



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**BEATRIZ MARTINS CARNEIRO**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CALCOGENOÉSTERES CONTRA CÉLULAS  
PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Staphylococcus* spp.**

**FORTALEZA**

**2021**

BEATRIZ MARTINS CARNEIRO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CALCOGENOÉSTERES CONTRA CÉLULAS  
PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Staphylococcus* spp.

Monografia apresentada ao Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do Ceará,  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira

FORTALEZA

2021

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)

---

C287a Carneiro, Beatriz Martins.

Atividade antimicrobiana de calcogenoésteres contra células planctônicas e biofilmes de *Staphylococcus* spp. / Beatriz Martins Carneiro. – 2021.  
36 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.

1. Biofilmes. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Calcogenoésteres. I. Título.

CDD 570

---

BEATRIZ MARTINS CARNEIRO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CALCOGENOÉSTERES CONTRA CÉLULAS  
PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Staphylococcus* spp.

Monografia apresentada ao Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do Ceará,  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Biologia.

Aprovada em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Me. Alexandre Lopes Andrade  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Me. Aryane de Azevedo Pinheiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Francisca Maria e Anildo.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais e meu irmão pelo suporte financeiro e emocional. Se estou hoje aqui é graças a vocês.

Aos amigos e familiares que de alguma forma me ajudaram e torceram por mim, em especial a tia Geni que me acolheu em sua casa em Fortaleza.

Ao Joshua e a Gracivânia que de várias formas me ajudaram durante esses anos.

À Andreza, Anderson, Grazy, Ju, Mari e Math, os "Polonizadores uspulsos". Cada um sabe o valor que tem e o suporte de vocês durante a graduação tornou essa jornada mais leve e divertida.

Ao LIBS (Laboratório Integrado de Biomoléculas - UFC) e a todos os integrantes que me acolheram. Um grupo com pessoas maravilhosas e sempre dispostas a ajudar. Tive a sorte grande em encontrar um grupo assim durante a minha graduação.

Aos mestres, doutores e colegas de iniciação científica do grupo LIBS, em especial todos os membros do laboratório de Microbiologia.

À UFC, e seu corpo docente.

Ao Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira pela orientação que foi essencial para realização deste trabalho.

Aos membros participantes da banca examinadora, Me. Aryane de Azevedo Pinheiro e Me. Alexandre Lopes Andrade pela disponibilidade, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos professores e funcionários do curso de Ciências Biológicas, que de forma direta ou indireta contribuíram com a minha formação acadêmica.

Agradeço a todos que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho, eu jamais teria conseguido sozinha.

Obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

— José de Alencar

## RESUMO

Biofilmes são descritos como comunidades microbianas aderidas em uma superfície e inseridas em uma matriz polimérica extracelular produzida por elas mesmas, estando associados ao aumento da resistência antimicrobiana. Frente a esta problemática, a descoberta de novas moléculas que apresentem efeito antimicrobiano, constitui-se essencial para superar os problemas atuais de resistência aos antibióticos. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de compostos da classe de organocalcogênios, os calcogenoésteres (selenoésteres), sobre células planctônicas e biofilme de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, os compostos foram denominados S501, N1 e N2. Para determinar a atividade antibacteriana, os compostos foram diluídos em concentrações que variaram de 250 a 7,8 µg/mL e distribuídos em placas de 96 poços de poliestireno, com cada suspensão bacteriana ajustada ( $1 \times 10^6$  UFC/ mL) em meio TSB, em seguida, incubadas durante 24 horas a 37 °C. A susceptibilidade do microrganismo aos compostos foi avaliada através de ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). A atividade antibiofilme foi avaliada pela quantificação de biomassa através do método de coloração com cristal violeta e pela quantificação do número de células viáveis no biofilme através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os resultados mostraram que S501, N1 e N2 apresentaram CIM de 62,5, 125 e 62,5 µg/mL, respectivamente, para *S. aureus*, já S501 e N1 apresentaram CIM de 62,5 e 125µg/mL, respectivamente, para *S. epidermidis*. Todos os compostos inibiram a formação de biomassa, destacando-se S501 e N1 que reduziram cerca de 80%. Em adição, o número de células viáveis do biofilme foi reduzido, destacando-se S501 que na concentração de 250 µg/mL gerou redução de 1,6 log<sub>10</sub> quando comparado ao controle. Conclui-se, portanto, que os calcogenoésteres testados podem representar uma alternativa em potencial para a prevenção de biofilmes envolvendo *S. aureus* e *S. epidermidis*, entretanto, estudos complementares são necessários para esclarecer os mecanismos de ação dos compostos estudados.

**Palavras-chave:** Biofilmes. Resistência antimicrobiana. Calcogenoésteres.

## ABSTRACT

Biofilms are described as microbial communities adhered to a surface and inserted into an extracellular polymeric matrix produced by themselves, being associated with increased antimicrobial resistance. Faced with this problem, the discovery of new molecules that have an antimicrobial effect is essential to overcome the current problems of antibiotic resistance. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of compounds from the class of organochalcogens, the chalcogenoesters (selenoesters), on planktonic cells and biofilm of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; the compounds were named S501, N1 and N2. To determine the antibacterial activity, the compounds were diluted in concentrations ranging from 250 to 7.8 µg/mL and distributed in 96-well polystyrene plates, with each bacterial suspension adjusted ( $1 \times 10^6$  CFU/mL) in TSB medium, then incubated for 24 hours at 37°C. The susceptibility of the microorganism to the compounds was evaluated using minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (CBM) tests. The antibiofilm activity was evaluated by biomass quantification using the crystal violet staining method and by quantifying the number of viable cells in the biofilm by counting colony forming units (CFU). The results showed that S501, N1 and N2 presented MIC of 62.5, 125 and 62.5 µg/mL, respectively, for *S. aureus*, whereas S501 and N1 presented MIC of 62.50, 125µg/mL, respectively, for *S. epidermidis*. All compounds inhibited the formation of biomass, standing out S501 and N1 that reduced about 80%. In addition, the number of viable cells in the biofilm was reduced, standing out S501 that at the concentration of 250 µg/mL generated a reduction of 1.6 log<sub>10</sub> when compared to the control. Therefore, it is concluded that the tested chalcogenoesters may represent a potential alternative for the prevention of biofilms involving *S. aureus* and *S. epidermidis*, however, further studies are needed to clarify the mechanisms of action of the studied compounds.

**Keywords:** Biofilms. Antimicrobial resistance. Chalcogenoesters.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Etapas do desenvolvimento do biofilme bacteriano.....	16
Figura 2 – Comparação das principais causas de morte com mortes atribuíveis a RAM...	17
Figura 3 – Fórmula estrutural dos calcogenoésteres utilizados no estudo.....	22
Figura 4 – Efeito dos calcogenoésteres S501, N1 e N2 sobre biofilmes de <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	29
Figura 5 – Efeito dos calcogenoésteres S501, N1 e N2 sobre biofilmes de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	30
Figura 6 – Efeito dos calcogenoésteres S501, N1 e N2 sobre biofilmes pré-formados de <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	32
Figura 7 – Efeito dos calcogenoésteres S501, N1 e N2 sobre biofilmes pré-formados de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Infecções humanas associadas com a formação de biofilmes e microrganismos comumente envolvidos.....	18
Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos calcogenoésteres sobre as cepas de <i>Staphylococcus</i> spp.....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ANOVA	Análise de Variância
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
TSB	Soja Tríplica Caldo
TSA	Soja Tríplica Ágar
UFC	Unidade Formadora de Colônia
CV	Cristal Violeta
SPE	Substância Polimérica Extracelular
GPx	Glutathione Peroxidase
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
D.O	Densidade Óptica

