poços foram novamente lavados com água estéril para retirar o excesso do CV e adicionaram-se 200 µL de ácido acético 33% por 5 minutos e a absorbância foi medida como auxílio do espectrofotômetro (Spectramax) à 590nm.

4.4.2 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C com 5,0 % de CO₂ para crescimento do biofilme. Posteriormente os poços foram lavados com 200 µL de água destilada estéril por três vezes sendo que na última lavagem a água foi deixada nos poços e as placas foram levadas para o banho ultrassônico (Sonicor/SC-52) por 6 minutos para a liberação das bactérias aderidas ao biofilme. Todo o experimento foi realizado em quintuplicata, dessa forma, o volume dos cinco poços foi reunido em um microtubo estéril perfazendo um volume final de 1mL. Esse procedimento foi realizado para todas as diferentes concentrações da substância testada.

O conteúdo reunido no microtubo foi redistribuído em uma placa de 96 poços onde se realizou diluições na base dez. Em seguida, 10 µL da suspensão dos poços foram transferidos para uma placa de petri com meio BHI Ágar que foram incubadas a 37°C durante 24 horas com 5,0 % de CO₂. Posteriormente foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias em cada placa de petri. O valor foi expresso em LogUFC/mL.

4.5 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata com os respectivos resultados categorizados em Microsoft Excel® (Versão 2010 para Windows) e posterior

análise estatística no software GraphPad Prism® (Versão 5.0 para Windows). Para a análise de diferenças inter-grupos foi realizada análise de variância ANOVA com pós-teste de *Bonferroni* e nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito dos calcogenoésteres sobre o crescimento planctônico

Através da análise da CIM e da CBM os calcogenoésteres C03 e C04 apresentaram CIM para *S. mutans* nas concentrações de 125 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente. Para *S. parasanguinis* apenas C02 e C04, ambos na concentração de 31,25 µg/mL, apresentaram CIM. O único composto a apresentar CBM foi o C02 na concentração de 250 µg/mL para *S. parasanguinis*. Apenas C01 não apresentou CIM nem CBM para bactérias testadas (Tabela 1).

S. parasanguinis está envolvida com a colonização primária do biofilme oral, desenvolvimento de doença periodontal e também tendo sido relacionado a quadros de endocardite infecciosa. Sua relação com o desenvolvimento do biofilme cariogênico reside no fato da espécie possuir o gene *Fap I*, que é responsável pela produção de fímbrias encarregadas da adesão do próprio micro-organismo à superfície dentária e o gene *BapA1*, responsável pela ligação do *S. parasanguinis* ao colonizador secundário (GENG *et al.*, 2012). Uma molécula que possa agir na forma planctônica por meio de uma atividade bactericida, como o caso do C02 seria capaz de impedir a adesão de uma colonizadora inicial do biofilme oral e conseqüentemente provocar um desarranjo na sequência de formação do biofilme, tendo em vista que as bactérias colonizadoras secundárias também seriam afetadas indiretamente.

S. mutans é amplamente conhecido por suas propriedades acidúricas e acidogênicas, sendo considerado um dos patógenos mais importantes envolvidos em cáries dentárias (LIU; BURNE, 2009). Em um trabalho de Sousa e colaboradores (2017) os selenoésteres S501 e S502, apresentaram CIM na concentração de 62,5 e 31,25 µg/mL, respectivamente, quando testados na forma planctônica de *S. parasanguinis*. Enquanto os tioésteres S505 e S506 foram mais eficazes em células planctônica de *S. mutans* com valores de CIM de 250 e 62,5 µg/mL, respectivamente.

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) após 24 h de crescimento de *S. mutans* e *S. parasanguinis*

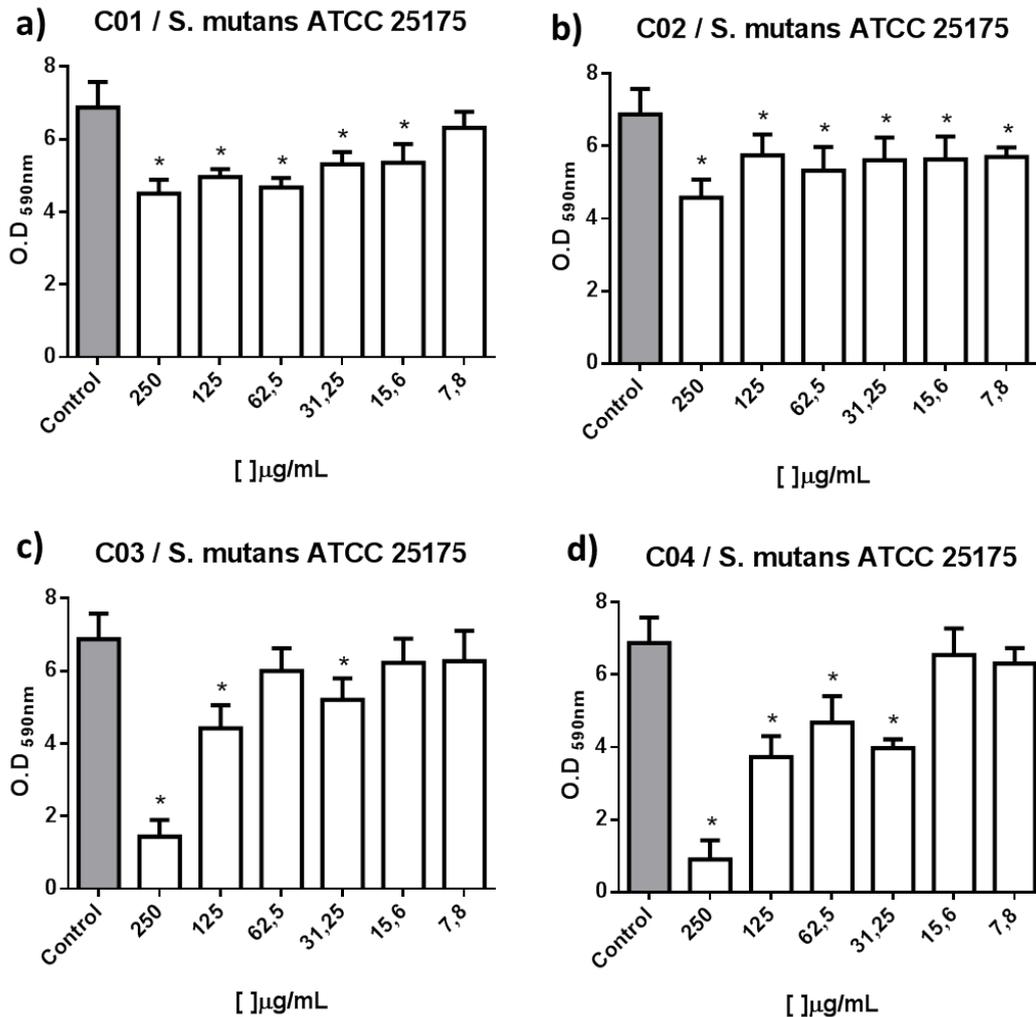
Bactéria	C01		C02		C03		C04	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	-	-	-	-	125	-	250	-
<i>S. parasanguinis</i> ATCC 903	-	-	31,25	250	-	-	31,25	-

