



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

THAÍSE CRISTINA GEREMIAS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MEMBRANAS DE NANOFIBRAS DE PLGA ASSOCIADAS A
ANTIBIOFILME**

**FLORIANÓPOLIS
2017**

Thaíse Cristina Geremias

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MEMBRANAS DE NANOFIBRAS DE PLGA ASSOCIADAS A
ANTIBIOFILME**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

Coorientador: Dr. Marcos Bastistella

Florianópolis
2017

Geremias, Thaise Cristina

Desenvolvimento e caracterização de membranas de nanofibras de PLGA associadas a antibiofilme / Thaise Cristina Geremias ; orientador, Ricardo de Souza Magini, coorientador, Marcos Antonio Batistella, 2017.

94 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Materiais biomédicos. 3. Polímeros reabsorvíveis. 4. Regeneração Ósseo Guiada . I. Magini, Ricardo de Souza. II. Batistella, Marcos Antonio. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

Thaíse Cristina Geremias

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MEMBRANAS DE NANOFIBRAS DE PLGA ASSOCIADAS A
ANTIBIOFILME**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “MESTRE EM ODONTOLOGIA – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM IMPLANTODONTIA”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 27 de março de 2017.

Prof.^a Dr.^a Elena Riet Correa Rivero
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Ándrea de Lima Pimenta
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Águedo Áragones
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho a minha
família, que sempre amarei
incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

A todos os meus grandes mestres, e, como condição *sine qua non*, grandes homens, que me ensinaram a buscar meu próprio caminho e jamais estudar por estudar ou colecionar titulações, mas procurar respostas a determinadas questões que tenham relevância, e principalmente, que tenham importância na minha formação como ser humano. Dentre algumas dessas figuras marcantes que passaram por minha vida, guardo com especial carinho Alfons Gossen, Eric Bergman, Otto Dieter Gerken, Calvino Heibnitz e Antônio Carlos Cardoso.

Ao Professor Ricardo Magini, por todas as oportunidades junto aos fundamentais ensinamentos. Serei sempre grata por tudo e essencialmente, todas as palavras que, de alguma forma, me inspiraram a procurar evolução.

À Professora Andréa Pimenta, por ser essa grande professora e pesquisadora. Agradeço muito a oportunidade de poder trabalhar, aprender e conviver durante o período desse trabalho.

Ao pesquisador Marcos Batistella por toda ajuda, cumplicidade e ensinamentos imprescindíveis na execução desse trabalho.

Ao meu grupo de pesquisa do LABSIN/LABMASSA, que me ajudaram na concepção e execução deste trabalho. Muito obrigada por toda assistência e companheirismo. Em especial ao Professor Antônio Augusto Ulson, Professor César Franco, e ao pesquisador Águedo Aragonés.

A todos os professores, colegas e funcionários do CEPID, a quem nutro uma dívida intelectual impagável.

A toda minha família, pois mais importante do que qualquer doação inerente a um lar provido de amor durante todos esses anos, foram vocês que constituíram a base moral na qual pude construir meu caráter.

A todos os meus amigos e conselheiros, a quem importunei durante a execução deste trabalho, minha eterna gratidão e lealdade. Em especial ao Filipe Maciel, Guilherme Speck, Rodrigo Lucas e Juan Felipe, que será um grande professor, pois não simplesmente otimizou minhas capacidades, mas me fez reconhecer minhas limitações e o que eu ainda preciso continuar trabalhando.

Ao Projeto *Electrospun Nanofibers Smart Textile Products for Industry Innovation*. Edital Chamada n. 71/2013 MEC/MCTI/CAPES/CNPq/FAPs e Projeto PVE 407369/2013-9 e a todos os contribuintes, que fazem da Universidade um espaço de pesquisa e formação de conhecimento.

“Somos condenados a escolher, e cada escolha traz o risco de uma perda irreparável. Felizes os que vivem sob disciplina que aceitam sem questionar, que obedecem espontaneamente às ordens de seus líderes, espirituais ou temporais, cuja palavra aceitam como lei infrangível; igualmente felizes os que, através de seus próprios métodos, chegaram a convicções claras e inabaláveis com relação ao que fazer e o que ser, sem a menor sombra de dúvida. Só posso dizer que os que se instalam nesses confortáveis leitos do dogma são vítimas de uma miopia auto-imposta, antolhos que podem trazer contentamento, mas não a compreensão do que significa a humanidade do ser.”

Isaiah Berlin, 1991

RESUMO

O aprimoramento recente das técnicas que envolvem o desenvolvimento de nanofibras e o processo de eletrofição a partir de polímeros têm resultado em novos materiais com funcionalidade controlada e grande potencial de aplicação na área de biomédica. As membranas, comumente utilizadas em técnicas reconstrutivas, devem apresentar biocompatibilidade, permeabilidade seletiva, biodegradação controlada, estabilidade dimensional e permitir a adição de substâncias como antimicrobianos e bioestimuladores. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e analisar a atividade de membranas funcionalizadas com antibiofilme na prevenção da formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* em membranas eletrofiadas de PLGA. As nanofibras de PLGA foram preparadas com diferentes aditivos: óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (tea tree) e *Coffea canephora*, furan-2(5H)-ona e uma nova lactama sintética, em três diferentes concentrações progressivas (0.002, 0.004 and 0.008% w/v). As amostras de membranas foram caracterizadas por MEV, FTIR-ATR e CG-MS e expostas à culturas de *S. mutans*. Após 24 h e 48 h de incubação, determinou-se o crescimento planctônico por espectrofotometria e a formação de biofilmes foi avaliada por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC·ml⁻¹). A citotoxicidade dos novos biomateriais foi avaliada pelo ensaio de MTS, através da quantificação de células-tronco mesenquimais derivadas da placenta humana (CTMPs) viáveis, cultivadas sobre as membranas de nanofibras funcionalizadas. O MEV revelou características de morfologia, e membranas livre de *beads*. Os resultados de FTIR-ATR mostraram que não foram detectados resíduos de solventes nas membranas, mas os resultados de GC-MS mostraram que *N,N*-dimetilformamida e dimetilsulfóxido estavam presentes como resíduos nas membranas após a funcionalização. Os resultados da formação do biofilme indicaram uma redução significativa de ligação bacteriana às superfícies das membranas funcionalizadas (ANOVA e teste post-hoc de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$). Os resultados da citotoxicidade mostraram que as membranas funcionalizadas com furanona não demonstraram diferença estatística significativa na viabilidade celular em comparação com as membranas controle.

Palavras-chave: Inibidores de biofilme. Lactamas. Eletrofição. PLGA. Adesão bacteriana. *Streptococcus mutan*.

ABSTRACT

Membranes of various polymers have been studied and used in several fields. One of the applications that receive more attention of researchers is the medical area, in the search for biocompatible materials with differentiated properties. In this context, poly (lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) electrospun nanofibers have been studied as very promising materials for medical applications. One of these applications is related to the inhibition of biofilm formation in membrane surface. The aim of this work was to develop and analyze the activity of antibiofilm functionalized membranes in preventing *Streptococcus mutans* biofilm formation on PLGA electrospun membranes.