## LISTA DE SÍMBOLOS

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

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Obtenção dos calcogenoésteres.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>Microrganismos e condições de cultivo.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3</b>	<b>Ensaio de atividade sobre o crescimento planctônico dos microrganismos.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4</b>	<b>Ensaio de atividade sobre a formação de biofilme.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4.1</b>	<b><i>Quantificação de biomassa.....</i></b>	<b>24</b>
<b>3.4.2</b>	<b><i>Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).....</i></b>	<b>24</b>
<b>3.5</b>	<b>Ensaio sobre biofilmes pré-formados.....</b>	<b>25</b>
<b>3.6</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Efeito dos calcogenoésteres sobre o crescimento planctônico.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>Atividade antibiofilme.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3</b>	<b>Contagem do número de células viáveis.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4</b>	<b>Quantificação de biomassa de biofilmes pré-formados.....</b>	<b>31</b>
<b>4.5</b>	<b>Contagem do número de células viáveis de biofilmes pré-formados.....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>34</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A primeira observação relacionada a biofilmes foi realizada por Antonie Van Leeuwenhoek em 1674, o mesmo com o auxílio do seu microscópio simples estava analisando amostras retiradas da sua própria placa dentária e notou a presença de mais fragmentos agregados do que fragmentos “livres”. No entanto, a primeira publicação que descreve os biofilmes foi realizada por Zobell em 1943, onde o mesmo relatou a adesão de bactérias marinhas em cascos de navios. Apenas em 1978 com o avanço das técnicas de microscopia foi que Costerton e colaboradores relataram em seu estudo que a maioria dos microrganismos em ambientes naturais se encontravam fixos a substratos e não totalmente de forma dispersa. Logo, a esses microrganismos aderidos foi atribuída a definição de biofilme (MENOITA *et al.*, 2012).

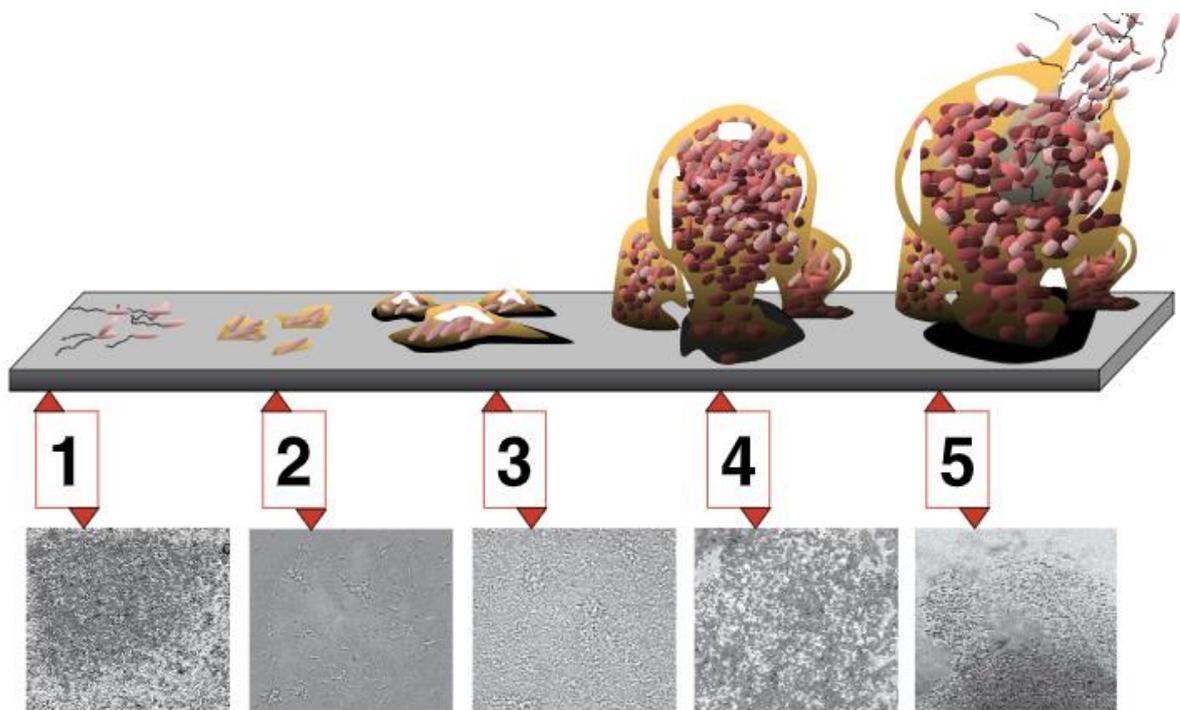
Desde então, várias pesquisas foram realizadas e o conceito de biofilme vem evoluindo. Atualmente os biofilmes podem ser definidos como uma comunidade de microrganismos podendo compreender uma única ou múltiplas espécies microbianas, que estão aderidos a uma superfície biótica ou abiótica, embebidos em uma matriz polimérica extracelular autoproduzida. A matriz contém principalmente DNA extracelular, polissacarídeos e proteínas (DONLAN, 2002; O'TOOLE *et al.*, 2000; TOLKER-NIELSEN, 2015).

Algumas razões estão implicadas na formação do biofilme. O biofilme garante uma maior resistência a perturbações externas, sendo assim um mecanismo de autodefesa do microrganismo. Retardam a adsorção de moléculas tóxicas, como antibióticos e também ocorre uma maior resistência ao sistema imune do hospedeiro. A capacidade de adesão a superfícies ricas em nutrientes permite que as células bacterianas sejam fixadas e assim permaneçam em um nicho favorável. A formação de biofilme implica também as células a viverem em associação com outras espécies, tal processo facilita a troca de nutrientes ou informações genéticas e dessa forma aumenta as chances de sobrevivência (MADIGAN *et al.*, 2016).

Monds (2009) descreve que o desenvolvimento de biofilmes geralmente ocorre em cinco estágios: (1) primeiramente as células planctônicas tendem a se ligar de forma reversível às superfícies, seja por meio de flagelos, pili, fimbrias e polissacarídeos; (2) À medida que ocorre a multiplicação das células microbianas, as bactérias se ligam de maneira irreversível devido o aumento da produção de proteínas e polissacarídeos da matriz

extracelular; (3) com esse crescimento as células microbianas começam a secretar uma matriz circundante, formando agrupamentos de células chamadas de microcolônias; (4) as microcolônias crescem em tamanho e se aderem para formar macro colônias, nesse estágio o biofilme se torna maduro; (5) as células podem se dispersar das macro colônias, proliferando como células planctônicas e formando um novo biofilme. As etapas do desenvolvimento do biofilme podem ser vistas na Figura 1.

Figura 1 – Etapas do desenvolvimento do biofilme bacteriano



Fonte: Adaptado de MONROE (2007).

De acordo com o órgão norte-americano *National Institutes of Health* (NIH), cerca de 80% de todas as infecções no mundo estão associadas a biofilmes (NIH, 2002). Costerton *et al.* (1999) salienta que a formação do biofilme está relacionada com diversas doenças, como fibrose cística, feridas, pneumonia, otite média, assim como muitas infecções crônicas e persistentes. Isso se dá ao fato de que comparado a forma planctônica, as bactérias agregadas em um biofilme se tornam de 10-1000 vezes menos suscetíveis aos antimicrobianos (KARYGIANNI *et al.*, 2014).