(Fonte: Elaborada pelo autor)

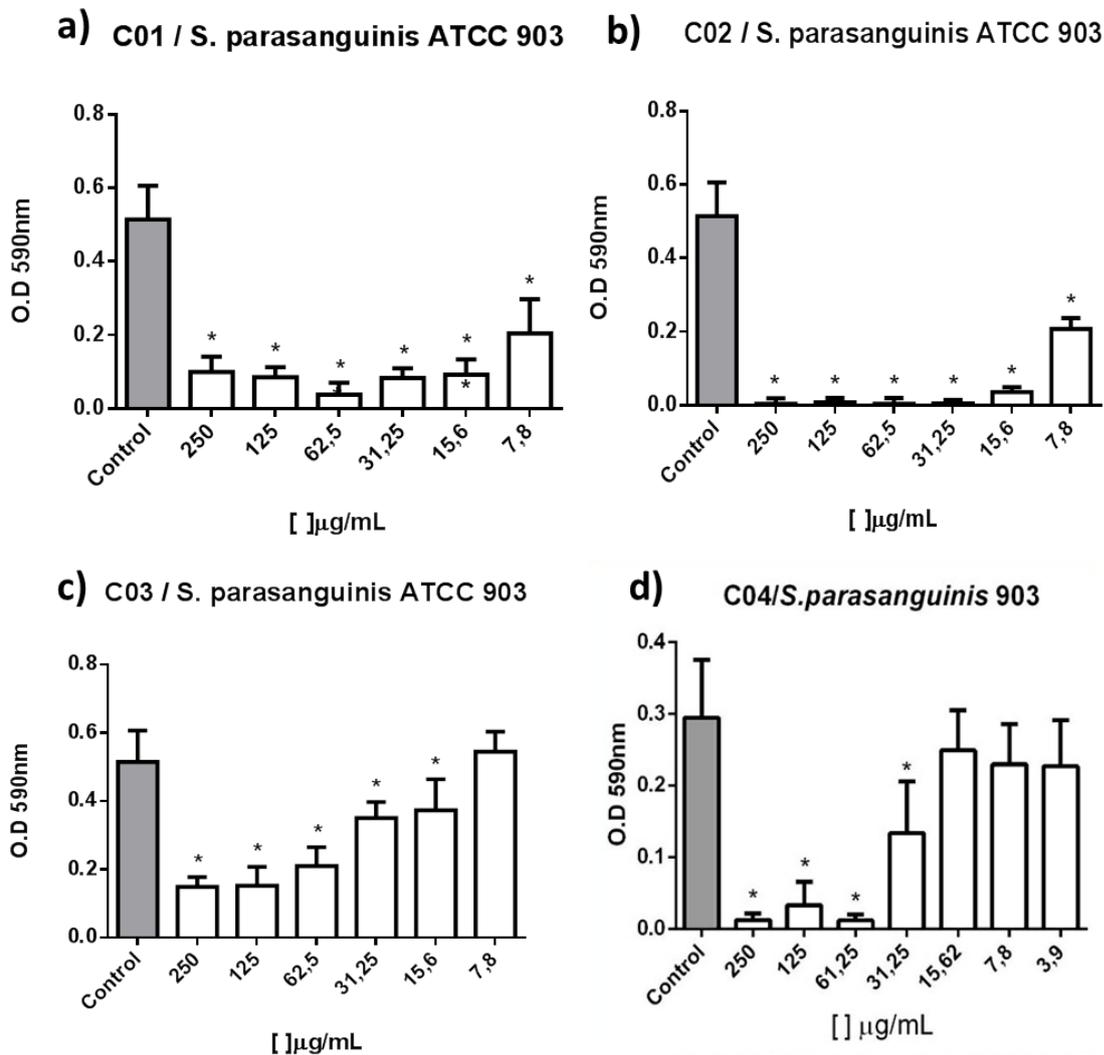
5.2 Atividade antibiofilme

Em relação à formação de biofilme de *S. parasanguinis*, a biomassa foi reduzida na presença C01, C03 e C04 e quase que completamente inibida com C02 a partir da concentração de 31,25 µg/mL. Para *S. mutans* houve uma redução de biomassa na maioria das concentrações de C01, C02, C03 e C04, sendo que na concentração de 250 µg/mL de C03 e C04 verificou-se uma maior redução (Gráficos 1 e 2).