PLGA nanofibers were prepared with different additives: *Melaleuca alternifolia* (tea tree) and *Coffea canephora* essential oils, furan-2(5H)-one and a novel synthetic lactam, in three concentrations (0.002, 0.004 and 0.008% w/v). Membrane samples were characterized by SEM, FTIR-ATR, and CG-MS and exposed to *S. mutans* cultures. Following a 24 h and 48 h incubation period, planktonic growth was determined by spectrophotometry and biofilm formation was evaluated by colony forming units (CFU·ml⁻¹) counts. Cytotoxicity of the new biomaterials was assessed by MTS assay, through the quantification of viable placenta-derived stem cells (p-SCs) grown over the functionalized nanofibrous membranes. Observation of the electrospun membranes on SEM images revealed the smooth and bead-free morphology of the nanofibers. No solvent residues were observed by FTIR-ATR but the GC-MS results showed that *N,N*-dimethylformamide and dimethylsulfoxide were present as residues in the membranes after functionalization. Biofilm formation results exhibited a significant reduction in the bacterial attachment to the functionalized membrane surfaces (ANOVA and Tukey's post-hoc test with a significance level of $p < 0.05$). Cytotoxicity results showed that furan-2(5H)-one-functionalized membranes demonstrated no statistically significant difference in the cell viability compared to the control membranes.

indicating no influence on cell proliferation and a promise in prevention of biomaterial associated infections and provide tissue cell integration.

Keywords: Biofilm Inhibitors. Lactams. Electrospinning. PLGA. Bacterial adhesion. *Streptococcus mutans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Estrutura para furanona natural (1) e furanonas sintéticas (2a-g), lactamas sintéticas (3, 4) e furanan-2(5H)-ona (5).....	42
Figura 2– Imagens de MEV das membranas eletrofiadas por grupo: A) PLGA Controle, B) CCO-4, C) TTO-4, D) FUR-4, and E) LAC-4.....	47
Figura 3 – Espectros FTIR - ATR das amostras de eletrofiadas.....	49
Figura 4 – Quantificação de crescimento planctônico de <i>S. mutans</i> (TSB, 24 e 48 h a 37 °C).....	50
Figura 5 – Formação de biofilme de <i>S. mutans</i> (TSB, 48 h a 37 ° C) sobre superfícies de membranas de nanofibras, por unidades formadoras de colônias (UFC/ml) (ANOVA e teste post-hoc de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$).....	51
Figura 6 – Proliferação de células CTMPs em membranas de nanofibras após 2 dias de cultura celular (ANOVA e Tukey's post-hoc teste com um nível de significância de $p < 0,05$).....	52

LISTA DE QUADROS

Tabela 1 – Diâmetros característicos das fibras.....	48
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DMF	Dimelformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
TSB	Caldo Trípico de Soja
PBS	Tampão fosfato-salino
DO	Densidade Óptica
EDS	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia
MS	Espectrômetro de Massa
CG	Cromatografia gasosa
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
ATR	Modo de reflectância total atenuada
BHI	Infuso de cérebro-coração
d_{50}	Diâmetro Médio
OH-	Hidroxila
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
CO ₂	Dióxido de Carbono
PBS	Tampão fosfato salino
ATR	
ROG	Regeneração Ósseo Guiada
PGA	Ácido Poliglicólico
PLA	Ácido Polilático
QS	<i>Quorum Sensing</i>
PLGA	Ácido polilático co-glicólico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNA	Sódio
AHL	N-acil Homoserina lactona
AI-2	Auto-indutor 2
IC ₅₀	50% da concentração inibitória máxima
V	Volume
UFC	Unidade Formadora de Colônia
w/v	% massa por volume
UV	Radiação Ultravioleta
CH ₃	Metila
C=O	Carbonila
CH ₂	Metileno
C	Carbono

H	Hidrogênio
g/l	Gramas por litro
°C	Graus Celsius
m	Metro
µg	Micrograma
mg	Miligramas
mL	Mililitro
h	Horas
µL	Microlitro
min	Minutos
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
<	Menor
®	Marca Registrada
mL/h	Miligramas por hora
mL/min	Mililitro por minuto
RTG	Regeração Tecidual Guiada
mV	Milivolts
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
cm-1	Centímetros
kV	Kilovolts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	OBJETIVOS	27
1.1.1	Objetivo Geral.....	27
1.1.2	Objetivos Específicos.....	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1	ELETROFIAÇÃO	29
2.2	MICROBIOTA ORAL	30
2.3	BIOFILME-MICROBIOTA ORQUESTRADA.....	32
2.4	INIBIDORES DE QUORUM SENSING	34
3	ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	39
3.1	RESUMO.....	39
3.2	INTRODUÇÃO.....	40
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.4	RESULTADOS.....	47
3.5	DISCUSSÃO.....	52
3.6	CONCLUSÃO.....	54
3.7	REFERÊNCIAS.....	55
4	ARTIGO EM INGLÊS.....	61
4.1	ABSTRACT.....	61
4.2	INTRODUCTION.....	62
4.3	MATERIALS AND METHODS.....	64
4.4	RESULTS.....	68
4.5	DISCUSSION.....	74
4.6	CONCLUSION.....	77
4.7	REFERENCES.....	78
5	REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

Nanofibras poliméricas podem ser processadas por um grande número de métodos, incluindo a separação de fase, estiramento mecânico, contra moldagem, auto moldagem e, por fim, a eletrofiação. O processo de eletrofiação, em especial, ostenta significativo potencial comercial devido a sua metodologia de baixo custo, produzindo nanofibras a partir de uma grande variedade de materiais, de forma reprodutível e de fácil construção. As nanofibras têm sido empregadas em muitas áreas e confeccionadas à base de polímeros naturais, únicos ou em sistema de blendas poliméricas, impregnados de nanopartículas ou medicamentos, e precursores cerâmicos (RAMAKRISHNA *et al.*, 2005).

A definição de nanofibras, contextualizado em âmbito têxtil, são de fibras com diâmetros inferiores a 500 nm, onde se encontram os nanotubos e nanopartículas. O reduzido diâmetro e morfologia das fibras resultam em grande área superficial, poros de tamanho reduzido e estrutura em escala nanométrica, com uma vasta possibilidade de funcionalização, fazem das nanofibras eletrofiadas promissoras a uma grande gama de aplicações (RAMAKRISHNA *et al.*, 2006).

O aprimoramento recente das técnicas que envolvem o processo da eletrofiação a partir de polímeros tem contribuído com o desenvolvimento crescente de pesquisas na área da funcionalidade controlada e, conseqüentemente, em um grande potencial de aplicação destas nanofibras eletrofiadas, inclusive na área de biomédica. Agentes reparadores de tecidos e órgãos, arcabouços celulares, vetores de liberação de fármacos e terapias, implantes biocompatíveis e biodegradáveis, produtos de diagnóstico e instrumentação, protetores contra agentes infecciosos e membranas envolvidas em técnicas regenerativas, são alguns exemplos (SPASOVA *et al.* 2007; COREY *et al.*, 2008; INANÇ *et al.*, 2009).

No âmbito odontológico, o sucesso de um tratamento reabilitador através de próteses dentárias sobre implante depende em grande parte da quantidade óssea existente nos sítios de instalação dos mesmos. No entanto, uma grande parcela dos casos apresentam dimensões ósseas insuficientes devido às reabsorções, injúrias ou trauma na região (CHIAPASCO, 2009). Logo, o emprego de técnicas reconstrutivas, como a da Regeneração Óssea Guiada (ROG), faz-se necessário. Nesses casos, a utilização de uma barreira física tecidual é empregada para proporcionar migração celular seletiva, evitando a invasão de fibroblastos nos sítios de cicatrização, de modo a alcançar a almejada

formação óssea (DAHLIN *et al.*, 1988; SALONEN; PERSSON, 1990).

