

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Curso de Graduação em Biomedicina

Alessandra Akemi Cury Satokata

**HIDROXICHALCONAS COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO E
ANTIBIOFILME FRENTE A BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS**

UBERLÂNDIA

2021

Alessandra Akemi Cury Satokata

**HIDROXICHALCONAS COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO E
ANTIBIOFILME FRENTE A BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique
Gomes Martins

UBERLÂNDIA

2021

Alessandra Akemi Cury Satokata

**HIDROXICHALCONAS COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO E
ANTIBIOFILME FRENTE A BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique
Gomes Martins

Banca examinadora

Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins
Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, MG

Prof^ª. Dra. Sabrina Royer
Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, MG

Dra. Ralciane de Paula Menezes
Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, MG

Uberlândia, 10 de junho de 2021

SUMÁRIO

ARTIGO 1

MATERIAL SUPLEMENTAR 25

 Documento S1 – estatística *P. nigrescens* 26

 Documento S2 – estatística *P. anaerobius* 30

 Documento S3 – estatística *P. oralis* 34

 Documento S4 – estatística *A. viscosus* 38

 Documento S5 – estatística *P. asaccharolytica* 42

 Documento S6 – estatística *F. nucleatum* 46

**HIDROXICHALCONAS COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO E
ANTIBIOFILME FRENTE A BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS**

**Alessandra Akemi Cury Satokata^a, Jonathan Henrique de Souza^a, Luana Luiza
Oliveira Silva^a, Mariana Brentini Santiago^a, Salvador Boccaletti Ramos^b, Leticia
Ribeiro de Assis^c, Reinaldo dos Santos Theodoro^c, Lígia Rodrigues e Oliveira^c,
Luis Octávio Regasini ^c, Carlos Henrique Gomes Martins^a**

^a Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEA), Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

^b Programa de Pós-graduação em Promoção em Saúde, Universidade de Franca, Franca,
SP, Brasil.

^c Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ), Departamento de Química e
Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

*Autor correspondente: Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEA), Instituto de
Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720, Bloco 2B
Sala 221 Uberlândia, MG, 33 38405-320, Brasil.

Endereço de e-mail: carlos.martins2@ufu.br (C.H.G. Martins).

Resumo

Objetivo: A periodontite é uma patologia resultante de uma complexa interação entre os microrganismos presentes na formação do biofilme e a resposta imune do hospedeiro. O aumento no uso de antibióticos, associado ao seu uso inadequado tem resultado em um crescimento consistente da resistência em bactérias anaeróbias. Diante deste cenário, torna-se urgente a identificação de novas substâncias naturais com potencial antimicrobiano como tem se demonstrado nas chalconas. O presente estudo avaliou a atividade antibacteriana de 15 hidroxichalconas frente às bactérias periodontopatogênicas bem como sua atividade antibiofilme. **Métodos:** Para tal, os compostos foram avaliados através dos testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB). **Resultados:** As amostras T3, Li-6, Li-9, Li-40, Li-42 e LR-72 demonstraram boa atividade antibacteriana e antibiofilme para a maioria das bactérias avaliadas, com CIM menor ou igual a 6,25 µg/mL, redução de mais de 95% da biomassa do biofilme e inibição total da viabilidade celular entre 0,78 e 100 µg/mL. Entre as chalconas, a Li-6 destacou-se por se mostrar efetiva sobre todas as bactérias, tanto nos testes de CIM como na atividade antibiofilme. **Conclusão:** Com isso, consolidamos uma base para o desenvolvimento de novos estudos acerca dos efeitos destas moléculas como agentes no combate e prevenção da periodontite.

Palavras-chave: Chalcona; Bactéria anaeróbia; Periodontite; Atividade antibacteriana; Atividade antibiofilme.

Abstract

Objectives: Periodontitis is a pathology resulting from complex interaction between the microorganisms present in the biofilm and the host's immune response. Increased use of antibiotics, associated with their inappropriate use has increased the resistance of anaerobic bacteria. Therefore, identifying new antimicrobial substances, such as chalcones, is urgent. This study evaluates the antibacterial activity and the antibiofilm activity of 15 hydroxychalcones against periodontopathogenic bacteria.

Methods: The compounds were evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum inhibitory concentration of biofilm (MICB) tests. **Results:** Samples T3, Li-6, Li-9, Li-40, Li-42, and LR-72 showed good antibacterial and antibiofilm activity for most of the evaluated bacteria: MIC was lower than or equal to 6.25 µg/mL, biofilm biomass was reduced by 95%, and cell viability was totally inhibited for sample concentrations between 0.78 and 100 µg/mL. Among the tested chalcones, Li-6 stood out: it was effective on all bacteria, as revealed by both MIC and MICB results. **Conclusions:** Our results have consolidated a base for the development of new studies on the effects of the tested molecules as agents to combat and to prevent periodontitis.

Keywords: Chalcone; Anaerobic bacteria; Periodontitis; Antibacterial activity; Antibiofilm activity.

1. Introdução

A microbiota bucal representa uma parcela importante da microbiota humana, contendo de centenas a milhares de espécies bacterianas [1]. Na superfície dos dentes é comum que ocorra a formação de biofilmes microbianos e algumas das bactérias presentes nestas estruturas podem ser causadoras de complicações odontológicas, como cáries, problemas endodônticos e periodontais [1].

Dentre as patologias bucais, a periodontite afeta o ligamento periodontal e o osso alveolar. É resultante de uma complexa interação entre os microrganismos presentes na formação do biofilme, como *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella nigrescens*, e a resposta imune do hospedeiro [2, 3]. Diversas bactérias são capazes de colonizar a área periodontal e produzir fatores de virulência, como enzimas e toxinas, que auxiliam na evasão do sistema imune e permitem o desenvolvimento da periodontite [4].

As infecções periodontais, na maior parte dos casos, costumam ser tratadas com desbridamento mecânico do biofilme, uso de enxaguatórios antissépticos e abordagem cirúrgica. Em outros casos, pode ser necessária a associação de um antibiótico sistêmico, como amoxicilina, amoxicilina mais clavulanato, metronidazol e azitromicina [3]. O aumento no uso de antibióticos associado ao uso inadequado tem resultado em um crescimento consistente, nas últimas três décadas, da resistência em bactérias anaeróbias [5]. Dentre os antibacterianos tópicos ainda observa-se uma grande carência, visto que muitos produtos são de difícil manuseio, rápida remoção da bolsa periodontal e custo elevado [6].

Diante deste cenário, torna-se urgente a identificação de novas substâncias com potencial antimicrobiano [7]. Para este fim o estudo de produtos naturais é amplamente realizado e, quando associado a elementos químicos sintéticos e biológicos, podem gerar novas moléculas farmacologicamente eficazes [8]. Dentre os compostos estudados, as chalconas naturais e sintéticas tem se mostrado promissoras como agentes antibacterianos, sendo a hibridização de moléculas e o teste de combinações uma tendência no estudo destas substâncias [9].

As chalconas correspondem a uma família de moléculas composta por cetonas α - β -insaturadas que são capazes de exercer inúmeras atividades como antimalárica [10], antileishmania [11], anticâncer [12], antiviral [13] e antibacteriana [14]. Diversos estudos vêm demonstrando o potencial antimicrobiano de chalconas [15, 16], dentre eles

Koudokpon, et al. [17] identificaram dez chalconas e dihidrochalconas presentes nos extratos de *Uvaria chamae* e confirmaram sua ação antimicrobiana.

Outro estudo identificou ainda a capacidade de algumas chalconas sintéticas inibirem fatores de virulência e formação de biofilme em bactérias multirresistentes, além de apresentarem efeito sinérgico quando associadas a antimicrobianos comerciais [18]. Chalconas catiônicas também foram relatadas como potencial terapêutico, tendo em vista a boa atividade antimicrobiana associada a uma citotoxicidade insignificante [19]. Em uma comparação da atividade antibiofilme entre chalconas hidroxiladas e uma similar sem o grupo hidroxila, Kunthalert, et al. [20] identificaram que a presença do oxigênio possui um papel essencial na ação da molécula.

Fundamentado nas informações apresentadas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de hidroxichalconas frente às bactérias periodontopatogênicas no modo planctônico e sésil.

2. Material e métodos

2.1 Síntese das hidroxichalconas

As chalconas foram obtidas por meio da reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt seguindo os protocolos reportados anteriormente com pequenas modificações [21]. À uma solução etanólica (10 mL) contendo 3-hidroxiacetofenona (1 mmol) sob agitação e banho de gelo, foi adicionado gota a gota uma solução aquosa de NaOH à 60% (2 mL). Em seguida, os respectivos derivados benzaldeídicos (1,2 mmol) foram adicionados solubilizados em 5 mL de etanol. A mistura reacional foi mantida sob agitação em temperatura ambiente até ser observado a conversão completa dos reagentes em produtos, acompanhada por cromatografia em camada delgada. O meio reacional foi vertido em gelo triturado e acidificado até pH 2 com solução de HCl (1 mol/L), ou neutralizado para as piridinilchalconas Li-45 e Li-46. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada, seco à temperatura ambiente e recristalizado em uma mistura de hexano e etanol (4:1) à quente, fornecendo as seguintes hidroxichalconas: 1- (3- hidroxifenil)- 3- fenil- 2- propen- 1- ona (**T3**), 3- (4- clorofenil)- 1- (3- hidroxifenil)-2-propen-1-ona (**Li-6**), 1-(3-hidroxifenil)-3-(4-metilfenil)-2-propen-1-ona (**Li-7**), 1-(3-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona (**Li-8**), 3-(3,4-diclorofenil)-1-(3-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (**Li-9**), 3-(2-furanyl)-1-(3-hidroxifenil)-

2-propen-1-ona (**Li-15**), 1-(3-hidroxifenil)-3-(2-tiofenil)- 2-propen-1-ona (**Li-16**), 1-(3-hidroxifenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona (**Li-21**), 3-(3-clorofenil)-1-(3-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (**Li-40**), 3-(2,4-diclorofenil)-1-(3-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (**Li-42**), 1-(3-hidroxifenil)-3-(3-piridinil)-2-propen-1-ona (**Li-45**), 1-(3-hidroxifenil)-3-(4-piridinil)- 2-propen-1-ona (**Li-46**), 1-(3-hidroxifenil)-3-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (**Li-58**), e 3-(4-bromofenil)-1-(3-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (**LR-72**) (Figura 1).

As estruturas das chalconas foram confirmadas por meio da análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e de Carbono treze (RMN de ^{13}C), obtidos em espectrômetro Bruker Avance III operando a 600 MHz e 150 MHz, respectivamente.

2.2 Atividade antibacteriana

2.2.1 Bactérias avaliadas

Foram utilizadas bactérias provenientes da American Type Culture Collection (ATCC) mantidos na coleção de cultura do Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEA), do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob criopreservação a -20°C . Os testes foram realizados com as bactérias *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563), *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337), *P. oralis* (ATCC 33269), *Actinomyces viscosus* (ATCC 43146), *Porphyromonas asaccharolytica* (ATCC 25260) e *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586). Para o controle da técnica foram utilizadas *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) e *Bacterioides thetaiotaomicron* (ATCC 29741).

2.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Foi utilizado o método de determinação da CIM por microdiluição em microplaca preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007) [22] com adaptações para a interpretação dos resultados. Os testes foram realizados em triplicata. A amostra foi solubilizada em dimetilsulfóxido - DMSO (Merck, Darmstadt, HE, Alemanha) e caldo Schaedler (Difco Labs, Detroit, MI, USA) suplementado com hemina 5 mg/mL (Sigma, St. Louis, MO, USA) e menadiona 1 mg/mL (Sigma). Em uma microplaca estéril de 96 poços (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadinger,

Schaffhausen, Suíça) foi depositado um total de 200 µL de caldo Schaedler (Difco), amostra teste e suspensão bacteriana contendo 2×10^6 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), de forma a se obter uma concentração das amostras de 0,195 a 400 µg/mL. A concentração final de DMSO (Merck) não foi superior a 5%.