Um dos eventos fundamentais durante o desenvolvimento dos biofilmes bacterianos é a produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) que compõem o espaço intercelular de agregados microbianos e forma a estrutura e arquitetura da matriz do biofilme. A matriz extracelular proporciona estabilidade mecânica e proteção para os micro-organismos (FLEMMING; WINGENDER, 2010; HOURY *et al.*, 2012; WILKING *et al.*, 2013). As SPE geram a incapacidade dos agentes antimicrobianos de penetrarem no biofilme. Dessa forma, através de uma molécula capaz de inibir a formação ou ainda reduzir a matriz do biofilme, possibilitara uma intervenção no biofilme já instalado barrando o processo de desmineralização do esmalte dentário. Vale ressaltar a quase completa redução da biomassa da *S. parasanguinis* pelo C02, nas concentrações de 31,25-250 µg/mL, o que levanta a possibilidade de associar o calcogenoéster em questão à outra droga, com ação direta na célula bacteriana, por exemplo, com objetivo de ter um sinergismo de mecanismos de ação contra os micro-organismos formadores de biofilme.

Gráfico 1 - Quantificação da biomassa de *S. mutans* ATCC 25175

Fonte: Elaborado pelo autor. Biomassa de *S. mutans* ATCC 25175 após um crescimento de 24 h na presença de calcogenoésteres. A quantificação de biomassa foi realizada por coloração do biofilme com violeta de cristal e leitura de absorbância a 590 nm. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias. * = $p < 0,05$ em comparação com o grupo de controle. **1.a** Redução da biomassa em todas as concentrações testadas de **C01** quando comparado ao controle; **1.b** Redução da biomassa em todas as concentrações testadas de **C02** quando comparado ao controle; **1.c** Redução da biomassa em todas as concentrações testadas de **C03** quando comparado ao controle sendo que na concentração de 250 µg/mL houve redução de aproximadamente 75% da biomassa; **1.d** Redução da biomassa em todas as concentrações testadas de **C04** quando comparado ao controle sendo que na concentração de 250 µg/mL houve redução de mais de 75% da biomassa.

Gráfico 2 - Quantificação da biomassa de *S. parasanguinis* ATCC 903

Fonte: Elaborado pelo autor. Biomassa de *S. parasanguinis* ATCC 903 após um crescimento de 24 h na presença de calcogenoésteres. A quantificação de biomassa foi realizada por coloração do biofilme com violeta de cristal e leitura de absorbância a 590 nm. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias. * = $p < 0,05$ em comparação com o grupo de controle. **2.a** Redução de 60 a \cong 95% da biomassa entre as concentrações 7,8- 250 $\mu\text{g/mL}$ de **C01** quando comparado ao controle; **2.b** Redução de 70 a \cong 100% da biomassa a partir da menor concentração 7,8-250 $\mu\text{g/mL}$ de **C02** quando comparado ao controle; **2.c** Redução de aproximadamente 50% da biomassa nas concentrações de 62,5-250 $\mu\text{g/mL}$ de **C03** quando comparado ao controle; **2.d** Redução de 40 a \cong 95% da biomassa entre as concentrações de 31,25-250 $\mu\text{g/mL}$ de **C04** quando comparado ao controle.

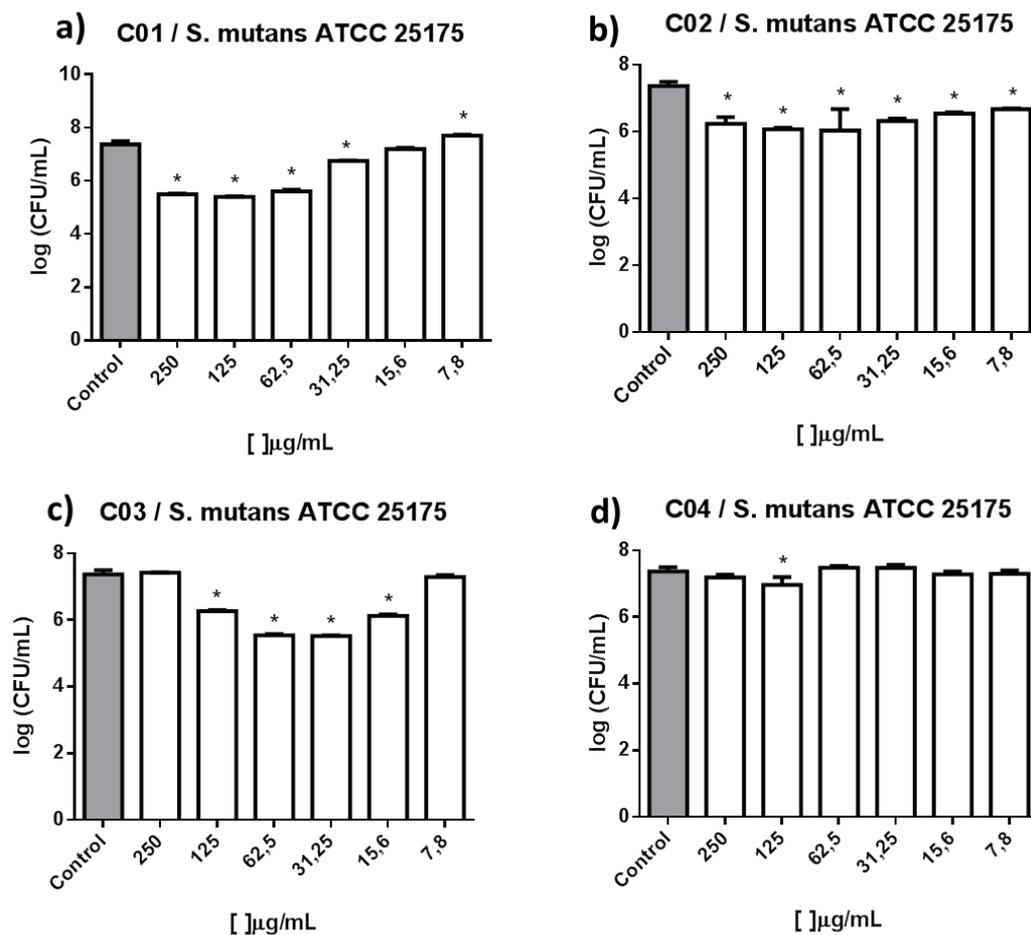
5.3 Contagem do número de células viáveis