As membranas, comumente utilizadas como barreira física tecidual nas técnicas reconstrutivas, devem apresentar características como: biocompatibilidade, permeabilidade seletiva, biodegradação controlada, estabilidade dimensional e rigidez adequadas para funcionar como mantenedora de espaço, facilidade de manejo cirúrgico, além de permitir a adição de substâncias como antimicrobianos e bioestimuladores (RETZEPI; DONOS, 2010).

Os ácidos poliláticos (PLA) possuem biocompatibilidade, alta resistência, comportamento termoplástico, e degradação lenta. O ácido poliglicólico (PGA) exibe boas propriedades mecânicas e seu principal uso é como material de suporte. Sabendo-se que a combinação de polímeros permite melhorar as propriedades físicas e químicas das membranas, mostrando-se como uma boa alternativa para a obtenção de um material com as propriedades desejadas, o ácido polilático coglicólico (PLGA), uma combinação do ácido polilático e poliglicólico, torna-se uma opção adequada para o uso em procedimentos reconstrutivos (GENTILE *et al.*, 2014).

O sucesso de qualquer tratamento regenerativo/reconstrutivo depende de um processo de cicatrização livre de infecções. A adesão e colonização bacteriana podem resultar no desenvolvimento de infecção e consequente falha do tratamento regenerativo. Como forma de tratamento, os agentes antimicrobianos reduziram significativamente a carga de processos infecciosos, porém esse progresso tem sido ameaçada pela crescente incidência de resistência microbiana aos antibióticos (CEGELSKI *et al.*, 2008; CONSTERTON, 1999; BARCZAK; HUNG, 2009; RASKO; SPERANDIO, 2010).

A resistência microbiana aos antibióticos convencionais desencadeou uma nova demanda em busca de estratégias no controle microbiano, essencialmente as que favoreçam terapias dirigidas contra a aderência bacteriana, a substratos bióticos e abióticos, em detrimento daquelas dirigidas contra a viabilidade dos microrganismos. Essas estratégias, ditas não convencionais, associam a vantagem de tratar infecções em seus estágios iniciais, como adesão e maturação bacteriana, ao baixo risco de indução de resistência ao tratamento na população-alvo (SUBRAMANI *et al.*, 2009)

1.1 OBJETIVOS

Com base no que foi discutido e dando continuidade a trabalhos anteriormente desenvolvidos, propõe-se como objetivos o seguinte:

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento de membranas de nanofibras de PLGA, por eletrofição, com a incorporação de antibiofilmes, visando propósitos terapêuticos contra a colonização bacteriana sobre materiais biomédicos.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Eletrofiar membranas de PLGA/ DFM/ aditivos utilizando parâmetros de eletrofição ideais ao objetivo proposto;
2. Incorporar os compostos antibiofilme em 3 concentrações progressivas (0.002, 0.004 e 0.008 % w/v);
3. Caracterizar físico e quimicamente as melhores membranas poliméricas de PLGA com propriedade antibiofilme;
4. Analisar o potencial de inibição e adesão de biofilme, bem como a influência no crescimento planctônico bacteriano das membranas bioativas;
5. Avaliar, por meio de análises *in vitro* (viabilidade celular), a resposta celular de células tronco derivadas de placenta humana frente às membranas antibiofilme de PLGA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ELETROFIAÇÃO

Dentre os métodos para gerar nanoestruturas em formato de fibras, a eletrofiação fornece a abordagem mais simples na aquisição de nanofibras longas, com diâmetro uniforme e composição diversificada. Contudo, é imprescindível o domínio de cada sistema em estudo, bem como as melhores condições de processamento de cada um em questão. Portanto, dominar o processo e as variáveis do mesmo é fundamental para se conseguir bons resultados.

O termo eletrofiação deriva de fiação eletrostática, e seu uso é relativamente recente (início da década de 90); porém, a idéia fundamental foi gerada há aproximadamente 80 anos atrás. Formhals publicou uma série de patentes, descrevendo os fundamentos experimentais para produção de filamentos poliméricos usando força eletrostática. Reneker e Chun, na década de 1990, retomaram o interesse nesta tecnologia, mostrando a possibilidade de fiação de uma gama de soluções poliméricas nos anos 90 (FRENOT & CHRONAKIS, 2003).

A eletrofiação pode ser aplicada a uma gama de polímeros que são convencionalmente fiados como poliamidas, poliésteres e acrílicos bem como biopolímeros como proteínas, DNA, polipeptídeos e polissacarídeos.

Os acessórios básicos de um aparato de eletrofiação incluem:

- 1: Um tubo capilar acoplado à uma agulha de diâmetro reduzido;
- 2: Gerador fonte de alta voltagem;
- 3: Coletor metálico.

O processo baseia-se em um eletrodo conectado à fonte de alta voltagem que se estende até o tubo capilar contendo a solução polimérica; enquanto que, outro eletrodo é fixado em um coletor de metal, normalmente uma placa de cobre ou de alumínio. O tubo capilar e o coletor são geralmente mantidos a uma pequena distância um do outro e, durante os ensaios, a solução de polímero é forçada a escoar pelo êmbolo da seringa até a agulha, por gravidade ou por pressão de uma bomba dosadora no êmbolo. Inicialmente, como resultado da tensão de superfície, uma gota da solução fica pendente na ponta da agulha, com uma carga líquida diferente de zero devido à ação do campo elétrico. Por sua vez, cargas de repulsão, na superfície do coletor, causam uma força diretamente oposta a tensão de superfície.

Com o aumento do campo elétrico a valores críticos, as forças

eletrostáticas superam a tensão superficial dando origem a um jato cônico do fluido que é ejetado, conhecido como cone de Taylor. Ao contrário do processo convencional de fiação, o jato é estável somente próximo da ponta da agulha; depois disso, o jato apresenta instabilidade à caminho do coletor, com carga elétrica oposta. No tempo entre a saída da seringa e o depósito no coletor, o solvente apropriado evapora e fibras secas são depositadas. O alinhamento das fibras pode-se ser variável, apresentando configurações regulares ou irregulares, em distintos graus de ordem e direção (SCHIFFMAN & SCHAUER, 2008).

Embora o princípio da eletrofiação consista em uma técnica um tanto quanto simplória, o processo em si mantém considerável complexidade tomado em consideração o número de parâmetros que influenciam o formato, o diâmetro e as dimensões da fibra resultante. Nanofibras com características ideais ostentam diâmetros com valores estáveis, superfície da fibra livre de defeitos ou com defeitos controláveis associada à nanofibras contínuas.

Dentre os muitos parâmetros que podem influenciar a transformação das soluções poliméricas em nanofibras, podemos diferenciá-los em parâmetros envolvidos nas condições de processo, propriedades da solução e parâmetros ambientais. A solução pode alternar vários fatores, tais como viscosidade, condutividade elétrica e tensão de superfície. Já as condições de processo, sofrem influência da força do campo elétrico aplicado, a distância entre a agulha e o coletor, e a taxa de vazão da solução polimérica. Dentre os parâmetros ambientais podemos citar a temperatura da solução, umidade e velocidade do ar (HUANG *et al.*, 2003).