Foram realizados o controle de crescimento bacteriano e o controle de esterilidade do caldo, das amostras e do DMSO (Merck), além do controle da técnica com metronidazol (Sigma) em concentrações de 0,0115 a 5,9 µg/mL. A placa foi incubada a 36°C em câmara de anaerobiose (10% CO₂, 5- 10% de H₂ e 85% de N₂, Don Whitley Scientific, West Yorkshire, Inglaterra) durante 72 horas. Para revelação do crescimento bacteriano foi utilizado 30 µL de uma solução aquosa de resazurina (Sigma) a 0,02%. As placas foram reincubadas durante 30 minutos, e analisadas de acordo com as variações de cor entre azul (sem crescimento bacteriano) e rosa (com crescimento bacteriano). A menor concentração de amostra cujo poço permaneceu azul foi considerada a CIM.

2.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB)

A determinação da CIMB foi similar ao realizado para as células planctônicas (CLSI, 2007) [22], sendo realizada com as bactérias que apresentaram os melhores resultados da CIM. Em uma microplaca esterilizada de 96 poços (TPP) foi colocado 200 µL de caldo Schaedler (Difco), hidroxichalcona teste e suspensão bacteriana em concentração e tempo definidos na padronização da formação do biofilme (dados não apresentados), obtendo amostras de 0,195 a 400 µg/mL. Também foi realizado na CIMB o uso de metronidazol (Sigma) em concentrações de 0,0115 a 5,9 µg/mL frente as mesmas bactérias avaliadas. Após o período de incubação de 120 horas (formação do biofilme), o meio foi aspirado, removendo as células não aderidas. O biofilme foi fixado com metanol, corado com solução de cristal violeta (Sigma) a 0,2 % (wt/vol) e a formação do biofilme foi mensurada através da adição de 200 µL de ácido acético a 33,3% nos poços corados. A leitura foi realizada a 595 nm utilizando um leitor de microplacas Epoch™ (BioTek, Winooski, VT, USA) e a porcentagem de biofilme formado foi calculada através da equação utilizada por Shen, et al. [23]:

$$\text{Porcentagem de biofilme (\%)} = \frac{OD_t - OD_b}{OD_c - OD_b} \times 100$$

196

197 ODT = densidade óptica do tratado com a amostra teste

198 ODb = densidade óptica do branco (controle de caldo)

199 ODc = densidade óptica do controle (crescimento bacteriano)

200

201 Para avaliação da viabilidade celular do biofilme foi realizada a contagem de
202 microrganismos. Após o período de incubação (120 horas) foi realizada cuidadosamente
203 a aspiração do sobrenadante de todos os poços. Em seguida, 200 µL de caldo Schaedler
204 (Difco) suplementado foram adicionados em cada poço e a placa submetida a um banho
205 de ultrassom (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil) durante 30 minutos na frequência de 38
206 Kiloherz (kHz) para o completo desprendimento do biofilme. Os poços foram
207 homogeneizados e foram realizadas diluições seriadas de 10^0 a 10^{-7} . Em seguida, 50 µL
208 de cada poço, correspondente a cada diluição, foram transferidos para uma única placa de
209 agar sangue suplementada com hemina 5 µg/mL (Sigma) e menadiona 1 µg/mL (Sigma)
210 fracionada em 8 partes [24] e incubada em câmara de anaerobiose a 37°C por 72 horas.
211 Após a contagem das placas, os resultados formam expressos em Log₁₀ UFC/mL.

212

213 2.3 Análise estatística

214 Para a análise estatística da atividade antibiofilme foi utilizado o teste não-paramétrico
215 Kruskal-Wallis e a análise dois a dois foi realizada através da comparação Dwass-Steel-
216 Critchlow-Fligner pairwise. Todos os testes foram realizados com um intervalo de
217 confiança de 95%, através do software The jamovi Project (versão 1.6) e R Core Team
218 (versão 4.0), considerando significativo $p < 0,05$.

219

220 3. Resultados

221 3.1 Preparo das Hidroxichalconas

222 A condensação aldólica de Claisen-Schmidt entre 3-hidroxiacetofenona e
223 derivados benzaldeídicos forneceu 15 hidroxichalconas com rendimentos satisfatórios de

60 a 98% após purificação por recristalização (Figura 2). Estruturalmente, os análogos chalcônicos sintetizados possuem um anel fenólico com hidroxila na posição 3' (Anel A) e um anel benzênico (Anel B) substituído por 4-Cl (**Li-6**), 3,4-diCl (**Li-9**), 3-Cl (**Li-40**), 2,4-diCl (**Li-42**), 4-Br (**LR-72**), 4-CH₃ (**Li-7**), 4-OCH₃ (**Li-8**), e 4-NO₂ (**Li-58**). Foram sintetizados também análogos de 3'-hidroxichalcona com o anel B benzênico permutado por 2-furanila (**Li-15**), 2-tiofenila (**Li-16**), piridinilas (**Li-45** e **Li-46**) e naftilas (**Li-21** e **Li-22**). As estruturas das hidroxichalconas foram confirmadas por espectros de RMN de ¹H e de ¹³C, as quais foram ilustradas na Figura 1.

3.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

Do total de 15 amostras de chalcona avaliadas, os melhores resultados foram para T3, Li-6, Li-9, Li-40, Li-42, Li-58 e LR-72, com CIM iguais ou menores a 6,25 µg/mL na maioria das bactérias testadas e não foi encontrado para nenhuma bactéria ensaiada valores de CIM acima de 25 µg/mL. Os resultados estão demonstrados na Tabela 1.

As amostras Li-15, Li-16, Li-21, Li-22 e Li-46 resultaram em valores de CIM iguais ou maiores que 12,5 µg/mL para todas as bactérias avaliadas. Li-16 não foi capaz de inibir o crescimento de *P. anaerobius* (ATCC 27337) em qualquer concentração testada, enquanto Li-22 obteve o mesmo comportamento para 5 das 6 bactérias testadas. Li-7 obteve CIM de 6,25 µg/mL para três das seis bactérias e Li-8 demonstrou o mesmo valor apenas para *P. anaerobius* (ATCC 27337), obtendo CIM igual ou maior que 12,5 µg/mL para as demais bactérias. A amostra Li-45 obteve um bom resultado do MIC para *P. anaerobius* (ATCC 27337), mas valores superiores para todas as outras bactérias (Tabela 1).

O controle da técnica realizado com a ação do metronidazol sobre *B. fragilis* (ATCC 25285) e *B. thetaiotaomicron* (ATCC 29741) resultou em CIM de 0,7375 µg/mL para ambas as bactérias (Tabela 1).

3.3 Concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB)

Para este ensaio os testes estatísticos foram aplicados na comparação entre as médias ($\bar{x}$) dos resultados de cada amostra sobre a bactéria analisada e entre as médias ($\bar{x}$) dos resultados em cada concentração para o mesmo microrganismo ($p < 0,05$). Os resultados completos da análise estatísticas encontram-se nos materiais suplementares (Documentos S1-S6).

As amostras T3, Li-6, Li-9, Li-40, Li-42 e LR-72 demonstraram bom potencial antibiofilme. Dentre elas, Li-6 se destacou por apresentar resultados promissores nas duas metodologias empregadas para análise da atividade antibiofilme nas seis bactérias avaliadas no presente estudo. Por outro lado, Li-58 obteve desempenho inferior as demais amostras em alguns dos ensaios realizados (Figura 3 e 4).

Nos testes realizados com *P. nigrescens* (ATCC 33563), Li-9 apresentou diferença significativa em relação a três outras amostras (Li-6, Li-40 e Li-42) (Documento S1). Através das concentrações, Li-9 inibiu mais de 99% do biofilme com 1,56 $\mu\text{g/mL}$, enquanto as demais exigiram de 3,12 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$ para inibir mais de 95% do biofilme (Figura 3). Na viabilidade celular, Li-9 foi capaz de eliminar *P. nigrescens* (ATCC 33563) a partir de 3,12 $\mu\text{g/mL}$ ao passo que as demais amostras tiveram o mesmo efeito entre 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4).

Para *P. anaerobius* (ATCC 27337) a chalcona T3 ($\bar{x} = 45,6 \pm 57,2$) apresentou uma inibição estatisticamente diferente das demais amostras, com exceção de Li-42 ($\bar{x} = 74,0 \pm 28,8$) (Documento S2). Todas foram capazes de inibir mais de 97% da formação do biofilme, porém Li-42 exigiu a concentração mais elevada (12,5 $\mu\text{g/mL}$), seguida por T3 (6,25 $\mu\text{g/mL}$). Li-9 necessitou a menor concentração (0,78 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 3). Na contagem de UFC/mL foram necessárias concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ de Li-40 e Li-58 para reduzir 100% da contagem, ao passo que as demais apresentaram o mesmo desempenho com até 6,25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4).

Com *P. oralis* (ATCC 33269) Li-58 exigiu a maior concentração para exercer efeito, tanto na porcentagem de inibição (96,5% na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$) como na viabilidade celular, com ausência de crescimento na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3 e 4; Documento S3).

Nos testes com *A. viscosus* (ATCC 43146) nenhuma das chalcona reduziu mais de 95% da formação em concentração menor que 25 µg/mL, sendo Li-58 incapaz de inibir em qualquer concentração avaliadas (Figura 3). Li-9 apresentou diferença significativa ($p<0,05$) em relação as demais amostras na contagem de UFC/mL, sendo incapaz de impedir o crescimento bacteriano em qualquer concentração testada, bem como LR-72 (Documento S4). As demais amostras exerceram efeito entre 12,5 e 100 µg/mL (Figura 4).

Nos ensaios com *P. asaccharolytica* (ATCC 25260) Li-6 ($\bar{x} = 80,5 \pm 31,9$) apresentou diferença estatística em relação a Li-9 ($\bar{x} = 44,1 \pm 54,6$) (Documento S5). A diferença se confirmou através das concentrações, em que Li-9 inibiu 98,3% com 25 µg/mL enquanto as demais amostras inibiram mais de 95% entre 3,12 µg/mL e 6,25 µg/mL (Figura 3). Na contagem de microrganismos, todas as chalconas impediram o crescimento bacteriano entre 1,56 e 6,25 µg/mL (Figura 4).

As amostras T3 e Li-58 apresentaram diferença ($p<0,05$) em relação as demais amostras testadas com *F. nucleatum* (ATCC 25586), Li-58 inibiu 98,3% apenas com 400 µg/mL, ao passo que T3 inibiu 100% com 6,25 µg/mL (Documento S6). As demais amostras inibiram mais de 98% entre 1,56 µg/mL e 3,12 µg/mL (Figura 3). Os testes de viabilidade celular apontaram uma média estatisticamente maior na contagem de Li-58, inibindo o crescimento bacteriano apenas com 400 µg/mL enquanto as demais apresentaram o mesmo efeito com 6,25 µg/mL (Figura 4; Documento S6).

4. Discussão

Segundo os dados obtidos por Boyanova, et al. [25], a resistência a múltiplos fármacos é bastante imprevisível dentro do grupo das bactérias anaeróbias, sendo a busca de novos antimicrobianos considerada uma esperança no tratamento contra estes microrganismos. De acordo com o levantamento realizado por Singh, et al. [26] as chalconas tem se destacado em diversos estudos por seu efeito antimicrobiano e, por isso, devem ter seu potencial mais explorado. Após uma revisão da literatura, não foram encontrados estudos que avaliassem a atividade antibacteriana e antibiofilme das chalconas presentes neste trabalho frente as bactérias periodontopatogênicas avaliadas, o que ensejou o presente estudo.