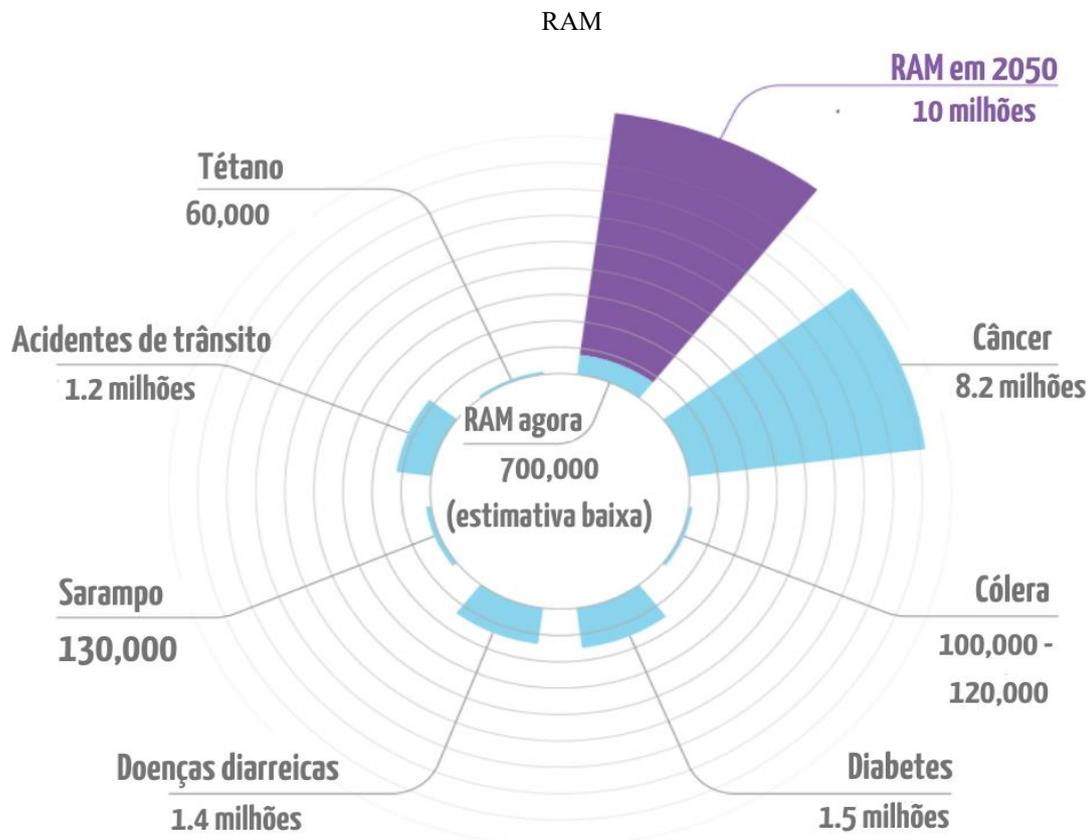
Dentre as descobertas da ciência médica, podemos citar os antibióticos como uma das mais importantes (GOTTFRIED, 2005). No entanto, nos últimos anos em decorrência da imprudência humana, seja pelo uso desses medicamentos de forma abusiva ou inadequada,

seja na produção de alimentos, na saúde humana ou animal, o número de microrganismos resistentes aumentou. Apesar da resistência antimicrobiana (RAM) ser um fenômeno natural que ocorre em bactérias, fungos, parasitas e vírus, tal processo pode ser acelerado e os fármacos atuais podem não ser mais efetivos (ÅRDAL *et al.*, 2020).

De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2020, nenhum dos 43 antibióticos que atualmente estão em fase de desenvolvimento clínico, suprem o problema da resistência das bactérias multirresistentes que estão na lista de prioridades (WHO, 2017; WHO, 2021).

A resistência antimicrobiana é considerada uma das maiores ameaças à saúde pública mundial. O'Neill (2014) em seu relatório, estima que cerca de 700.000 pessoas morrem a cada ano devido a infecções bacterianas comuns com cepas resistentes. O mesmo enfatiza que se ações não forem tomadas, com base no aumento da resistência aos medicamentos para seis patógenos, esse número pode aumentar para 10 milhões de mortes a cada ano até 2050 (Figura 2), e os custos relacionados a RAM chegariam a US\$ 100 trilhões de dólares.

Figura 2 – Comparação das principais causas de morte com mortes atribuíveis a



Fonte: Adaptado de O'NEILL (2014).

Trentin e colaboradores (2013) destacam alguns dos patógenos formadores de biofilme mais comumente encontrados em infecções humanas, como: *Staphylococcus* spp.; *Pseudomonas aeruginosa* e enterobactérias, como *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae*. Outros exemplos de patógenos podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1 - Infecções humanas associadas com a formação de biofilmes e microrganismos comumente envolvidos.

TIPO DE INFECÇÃO	MICROORGANISMO	REFERÊNCIAS
Endocardites	<i>Staphylococcus aureus</i>	Costerton; Stewart; Greenberg (1999)
Osteomielite	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Lynch & Robertson (2008)
Rinossinusite	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Marks; Parameswaran; Hakansson (2012)
Amigdalite	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Brouwer <i>et al.</i> (2016)
Fibrose cística	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tolker-Nielsen (2014)
Infecções urinárias	<i>Escherichia coli</i>	Hannan <i>et al.</i> (2012)
Infecções em pacientes com dispositivos médicos	<i>Enterococcus faecium</i>	Paganelli <i>et al.</i> (2013)
Bacteremia, Meningite	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Goh <i>et al.</i> (2013)
Infecções do trato respiratório	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Chung (2016)

Fonte: Adaptado de PARRINO *et al.* (2018).

*S. aureus* e *S. epidermidis* são reconhecidas por serem grandes produtoras de biofilmes. Ambas são encontradas como parte integrante da microbiota da pele e superfícies de mucosas em humanos. São patógenos oportunistas, estando relacionados a infecções nosocomiais e infecções em dispositivos médicos de longa permanência. Essas infecções ocorrem principalmente em pacientes imunocomprometidos, seja por contaminação do próprio paciente, visitante ou profissional da saúde (ARCHER *et al.*, 2011; OTTO, 2008).

Estima-se que pacientes com infecções por *S. aureus* resistentes à metilicina tenham 64% mais probabilidade de morrer do que pacientes com infecções não resistentes (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020).

Um grande esforço tem sido realizado para a descoberta de novas moléculas, tanto de origem natural quanto sintética, que expressem atividade contra os microrganismos multirresistentes, dessa forma, diminuindo o número de mortes causadas por infecções bacterianas (ANDRADE, 2018).

Nesse contexto, se faz necessário a busca por novas alternativas capazes de prevenir e/ou controlar os biofilmes bacterianos. Os organocalcogênios são compostos que possuem em sua composição elementos localizados no grupo 16 da tabela periódica (oxigênio, enxofre, selênio, telúrio e polônio). A estratégia de introduzir um átomo de calcogênio é uma forma de acessar compostos versáteis, já que os mesmos possuem papel importante em processos de síntese orgânica, sendo amplamente utilizados tanto como reagentes ou como intermediários de reação. Além disso, são por si mesmas moléculas interessantes, exibindo diversas atividades biológicas e farmacológicas (LENARDÃO *et al.*, 2020; MORETTO, 2005)

Dentre os organocalcogênios, os calcogenoésteres (ésteres de selenol, tiol e telurol) têm sido alvo de interesse devido a sua importância em várias transformações orgânicas. Os selenoésteres vem ganhando destaque por apresentarem diversas atividades, dentre elas, podemos citar as atividades antivirais, antimicrobianas, antioxidantes, antitumorais e determinados compostos de selênio apresentam ação antinociceptiva, neuroprotetora, hepatoprotetora e ação mimética de várias enzimas e proteínas (HUANG, 2016; NOGUEIRA; BARBOSA; ROCHA, 2021; PETERLE, 2019; RAMPON *et al.*, 2010; RAMPON, 2013; VICTORIA *et al.*, 2013).

O selênio está presente em mamíferos na forma do aminoácido selenocisteína (NOGUEIRA, 2004). Flohe *et al.* (1973) relatou em seu estudo a primeira função bioquímica do selênio como parte integrante da enzima Glutathione Peroxidase (GPx). Vários autores atribuem a atividade antioxidante do selênio ao fato deste ser capaz de mimetizar a GPx, dessa forma sendo capaz de degradar peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (BUENO, 2015).

Apesar dos resultados promissores dos calcogenoésteres em relação à atividade antimicrobiana, poucos são os estudos que abordam especificamente sua atividade sobre biofilmes bacterianos. Dentre os escassos estudos destacam-se resultados como, atividade antimicrobiana e antibiofilme contra as cepas de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 11733

*Streptococcus pyogenes* ATCC 19675 (CAMARA-LEIMBACH, 2015), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SPENGLER *et al.*, 2019), *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (PINHEIRO, 2017).

Frente a esta problemática, o presente estudo buscou avaliar a atividade antimicrobiana de calcogenoésteres sobre células planctônicas e biofilmes de duas espécies de estafilococos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antimicrobiano de três calcogenoésteres contra o crescimento de células planctônicas e o desenvolvimento de biofilmes de duas espécies de estafilococos.