2.2 MICROBIOTA ORAL

O ambiente bucal assemelha-se a outros habitats do corpo humano, especialmente por apresentar uma microbiota característica. A composição e atividade das distintas comunidades microbianas são ditadas mediante as condições ambientais específicas (FAUST *et al.*, 2012).

A microbiota cresce nas superfícies orais como comunidades metabolicamente organizadas de espécies que interagem entre si, intitulado-se de biofilme (ZIJNGE *et al.*, 2010). As propriedades dessas comunidades de biofilme distinguem-se não somente pela síntese dos organismos ali presentes. Tais comunidades apresentam-se em equilíbrio dinâmico com o ambiente e, são passíveis de um significativo rearranjo, tanto na composição quanto na atividade

metabólica, em resposta à mudanças na biologia oral e no estilo de vida do indivíduo (CRIELAARD *et al.*, 2011).

Embora inúmeras variações referentes à microbiota possam ser encontradas, um microbioma oral foi proposto e inclui representantes dos seguintes gêneros: *Streptococcus*, *Veillonella*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* (ZAURA *et al.*, 2009). Tal composição diversa, ostentando consistentes diferenças, deve-se às variações nas propriedades ambientais.

A microbiota residente depende de moléculas hospedeiras complexas, tais como proteínas e glicoproteínas para nutrição. Estas são catabolisadas por comunidades bacterianas, de forma orquestrada e sequencial, resultando no estabelecimento de inúmeras interdependências nutricionais (MARSCH *et al.*, 2014).

Bactérias encontradas nas fissuras oclusais, por exemplo, são predominantemente Gram positivas (especialmente *Streptococci*), facultativamente anaeróbias e metabolizam açúcares provenientes da dieta do hospedeiro.

Já, o biofilme gengival saudável contém muitas espécies Gram-negativas e, obrigatoriamente anaeróbicas, com metabolismo proteolítico, que sofrem influência principal do fluído crevicular gengival. Essa distribuição é uma evidência de que a composição e o metabolismo da microbiota em um determinado sítio é sensível e responsiva ao ambiente oral, e mais ainda, que existe relação dinâmica entre ambos (MARSCH *et al.*, 2014).

Como em outros habitats do corpo humano, a relação entre a microbiota oral e o hospedeiro estabelece-se a partir de vínculos mutualista. Os microrganismos são mantidos em ambiente que dispõe de ampla matriz diversificada de moléculas nutritivas, e os mesmos, por sua vez, fornecem benefícios para o hospedeiro. Existem evidências de comunicação ativa entre algumas das bactérias residentes e as células hospedeiras. Porém, os mecanismos biológicos precisos envolvidos no determinado "crosstalk" ainda estão sendo determinados (SMITH & GARRET, 2011; IVANOV & HONDA, 2012).

Algumas bactérias regulam a implantação, atividade e performance de células do sistema imune do hospedeiro, enquanto outras promovem uma resposta inflamatória "controlada". Tal reação ameniza respostas pró-inflamatórias potencialmente prejudiciais à microbiota oral residente enquanto poupa o hospedeiro, mantendo sua habilidade de responder a insultos microbianos genuínos (COSSEAU *et al.*, 2008).

A microbiota oral residente contribui para o sistema de defesa do hospedeiro, impedindo o estabelecimento de muitos microrganismos exógenos que o hospedeiro mantém contato em uma base diária. Essa "resistência à colonização" é consequência da microbiota oral natural estar melhor adaptada, apresentando metabolização mais eficiente dos nutrientes disponíveis e produção de fatores inibitórios, assim propiciando ambientes hostis que restringem a colonização por invasores microbianos em potencial (MARSCH *et al.*, 2014).

2.3. BIOFILME – MICROBIOTA ORQUESTRA

O processo inicial de aderência bacteriana ocorre de forma organizada: minutos após a higiene bucal, forma-se a película adquirida nas superfícies – dentes, implantes ou nas membranas, quando expostas. Em uma etapa seguinte à formação da película adquirida, as células bacterianas que estavam reversivelmente fixadas à superfície, se unem irreversivelmente a ela e passam a secretar a matriz extracelular que irá estruturar o biofilme. Novas bactérias planctônicas são recrutadas e incorporadas ao biofilme, embebidas em uma matriz altamente hidratada de exopolímeros bacterianos e se proliferam até adquirirem a forma de microcolônias aderidas. Após a maturação do biofilme, algumas bactérias da periferia passam do estado sésil para o estado flagelar móvel, possibilitando a colonização de um novo ambiente (LISTGARTEN, 1972; LISTGARTEN; MAYO; TREMBLAY, 1975; LISTGARTEN, 1976).

Biofilmes estabelecem-se como estruturas complexas e mais tolerantes aos inibidores, pois além da penetração restrita de agentes em suas camadas mais internas, taxa de crescimento lento e um fenótipo alterado da superfície, ele conta com suporte adicional, a proteção cruzada de células vizinhas. Estudos mostram que bactérias organizadas em biofilmes são capazes de sobreviver ao tratamento com antibióticos em concentrações até milhares de vezes maiores que a concentração mínima inibitória determinada para culturas das mesmas bactérias em suspensão (CERI *et al.*, 1999).

Em um biofilme, as bactérias podem atuar como uma entidade multicelular quando um determinado nível populacional é atingido. A percepção dessa densidade populacional pelas bactérias é resultado de uma comunicação intercelular, mediada pela produção de sinais moleculares sintetizados pelas células individualmente, chamados de autoindutores detectados por receptores específicos. Esta comunicação permite às células bacterianas regular a expressão de conjuntos de

genes especializados em resposta à densidade celular (DAVIES, 2003; HALL-STOODLEY *et al.*, 2004). Quando o nível crítico populacional é atingido, caracterizando um “quorum”, as bactérias passam a agir em grupo como um único organismo multicelular (DAVIES, 2003). Este mecanismo ficou conhecido como “*Quorum Sensing*” (QS) (CHA *et al.*, 1998).

O comportamento coletivo pode trazer vantagens, como por exemplo, a possibilidade de migração para ambientes com melhor oferta de nutrientes e a adoção de novos modelos de crescimento, tais como esporulação ou formação de biofilmes, o que propicia proteção contra os efeitos deletérios do ambiente e potencializa consideravelmente sua patogenicidade (RICHARDS & MELANDER, 2009).

A microbiologia tradicionalmente centra-se na identificação de espécies presentes em uma amostra através de espécimes representativas selecionadas em uma amostra. Estas são, então cultivadas em uma cultura de crescimento planctônico para avaliar o espectro de atividade dos agentes antimicrobianos, recorrendo à leitura do halo inibidor convencional. A aplicação de novas abordagens moleculares para compreender e definir a diversidade e o metabolismo da microbiota bucal está começando a desafiar esse panorama.

O projeto Microbioma Humano tem caracterizado, através de metagenomas, a microbiota em inúmeros sítios no corpo humano, e através dele foi possível constatar um grau de heterogeneidade na taxa individual de perfis microbiológicos coletados em todos os sítios, inclusive no habitat bucal. Porém, as amostras analisadas em termos de funções bioquímicas demonstraram significativo grau de consistência. Pode-se, logo, inferir que diferentes espécies podem desempenhar funções idênticas em uma comunidade microbiana. Portanto, a caracterização microbiológica buscando agentes antimicrobianos devem priorizar a inibição de funções metabólicas centrais, em detrimento de investigação de espécies bacterianas específicas (MARSCH *et al.*, 2014).