A determinação da concentração inibitória mínima através do método de microdiluição em caldo foi considerada por Alves, et al. [27] a melhor opção para avaliar a atividade antibacteriana. Os resultados da CIM obtidos nessa pesquisa vão de acordo com os resultados encontrados na literatura a respeito de ensaios com outras chalconas, obtendo valores semelhantes [28] ou inferiores [18, 29].

As amidas chalconas mais ativas dentre as avaliadas por El-Messery, et al. [28] apresentaram CIM entre 2,0 e 10,0 µg/mL ao serem testadas com diversas bactérias (*Staphylococcus aureus* IFO 3060, *Bacillus subtilis* IFO 3007, *Micrococcus luteus* IFO 3232, *Escherichia coli* IFO 3301 e *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3448). Ao analisarmos as 15 amostras e as seis bactérias utilizadas no presente estudo, obtivemos 90 resultados de CIM. Deste total, 29 resultaram em CIM similar ao observado pelos autores e 11 obtiveram valores inferiores a 2,0 µg/mL.

Cinquenta e quatro resultados apresentaram concentrações inferiores ao obtido por Shaik, et al. [29], que identificaram duas isobutilchalconas com atividade antibacteriana (*B. subtilis* NCIM-2079 e *S. aureus* NCIM-206) em concentração de 16 µg/mL. Este número foi ainda maior ao comparar com os dados de Usjak, et al. [18], em que observou-se atividade antibacteriana (*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 e *P. aeruginosa* ATCC 9027) na faixa de 100 e 175 µg/mL com o uso de quatro novas chalconas (*p*-CF₃, 2,6-diOCH₃, *o*-OCH₃ e *p*-F-*o*-CH₃).

De maneira geral, substituições no anel B fenílico dos análogos chalcônicos por cloro (Li-6, Li-9, Li-40, e Li-42) ou bromo (LR-72) mantiveram ou potencializaram a atividade antibacteriana de 2 a 4x quando comparada a chalcona T3 (anel B fenílico não substituído) contra a maioria das bactérias avaliadas (Tabela 1). A substituição por *p*-NO₂ no anel B (Li-58) levou a um incremento da atividade antibacteriana de 2 a 8x apenas contra *A. viscosus* (ATCC 43146) e *P. anaerobius* (ATCC 27337), respectivamente. Enquanto substituições por 4-CH₃ (Li-7), 4-OCH₃ (Li-8), assim como a permuta do anel B fenílico por 2-furanila (Li-15), 2-tiofenila (Li-16), 3-piridinila (Li-45), 4-piridinila (Li-46), 1-naftila (Li-21), e 2-naftila (Li-22) foram desfavoráveis à atividade antibacteriana, uma vez que levou à obtenção de valores CIM superiores ao da T3, com exceção da Li-45, a qual potencializou a atividade antibacteriana em 16× contra *P. anaerobius* (ATCC 27337).

A partir dos resultados de El-Messery, et al. [28] e as afirmativas de Gibbons [30], foram considerados em nosso estudo resultados de CIM de até 10,0 µg/mL como promissores para interesse farmacológico. As amostras T3, Li-6, Li-9, Li-40, Li-42, Li-58 e LR-72 apresentaram resultados de CIM dentro da faixa adotada para mais da metade dos microrganismos testados, sendo consideradas as hidroxichalconas mais promissoras. Em decorrência disto, as amostras supracitadas foram selecionadas para a realização dos testes de atividade antibiofilme com os microrganismos sobre os quais demonstraram a eficácia desejada. Portanto, a avaliação da capacidade de inibição do biofilme foi realizada entre as sete amostras com uma CIM igual ou inferior a 6,25 µg/mL.

Sendo o controle do biofilme bucal identificado como um importante fator na prevenção da periodontite [31], é fundamental analisar a atividade dos compostos sobre esta estrutura. Neste estudo foi analisada a capacidade de inibição da formação do biofilme através da quantificação da biomassa formada (cristal violeta) e também a viabilidade celular pela contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). A utilização de cristal violeta é uma das técnicas mais antigas empregadas para este fim, mas uma grande limitação é a incapacidade de distinção entre células vivas e mortas. Para superar este obstáculo, a associação da contagem em UFC/mL é empregada por diversos trabalhos, sendo esta a mais utilizada para a determinação da viabilidade celular [32, 33].

Nassima e Riadh [34], que avaliaram a porcentagem de inibição do biofilme na presença de alguns compostos fenólicos, consideraram forte potencial antiagregante para inibição de 88,64% e inibição apreciável em torno de 58,18% a 63,68%. Os autores demonstraram que nenhum dos compostos foi capaz de inibir 100% da formação do biofilme. Baseado nisso, é possível afirmar que os resultados obtidos no presente estudo foram bastante promissores, pois todas as chalconas foram capazes de inibir mais de 95% da formação do biofilme nas concentrações testadas para todas as bactérias, com exceção da Li-58 que não obteve tal desempenho frente *A. viscosus* (ATCC 43146).

Dentre os trabalhos que avaliaram a atividade antibiofilme de chalconas, encontramos grande variação entre as porcentagens de inibição. Dentre as chalconas avaliadas por Tutar, et al. [35] (1,3-bis-chalcones) foram observadas inibições entre 2,7% e 97,5% para as bactérias avaliadas (*B. subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus pyogenes* ATCC19615, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *Shigella boydii* ATCC 9905). Pimenta, et al.

[36] também indicaram extensa variação, sendo 87% a maior inibição observada entre os testes de (E)-chalconas com *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 35547, *Streptococcus mutans* ATCC25175 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. A partir disso, podemos afirmar que os resultados do presente estudo se mostraram similares ou até mais promissores em relação a essas chalconas já avaliadas.

As amostras testadas também obtiveram resultados promissores na redução da contagem de UFC/mL para a maioria das bactérias. Li-58 se diferenciou das demais, sendo incapaz de reduzir a viabilidade de *A. viscosus* (ATCC 43146) e exigindo concentrações mais elevadas para a erradicação de *P. oralis* (ATCC 33269) e *F. nucleatum* (ATCC 25586). Em nosso estudo, os resultados de CIMB corroboraram com os de Rukayadi, et al. [37] em relação as concentrações capazes de inibir de 90% a 100% da viabilidade celular (testes com panduratina A, uma chalcona natural, testada em isolados clínicos de *Enterococcus*), sendo diversas amostras capazes de exercer efeito em concentrações de até 12,5 µg/mL. Tendo em vista, ainda, que outros estudos consideraram a redução parcial da contagem como promissora, o fato de grande parte dos testes terem sido capazes de eliminar completamente o crescimento, indica o potencial destas moléculas como agentes antibiofilme [38, 39].

Uma característica observada em alguns dos ensaios realizados foi um aumento da formação de biofilme em concentrações intermediárias se comparado com menores concentrações de amostra e com o controle. Este padrão pode se dar por uma resposta global ao estresse celular envolvendo, dentre outros mecanismos, fatores genéticos e de sinalização intracelular [40]. Tais características se mostraram presentes em estudos na literatura que expuseram bactérias a uma dose sub-CIM de antibiótico, resultando em uma indução da formação do biofilme [41, 42].

Tendo como base os resultados obtidos no presente estudo e as informações presentes na literatura, podemos assumir que seis das quinze amostras de hidroxichalcona avaliadas obtiveram resultados promissores como agentes antibacterianos e antibiofilme nos testes *in vitro*.

5. Conclusão

Neste trabalho foram testadas 15 chalconas, sendo que sete demonstraram promissora atividade antibacteriana. As amostras T3, Li-6, Li-9, Li-40, Li-42 e LR-72 demonstraram forte potencial antibiofilme para a maioria das bactérias avaliadas. Dentre as chalconas destacou-se a Li-6, que demonstrou potencial atividade antibacteriana e antibiofilme para todas as bactérias anaeróbias avaliadas. Assim, consolidamos uma base para o desenvolvimento de novos estudos acerca dos efeitos destas moléculas como agentes no combate e prevenção da periodontite.

Financiamento

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [processo nº 307974 / 2019-7].

Referências

- [1] N.B. Arweiler, L. Netuschil, The Oral Microbiota. *Advances in experimental medicine and biology*. 902 (2016) 45-60. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_4
- [2] R. Teles, F. Teles, J. Frias-Lopez, B. Paster, A. Haffajee, Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontology 2000*. 62 (2013) 95-162. <https://doi.org/10.1111/prd.12010>
- [3] J. Slots, Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontology 2000*. 75 (2017) 7-23. <https://doi.org/10.1111/prd.12221>
- [4] J.L. Ebersole, D. Dawson, 3rd, P. Emecen-Huja, R. Nagarajan, K. Howard, M.E. Grady, et al., The periodontal war: microbes and immunity. *Periodontology 2000*. 75 (2017) 52-115. <https://doi.org/10.1111/prd.12222>
- [5] I. Brook, Antimicrobials therapy of anaerobic infections. *Journal of chemotherapy*. 28 (2016) 143-150. <https://doi.org/10.1179/1973947815Y.0000000068>
- [6] F. Graziani, D. Karapetsa, B. Alonso, D. Herrera, Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontology 2000*. 75 (2017) 152-188. <https://doi.org/10.1111/prd.12201>
- [7] D.K. Mahapatra, S.K. Bharti, V. Asati, Chalcone scaffolds as anti-infective agents: structural and molecular target perspectives. *European journal of medicinal chemistry*. 101 (2015) 496-524. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.052>

- [8] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of natural products*. 83 (2020) 770-803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- [9] G. Porras, F. Chassagne, J.T. Lyles, L. Marquez, M. Dettweiler, A.M. Salam, et al., Ethnobotany and the Role of Plant Natural Products in Antibiotic Drug Discovery. *Chemical reviews*. 121 (2021) 3495-3560. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00922>
- [10] P. Cheng, L. Yang, X. Huang, X. Wang, M. Gong, Chalcone hybrids and their antimalarial activity. *Archiv der Pharmazie*. 353 (2020) e1900350. <https://doi.org/10.1002/ardp.201900350>
- [11] M.V.P. de Mello, B.A. Abraham-Vieira, T.F.S. Domingos, J.B. de Jesus, A.C.C. de Sousa, C.R. Rodrigues, et al., A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. *European journal of medicinal chemistry*. 150 (2018) 920-929. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.047>
- [12] S. Shukla, A.K. Sood, K. Goyal, A. Singh, V. Sharma, N. Guliyar, et al., Chalcone Scaffolds as Anticancer Drugs: A Review on Molecular Insight in Action of Mechanisms and Anticancer Properties. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 10.2174/1871520620999201124212840(2020). <https://doi.org/10.2174/1871520620999201124212840>
- [13] D. Elkhaila, I. Al-Hashimi, A.E. Al Moustafa, A. Khalil, A comprehensive review on the antiviral activities of chalcones. *Journal of drug targeting*. 29 (2021) 403-419. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1853759>
- [14] W. Dan, J. Dai, Recent developments of chalcones as potential antibacterial agents in medicinal chemistry. *European journal of medicinal chemistry*. 187 (2020) 111980. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111980>
- [15] E.J. Henry, S.J. Bird, P. Gowland, M. Collins, J.P. Cassella, Ferrocenyl chalcone derivatives as possible antimicrobial agents. *The Journal of antibiotics*. 73 (2020) 299-308. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0280-y>
- [16] P. Yadav, K. Lal, L. Kumar, A. Kumar, A. Kumar, A.K. Paul, et al., Synthesis, crystal structure and antimicrobial potential of some fluorinated chalcone-1,2,3-triazole conjugates. *European journal of medicinal chemistry*. 155 (2018) 263-274. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.055>
- [17] H. Koudokpon, N. Armstrong, T.V. Dougnon, L. Fah, E. Hounsa, H.S. Bankole, et al., Antibacterial Activity of Chalcone and Dihydrochalcone Compounds from *Uvaria chamae* Roots against Multidrug-Resistant Bacteria. *BioMed research international*. 2018 (2018) 1453173. <https://doi.org/10.1155/2018/1453173>
- [18] D. Usjak, B. Ivkovic, D.D. Bozic, L. Boskovic, M. Milenkovic, Antimicrobial activity of novel chalcones and modulation of virulence factors in hospital strains of