Na análise das células viáveis para *S. mutans* apenas C01 e C03 mostraram uma considerável redução, com ênfase no C01 que na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ apresentou uma redução de 1,6 \log_{10} quando comparado ao controle. *S. parasanguinis* mostrou-se mais sensível aos quatro calcogenoésteres testados quando comparado aos resultados obtidos com *S.*

mutans. Para C01 e C02 a redução foi muito semelhante, inclusive a redução foi a mesma para todas as concentrações entre 7,8 e 250 $\mu\text{g/mL}$. Para C04 na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ a redução foi de 2,7 \log_{10} . (Figura 7 e 8).

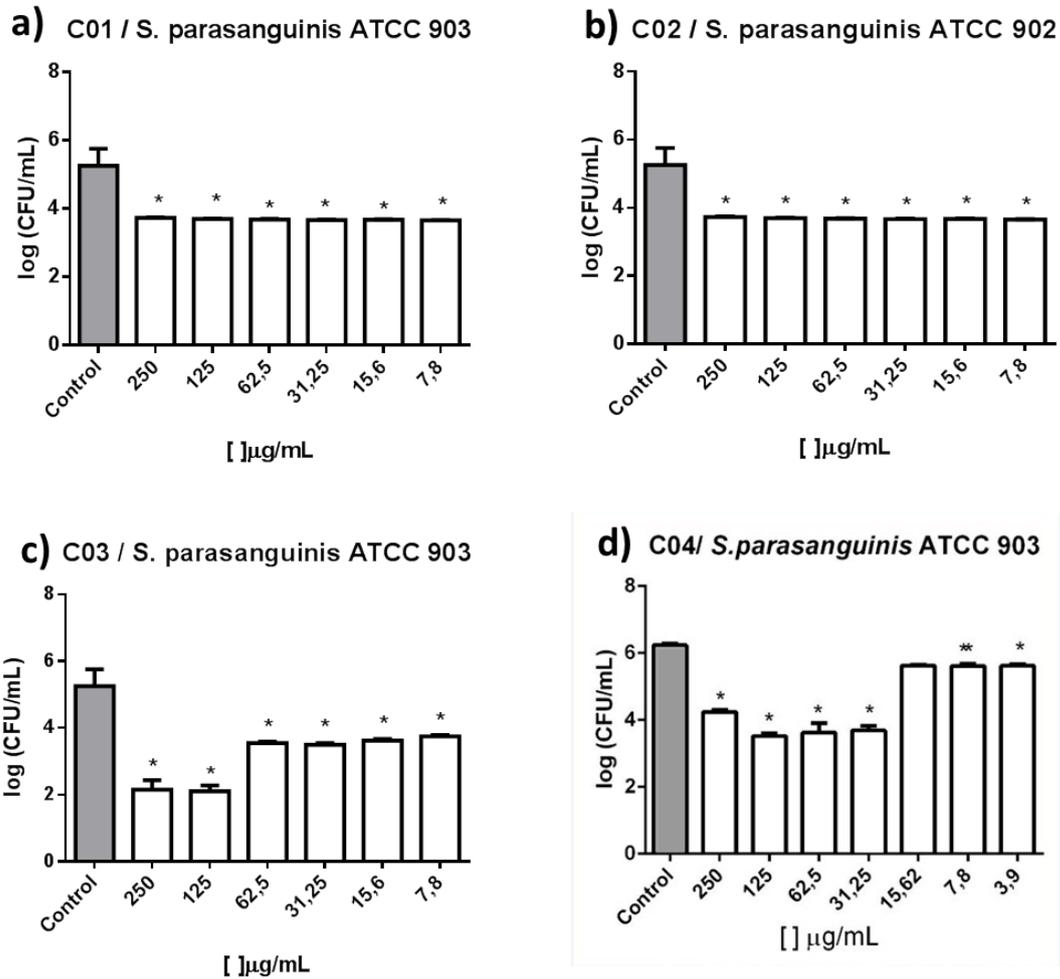
Uma das hipóteses para a atividade semelhante dos compostos C01 e C02 seria a presença do elemento selênio. Shakibaie e colaboradores (2015) demonstraram que nanopartículas de selênio em concentrações abaixo de 16 $\mu\text{g/mL}$ reduziram o biofilme de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* entre 34% a 55%, levando a acreditar que o selênio possa ser um forte agente antibiofilme.