Evidências compararam a microbiota em biofilmes de sítios saudáveis e sítios que apresentavam cárie dentária ou doenças periodontais, e comprovaram a existência de diferenças substanciais na composição da microbiota em processo de doença. Através da biologia molecular, se confirmou que muitas das bactérias associadas à doença são passíveis de serem encontradas em biofilmes em sítios saudáveis, contudo, em número e frequência clinicamente irrelevantes. Logo, a doença constitui-se no desequilíbrio da composição do biofilme, muito mais do que no resultado de infecção exógena (MARSCH *et al.*, 2014).

Um princípio-chave defendido por Marsch (2014) é que a doença pode ser controlada não dando ênfase direta aos patógenos putativos, mas sim também interferindo nas pressões ambientais que selecionam os microrganismos patogênicos, conduzindo assim a quadros de disbiose. Marsh ainda advoga o "*control without killing*", no qual agentes antimicrobianos em concentrações subletais podem alvejar fatores de virulência do micro-organismos sem, de fato, exercer efeito bactericida.

Os antibióticos convencionais visam o crescimento e os processos vitais basais das bactérias, levando à inibição do crescimento e à morte celular. A força seletiva que está inerentemente ligada a este modo de ação, eventualmente seleciona variantes resistentes aos antibióticos. A alternativa mais óbvia à ação mediada por antibióticos seria atenuar as bactérias no que diz respeito a sua patogenicidade, através da interferência no processo de QS, onde agentes teriam como alvo o bloqueio/interrupção do processo químico de mediação bacteriana em detrimento da destruição dos patógenos. Uma vez que tais agentes não destroem os patógenos diretamente, mas sim reduzem a população de bactérias resistentes por perturbar a organização do biofilme, evitando e/ou revertendo o desenvolvimento de resistência bacteriana à droga, são capazes de reduzir a mortalidade e virulência, assim como promover a eliminação de bactérias em modelos experimentais de infecção (HENTZER;GIVSKOV, 2003; RASMUSSEN; GIVSKOV, 2006).

2.4 INIBIDORES DE QUORUM SENSING

Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas utilizam circuitos de comunicação de sensores de *quorum sensing* para diversas atividades fisiológicas. Estes processos incluem simbiose, virulência, conjugação, produção de antibióticos, motilidade, esporulação e formação de biofilmes. Em geral, as bactérias Gram-negativas utilizam N-acil homoserina lactonas (AHL) como autoindutores, ao passo que bactérias Gram-positivas usam peptídios para se comunicar. Os avanços recentes indicam que a comunicação célula-célula através de autoindutores ocorrem tanto intra como interspécies bacterianas.

Além disso, há dados sugerindo que os autoindutores bacterianos induzem respostas específicas de organismos hospedeiros. Apesar da natureza dos sinais químicos, dos mecanismos de transmissão de sinal e genes envolvidos no *quorum sensing* bacteriano diferirem, em geral, a habilidade de se comunicar permite que as bactérias coordenem a expressão gênica e, portanto, o comportamento, de toda uma comunidade (MILLER & BASSLER, 2001).

A interrupção do QS pelos inibidores ocorre por meio da repressão da geração do sinal, do bloqueio dos receptores de sinais ou da degradação destes sinais.

Diferentemente dos antibióticos, os inibidores de QS não matam os patógenos diretamente, apenas atuam na repressão, bloqueio e/ou degradação dos sinais moduladores, interferindo conseqüentemente na virulência dessas bactérias. Isto implica em uma redução da pressão de seleção e em menor possibilidade de desenvolvimento de resistência por parte das bactérias (REN *et al.*, 2001).

Os primeiros exemplos de compostos bloqueadores de QS provieram do ambiente marinho. Foi demonstrado por Nys *et al.* (1993) que a macroalga australiana, *Delisea pulchra*, produz uma gama de furanonas halogenadas, as quais são depositadas à superfície em uma concentração onde regulam a colonização bacteriana e o estabelecimento de epibiotas. Esta compreensão biológica levou à aplicação de furanonas como inibidores de biofilmes bacterianos.

Givskov *et al.* (1996) e Kjelleberg *et al.* (1997) ofereceram a primeira demonstração de que esses metabólitos secundários inibem especificamente o QS bacteriano através da interferência em uma das principais vias reguladoras do mesmo, a relativa à AHL em bactérias Gram-negativas. Concomitantemente, o composto também interfere no sistema alternativo de sinalização QS, o AI-2 em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (MANEFIELD *et al.*, 2002; NYS *et al.*, 2006).

Uma vez que as furanonas naturais são incapazes de interferir em todos os mecanismos envolvidos no QS eficientemente, e apresentarem resultados de citotoxicidade questionáveis, uma série de análogos sintéticos têm sido fabricados na busca de suprir determinadas carências. Uma análise estrutural/funcional de várias furanonas com comprimento de cadeia lateral variável e substituições no anel de furanona indicou que os compostos sem cadeias laterais, mas com substituintes eletronegativos no anel de furanona, eram eficazes na inibição dos sistemas QS (HENTZER *et al.*, 2002; MANEFIELD *et al.*, 2002). Entre estes, os compostos C-30 (HENTZER *et al.*, 2003) e C-56 (HENTZER *et al.*, 2002) mostraram potencial inibidor de QS. Entre 93 genes, 1,7% do genoma de *P. aeruginosa* são significativamente afetados pela presença de furanona C-30, dos quais 80% são controlados por QS (HENTZER *et al.*, 2003).

Dadas suas propriedades na inibição na formação de biofilme oral, Weng (2012) realizou a incorporação de 3,4-dicloro-5-(1,3-etileno-glicolato glicerol metacrilato)-2-furanona em cimentos de alta

resistência experimental à compressão. A análise dos resultados microbiológicos mediante sua atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus sp.*, assim com a avaliação de viabilidade em células pulpares humanas foram significativamente promissores. A incorporação de furanona garantiu biocompatibilidade simultaneamente a significativa taxa de ação antibiofilme em presença de saliva, permanecendo ativa durante os 30 dias do estudo (WENG *et al.*, 2012).

Dentre esses compostos com composição química semelhante à furanonas sintéticas, estão as lactamas. A composição química desses compostos difere pelo fato de as lactamas apresentarem um átomo de oxigênio próximo à carbonila, enquanto as furanonas, o átomo próximo ao anel central é de nitrogênio. (Hentzer & Givskov, 2003; Manefield *et al.*, 2002). Estudos recentes têm mostrado que lactamas sintetizadas a partir de análogos de rubrolídeos, cuja estrutura se assemelha à de furanonas, são ativas contra a formação de biofilme de *Enterococcus faecalis*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, e *Streptococcus mutans* (PEREIRA *et al.*, 2014a; PEREIRA *et al.*, 2014b; XAVIER *et al.*, 2016).

Lactamas sintéticas, obtidas a partir de ácido mucobrómico e convertido através de uma lactamização para (Z)- e (E)- γ -alkylidene- γ -lactams, foram caracterizadas por ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C) e avaliadas conforme sua capacidade antibacteriana na presença de *Enterococcus faecalis*. Sua maior performance de atividade de inibição de biofilme foi alcançado pelo composto corresponde à lactama 13f (IC₅₀= 0,76 $\mu\text{g/ml}$), assim estabelecendo potencial e diretrizes, inclusive para o estudo em questão, no desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas direcionados para a inibição de QS e, conseqüentemente, estágios iniciais de infecções bacterianas (PEREIRA *et al.*, 2014a).