477 *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Microbial pathogenesis. 131
478 (2019) 186-196. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.015>

479 [19] W.C. Chu, P.Y. Bai, Z.Q. Yang, D.Y. Cui, Y.G. Hua, Y. Yang, et al., Synthesis
480 and antibacterial evaluation of novel cationic chalcone derivatives possessing broad
481 spectrum antibacterial activity. European journal of medicinal chemistry. 143 (2018)
482 905-921. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.009>

483 [20] D. Kunthalert, S. Baothong, P. Khetkam, S. Chokchaisiri, A. Suksamrarn, A
484 chalcone with potent inhibiting activity against biofilm formation by nontypeable
485 *Haemophilus influenzae*. Microbiology and immunology. 58 (2014) 581-589.
486 <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12194>

487 [21] M.B. Dos Santos, D. Bertholin Anselmo, J.G. de Oliveira, B.V. Jardim-Perassi,
488 D. Alves Monteiro, G. Silva, et al., Antiproliferative activity and p53 upregulation
489 effects of chalcones on human breast cancer cells. Journal of enzyme inhibition and
490 medicinal chemistry. 34 (2019) 1093-1099.
491 <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1615485>

492 [22] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial
493 Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria Approved Standard - Seventh Edition.
494 CLSI document M11-A7 [ISBN 1-56238-626-3]. Clinical and Laboratory Standards
495 Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne Pennsylvania 19087-1898 USA,
496 2007.

497 [23] Y. Shen, P. Li, X. Chen, Y. Zou, H. Li, G. Yuan, et al., Activity of Sodium
498 Lauryl Sulfate, Rhamnolipids, and N-Acetylcysteine Against Biofilms of Five Common
499 Pathogens. Microbial drug resistance. 26 (2020) 290-299.
500 <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0385>

501 [24] J.J. Harrison, R.J. Turner, H. Ceri, High-throughput metal susceptibility testing
502 of microbial biofilms. BMC microbiology. 5 (2005) 53. [https://doi.org/10.1186/1471-](https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-53)
503 2180-5-53

504 [25] L. Boyanova, R. Markovska, I. Mitov, Multidrug resistance in anaerobes. Future
505 microbiology. 14 (2019) 1055-1064. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0132>

506 [26] P. Singh, A. Anand, V. Kumar, Recent developments in biological activities of
507 chalcones: a mini review. European journal of medicinal chemistry. 85 (2014) 758-777.
508 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.033>

509 [27] E.G. Alves, A.H.C. Vinholis, L.A. Casemiro, N.A.J.C. Furtado, M.L.A.e. Silva,
510 W.R. Cunha, et al., Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da
511 atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras.
512 Química Nova. 31 (2008) 6. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500052>

513 [28] S.M. El-Messery, E.E. Habib, S.T.A. Al-Rashood, G.S. Hassan, Synthesis,
514 antimicrobial, anti-biofilm evaluation, and molecular modelling study of new chalcone

515 linked amines derivatives. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 33
 516 (2018) 818-832. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1461855>

517 [29] A.B. Shaik, R.P. Yejella, S. Shaik, Synthesis, Antimicrobial, and Computational
 518 Evaluation of Novel Isobutylchalcones as Antimicrobial Agents. *International journal of*
 519 *medicinal chemistry*. 2017 (2017) 6873924. <https://doi.org/10.1155/2017/6873924>

520 [30] S. Gibbons, Phytochemicals for bacterial resistance--strengths, weaknesses and
 521 opportunities. *Planta medica*. 74 (2008) 594-602. [https://doi.org/10.1055/s-2008-](https://doi.org/10.1055/s-2008-1074518)
 522 1074518

523 [31] K. Jhajharia, A. Parolia, K.V. Shetty, L.K. Mehta, Biofilm in endodontics: A
 524 review. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*. 5 (2015)
 525 1-12. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.151956>

526 [32] F. Pantanella, P. Valenti, T. Natalizi, D. Passeri, F. Berlutti, Analytical
 527 techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main
 528 techniques currently in use. *Annali di igiene : medicina preventiva e di comunita*. 25
 529 (2013) 31-42. <https://doi.org/10.7416/ai.2013.1904>

530 [33] J. Azeredo, N.F. Azevedo, R. Briandet, N. Cerca, T. Coenye, A.R. Costa, et al.,
 531 Critical review on biofilm methods. *Critical reviews in microbiology*. 43 (2017) 313-
 532 351. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>

533 [34] B. Nassima, K. Riadh, Antimicrobial and antibiofilm activities of phenolic
 534 compounds extracted from *Populus nigra* and *Populus alba* buds (Algeria). *Brazilian*
 535 *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 55 (2019). [https://doi.org/10.1590/s2175-](https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000218114)
 536 97902019000218114

537 [35] U. Tutar, U.M. Kocyigit, H. Gezeggen, Evaluation of antimicrobial, antibiofilm
 538 and carbonic anhydrase inhibition profiles of 1,3-bis-chalcone derivatives. *Journal of*
 539 *biochemical and molecular toxicology*. 33 (2019) e22281.
 540 <https://doi.org/10.1002/jbt.22281>

541 [36] A.L. Pimenta, L.D. Chiaradia-Delatorre, A. Mascarello, K.A. de Oliveira, P.C.
 542 Leal, R.A. Yunes, et al., Synthetic organic compounds with potential for bacterial
 543 biofilm inhibition, a path for the identification of compounds interfering with quorum
 544 sensing. *International journal of antimicrobial agents*. 42 (2013) 519-523.
 545 <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.07.006>

546 [37] Y. Rukayadi, S. Han, D. Yong, J.K. Hwang, In vitro antibacterial activity of
 547 panduratin A against enterococci clinical isolates. *Biological & pharmaceutical bulletin*.
 548 33 (2010) 1489-1493. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.1489>

549 [38] C.L. Quave, M. Estevez-Carmona, C.M. Compadre, G. Hobby, H. Hendrickson,
 550 K.E. Beenken, et al., Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit
 551 *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *PloS one*.
 552 7 (2012) e28737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028737>

- 553 [39] A.F. Millezi, K.A.D. Costa, J.M. Oliveira, S.P. Lopes, M.O. Pereira, R.H.
 554 Piccoli, Antibacterial and anti-biofilm activity of cinnamon essential oil and
 555 eugenol/Atividade antibacteriana e anti-biofilme de óleo essencial de canela e eugenol.
 556 Ciência Rural. 49 (2019). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180314>
- 557 [40] J.B. Kaplan, Antibiotic-induced biofilm formation. The International journal of
 558 artificial organs. 34 (2011) 737-751. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000027>
- 559 [41] Z. Rafeeq, N. Abid, N. Liaqat, P. Afridi, S. Siddique, S. Masood, et al., In-vitro
 560 Investigation of Antibiotics Efficacy Against Uropathogenic Escherichia coli Biofilms
 561 and Antibiotic Induced Biofilm Formation at Sub-Minimum Inhibitory Concentration of
 562 Ciprofloxacin. Infection and drug resistance. 13 (2020) 2801-2810.
 563 <https://doi.org/10.2147/IDR.S258355>
- 564 [42] S.T. Aka, S.H. Haji, Sub-MIC of antibiotics induced biofilm formation of
 565 Pseudomonas aeruginosa in the presence of chlorhexidine. Brazilian journal of
 566 microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]. 46 (2015) 149-
 567 154. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120140218>

568

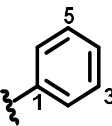
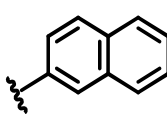
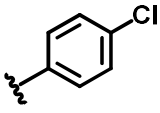
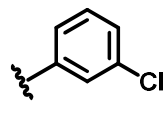
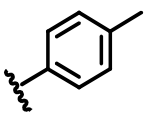
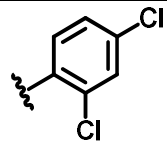
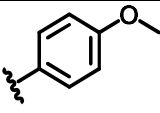
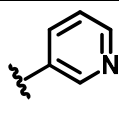
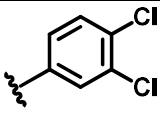
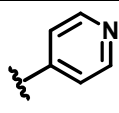
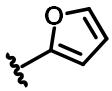
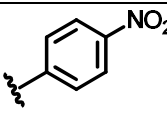
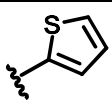
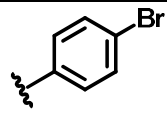
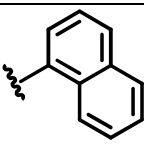
Chalcona	Ar	Chalcona	Ar
T3		Li-22	
Li-6		Li-40	
Li-7		Li-42	
Li-8		Li-45	
Li-9		Li-46	
Li-15		Li-58	
Li-16		LR-72	
Li-21			

Figura 1. Estrutura química das hidroxichalconas avaliadas.

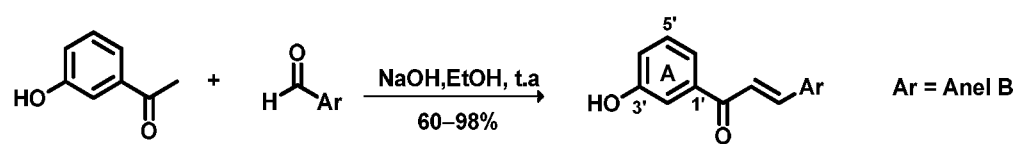


Figura 2. Esquema da síntese das 3'-hidroxichalconas.

Tabela 1

Concentração inibitória mínima (CIM) das hidroxichalconas frente a bactérias periodontopatogênicas avaliadas neste estudo.

Amostras	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Prevotella oralis</i>	<i>Actinomyces viscosus</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>*Bacterioides fragilis</i>	<i>*Bacterioides thetaiotaomicron</i>
	ATCC 33563	ATCC 27337	ATCC 33269	ATCC 43146	ATCC 25260	ATCC 25586	ATCC 25285	ATCC 29741
Concentração inibitória mínima (µg/mL)								
T3	12,5	6,25	3,12	12,5	6,25	3,12	-	-
Li-6	3,12	3,12	1,56	6,25	1,56	0,78	-	-
Li-7	12,5	6,25	6,25	25,0	6,25	12,5	-	-
Li-8	50,0	6,25	12,5	200,0	50,0	200,0	-	-
Li-9	3,12	1,56	0,78	3,12	3,12	12,5	-	-
Li-15	400,0	50,0	400,0	100,0	200,0	400,0	-	-
Li-16	25,0	>400,0	12,5	12,5	25,0	25,0	-	-
Li-21	50,0	12,5	50,0	400,0	50,0	400,0	-	-
Li-22	>400,0	25,0	>400,0	>400,0	>400,0	>400,0	-	-
Li-40	6,25	25,0	6,25	6,25	6,25	3,12	-	-
Li-42	6,25	1,56	1,56	3,12	1,56	12,5	-	-
Li-45	50,0	0,39	50,0	100,0	100,0	50,0	-	-
Li-46	200,0	100,0	12,5	400,0	12,5	400,0	-	-
Li-58	12,5	0,78	6,25	6,25	12,5	6,25	-	-
LR-72	3,12	6,25	1,56	3,12	6,25	3,12	-	-
Metronidazol	-	-	-	-	-	-	0,7375	0,7375