Gráfico 3 - Quantificação das unidades formadoras de colônias de *S. mutans* ATCC 25175



Fonte: Elaborado pelo autor. Viabilidade de células aprisionadas no biofilme de *S. mutans* ATCC 25175 após um crescimento de 24 h na presença de calcogenoésteres. A viabilidade foi determinada pela enumeração de UFCs incorporadas na matriz do biofilme. As barras de erro indicam o desvio padrão da média. * = $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle. **3.a** Redução do número de UFCs estatisticamente relevante a partir da concentração 31,25 $\mu\text{g/mL}$ de **C01** quando comparado ao controle; **3.b** Redução das UFCs em todas as concentrações testadas de **C02** quando comparado ao controle; **3.c** Curiosamente só houve redução das UFCs entre as concentrações 15,6-125 $\mu\text{g/mL}$ de **C03** seguido de um aumento das UFCs na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ quando comparada às concentrações anteriores. **3.d** Redução de UFCs apenas na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ de **C04** quando comparado ao controle.

Gráfico 4 - Quantificação das unidades formadoras de colônias de *S. parasanguinis* ATCC 903



Fonte: Elaborado pelo autor. Viabilidade de células aprisionadas no biofilme de *S. parasanguinis* ATCC 903 após um crescimento de 24 h na presença de calcogenoésteres. A viabilidade foi determinada pela enumeração de UFCs incorporadas na matriz do biofilme. As barras de erro indicam o desvio padrão da média. * = $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle. **4.a** e **4.b** O número de células viáveis de *S. parasanguinis* na presença de **C01** e **C02**, apresentaram redução muito semelhantes, inclusive nas diferentes concentrações 7,8 -250 µg/mL para os dois compostos; **4.c** Redução das UFCs foi semelhante entre as concentrações 7,8-62,5 µg/mL de **C03**, na concentração de 250 µg/mL houve uma redução de mais de 2,0 log₁₀; **4.d** Redução de UFCs em todas as concentrações testadas de **C04** quando comparado ao controle. Importante destacar que para a concentração de 125 µg/mL a redução foi de 2,7 log₁₀.

6 CONCLUSÃO

No estudo em questão, conclui-se que o calcogenoéster C02 apresentou marcante atividade bactericida especificamente para *S. parasanguinis*, os demais compostos apresentaram atividade bacteriostática para *S. mutans* e *S. parasanguinis*. Assim, os calcogenoésteres testados podem representar uma alternativa em potencial para a prevenção de biofilmes orais envolvendo *S. mutans* e *S. parasanguinis*. Sugere-se que estudos adicionais sejam realizados com o objetivo de elucidar os mecanismos de ação dos compostos estudados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AAS, J. A. *et al.* Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, nov. 2005.
- ABEE, T.*et al.* Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 2, n. 22, p. 172-179, Apr. 2011.
- AGARWAL, A.; SINGH, K. P.; JAIN, A. Medical significance and management of staphylococcal biofilm. **FEMS Immunol. Med. MIC.**, v. 58, n. 2, p. 147-160, 2010.
- AKCALI, A. *et al.* Periodontal diseases and stress: a brief review. **J. Oral Rehabil.**, v. 40, n.1, p. 60-68, jan. 2013.
- ARWANI, S. *et al.* Comparative evaluation of anti-plaque efficacy of herbal and 0.2% chlorhexidine gluconate mouthwash in a 4-day plaque re-growth study. **Journal Of Indian Society Of Periodontology**, v. 17, n. 1, p.72-77, 2013.
- BAEHNI, P. C.; TAKEUCHI, Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. **Oral Diseases**, v. 9, n. 1, p.23-29, jun. 2003.
- BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Front. Biosci.**, v. 9, p. 1267-1277, 2004.
- BATONI, G. *et al.* Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, p. 256-279, jun. 2011.
- BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal Of Pharmacology**, v. 153, n. 1, p.347-357, 29 jan. 2008.
- BOING, A. F. *et al.* Social determinants of health and dental caries in Brazil: a systematic review of the literature between 1999 and 2010. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. 2, p.102-115, 2014.
- BOS, R.; MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Co-adhesion of Oral Microbial Pairs under Flow in the Presence of Saliva and Lactose. **Journal Of Dental Research**, v. 75, n. 2, p.809-815, fev. 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BURMOLLE, M. *et al.* Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 3916-3923, jun. 2006.

CAMARA-LEIMBACH, Aigena. **ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE CALCOGENOL ÉSTERES SOBRE STREPTOCOCCUS RELACIONADOS À INFECCÕES**. 2015. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia de Recursos Naturais, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce, 2015.

CAUFIELD, P.W. *et al.* Oral Lactobacilli and Dental Caries. **Journal Of Dental Research**, v. 94, n. 9, p.110-118, 10 mar. 2015.

CHARACKLIS, W. G.; MCFETERS, G. A.; MARSHALL, K.C. Physiological ecology in biofilm systems. **Biofilms**, p. 341-94, 1990.

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

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. How bacteria stick. **Sci. Am.** v. 238, n. 1, p. 86-95, jan. 1978.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n.5428, p. 1318-1322, maio 1999.

COSTERTON, J. W.; WILSON, M.. Introducing Biofilms. **Biofilms**, v. 1, n. 1, p.1-4, jan. 2004.