### 2.2 Objetivos específicos

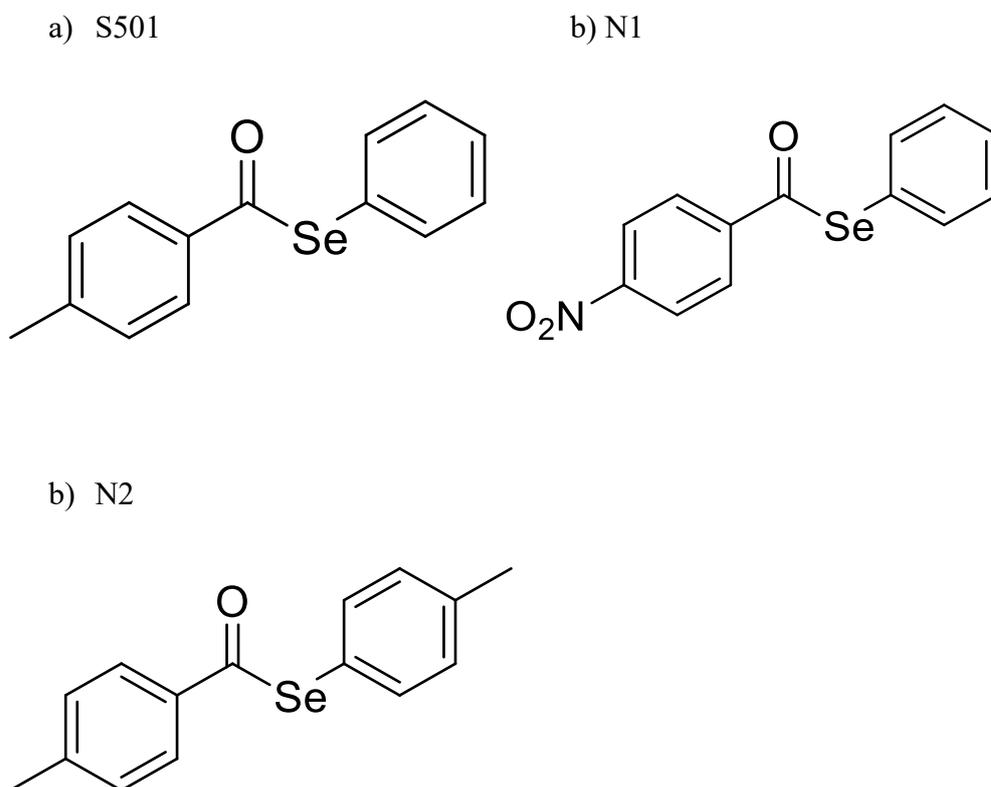
- Avaliar o efeito dos calcogenoésteres S501, N1 e N2 sobre o crescimento planctônico de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228;
- Avaliar a atividade dos calcogenoésteres S501, N1 e N2 sobre a formação de biomassa do biofilme pelas bactérias *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228;
- Averiguar o potencial dos calcogenoésteres em estudo em reduzir o número de células viáveis no biofilme formado por *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228;
- Avaliar a atividade dos calcogenoésteres sobre biofilmes pré-formados das cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção dos calcogenoésteres

Os calcogenoésteres foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Foram utilizados os calcogenoésteres: S501 (4-metilbenzoselenoato de fenila), N1 (4-nitrobenzoselenoato de fenila), N2 (p-metilbenzoselenoato de p-toluila), três selenoésteres (Figura 2).

Figura 3 - Fórmula estrutural dos calcogenoésteres utilizados no estudo



**Fonte:** Imagens cedidas pelo Prof. Dr. Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues – UFSM. Estrutura química dos calcogenoésteres utilizados: a) S501; b) N1; c) N2.

#### 3.2 Microrganismos e condições de cultivo

As cepas bacterianas utilizadas no estudo foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, obtidos da *American Type Culture Collection* (ATCC). Inicialmente coletadas da suspensão estoque, armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  em caldo Triptona Soja (TSB; Himedia, Índia) com 20% de glicerol, sendo estriadas em placas de petri contendo meio Ágar Triptona Soja (TSA) e posteriormente incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, foram transferidas cinco colônias uniformes para tubos tipo falcon contendo 5 mL de caldo TSB e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após a fase de ativação, a concentração de células de cada espécie bacteriana foi ajustada para  $2 \times 10^6$  células/mL com o auxílio de um leitor de placas (SpectraMax i3) por análise a 620 nm.

### **3.3 Ensaio de atividade sobre o crescimento planctônico dos microorganismos**

O efeito dos calcogenoésteres sobre o crescimento planctônico foi avaliado por meio do teste de microdiluição em placas de 96 poços de poliestireno. Os calcogenoésteres S502, N1 e N2 foram diluídos em meio TSB com as concentrações variando entre 250 – 7,8  $\mu\text{g/mL}$ . Cada poço da microplaca foi preenchido com 100  $\mu\text{L}$  do meio de cultura contendo a bactéria ajustada a  $2 \times 10^6$  células/mL, posteriormente foram adicionados em cada poço 100  $\mu\text{L}$  do meio contendo o calcogenoéster em suas diferentes concentrações, obtendo um volume final em cada poço de 200  $\mu\text{L}$ . Esse procedimento foi realizado para os três compostos testados contra as duas espécies de bactérias. As placas foram incubadas por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Após o período de incubação foi feita a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) através da mensuração da turbidez dos poços com auxílio do leitor de microplacas (SpectraMax i3), a um comprimento de onda de 620 nm. A CIM foi considerada a menor concentração do composto em que não apresentou crescimento bacteriano. Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi inoculado em placas de petri com meio TSA, 10  $\mu\text{L}$  da suspensão contida nos poços em que não houve crescimento bacteriano visível, as placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Sendo considerada CBM a menor concentração do composto testado que inibiu completamente o crescimento bacteriano nas placas de petri.

### **3.4 Ensaio de atividade sobre a formação de biofilme**

Os biofilmes foram avaliados pela quantificação da biomassa por coloração com Cristal de Violeta (CV) e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), o ensaio foi realizado com base no teste de placa de microtitulação segundo a metodologia descrita por Stepanovic *et al.* (2000). A preparação das placas para o ensaio foi semelhante ao utilizado para determinação dos efeitos dos calcogenoésteres sobre o crescimento planctônico.

### ***3.4.1 Quantificação da biomassa***

A quantificação da biomassa dos biofilmes foi determinada pelo método de coloração com cristal de violeta (CV). Após a incubação à 37°C por 24 horas, as placas foram lavadas com água destilada estéril por três vezes para a remoção do meio de cultura e retirada das células fracamente aderidas ao biofilme. Em seguida, foi adicionado 200 µL de metanol a 100% por 5 minutos para fixação dos biofilmes. Após o descarte do metanol, adicionou-se então, 200 µL de cristal violeta a 1 % por 5 minutos para coloração e em seguida, o excesso de corante foi removido com água destilada estéril. O corante remanescente foi removido com a adição de 200 µL de ácido acético a 33% por 5 minutos e então a biomassa foi quantificada através da medição da densidade óptica a 590 nm com o auxílio de um leitor de microplacas (SpectraMax i3).

### ***3.4.2 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)***

Foram preparadas placas estéreis de 96 poços utilizando um procedimento semelhante aos ensaios de atividade antimicrobiana, com a mesma concentração de células e substâncias, incubadas por 24 horas a 37 °C para crescimento do biofilme. Posteriormente os poços foram lavados três vezes com 200 µL de água destilada estéril sendo que na última lavagem a água foi deixada nos poços e as placas foram levadas para o banho ultrassônico (Sonicor/SC-52) por 8 minutos para a liberação das bactérias aderidas ao biofilme.

Para cada concentração da substância testada foi removido o volume de três poços e reunidos em um microtubo estéril perfazendo um volume final de 600 µL. Em uma nova placa de 96 poços o volume foi redistribuído e realizado diluições seriadas na base 10. Em seguida, 10 µL da suspensão foram plaqueados em placa de petri e incubados sobre as mesmas condições citadas acima, durante 24 horas. O número de Unidades Formadoras de Colônias foi determinado e o valor foi expresso em Log UFC/mL.