- : Ensaios não realizados; * Bactérias controle

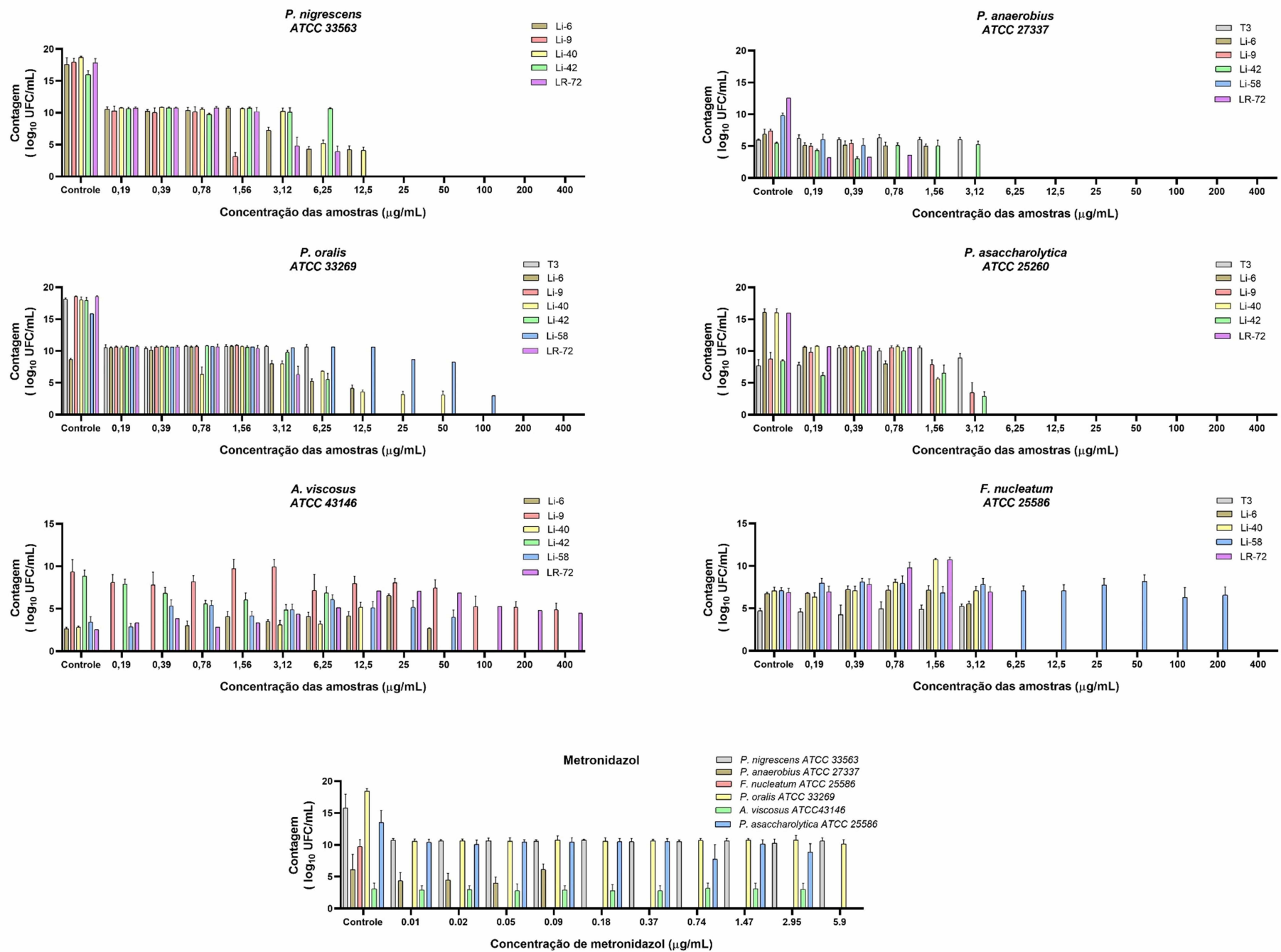


Figura 4. Atividade antibiofilme das hidroxichalconas pela contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de bactérias anaeróbias periodontopatogênicas após 120 horas de incubação. Testes realizados com as sete amostras mais promissoras com respectivas as bactérias com as quais foi obtida CIM menor ou igual a 6,25 $\mu\text{g/mL}$. Ensaios com metronidazol foram realizados com as mesmas bactérias avaliadas.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

Material Suplementar S1

Análise estatística

Prevotella nigrescens (ATCC 33563)

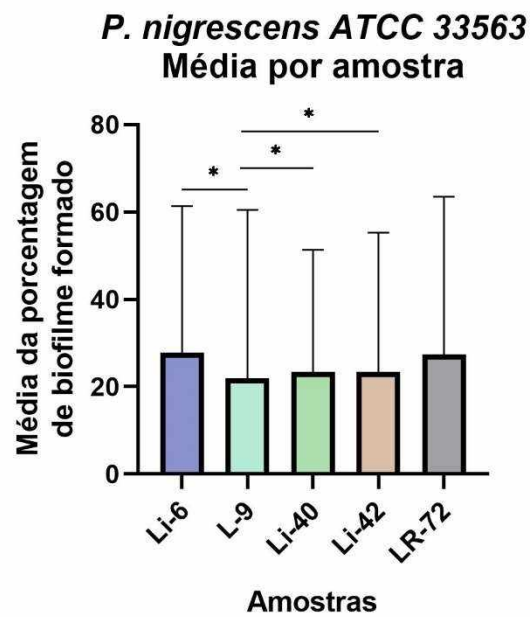


Figura S1.1 – Média da porcentagem de biofilme formado de *P. nigrescens* (ATCC 33563) por amostra. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

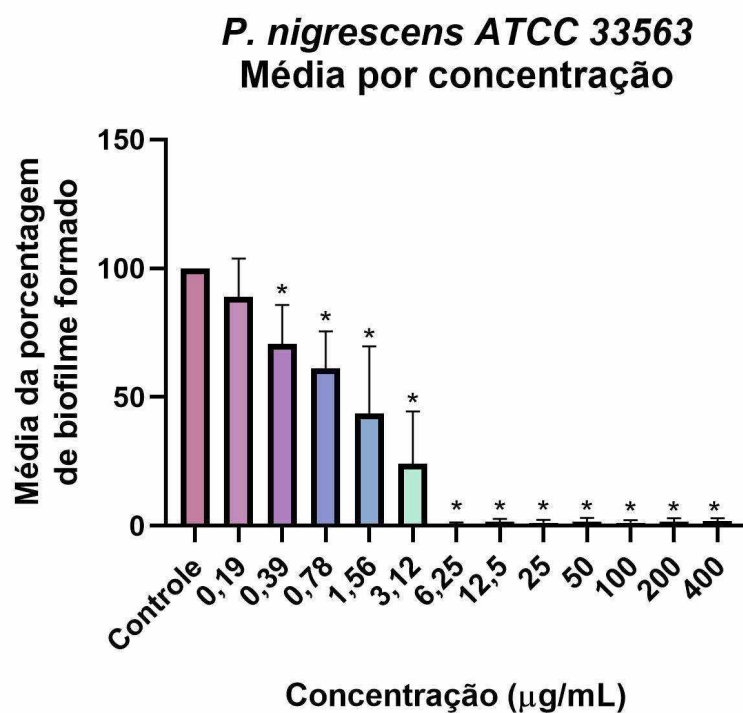


Figura S1.2 – Média da porcentagem de biofilme formado de *P. nigrescens* (ATCC 33563) por concentração. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em comparação ao controle.

***P. nigrescens* ATCC 33563**
Média por amostra

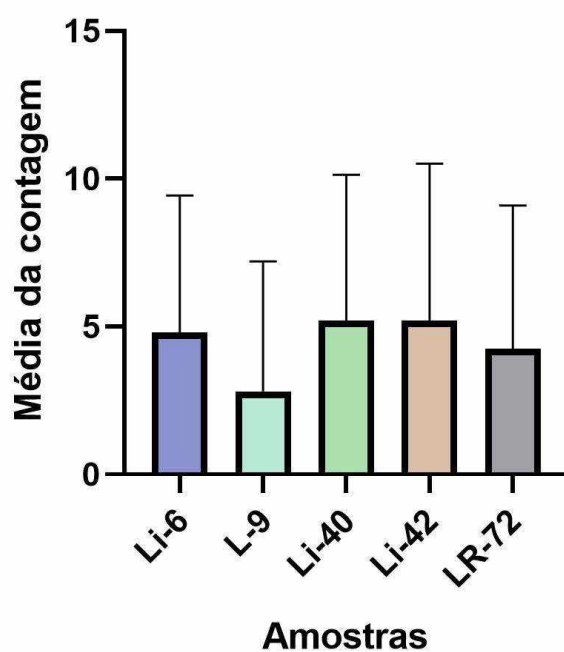


Figura S1.3 – Média da viabilidade celular (Log₁₀UFC/mL) de *P. nigrescens* (ATCC 33563) por amostra.

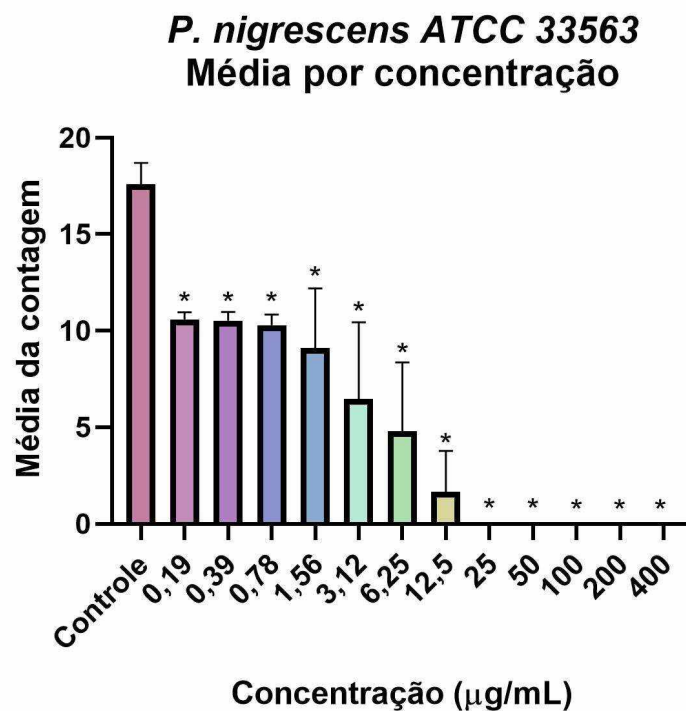


Figura S1.4 – Média da viabilidade celular (Log₁₀UFC/mL) de *P. nigrescens* (ATCC 33563) por concentração. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em comparação ao controle.

Referências

[1] The jamovi project (2020). *jamovi*. (Version 1.6) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

[2] R Core Team (2020). *R: A Language and environment for statistical computing*. (Version 4.0) [Computer software]. Retrieved from <https://cran.r-project.org>. (R packages retrieved from MRAN snapshot 2020-08-24).