Compostos inibidores de QS provenientes de origem natural fitoterápica também têm sido relatados na literatura (BJARNSHOLT *et al.*, 2005; RASMUSSEN *et al.*, 2005a). Extratos provenientes de *Malaleuca Alternifolia* (tea tree) demonstraram uma atividade de inibição da formação do biofilme significativa contra *P. Gingivalis* e *S. mutans* (TAKARADA *et al.*, 2004).

Já extratos de *Coffea Canephora* mostraram-se capazes de afetar a capacidade de *S. mutans* de formar biofilme estável *in vitro* e favorecer a dispersão de bactérias aderidas ao biofilme a partir das 24 horas, sem, contudo, ostentar propriedades bactericidas (STAUDER, 2010).

Com base no que foi discutido, objetiva-se o desenvolvimento de membranas de nanofibras de PLGA, por eletrofiação, com a incorporação de antibiofilmes, visando propósitos terapêuticos contra a colonização bacteriana sobre materiais biomédicos.

3 ARTIGO EM PORTUGUÊS

FUNCIONALIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE NANOFIBRAS DE PLGA COM COMPOSTOS ANTIBIOFILMES

3.1 RESUMO

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi desenvolver e analisar a atividade de membranas funcionalizadas com antibiofilme na prevenção da formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* em membranas eletrofiadas de PLGA.

Materiais e Métodos: As nanofibras de PLGA foram preparadas com diferentes aditivos: óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (tea tree) e *Coffea canephora*, furan-2(5H)-ona e uma nova lactama sintética, em três diferentes concentrações progressivas (0.002, 0.004 and 0.008% w/v). As amostras de membranas foram caracterizadas por MEV, FTIR-ATR e GC-MS e expostas à culturas de *S. mutans*. Após 24 h e 48 h de incubação, determinou-se o crescimento planctônico por espectrofotometria e a formação de biofilmes foi avaliada por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC·ml⁻¹). A citotoxicidade dos novos biomateriais foi avaliada pelo ensaio de MTS, através da quantificação de células-tronco mesenquimais derivadas da placenta humana (CTMPs) viáveis, cultivadas sobre as membranas de nanofibras funcionalizadas.

Resultados: O MEV revelou características de morfologia, e membranas livre de *beads*. Os resultados de FTIR-ATR mostraram que não foram detectados resíduos de solventes nas membranas, mas os resultados de GC-MS mostraram que *N,N*-dimetilformamida e dimetilsulfóxido estavam presentes como resíduos nas membranas após a funcionalização. Os resultados da formação do biofilme indicaram uma redução significativa de ligação bacteriana às superfícies das membranas funcionalizadas (ANOVA e teste post-hoc de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$). Os resultados da citotoxicidade mostraram que as membranas funcionalizadas com furanona não demonstraram diferença estatística significativa na viabilidade celular em comparação com as membranas controle.

Conclusão: Em conjunto, os resultados apresentados indicam que as membranas desenvolvidas mostram um bom potencial para o

desenvolvimento de biomateriais com atividade na prevenção de infecções associadas e compatibilidade para uma maior integração tecidual.

Palavras-chave: Biofilmes bacterianos; lactama; eletrofiliação, PLGA, funcionalização de biomateriais, tea tree, furanona.

3.2 INTRODUÇÃO

A infecção bacteriana é considerada uma das complicações mais graves associadas aos biomateriais implantados e, conseqüentemente, à perda de implantes [1], [2]. No caso da cavidade oral, o processo de formação do biofilme ocorre de forma seqüencial, com colonizadores primários aderindo aos receptores de glicoproteína presentes na película adquirida minutos após a limpeza [3]. *Streptococci* e *Actinomyces* são os principais colonizadores iniciais da superfície oral [4] e durante as primeiras horas de formação de biofilme, a microbiota precoce é dominada por *Streptococci* [5]. O biofilme desenvolve-se sobre o filme de condicionamento através das seguintes etapas: (1) transporte de colonizadores primários para a superfície; (2) adesão inicial fraca e reversível resultante de interações químicas entre micro-organismos e superfície; (3) adesão forte de microrganismos à superfície, estabelecida por interações específicas (ligações covalentes, iônicas ou de hidrogênio); (4) maturação, resultando no crescimento e maturação do biofilme [6].

Uma vez que a adesão bacteriana inicial ocorre, a colonização de bactérias desenvolve-se em um biofilme protetor maduro muitas vezes levando à remoção do implante e a exigência de tratamentos prolongados [7]. Isso se deve principalmente ao fato de que, quando organizados em biofilmes, as bactérias são capazes de sobreviver aos tratamentos tradicionais com antibióticos em concentrações até mil vezes maiores do que aquelas utilizadas para matar suas contrapartes planctônicas [8], o que enfatiza a necessidade de desenvolver terapias visando a inibição da formação de biofilmes. As terapias convencionais com antibióticos sistêmicos utilizadas no controle de biofilmes diminuem os sintomas de infecção eliminando a população microbiana planctônica circulante, embora permaneçam ineficazes contra as que estão enterradas dentro da matriz extrapolimérica do biofilme. Embora as estratégias para inibir a adesão bacteriana inicial para prevenir a infecção sejam extremamente importantes, as membranas eletrofiadas podem proporcionar uma condição de suporte para adesão e proliferação

das células devido às semelhanças nas propriedades físicas e na estrutura do tecido humano.

Muitas bactérias são conhecidas por regularem suas atividades cooperativas, como a formação de biofilmes, através de um mecanismo chamado *quorum sensing* (QS), no qual as células bacterianas se comunicam entre si liberando, detectando e respondendo a pequenas moléculas de sinal difusíveis. A comunicação intra e interbacteriana que resulta em expressão de genes coordenada e leva a um "comportamento comunitário" de bactérias são fenômenos comuns na natureza. Diferentes moléculas de sinalização são responsáveis por essa comunicação; Mas aqueles na classe de N-acil homoserina lactonas (AHL) são os mediadores ou autoindutores mais comuns da expressão de genes regulados por QS em bactérias.

A regulação genética da densidade celular bacteriana tem importância significativa em várias relações ecológicas envolvendo bactérias, desde sua patologia contra plantas, animais e seres humanos, bem como na comunicação entre procariontes e células eucariotas [12], [13]. A manipulação de QS também pode ser uma ferramenta eficiente para modificar as comunidades microbianas, melhorar as estratégias de proteção e curar doenças bacterianas [13], [14]. Uma vez que o seu objetivo é reduzir a virulência e não a sobrevivência bacteriana, a inibição do QS pode controlar a patogenicidade, evitar a resistência aos antibióticos e a formação de biofilmes nas infecções sistêmicas e locais. Portanto, a repressão da expressão de fenótipos regulados por QS aparece como uma estratégia alternativa promissora à terapia antibiótica convencional para o controle de infecções microbianas.