COWAN, M. M.; WARREN, T. M.; FLETCHER, M. Mixed species colonization of solid surfaces in laboratory biofilms. **Biofouling**, v. 3, p. 23-34, 1991.

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, aug. 2013.

CUMMINS, D. Dental caries: A disease which remains a public health concern in the 21st century-the exploration of a breakthrough technology for caries prevention. **J. Clin. Dent.**, V. 41, p. 1-14, 2013.

DAVEY, M. E.; OTOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, n. 4, p. 847-867, dez. 2000.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat Rev. Drug Discov.**, v. 2, p. 114-122, fev. 2003.

DEWHIRST, F. E. *et al.* The Human Oral Microbiome. **Journal Of Bacteriology**, v. 192, n. 19, p. 5002-5017, jul. 2010.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 881-890, 2002.

DONLAN, R. M. COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 167-193, apr. 2002.

DONLAN, R. M.; PIPES, W. O.; YOHE, T. L. Biofilm formation on cast iron substrata in water distribution systems. **Water Research**, v. 28, n. 6, p.1497-1503, jun. 1994.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: Seen any biofilms lately?. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 155-166, abr. 2002.

ELIAS, S.; BANIN, E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. **Fems Microbiology Reviews**, v. 36, n. 5, p. 990-1004, set. 2012.

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

FEJERSKOV, O. *et al.* Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. **Caries Research**, v. 38, n. 3, p. 182-191, 2004.

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

FINE, D. H. *et al.* A Consortium of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus parasanguinis*, and *Filifactor alocis* Is Present in Sites Prior to Bone Loss in a Longitudinal Study of Localized Aggressive Periodontitis. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 9, p. 2850-2861, jun. 2013.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 623-633, set. 2010.

FLOHE, L.; GUNZLER, W.A.; SCHOCK, H.H. Glutathione peroxidase a selenoenzyme. **FEBS Lett**, v. 32, p. 132-134, 1973.

GENG J. *et al.* Complete genome and transcriptomes of *Streptococcus parasanguinis* FW213: phylogenetic relations and potential virulence mechanisms. **PLoS One**. v. 7, p. 347-360, 2012.

- GHISLENI, G. *et al.* Diphenyl diselenide exerts anxiolytic-like effect in Wistar rats: putative roles of GABAA and 5HT receptors. **Prog Neuro Biol Psychiatry**, v. 32, p. 1508–1515, 2008.
- GIACAMAN, R. A.; ARANEDA, E.; PADILLA, C. Association between biofilm-forming isolates of mutans streptococci and caries experience in adults. **Arch. Of Oral Biol.**, v. 55, n. 8, p. 550-554, 2010.
- GURAV, A.; JADHAV, V. Periodontitis and risk of diabetes mellitus. **J. Diabetes** v. 3, p. 21-28, 2011.
- HARDING, M. W. *et al.* Can filamentous fungi form biofilms?. **Trends In Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475-480, nov. 2009.
- HASIBUL, K. *et al.* D-Tagatose inhibits the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **Molecular Medicine Reports**, p. 843-851, nov. 2017.
- HERBETTE, S; ROECKEL-DREVET, P; DREVET, J. R. Seleno-independent glutathione peroxidases. **Febs Journal**, v. 274, n. 9, p.2163-2180, abr. 2007.
- HØIBY, N. Recent advances in the treatment of Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis. **BMC Med.**, v. 9, n. 1, p. 1-7, abr. 2011.
- HOLBEN, D. H.; SMITH, A.M. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, p. 836-843, 1999.
- HORTENSE, S. R. *et al.* USO DA CLOREXIDINA COMO AGENTE PREVENTIVO E TERAPÊUTICO NA ODONTOLOGIA. **Revista de Odontologia da Universidade**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 178-184, 2010.
- HOURY, A. *et al.* Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 109, n. 32, p. 13088-13088, ago, 2012.
- KELLER, L.; SURETE, M. G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nat Rev. Microbiol.**, v.4, p. 249-258, 2006.
- KITTEN, T. Vaccination with FimA from Streptococcus parasanguis Protects Rats from Endocarditis Caused by Other Viridans Streptococci. **Infection And Immunity**, v. 70, n. 1, p.422-425, jan. 2002.
- KHOROUSHI, M.; KACHUIE, M. Prevention and Treatment of White Spot Lesions in

Orthodontic Patients. **Contemp Clin Dent.**, v. 8, n. 1, p.11-19, 2017.

KOLENBRANDER, P. E. *et al.* Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p.471-480, 1 jun. 2010.

LIU, Y.; BURNE, R. A. Multiple Two-Component Systems of *Streptococcus mutans* Regulate Arginine Deiminase Gene Expression and Stress Tolerance. **Journal Of Bacteriology**, v. 191, n. 23, p. 7363-7366, set. 2009.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 353-380, 1986.

LOPES, L. M. *et al.* Indicadores e fatores de risco da cárie dentária em crianças no Brasil - uma revisão de literatura. **RFO UPF**, Passo Fundo , v. 19, n. 2, ago. 2014.

LOPÉZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 2, n. 7, p. 1-11, jun. 2010.

LUPPENS, S. B. *et al.* Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 4194–4200, 2002.

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

MAIDEN, M. F. J.; COHEE, P.; TANNER, A. C. R. Proposal to conserve the adjectival form of the specific epithet in the reclassification of *Bacteroides forsythus* Tanner et al. 1986 to the genus *Tannerella Sakamoto et al.* 2002 as *Tannerella forsythia* corrig., gen. nov., comb. nov. Request for an Opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 2111-2112, nov. 2003.