Material Suplementar S2

Análise estatística

Peptostreptococcus anaerobius (ATCC 27337)

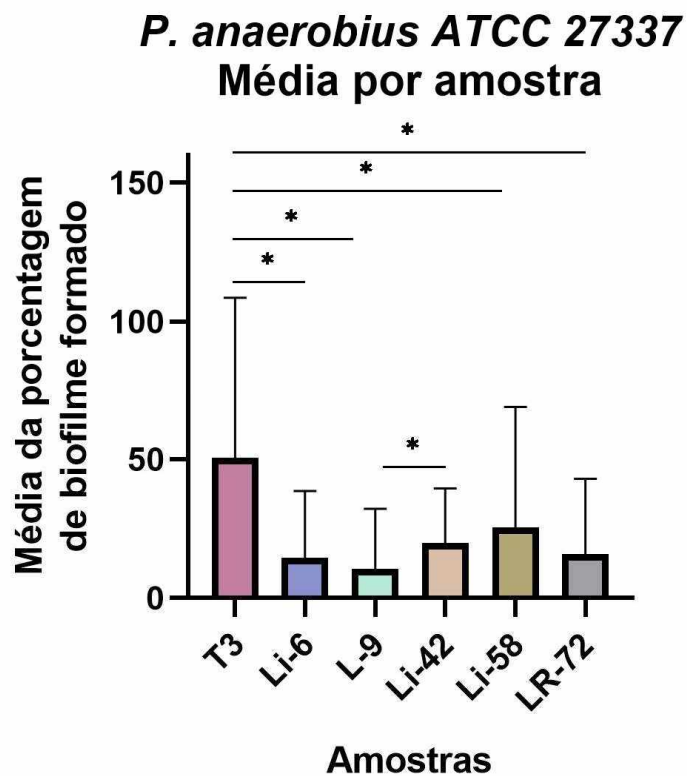


Figura S2.1 – Média da porcentagem de biofilme formado de *P. anaerobius* (ATCC 27337) por amostra. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

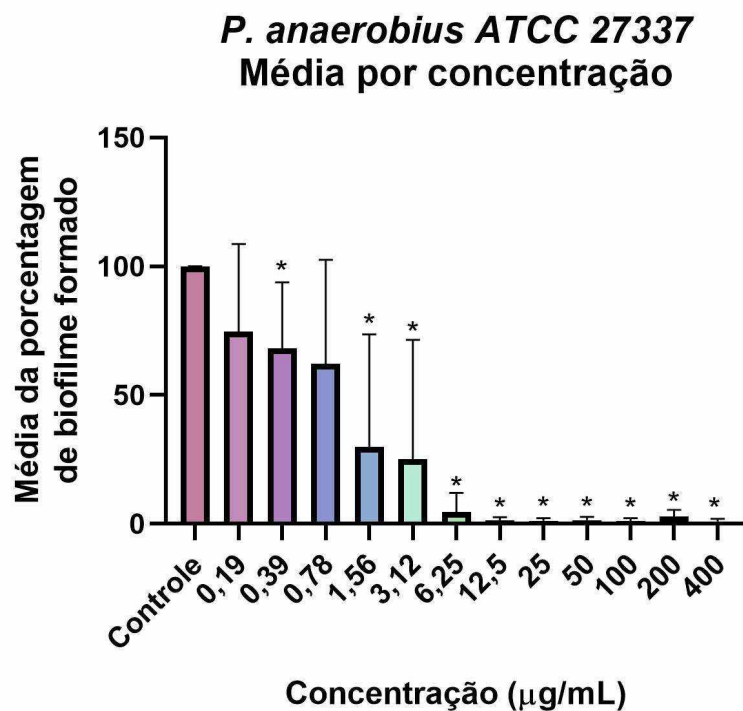


Figura S2.2 – Média da porcentagem de biofilme formado de *P. anaerobius* (ATCC 27337) por concentração. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em comparação ao controle.

***P. anaerobius* ATCC 27337**
Média por amostra

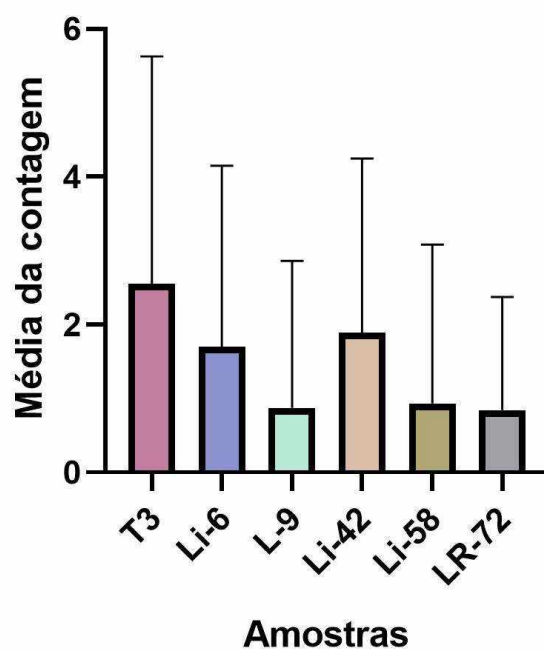


Figura S2.3 – Média da viabilidade celular (Log₁₀UFC/mL) de *P. anaerobius* (ATCC 27337) por amostra.

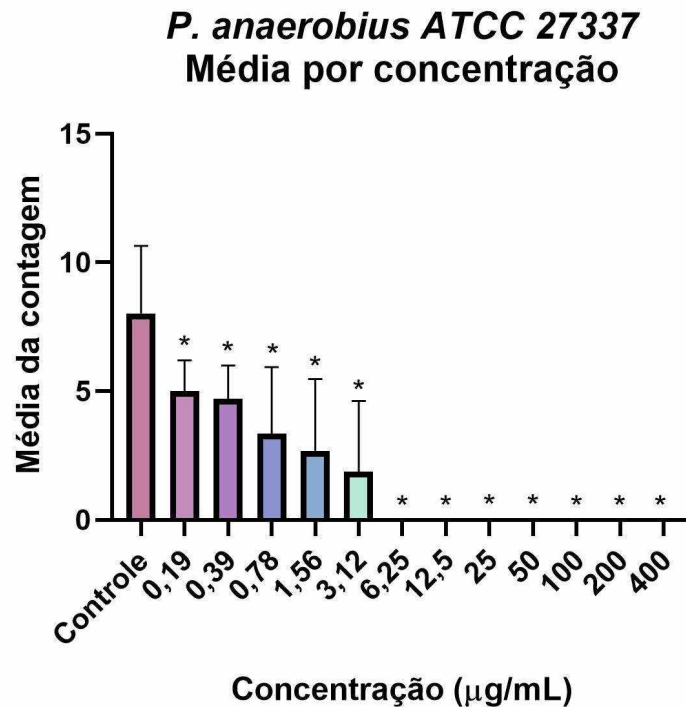


Figura S2.4 – Média da viabilidade celular (Log₁₀UFC/mL) de *P. anaerobius* (ATCC 27337) por concentração. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em comparação ao controle

Referências

[1] The jamovi project (2020). *jamovi*. (Version 1.6) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

[2] R Core Team (2020). *R: A Language and environment for statistical computing*. (Version 4.0) [Computer software]. Retrieved from <https://cran.r-project.org>. (R packages retrieved from MRAN snapshot 2020-08-24).

Material Suplementar S3

Análise estatística

Prevotella oralis (ATCC 33269)

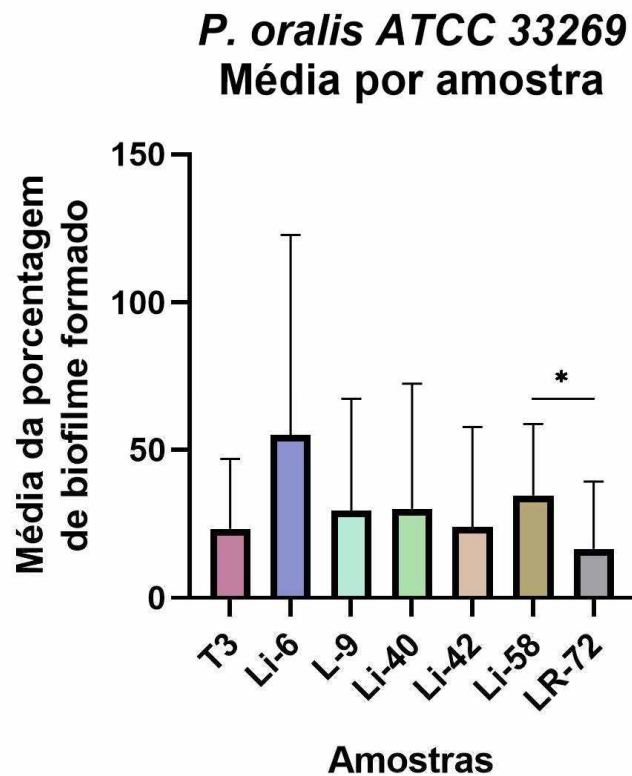


Figura S3.1 – Média da porcentagem de biofilme formado de *P. oralis* (ATCC 33269) por amostra. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

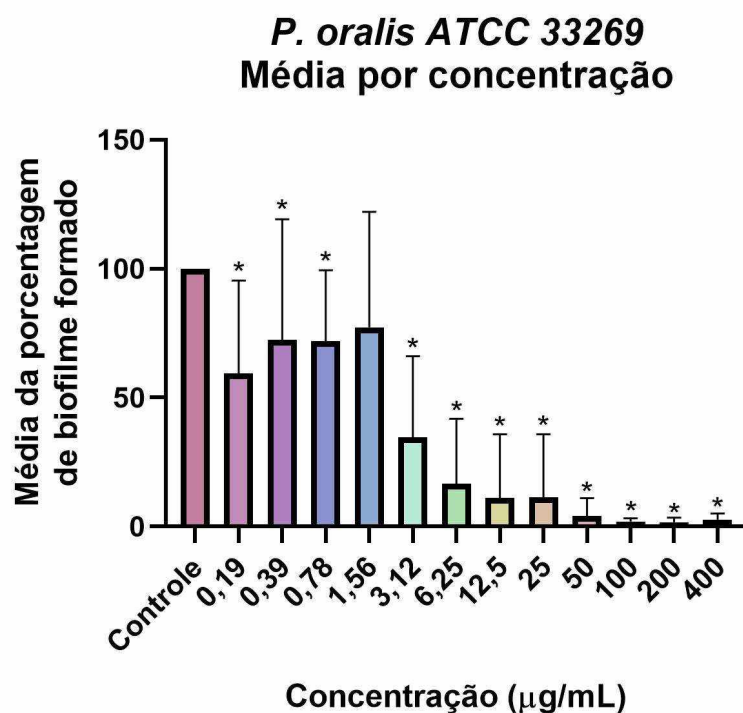


Figura S3.2 – Média da porcentagem de biofilme formado de *P. oralis* (ATCC 33269) por concentração. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em comparação ao controle.

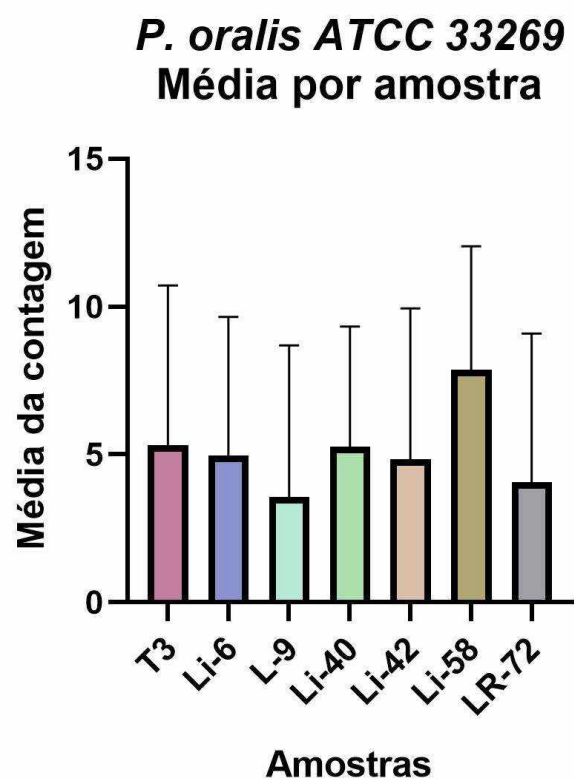


Figura S3.3 – Média da viabilidade celular ($\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$) de *P. oralis* (ATCC 33269) por amostra.