Vários estudos demonstraram que o uso de inibidores de QS pode ser muito eficaz no controle do biofilme. Várias furanonas já foram utilizadas com sucesso para a inibição da adesão bacteriana [18] - [21]. No entanto, uma série de compostos sintéticos e naturais de algas, fungos e outros organismos que demonstraram atividade inibitória de QS têm pouco ou nenhum valor terapêutico devido à sua natureza instável ou toxicidade associada. Por conseguinte, os esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de compostos inibidores QS seguros e eficazes tanto sintéticos como a partir de fontes naturais, particularmente plantas medicinais, especiarias e frutos, esponjas e algas [22].

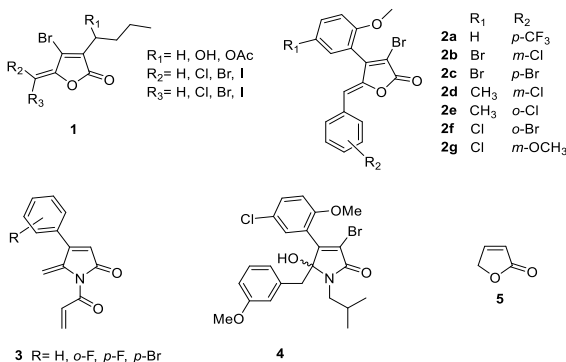


Fig 1. Estrutura para furanona natural (**1**) e furanonas sintéticas (**2a-g**), lactamas sintéticas (**3, 4**) e furanan-2(5H)-ona (**5**).

Estudos recentes sugerem que óleos essenciais como *Coffea canephora*, *Malaleuca alternifolia* (*tea tree*) e *Cinnamomum verum* (canela) poderiam interferir com este mecanismo [23] - [25]. Kahn *et al.* estudou 21 óleos essenciais e avaliou sua atividade anti-QS usando a bactéria *Chromobacterium violaceum* [26]. Os autores mostraram que quatro óleos essenciais, *Cinnamomum verum* (canela), *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Syzygium aromaticum* (cravo) e *Mentha piperita* (hortelã-pimenta) mostram atividade anti-QS. Husain *et al.* estudaram a influência do óleo de hortelã no mecanismo QS. Os autores mostraram que o mentol (presente no óleo de *peppermint*) em concentrações inferiores à concentração inibitória mínima interferiu fortemente com as moléculas de sinalização da N-acil homoserina lactona que regula os fatores de virulência e a formação de biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila*.

Neste estudo, desenvolvemos membranas eletrofiadas, composta de fibras alinhadas aleatoriamente, com permeabilidade seletiva a partir de ácido polilático-co-glicólico (PLGA), e as funcionalizamos com compostos inibidores de biofilme em diferentes concentrações de acordo com estudos anteriores: óleos essenciais de *Tea tree* e *C. canephora*, γ -hydroxy- γ -lactama (**4**) e furan-2(5H)-ona (**5**) (Fig.1). PLGA foi escolhido devido à sua ampla gama de aplicações como biomaterial sua biocompatibilidade, propriedades mecânicas e biodegradabilidade [29].

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Materiais das nanofibras

O PLGA utilizado foi PURASORB PLG 8218. O óleo essencial de *Malaleuca Alternifolia* (tea tree) (Desertessence®) foi adquirido no mercado local e utilizados como recebidos. O óleo essencial de *Coffea canephora* foi preparado pelo grupo de Gurerreiro Filho e utilizado como recebido. O composto de furan-2(5H)-ona (Sigma Aldrich®). Foram também utilizados o clorofórmio (Vetec®), a N,N-dimetilformamida (DMF) (Synth®) e o dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec®).

O composto Lactama **4** foi sintetizado e completamente caracterizado através de IR, ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C RMN) e espectrometria de massa [30]. Anteriormente a sua incorporação, o composto foi dissolvido em DMSO para uma concentração de 50 % (w/v).

3.3.2 Produção de membranas PLGA

Para a preparação das nanofibras PLGA foi primeiro solubilizado (10% w/v) numa solução contendo clorofórmio e N, N-dimetilformamida (95: 5 v/v) durante 8 h. Para cada agente a ser testado (óleos essenciais, lactama **4** e furan-2 (5H) -ona **5**, foi separada uma dada quantidade da solução de polímero (PLGA + clorofórmio + DMF) e os aditivos foram adicionados em diferentes concentrações a um volume final de 2 mL. As soluções foram colocadas em seringas de plástico (5,0 mL) e injetadas através de agulhas de aço inoxidável, conectadas a uma fonte de alimentação de alta tensão, usando uma tensão de 13 kV com um caudal de 2 mL h^{-1} . A distância entre a agulha e o coletor foram de 15 cm e o coletor foi composto de uma placa de metal retangular. Além das fibras que contêm os diferentes óleos, as mantas de PLGA também foram preparadas e utilizadas como referência (PLGA Controle). As concentrações e os códigos para as amostras utilizadas neste estudo são: CCO-2, CCO-4 e CCO-8 (óleo de *C. canephora* a 0,002, 0,004 e 0,008 w/v, respectivamente), TTO-2, TTO-4 e TTO-8 (para óleo de *M. alternifolia* - a 0,002, 0,004 e 0,008% w/v, respectivamente), FUR-2, FUR-4 e FUR-8 (para furan-2 (5H) -ona **5** a 0,002, 0,004 e 0,008% w/v) e LAC-2, LAC-4 e LAC-8 (para a lactama **4** a 0,002, 0,004 e 0,008% w/v).

3.3.3 Estirpes bacterianas e condições de crescimento

O *S. mutans* ATCC 25175 foi cultivado sob condições microaerofílicas durante 48 h a 37 ° C em placas de ágar, de infusão de cérebro e coração (BHI) (Bacto®, Difco), suplementado com 3 g / l de extrato de levedura (Bacto® Difco) e 200 g / l de sacarose (Bacto®, Difco, EUA). Para os ensaios de biofilme, as células de *S. mutans* foram inoculadas em Caldo de Soja Tríplico (TSB) (Bacto®, Difco) suplementado com 3 g/ l de extrato de levedura e 200 g / l de sacarose e incubadas durante 18 h a 37 ° C. Após incubação, as células foram colhidas por centrifugação a 5000 rpm durante 10 min, a 4 ° C e lavadas duas vezes numa solução tampão fosfato (PBS).

3.3.4 Formação e análise de biofilme

Após crescimento, seguindo as condições acima descritas, as células de *S. mutans* foram ressuspensas em meio de TSB suplementado com mucina (2,5 g/l), peptona (5 g/l), ureia (1 g/l), extrato de levedura (2 g/l) e sacarose (200 g/l), para se obter uma suspensão com uma densidade óptica (DO₆₃₀) de 0,6, correspondendo a aproximadamente 1×10^8 CFU / ml. A DO₆₃₀ foi medida utilizando um espectrofotômetro (BioTek®, EUA) [31], [32].

As membranas eletrofiadas foram cortadas para adequarem-se à placa de 24 poços e esterilizadas sob radiação UV durante 12 horas. Amostras de membranas nanofibras esterilizadas foram colocadas em placas de 24 poços contendo 2 ml de suspensão de *S. mutans* em meio TSB, e incubadas durante 48 h a 37 °C, sob condições microaerofílicas. Foram utilizados 200 µl destas culturas para quantificar o crescimento planctônico por determinação de DO₆₃₀ num leitor de microplacas (BioTek®, EUA).

Esta concentração de inoculação foi escolhida de acordo com estudos preliminares para determinar a concentração que produziria o biofilme estruturado e robusto no período em que nosso estudo foi realizado. Antes da amostragem, as amostras foram agitadas para garantir que todas as bactérias que não estivessem no biofilme fossem suspensas no meio.