### **3.5 Ensaio sobre biofilmes pré-formados**

Os ensaios foram também realizados em placas de 96 poços de poliestireno. As suspensões de células (200 µL de  $1 \times 10^6$  UFC/mL) foram adicionadas a cada poço e incubadas a 37° C durante 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi removido e um volume igual dos calcogenoésteres nas concentrações que variaram de 250 a 7,8 µg/mL foi adicionado aos poços, sendo que no controle de bactéria não tratada com estes compostos, foi adicionado 200 µL de meio de cultura. Após 24 horas, o meio foi retirado e cada poço foi lavado com água destilada estéril para remoção das células fracamente aderidas. Em seguida, os biofilmes foram avaliados quanto à formação de biomassa e número de células viáveis como descrito anteriormente.

### **3.6 Análise estatística**

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Os resultados foram categorizados no Microsoft Excel® (Versão 2010 para Windows) com posterior análise estatística no software GraphPad Prism® (Versão 5.0 para Windows). Para a análise de diferenças inter-grupos foi realizado análise de variância ANOVA com pós-teste Bonferroni e nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Efeito dos calcogenoésteres sobre o crescimento planctônico

Através da análise da CIM e da CBM o composto S501 apresentou valores de CIM para *S. aureus* e *S. epidermidis* a partir de 62,5 µg/mL. Ainda para estas duas cepas a CBM foi de 62,5 µg/mL e 125 µg/mL, respectivamente. O composto N1 apresentou valores de CIM a partir de 125 µg/mL e CBM com variações de 250 µg/mL e 125 µg/mL sobre as cepas de *Staphylococcus* spp.. Observou-se que o composto N2 apresentou atividade antimicrobiana apenas para *S. aureus* com CIM de 62,5 µg/mL e CBM de 125 µg/mL (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos calcogenoésteres sobre as cepas de *Staphylococcus* spp

Bactéria	S501		N1		N2	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	62,5	62,5	125	250	62,5	125
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	62,5	125	125	125	ND	ND

Fonte: Elaborada pelo autor. ND – Não determinado.

Foi descrito na literatura por Stevanovic *et al.* (2015) as propriedades antibacterianas de nanopartículas de selênio, que apresentaram CIM para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e para *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 de 125 e 250 µg/mL, respectivamente. No trabalho de El-Shamy *et al.* (2015) foi analisado 23 tipos de análogos de nucleosídeos contendo enxofre e selênio, apresentando valores de CIM variando entre 12,5 - 200 µg/mL para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans*.

Em um estudo realizado por Shaaban *et al.* (2014) apesar de não ter sido determinado valores de CIM e CBM, foi relatado toxicidade por uma série de organocalcogênios contra algumas cepas bacterianas, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium phlei*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, e *Klebsiella pneumoniae*; e ao fungo *Aspergillus niger*.

Fazendo uma relação entre os estudos mencionados e os resultados encontrados no presente trabalho, é reforçado o potencial promissor dos calcogenoésteres contendo selênio, no que diz respeito a propriedades antimicrobianas. Moléculas que exibem atividade bactericida sobre as células planctônicas, como foi observado em S501, N1 e no caso de N2 somente para *S. Aureus*, seriam capazes de impedir a adesão do microrganismo à superfície, dessa forma interferindo na formação do biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis*.

#### 4.2 Atividade antibiofilme

Em relação à formação de biofilme de *S. aureus* o composto S501 reduziu a formação de biomassa em todas as concentrações, com níveis de redução entre 29% e 90%. O composto N1 reduziu a biomassa a partir da concentração de 7,8 a 62,5 µg/mL com níveis de redução entre 12% e 43%. Já o N2 apresentou níveis de redução entre 9% e 60% observadas nas concentrações que variaram de 7,8 a 125 µg/mL (Figura 4A, B e C).

Para os três calcogenoésteres testados em *S. epidermidis* foi observado uma redução na formação de biomassa nas maiores concentrações (250 - 62,5 µg/mL) com níveis variando entre 63% - 96% para S501; 40% - 79% para N1 e 18% - 44% para N2, sendo que em N1 e N2 verificou-se uma maior redução na concentração de 125 µg/mL (Figura 5A, B e C). A redução de biomassa pode estar relacionada à diminuição das células planctônicas, já que foi observado atividade bacteriostática e bactericida dos três calcogenoésteres, no caso de *S. epidermidis* apenas S501 e N1.

Com relação a estudos envolvendo atividade antibiofilme, Shakibaie *et al.* (2015) demonstrou que nanopartículas de selênio em concentrações abaixo de 16 µg/mL reduziram o biofilme de isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* entre 34% a 55%.

Dentre os escassos estudos envolvendo selenoésteres, Spengler *et al.* (2019) relatou em seu trabalho uma inibição do biofilme de cerca de 70% sobre *Staphylococcus aureus* e cerca de 45% para *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Em um estudo realizado por Pinheiro (2017) foi demonstrado a atividade antibiofilme de dois selenoésteres C01 e C02 sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903.

Infecções nosocomiais e infecções em dispositivos médicos de longa permanência ocorrem principalmente em pacientes imunocomprometidos. *S. aureus* e *S. epidermidis* são patógenos oportunistas e reconhecidos por sua capacidade de produzir uma grande quantidade de biofilme. No ambiente hospitalar esses microrganismos estão relacionados a grande parte dessas infecções, apesar de serem encontrados como parte integrante da microbiota humana e em superfícies de mucosas (ARCHER et al., 2011; OTTO, 2008). De acordo com os estudos mencionados e os resultados obtidos, fica evidente que os compostos de selênio são fortes agentes antibiofilme.

### 4.3 Contagem do número de células viáveis

Na análise das células viáveis para *S. aureus* todos os três compostos testados mostraram uma considerável redução, com ênfase em S501 que na concentração de 250 µg/mL apresentou uma redução de 1,6 log<sub>10</sub> e na concentração de 15,6 µg/mL a redução foi de 1,7 log<sub>10</sub> quando comparado ao controle. Já o N1 apresentou uma redução em todas as concentrações, variando entre 0,57 a 0,76 log<sub>10</sub>. O composto N2 apresentou uma pequena redução em todas as concentrações, destacando-se que em 31,2 µg/mL a redução foi de 1,5 log<sub>10</sub> (Figura 4D, E e F).

*S. epidermidis* mostrou-se menos sensível aos calcogenoésteres testados, apenas S501 e N1 apresentaram uma redução significativa. Para S501 a redução na concentração de 15,6 µg/mL foi de 0,6 log<sub>10</sub>. Em N1 a redução na concentração de 62,5 µg/mL foi de 0,97 log<sub>10</sub> (Figura 5D, E e F).

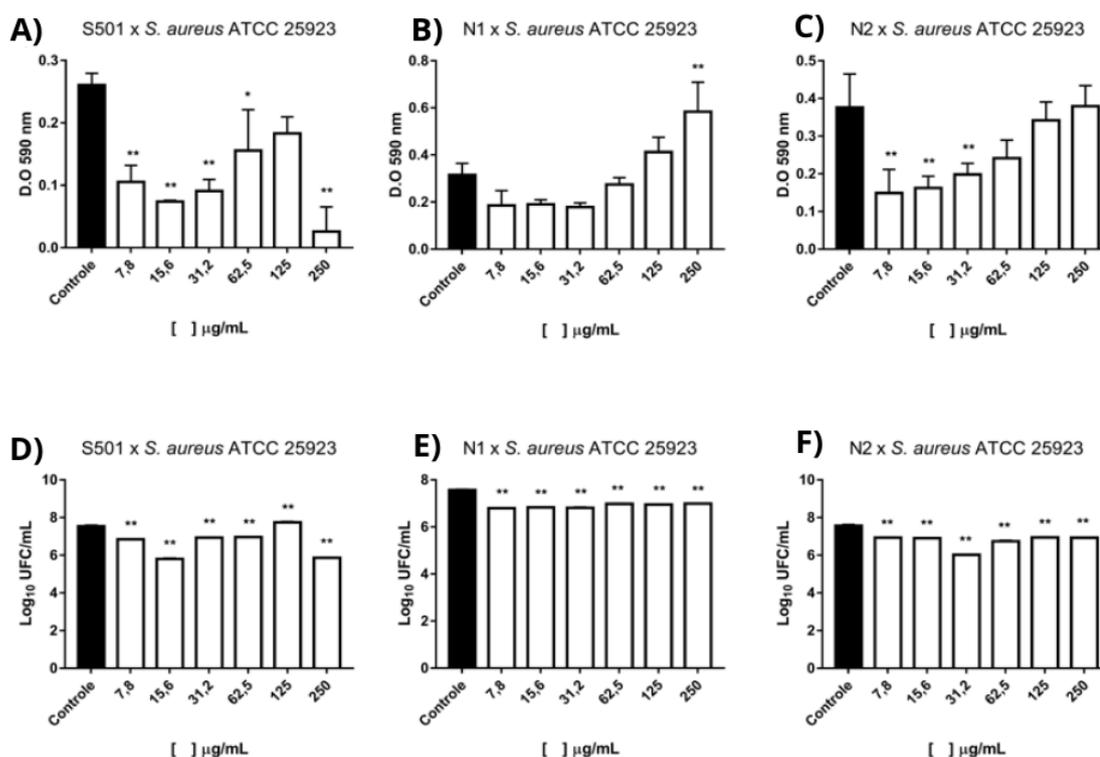
Shakibaie *et al.* (2015) descreve na literatura que nanopartículas de selênio reduzem ligeiramente a quantidade de células viáveis do biofilme de três isolados clínicos: *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis*, não apresentando toxicidade contra essas cepas. No estudo de Pinheiro (2017) os dois selenoésteres testados apresentaram redução no número de células viáveis para *S. mutans* e *S. parasanguinis*, com ênfase no composto C01 que na concentração de 250 µg/mL apresentou uma redução de 1,6 log<sub>10</sub>.