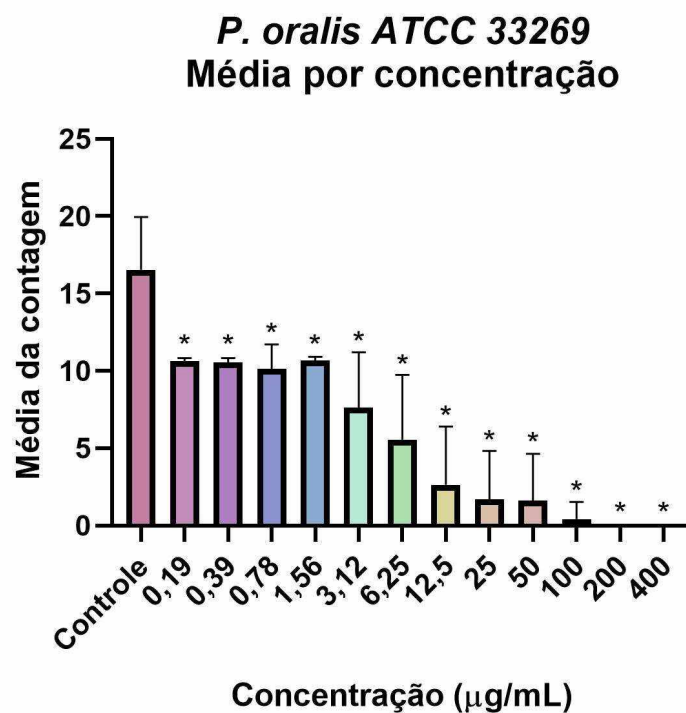


Figura S3.4 – Média da viabilidade celular (Log₁₀UFC/mL) de *P. oralis* (ATCC 33269) por concentração. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em comparação ao controle.

Referências

[1] The jamovi project (2020). *jamovi*. (Version 1.6) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

[2] R Core Team (2020). *R: A Language and environment for statistical computing*. (Version 4.0) [Computer software]. Retrieved from <https://cran.r-project.org>. (R packages retrieved from MRAN snapshot 2020-08-24).

Material Suplementar S4

Análise estatística

Actinomyces viscosus (ATCC 43146)

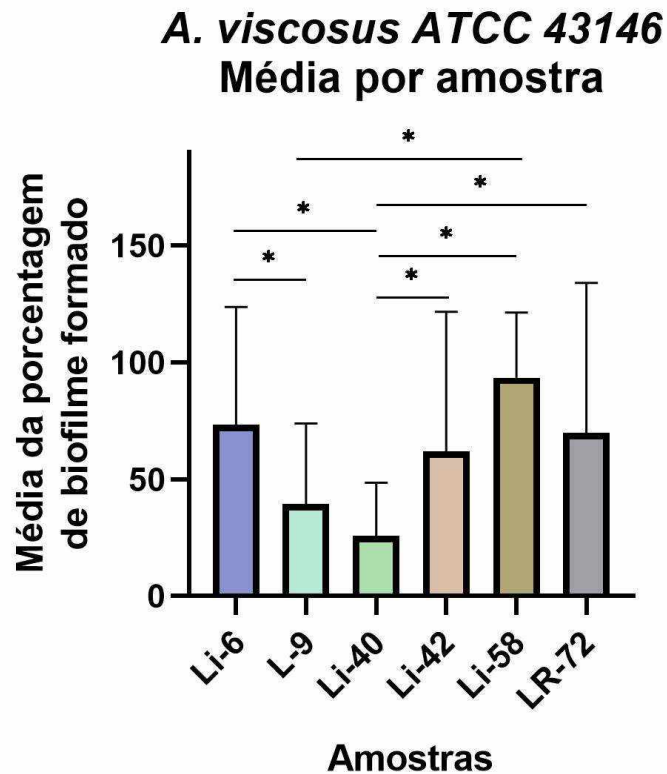


Figura S4.1 – Média da porcentagem de biofilme formado de *A. viscosus* (ATCC 43146) por amostra. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

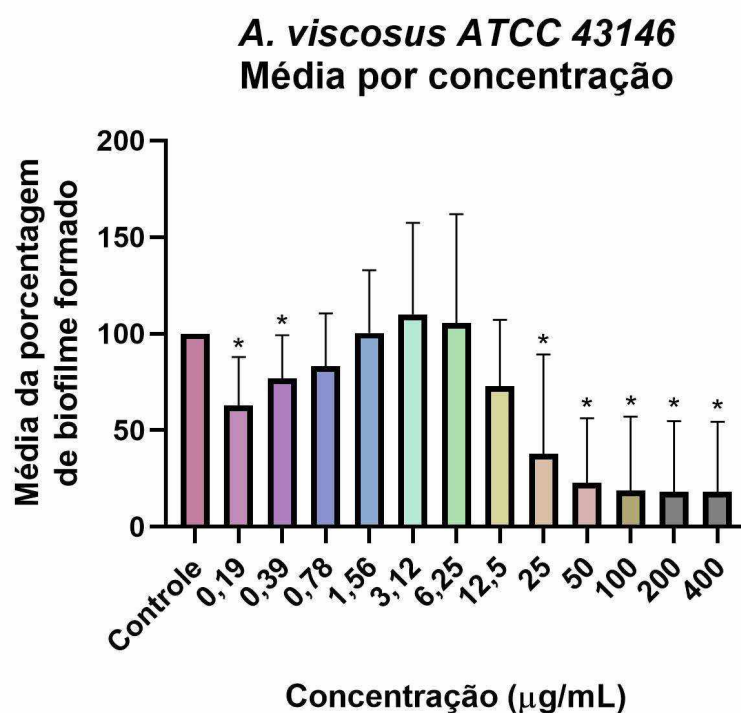


Figura S4.2 – Média da porcentagem de biofilme formado de *A. viscosus* (ATCC 43146) por concentração. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em comparação ao controle.

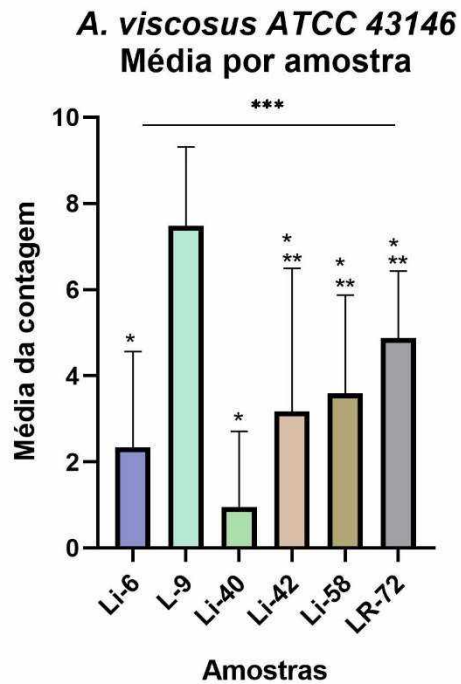


Figura S4.3 – Média da viabilidade celular (Log₁₀UFC/mL) de *A. viscosus* (ATCC 43146) por amostra. Um asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em comparação com Li-9. Dois asteriscos () indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em comparação com Li-40. Três asteriscos (***) indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre Li-6 e LR-72.**

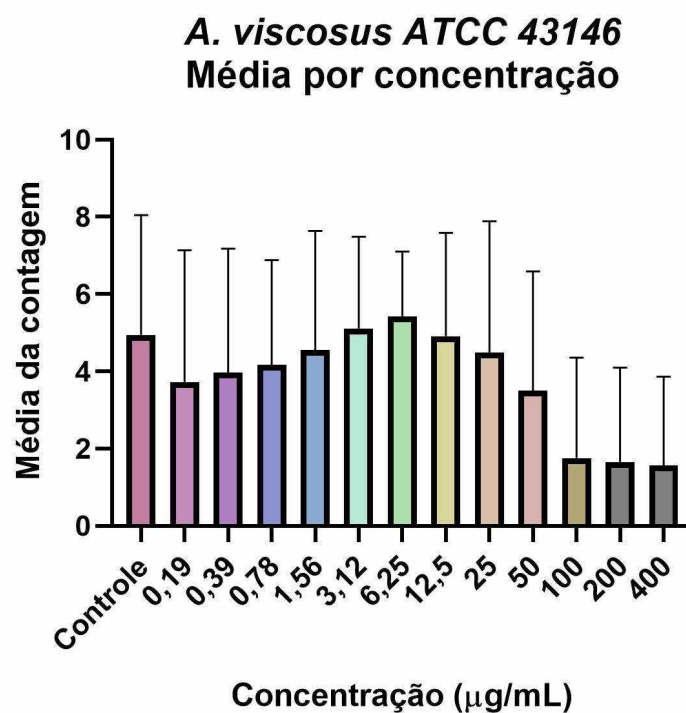


Figura S4.4 – Média da viabilidade celular (Log₁₀UFC/mL) de *A. viscosus* (ATCC 43146) por concentração.

Referências

[1] The jamovi project (2020). *jamovi*. (Version 1.6) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

[2] R Core Team (2020). *R: A Language and environment for statistical computing*. (Version 4.0) [Computer software]. Retrieved from <https://cran.r-project.org>. (R packages retrieved from MRAN snapshot 2020-08-24).

Material Suplementar S5

Análise estatística

Porphyromonas asaccharolytica (ATCC 25260)

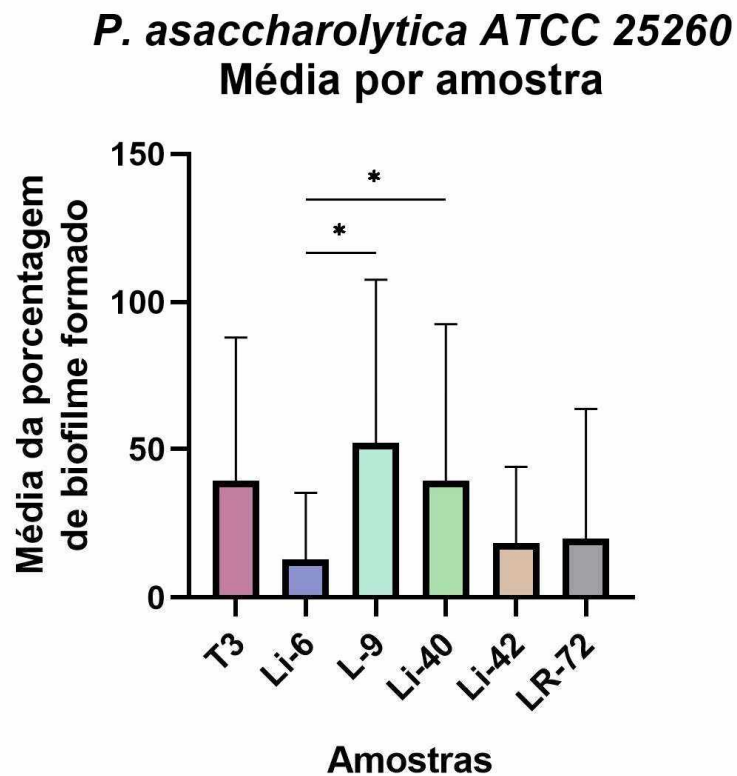


Figura S5.1 – Média da porcentagem de biofilme formado de *P. asaccharolytica* (ATCC 25260) por amostra. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

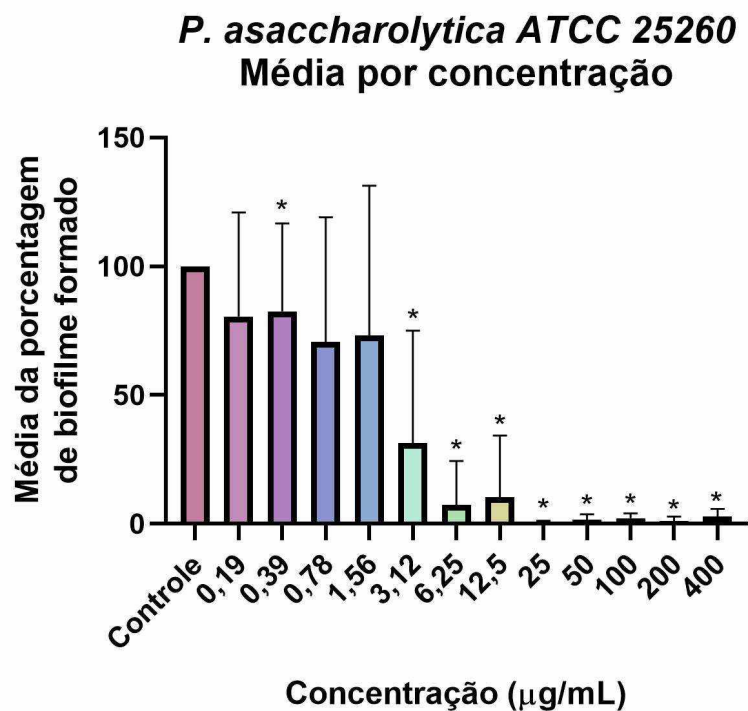


Figura S5.2 – Média da porcentagem de biofilme formado de *P. asaccharolytica* (ATCC 25260) por concentração. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em comparação ao controle.