MARSH, P. D.; HEAD, D. A.; DEVINE, D. A. Ecological Approaches to Oral Biofilms: Control without Killing. **Caries Research**, v. 49, n. 1, p.46-54, 2015.

MUGESH, G.; SINGH, H. B. Synthetic organoselenium compounds as antioxidants: glutathione peroxidase activity. **Chemical Society Reviews**, v. 29, n. 5, p.347-357, 2000.

MURPHY, C. N. *et al.* Role of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae in Colonizing Silicone Tubes Implanted into the Bladders of Mice as a Model of Catheter-Associated Urinary Tract Infections. **Infection And Immunity**, v. 81, n. 8, p.3009-3017, 10 jun. 2013.

NARAYANAPERUMAL, Senthil. **IONIC LIQUID & ORGANOCHALCOGENOLATES: AN EFFICIENT REACTION MEDIA FOR THE SYNTHESIS OF ORGANOCHALCOGEN DERIVATIVES**. 2010. 148 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Organoselenium and Organotellurium Compounds: Toxicology and Pharmacology. **Chem. Rev.**, v. 104, n. 12, p.6255-6286, 2004.

O'DONNELL, L. E. *et al.* The Oral Microbiome of Denture Wearers Is Influenced by Levels of Natural Dentition. **Plos One**, v. 10, n. 9, p. 1-22, set. 2015

PASTAR, I. *et al.* Interactions of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus USA300 and Pseudomonas aeruginosa in Polymicrobial Wound Infection. **Plos One**, v. 8, n. 2, p.1-12, 22 fev. 2013.

PASTER, B. J. *et al.* Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque. **Journal Of Bacteriology**, v. 183, n. 12, p.3770-3783, jun. 2001.

PITTS, N. B. *et al.* The dental caries experience of 5-year-old children in England and Wales (2003/4) and in Scotland (2002/3). Surveys co-ordinated by the British Association for the Study of Community Dentistry. **Community Dent Health**, v. 22, p. 45–56, 2005.

POST, J. C. *et al.* The role of biofilms in otolaryngologic infection: update 2007. **Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 15, n. 5, p. 347-351, out. 2007.

RAMPON, D. S. *et al.* An evaluation of the chalcogen atom effect on the mesomorphic and electronic properties in a new homologous series of chalcogeno esters. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 11, p.2100-2107, 2010.

READING, N. C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **Fems Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p.1-11, jan. 2006.

RICKARD, A. H. *et al.* Autoinducer: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. **Mol. Microbiol.**, v. 60, n. 6, p. 1446-1456, jun. 2006.

RØDER, H. L.; SØRENSEN, S. J.; BURMØLLE, M. Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start?. **Trends In Microbiology**, v. 24, n. 6, p.503-513, jun. 2016.

ROSA, R.M. *et al.* Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. **Braz J Med Biol Res.**, v. 40, p. 1287–1304, 2007.

ROSSETI, I. B. et al. Candida albicans growth and germ tube formation can be inhibited by simple diphenyl diselenides [(PhSe)₂, (MeOPhSe)₂, (p-Cl-PhSe)₂, (F₃CPhSe)₂] and diphenyl ditelluride. **Mycoses**, São Paulo, v. 54, n. 6, p.506-513, 2010.

SALWICZEK, M. et al. Emerging rules for effective antimicrobial coatings. **Trends In Biotechnology**, v. 32, n. 2, p.82-90, fev. 2014.

SANTANA, D. P. et al. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v. 12, n. 2, p.229-233, 2013

SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **The Lancet**, v. 369, n. 9555, p.51-59, jan. 2007.

SHAKIBAIE, M. et al. Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*. **J Trace Elem Med Biol**, v. 29, p. 235–241, 2015.

SILVA FILHO, S. F. Tabela Periódica Atualizada (2017). **Química explicata**, 2017. Disponível em: < <https://quimicaexplica.wordpress.com/2017/08/02/tabela-periodica-atualizada-2017/>>. Acesso em: 22 dez. 2017.

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

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergente biofilm control strategies. **LWT – Food Sci. Technol.**, v. 43, n. 4, p. 573-583, maio 2010.

SIMÓN-SORO, A.; MIRA, A. Solving the etiology of dental caries. **Trends In Microbiology**, v. 23, n. 2, p.76-82, fev. 2015.

SOCRANSKY, S. S. HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol 2000**, v.28, p.12-55, 2002.

SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal Of Clinical Periodontology**, v. 25, n. 2, p. 134-144, fev. 1998.

SOET, J. J.; NYVAD, B.; KILIAN, M. Strain-Related Acid Production by Oral Streptococci. **Caries Research**, v. 34, n. 6, p.486-490, 2000.

SOUSA, L. S. et al. Antibacterial effect of chalcogenoesters on planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus parasanguinis*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, n. 8, p.1609-1618, mar. 2017.

STEPANOVIC, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J. Microbiol. Methods.**, v. 40, n. 2, p. 175-179, abr. 2000.

TAGLIAFERRO, E. P. S.; PARDI, V. Ambrosano GMB, Meneghim MC, Pereira AC. An overview of caries risk assessment in 0-18 years-olds over the last ten years (1997-2007). **Braz J Oral Sci.**, v. 27, n. 7, p. 1682-1690, 2008.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. **Caries Research**, v. 42, n. 6, p.409-418, 2008.

VARGAS, J. *et al.* Synthesis of chiral β -chalcogen amine derivatives and Gram-positive bacteria activity. **Tetrahedron**, v. 68, p. 10444–10448, 2012.