A diminuição de células viáveis pode estar relacionada com a atividade bactericida e bacteriostática, que impediram a adesão do microrganismo à superfície, dessa forma evitando

a formação de biofilme. Apesar da quantidade considerável de redução da biomassa, a redução no número de células viáveis foi menor, fato este que pode estar relacionado a proteção que a matriz do biofilme garante ao microrganismo. Não é descartada a possibilidade de associação dos calcogenoésteres a outros fármacos, com o intuito de analisar a atividade sinérgica de mecanismos de ação contra os microrganismos formadores de biofilme.

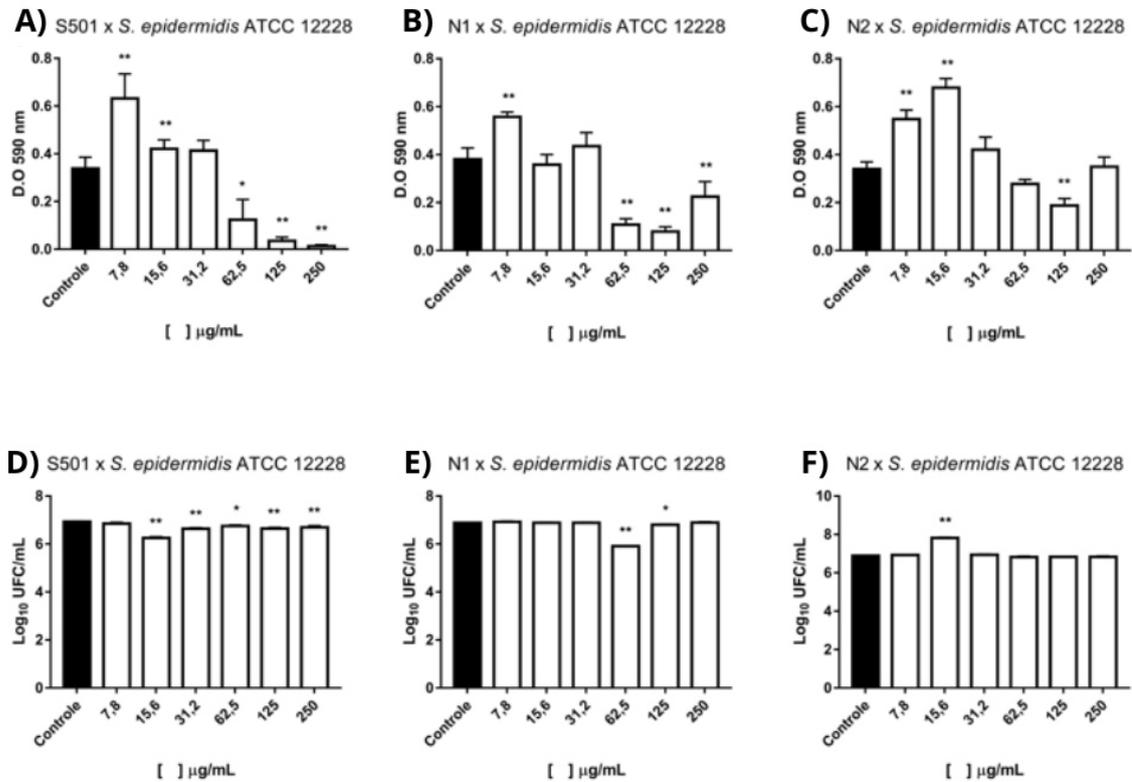
No estudo de Spengler *et al.* (2019) foi testado a combinação de alguns selenoésteres com ciprofloxacina (CIP) para *S. aureus* e com tetraciclina (TET) para *S. typhimurium*, que apesar de apresentarem atividade antagônica ou indiferente em algumas concentrações para os dois antibióticos, foi observada atividade sinérgica dependente da concentração dos agentes antibacterianos. O mesmo reforça que assim como as nanopartículas de selênio, os selenoésteres poderiam ser usados para revestir superfícies de dispositivos médicos, já que impedem a adesão do microrganismo à superfície, inibindo a formação de biofilme.

Figura 4 – Efeito dos calcogenoésteres S501, N1 e N2 sobre biofilmes de *S. aureus* ATCC 25923



**Fonte: Autor.** Quantificação da biomassa (A, B, C) e análise das células viáveis (D, E, F) de *S. aureus* ATCC 25923. Barras brancas representam bactérias tratadas com os calcogenoésteres, barras pretas representam bactérias sem tratamento. (\* =  $p < 0,05$  e \*\* =  $p < 0,01$  em comparação com o grupo de controle).

Figura 5 - Efeito dos calcogenoésteres S501, N1 e N2 sobre biofilmes de *S. epidermidis* ATCC 12228



**Fonte: Autor.** Quantificação da biomassa (A, B, C) e análise das células viáveis (D, E, F) de *S. epidermidis* ATCC 12228. Barras brancas representam bactérias tratadas com os calcogenoésteres, barras pretas representam bactérias sem tratamento. (\* =  $p < 0,05$  e \*\* =  $p < 0,01$  em comparação com o grupo de controle).

#### 4.4 Quantificação da biomassa de biofilmes pré-formados

Os resultados estão representados na Figura 6A, B, C e mostraram que todos os compostos foram efetivos na redução da biomassa para *S. aureus*. Destacando-se a atividade nas concentrações a partir de 31,2 a 125  $\mu\text{g/mL}$  que reduziram entre 36% - 69% para S501; 45% - 53% para o composto N1 e 33% - 77% para o N2.

Para *S. epidermidis* todos os compostos apresentaram uma redução nas maiores concentrações (250 - 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre os biofilmes pré-formados. No entanto, também foi observado uma pequena redução nas menores concentrações. Para S501 a redução variou entre 18% - 70%; 3% - 43% para o composto N1, sendo que na concentração de 15,6  $\mu\text{g/mL}$  foi observado um aumento na produção de biomassa, ultrapassando o controle de bactéria sem tratamento, fato que pode estar relacionado ao estresse causado pelo N1; O composto N2 apresentou uma redução variando entre 22% - 59% (Figura 7A, B e C).

#### 4.5 Contagem do número de células viáveis de biofilmes pré-formados

Em relação ao número de células viáveis dos biofilmes pré-formados para *S. aureus*, apenas N1 apresentou uma considerável redução, com ênfase que na concentração de 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$  apresentou uma redução de 1  $\log_{10}$  e 0,93  $\log_{10}$ , respectivamente (Figura 6D, E e F). Para *S. epidermidis*, apenas S501 apresentou na concentração de 15,6  $\mu\text{g/mL}$  uma redução do número de UFCs em 2,6  $\log_{10}$  quando comparado ao controle (Figura 7D, E e F).