***P. asaccharolytica* ATCC 25260**
Média por amostra

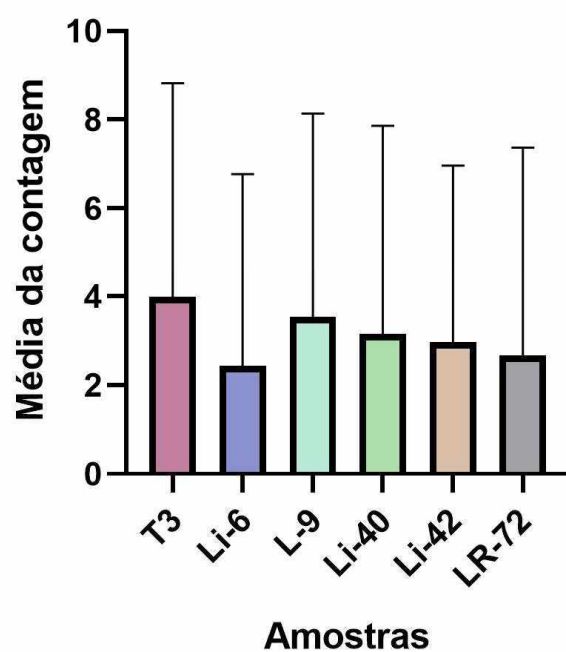


Figura S5.3 – Média da viabilidade celular (Log₁₀UFC/mL) de *P. asaccharolytica* (ATCC 25260) por amostra.

***P. asaccharolytica* ATCC 25260**
Média por concentração

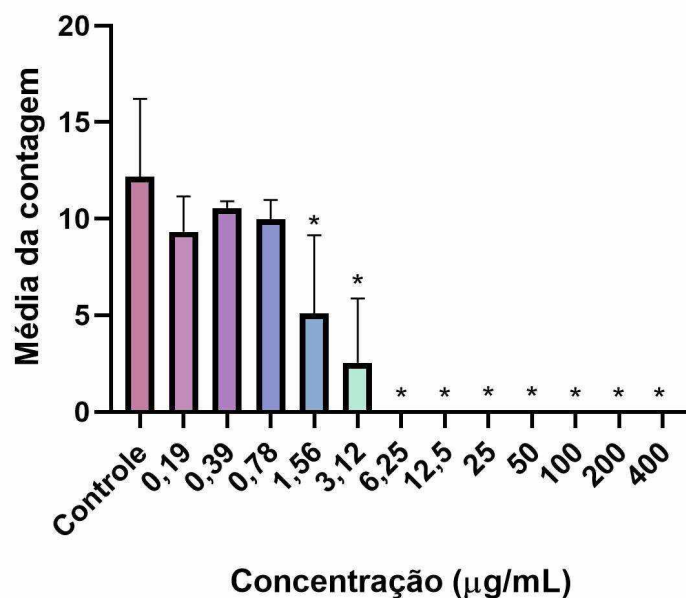


Figura S5.4 – Média da viabilidade celular (Log₁₀UFC/mL) de *P. asaccharolytica* (ATCC 25260) por concentração. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em comparação ao controle.

Referências

[1] The jamovi project (2020). *jamovi*. (Version 1.6) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

[2] R Core Team (2020). *R: A Language and environment for statistical computing*. (Version 4.0) [Computer software]. Retrieved from <https://cran.r-project.org>. (R packages retrieved from MRAN snapshot 2020-08-24).

Material Suplementar S6

Análise estatística

Fusobacterium nucleatum (ATCC 25586)

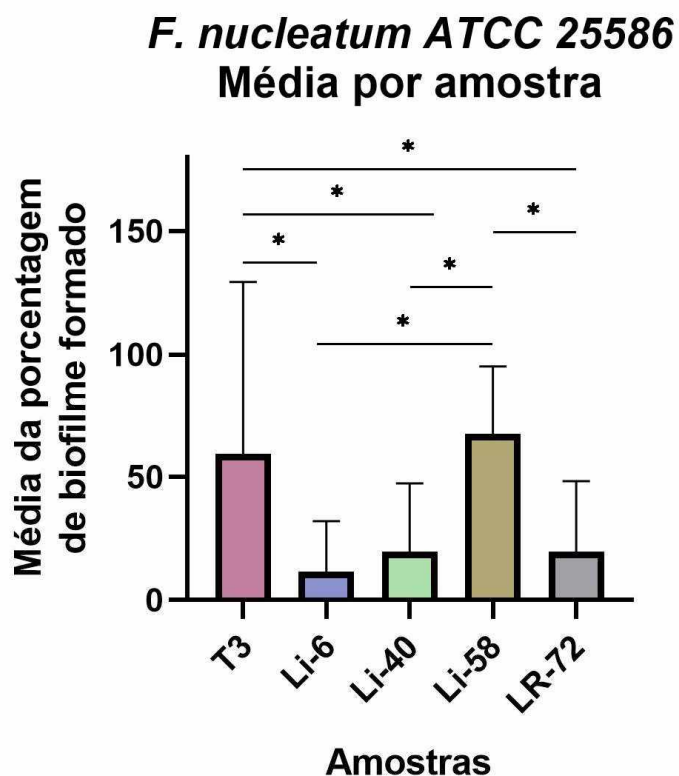


Figura S6.1 – Média da porcentagem de biofilme formado de *F. nucleatum* (ATCC 25586) por amostra. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

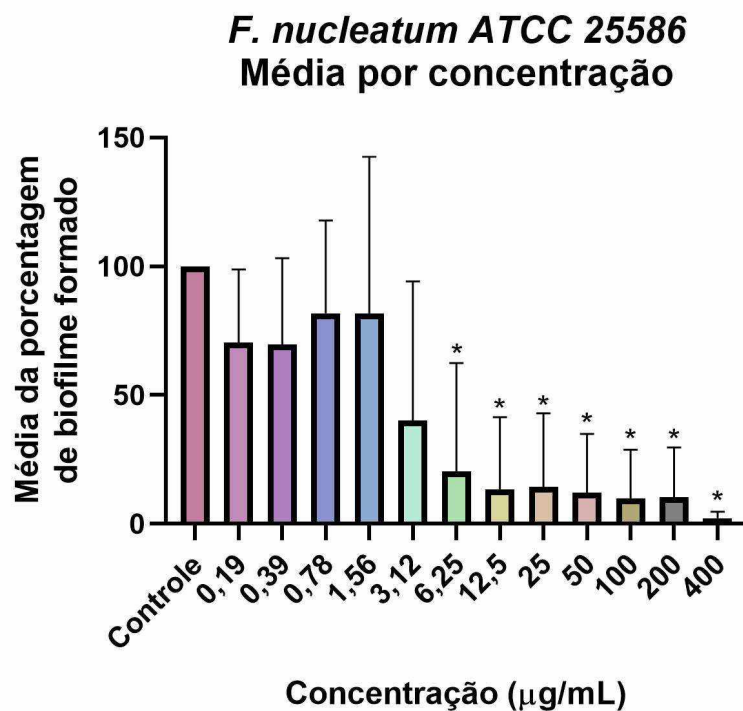


Figura S6.2 – Média da porcentagem de biofilme formado de *F. nucleatum* (ATCC 25586) por concentração. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em comparação ao controle.

***F. nucleatum* ATCC 25586**
Média por amostra

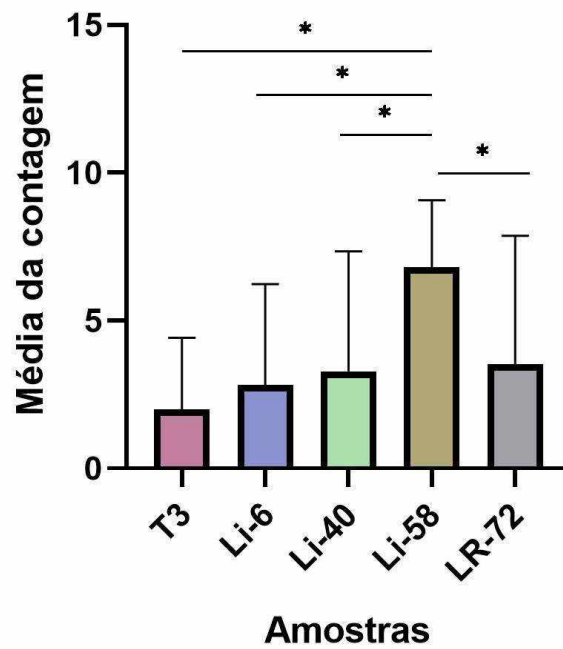


Figura S6.3 – Média da viabilidade celular (Log₁₀UFC/mL) de *F. nucleatum* (ATCC 25586) por amostra. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

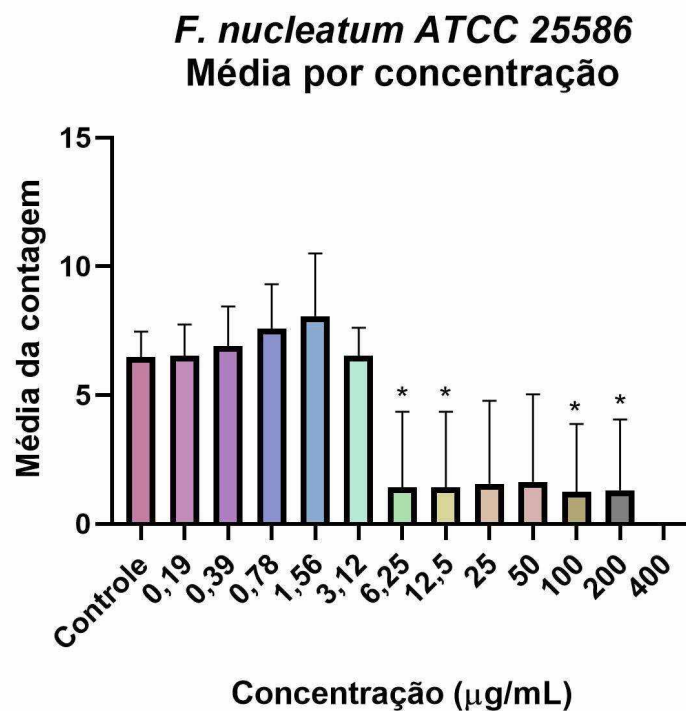


Figura S6.4 – Média da viabilidade celular (Log₁₀UFC/mL) de *F. nucleatum* (ATCC 25586) por concentração. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em comparação ao controle.

Referências

[1] The jamovi project (2020). *jamovi*. (Version 1.6) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

[2] R Core Team (2020). *R: A Language and environment for statistical computing*. (Version 4.0) [Computer software]. Retrieved from <https://cran.r-project.org>. (R packages retrieved from MRAN snapshot 2020-08-24).