WIDGEROW, S. Persistence of the chronic wound – implicating biofilm. **Wound Healing Southern Africa**, v. 1, n. 2, p. 5-7, 2008.

WILKING, J. N. *et al.* Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 110, n. 3, p. 848-852, 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.

XU, K. D.; MCFETERS, G. A.; STEWART, P. S. Biofilm resistance to antimicrobial agents. **Microbiology**, v. 146, n. 3, p.547-549, mar. 2000.

YASSIN, S. A. *et al.* Inhibition of multispecies biofilms by a fluoride-releasing dental prosthesis copolymer. **Journal Of Dentistry**, v. 48, p. 62-70, maio 2016.

ZANATTA, F. B.; RÖSING, C. K. CLOREXIDINA: MECANISMO DE AÇÃO E EVIDÊNCIAS ATUAIS DE SUA EFICÁCIA NO CONTEXTO DO BIOFILME SUPRAGENGIVAL. **Scientific-a**, v. 2, n. 1, p.35-43, 2007.

ZAURA, E. *et al.* Defining the healthy. **Bmc Microbiology**, v. 9, n. 1, p.250-259, 2009.

ZHANG, X. *et al.* A brief review of recent developments in the designs that prevent bio-fouling on silicon and silicon-based materials. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p.11-18, fev. 2017.

ZHENG, H. *et al.* Subgingival microbiome in patients with healthy and ailing dental implants. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p.1-22, jun. 2015.

ANEXO A- TABELA PERIÓDICA

CLASSIFICAÇÃO PERIÓDICA DOS ELEMENTOS (com massas atômicas referidas ao isótopo 12 do carbono)

1 1A												13 3A		14 4A		15 5A		16 6A		17 7A		18 0			
I												IIIA													
H 1,008												B 10,81		C 12,011		N 14,007		O 15,999		F 18,998		Ne 20,180			
II												III		IV		V		VI		VII		VIII			
Li 6,94												Al 26,982		Si 28,085		P 30,974		S 32,06		Cl 35,45		Ar 39,948			
Be 9,012												Ga 69,723		Ge 72,631		As 74,922		Se 78,96		Br 79,904		Kr 83,798			
III												IV		V		VI		VII		VIII		IX			
Na 22,990												Zn 65,38		In 114,82		Sn 118,71		Sb 121,76		Te 127,60		I 126,90		Xe 131,29	
Mg 24,305												Cd 112,41		Pb 207,2		Bi 208,98		Po 209		At 210		Rn 222			
IV												V		VI		VII		VIII		IX		X			
K 39,098												Ag 107,87		Au 196,97		Hg 200,59		Tl 204,38		Pb 207,2		Bi 208,98		Po 209	
Ca 40,078												Pt 195,08		Au 196,97		Hg 200,59		Tl 204,38		Pb 207,2		Bi 208,98		Po 209	
V												VI		VII		VIII		IX		X		XI			
Rb 85,468												Ir 226,10		Pt 195,08		Au 196,97		Hg 200,59		Tl 204,38		Pb 207,2		Bi 208,98	
Sr 87,62												Rh 101,07		Pd 106,42		Ag 107,87		Cd 112,41		In 114,82		Sn 118,71		Sb 121,76	
VI												VII		VIII		IX		X		XI		XII			
Cs 132,91												Os 190,23		Ir 226,10		Pt 195,08		Au 196,97		Hg 200,59		Tl 204,38		Pb 207,2	
Ba 137,33												Ru 101,07		Rh 101,07		Pd 106,42		Ag 107,87		Cd 112,41		In 114,82		Sn 118,71	
VII												VIII		IX		X		XI		XII		XIII			
Fr 223,02												Co 58,93		Ni 58,69		Cu 63,55		Zn 65,38		Ga 69,72		Ge 72,63		As 74,92	
Ra 226,03												Fe 55,85		Co 58,93		Ni 58,69		Cu 63,55		Zn 65,38		Ga 69,72		Ge 72,63	

NOME DO ELEMENTO

Número Atômico

Símbolo

Massa Atômica

ELETRONS NAS CAMADAS

Série dos lantanídeos

57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
138,91	140,12	140,91	144,24	144,91	150,36	151,96	157,25	158,93	162,50	164,93	167,26	168,93	173,05	174,97

Série dos actínídeos

89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103
Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr
227,03	232,04	231,04	238,03	237,05	244,06	243,06	247,07	247,07	251,08	252,08	257,10	258,10	259,10	262,11

bloco f

Referências:
WIESER, M.E. e COPLIN, T.B.
Atomic weights of the elements
2009. *Pure and Applied Chemistry*,
v. 83, p. 359-396, 2011.

Notas:
Versão IUPAC (pt-br), com 5 algarismos significativos, baseada em [DOI:10.1515/pac-2015-0305](https://doi.org/10.1515/pac-2015-0305).
Massa atômica relativa. A incerteza no último dígito é ± 1, exceto quando indicado entre parênteses.
† Os valores referem-se ao isótopo mais estável.

Caso encontre algum erro favor avisar pelo e-mail
silverio_f.dasilvafilho@hotmail.com

Os quatro novos elementos da tabela periódica, de número atômico 113, 115, 117 e 118, nomeados em 2016, foram ratificados no dia 13 de julho de 2017, durante o 46º Congresso Mundial de Química da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), que foi realizado na cidade de São Paulo.

Atualizada em agosto de 2017.

Fonte: Silva Filho (2017)