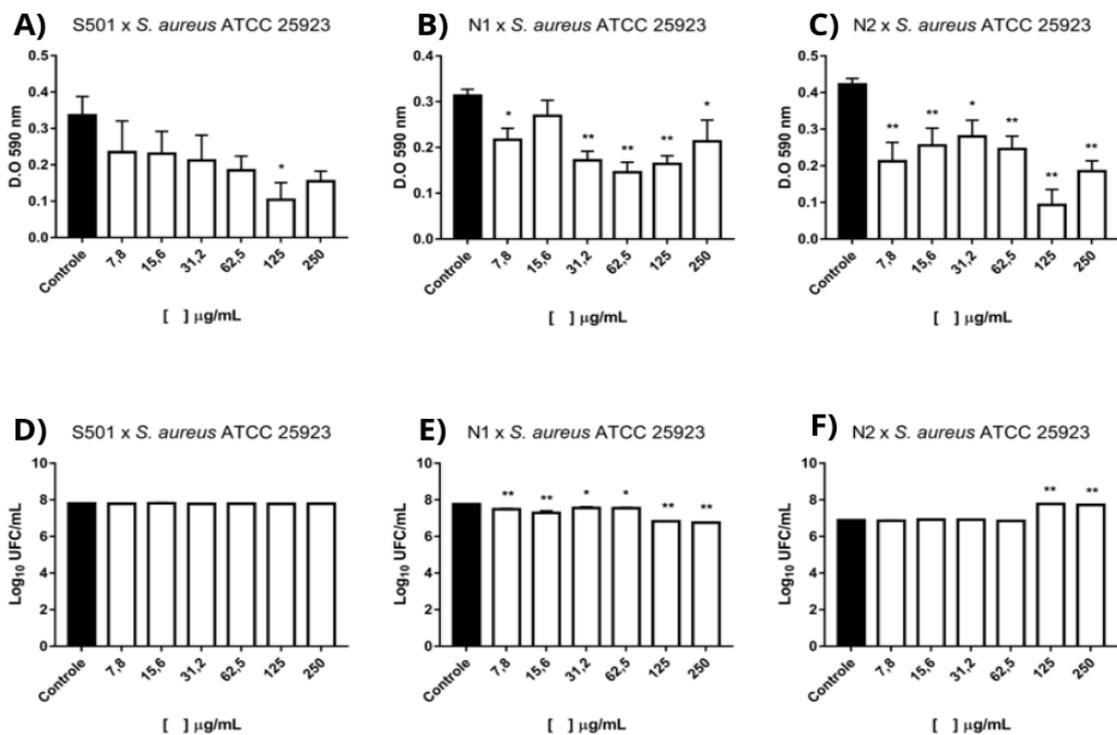
Em um trabalho de Sousa e colaboradores (2017) com estreptococos orais, foi demonstrado a atividade sobre biofilmes pré-formados, os selenoésteres S501 e S502 reduziram a biomassa de *S. parasanguinis* em 55% e 63%, respectivamente. Além disso, em relação ao número de células viáveis para *S. parasanguinis*, S502 reduziu cerca de 1,9  $\log_{10}$  na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$ . Foi observado uma melhor redução para *S. mutans* pelo tratamento com S501, S502 e S503 em concentrações mais baixas.

Em relação aos biofilmes pré-formados, os calcogenoésteres apresentaram uma menor redução quando comparados aos ensaios sobre células planctônicas. Tal resultado já era

esperado. Sabe-se que bactérias estão relacionadas a infecções crônicas e persistentes devido a sua capacidade de formar comunidades sésseis e produzir biofilme. Quando os microrganismos estão incorporados a um biofilme e aderem a esse estilo de vida sésbil, eles podem ser até 1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que bactérias planctônicas (ARCHER *et al.*, 2011; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; KARYGIANNI *et al.*, 2014). Em relação aos estudos mencionados, fica claro que compostos contendo selênio possuem atividade contra biofilmes pré-formados.

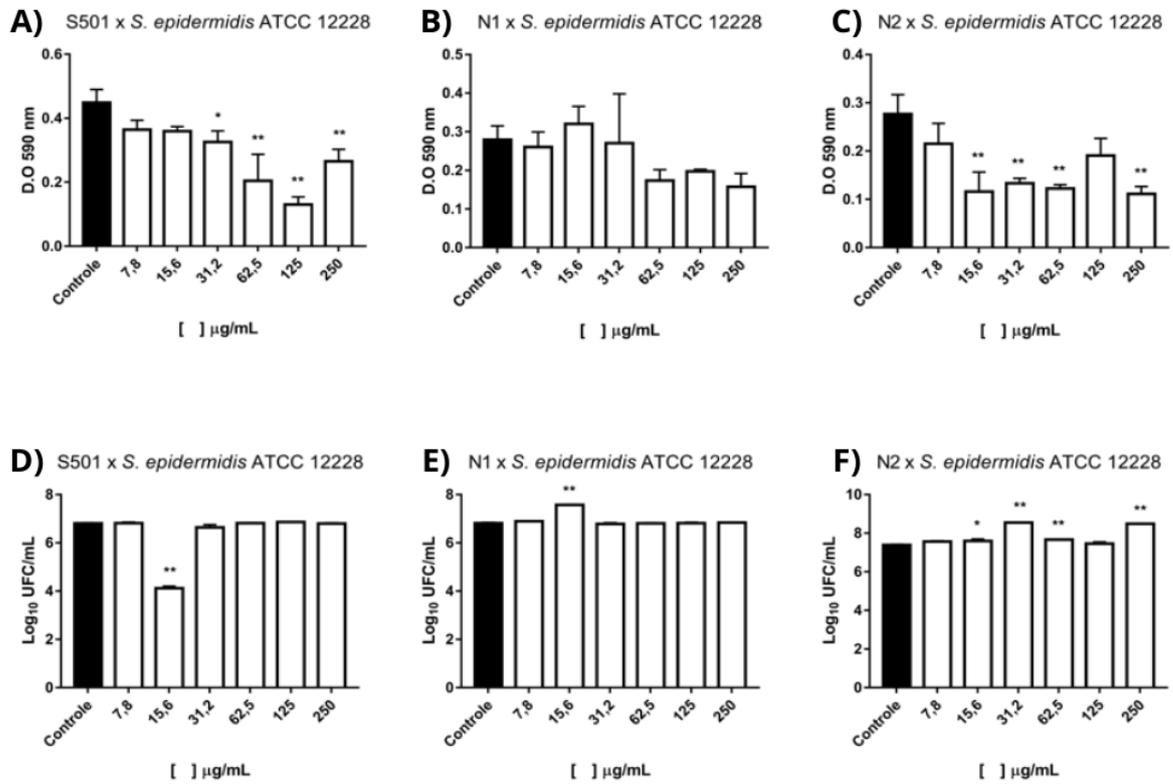
Apesar da estrutura dos calcogenoésteres S501 e N2 serem semelhantes, variando apenas em um grupo metil para S501, a ação antimicrobiana e antibiofilme foi diferente para ambos, sendo mais pronunciada em S501, podendo ter relação ao grupamento metil. São necessários estudos adicionais para elucidar o mecanismo de ação desses compostos sobre o biofilme já maduro.

Figura 6 - Efeito dos calcogenoésteres S501, N1 e N2 sobre biofilmes pré-formados de *S. aureus* ATCC 25923



**Fonte: Autor.** Quantificação da biomassa (A, B, C) e análise das células viáveis (D, E, F) de *S. aureus* ATCC 25923. Barras brancas representam bactérias tratadas com os calcogenoésteres, barras pretas representam bactérias sem tratamento. (\* =  $p < 0,05$  e \*\* =  $p < 0,01$  em comparação com o grupo de controle).

Figura 7 - Efeito dos calcogenóesteres S501, N1 e N2 sobre biofilmes pré-formados de *S. epidermidis* ATCC 12228



**Fonte: Autor.** Quantificação da biomassa (A, B, C) e análise das células viáveis (D, E, F) de *S. epidermidis* ATCC 12228. Barras brancas representam bactérias tratadas com os calcogenóesteres, barras pretas representam bactérias sem tratamento. (\* =  $p < 0,05$  e \*\* =  $p < 0,01$  em comparação com o grupo de controle).

## 5 CONCLUSÃO

Os calcogenoésteres S501, N1 e N2, apresentaram atividade antibacteriana e antibiofilme sobre as cepas de *Staphylococcus* spp.. Com destaque para o composto S501 que mostrou um efeito mais eficaz na redução do biofilme de *S. aureus*. *S. epidermidis* se mostrou mais sensível aos compostos nos ensaios de biofilmes pré-formados.

Dessa forma, os calcogenoésteres testados podem representar uma alternativa em potencial para a prevenção de biofilmes envolvendo *S. aureus* e *S. epidermidis*. No entanto, estudos complementares são necessários para esclarecer os mecanismos de ação dos compostos estudados neste trabalho. Sugere-se também, a realização de estudos que avaliem a toxicidade dos calcogenoésteres.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. L. **Atividade antibacteriana, antibiofilme e o efeito combinado a antibióticos de complexos de rutênio do tipo cis-[RuCl<sub>2</sub>(dppb)(NN-R)]<sup>2+</sup> sobre bactérias resistentes e o efeito destes combinados aos antibióticos ampicilina e tetraciclina.** 2018. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.
- ARCHER, N. K. *et al.* Staphylococcus aureus biofilms: Properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445–459, 2011.
- ÅRDAL, Christine *et al.* “Antibiotic development - economic, regulatory and societal challenges.” **Nature reviews. Microbiology** vol. 18,5: 267-274. 2020.
- BROUWER, S. *et al.* Streptococcus pyogenes adhesion and colonization. **Febs Letters**, [S.L.], v. 590, n. 21, p. 3739-3757, 1 jul. 2016.
- BUENO, D. C. **Toxicidade de organocalcogênios e seus mecanismos através da expressão gênica em leucócitos humanos.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas; Bioquímica Toxicológica, RS, 2015.
- CAMARA-LEIMBACH, A. **ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE CALCOGENOL ÉSTERES SOBRE STREPTOCOCCUS RELACIONADOS À INFECÇÕES.** 2015. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia de Recursos Naturais, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce, 2015.
- CHUNG, P. Y. The emerging problems of Klebsiella pneumoniae infections: carbapenem resistance and biofilm formation. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 363, n. 20, p. 219, 22 set. 2016.
- 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.
- DE SOUSA, L.S. *et al.* Antibacterial effect of chalcogenoesters on planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus parasanguinis* . **Med Chem Res** 26, 1609–1618, 2017.
- DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases.**, v. 9, n. 8, p. 881-890, 2002.
- EL-SHAMYA, 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, março 2015.
- FLOHE, L *et al.* Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. **FEBS letters** vol. 32,1. 132-4, 1973.

GOH, H. M. S. *et al.* Molecular Analysis of the *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated Protein. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 79, n. 21, p. 6535-6543, nov. 2013.

GOTTFRIED, J. History Repeating? Avoiding a Return to the Pre- Antibiotic Age (2005 Third Year Paper), **Harvard University's DASH** repository; 2005.

HANNAN, T. J. *et al.* Host–pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 616-648, maio 2012.

HUANG, M.-F. N. **Síntese de novos compostos organosselênicos com potencial atividade antimicrobiana e antitumoral**. 2016. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

KARYGIANNI, L. *et al.* Novel broad-spectrum antimicrobial photoinactivation of in situ oral biofilms using visible light plus water-filtered infrared-A (VIS + wIRA). **Applied Environmental Microbiology**, v. 80, p. 7324–7336, 2014.

LENARDÃO, E. J. *et al.* 6. Synthesis of organoselenium compounds using nonconventional reaction media. **Organoselenium Chemistry**, edited by Brindaban C. Ranu and Bubun Banerjee, Berlin, Boston: De Gruyter, pp. 193-276, 2020.

LYNCH, A. S.; ROBERTSON, G. T.. Bacterial and Fungal Biofilm Infections. **Annual Review Of Medicine**, [S.L.], v. 59, n. 1, p. 415-428, fev. 2008.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016

MARKS, L. R.; PARAMESWARAN, G. I.; HAKANSSON, A. P. Pneumococcal Interactions with Epithelial Cells Are Crucial for Optimal Biofilm Formation and Colonization In Vitro and In Vivo. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 80, n. 8, p. 2744-2760, 29 maio 2012.

MENOITA, E. *et al.* Biofilmes: conhecer a entidade. **Journal of aging and innovation**, Lisboa, v.1, n. 3, p. 23-32, abr. 2012

MONDS, R. D.; O'TOOLE, GA. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends Microbiol.**17(2),73–87, 2009.

MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biology**, v. 5, n. 11, p. 2458–2461, 2007.

MORETTO, M. B. **Efeito de compostos organocalcogênicos e derivados da guanina em modelos de dano cerebral em ratos**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pós-graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, Porto Alegre, 2005.

NIH: **National Institutes of Health** [Internet]. 2002. Available from: <http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html>.

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.

NOGUEIRA, C.W., BARBOSA, N.V.; ROCHA, J.B.T. Toxicology and pharmacology of synthetic organoselenium compounds: an update. *Arch Toxicol* 95, 1179–1226, 2021.

O'NEILL, J. **Review on Antimicrobial Resistance**. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations., v. 4, December, 2014.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Resistência antimicrobiana. [29 de out. de 2020]. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>> Acesso em: 15-08-2021.

O'TOOLE, G. *et al.* Biofilm formation as microbial development. *Annual review of microbiology*. vol. 54, 49-79, 2000.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 322, p. 207–228, 2008.

PAGANELLI, F. L. *et al.* Enterococcus faecium Biofilm Formation: identification of major autolysin atla efm, associated acm surface localization, and atla efm-independent extracellular dna release. *Mbio*, [S.L.], v. 4, n. 2, p. e00154-13, maio 2013.

PARRINO, B. *et al.* Synthetic small molecules as anti-biofilm agents in the struggle against antibiotic resistance, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018.

PERTELE, M. M. **SÍNTESE DE COMPOSTOS ORGANOCALCOGÊNIOS COM POTENCIAL APLICAÇÃO BIOLÓGICA OU COMO LIGANTES PARA COMPLEXOS DE Fe(II) E Mn(I) LIBERADORES DE CO**. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2019.

PINHEIRO, A. A. **Avaliação da atividade de calcogenoésteres em células planctônicas e biofilmes de estreptococosorais**. 47 f. 2017. TCC (Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

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.

RAMPON, D. S. **Novos Materiais Moleculares Funcionais Derivados de Calcogenoésteres e Calcogenofenos: Síntese e Caracterização**. Tese (Doutorado) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA, 2013.

SHAABAN, S. *et al.* Sulfur, selenium and tellurium pseudopeptides: Synthesis and biological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v.22, n.14, p.3610–3619, Julho 2014.

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, janeiro 2015.

SPENGLER, G. *et al.* Antiviral, Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Selenoesters and Selenoanhydrides. *Molecules (Basel, Switzerland)* vol. 24,23 4264. 22 Nov. 2019.

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.

STEVANOVIĆA, M. *et al.* 45S5Bioglass®-based scaffolds coated with selenium nanoparticles or with poly(lactide-co-glycolide)/selenium particles: Processing, evaluation and antibacterial activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** v. 132, n.1, p.208–215, Agosto 2015

TOLKER-NIELSEN T. Biofilm development. **Microbiol Spectr**3:MB-0001-2014, 2015.

TOLKER-NIELSEN, T. Pseudomonas aeruginosa biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. **Apmis**, [S.L.], v. 122, p. 1-51, 14 nov. 2014.

TRENTIN, D. S.; GIORDAN, R. B.; MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato.** v. 14, n. 22, p. 113-238,dez 2013.

VICTORIA, F. N. *et al.* Antioxidant properties of (R)-Se-aryl thiazolidine-4-carboselenoate. **Chem Biol Interact.** 2013 Sep 25;205(2):100-7, 2013.

WHO. 2020 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. Geneva: **World Health Organization**; 2021.

WHO. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. **World Health Organization**; 2017. Disponível em: < <https://apps.who.int/iris/handle/10665/311820>>. Acesso em: 11-08-2021.