Para a quantificação do biofilme, as membranas de nanofibras recuperadas das placas de 24 poços após incubação com *S. mutans* foram lavadas duas vezes com PBS. As bactérias aderentes foram separadas das superfícies da membrana pelo tratamento com proteinase K. Resumidamente, as amostras foram depois colocadas em placas de 24

poços contendo 1 ml de PBS e 1% de proteinase K (Sigma-Aldrich®), e incubadas a 37 ° C durante 60 min [33]. Após o tratamento com proteinase K, utilizou-se um método físico para aumentar o desprendimento do biofilme, e as bactérias aderentes foram removidas das membranas por tratamento de vortex durante 1 min [34]. As suspensões foram então diluídas em série em PBS (até 10⁻⁶) e 100 µl foram plaqueados em ágar BHI e incubadas, como descrito anteriormente, para quantificar UFC/ml. Estas experiências foram realizadas em triplicata e em três ensaios independentes.

3.3.5 Análise de superfície

Para análise microscópica, as amostras das membranas foram revestidas com ouro, e analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (JEOL JSM-6390LV, Japão) a 15 kV. As imagens do MEV foram analisadas usando o *plugin* DiameterJ do software ImageJ®.

Em seguida, os diâmetros das fibras foram aferidos em cinco posições e três diferentes amostras e reportadas como d_{10} , d_{50} e d_{90} , que representam os diâmetros dos quais 10, 50 e 90% da amostra é constituída por fibras com um diâmetro inferior a este valor. O valor d_{50} é o diâmetro médio das fibras enquanto a diferença entre d_{10} e d_{90} indica a magnitude do diâmetro das fibras: neste caso, uma maior diferença entre esses valores indica uma maior distribuição do diâmetro da fibra.

3.3.6 Caracterizações químicas

Os testes de espectroscopia transformada de Fourier infravermelho (FTIR) foram realizados num Espectrômetro FTIR da Série Cary 600 (Agilent Technologies) utilizando o módulo de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de ZnSe. As análises foram na região de 400-4000 cm⁻¹ e resolução de 2 cm⁻¹.

A análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) foi realizada num cromatógrafo de gases (GC) Agilent 7890A GC System equipado com um autoamostrador (GC Sampler 80, Agilent). Todos os compostos foram separados utilizando uma coluna capilar Agilent 19091S-433HP-5MS (30m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm d.f.). As temperaturas do injetor e do detector foram ambas ajustadas a 250 ° C e a temperatura do forno foi programada como se segue: 40 ° C durante 2 min. E aumentou linearmente para 145 ° C (3 ° C/min), depois para 280 ° C (10.0°C / min), onde foi mantido durante 10 min. Gás hélio de alta

pureza (99.99%) foi utilizado como gás transportador com vazão de 3 mL/min.

Antes da análise, uma amostra de 0,02 mg foi embalada em frascos selados de 5 mL. Em todos os casos, as amostras foram mantidas a 25 ° C durante 96 horas antes de 1000 µL da amostra serem injetados. A concentração de cada constituinte foi calculada como a porcentagem da área de pico correspondente para a área total de todos os picos observados no cromatograma. Todos os compostos foram identificados por comparação de seus espectros de massa com os de um banco de dados NIST.

3.3.7 Ensaios de viabilidade celular

As células-tronco derivadas de placenta (CTMPs) provieram de uma cortês doação do Prof. Márcio Alvarez da Silva, do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina. Devido a sua multipotência e não tumorigenicidade, essas células representam o tipo normal de células humanas para ensaios rápido, confiável e econômicos de compostos de drogas tóxicas. Além disso, o uso desta linha celular particular é mais vantajoso devido à sua fácil disponibilidade, isolamento com abundante suprimento de células e menos problemas éticos. Os P-SC foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco), suplementado com 1% de penicilina / estreptomicina, 5% de soro de cavalo (Gibco), e 5% de soro de vitela (Gibco) a 37 ° C com 5% de CO₂ em incubadora. As membranas eletrofiadas foram reduzidas em proporções para adequarem-se à placa de cultura de células (TPP). Após esterilização sob radiação UV, durante 12 horas, as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS. 3×10^3 de CTMPs foram semeadas, por poço, sobre as membranas estéreis e cultivadas em meio DMEM, em atmosfera umidificada, com 5% de CO₂ a 37 ° C. As membranas foram então transferidas para placas de cultura individuais de 96 poços onde, após 48 h de cultura, a proliferação das células sobre as membranas de nanofibras foi estudada, utilizando o kit de ensaio de proliferação de células MTS (BioVision). Em tempo específico, a solução de MTS foi adicionada a cada poço e, incubada durante 2 h em incubadora a 37 ° C, com CO₂ a 5%. A medição da absorvância foi verificada a 490 nm utilizando um leitor de microplacas (BioTek®, EUA). Estas experiências foram realizadas em triplicata e em três ensaios independentes.

3.3.8 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA e teste post-hoc de Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Caracterização das membranas de PLGA

As membranas de PLGA foram caracterizadas por MEV e os resultados são mostrados na Figura 2. A partir dessas imagens, pode-se observar que todas as nanofibras obtidas foram homogêneas e sem a presença de *beads*. Além disso, a amostra PLGA Controle e TTO-4 (Figuras 2A e C, respectivamente) foram mais homogêneas sem a presença de fibras grossas. As amostras contendo óleo de *C. canephora*, *tea tree* e PLGA controle (Fig. 2 A, B e C, respectivamente) produziram fibras com diâmetros maiores, levando a uma maior dispersão do tamanho do diâmetro das fibras.

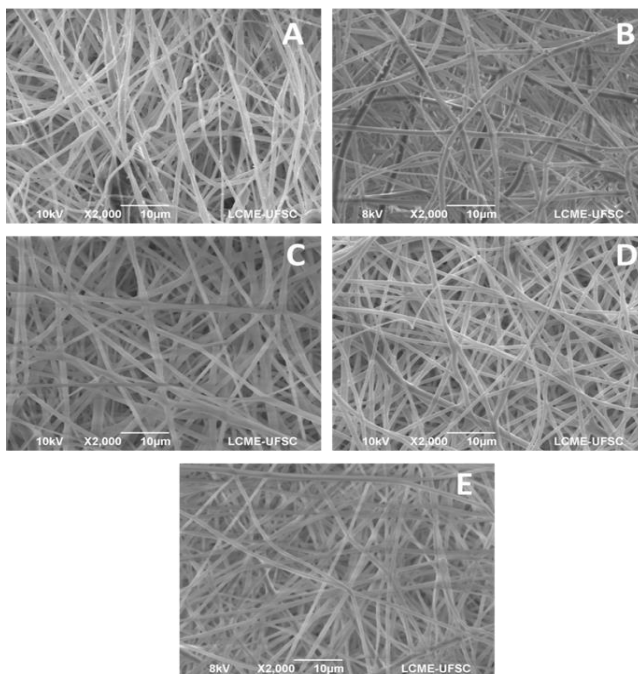


Fig. 2 Imagens de MEV representativas das membranas eletrofiadas por grupo: A) PLGA Controle, B) CCO-4, C) TTO-4, D) FUR-4, e E) LAC-4.

Os diâmetros característicos das fibras são mostrados na Tabela 1. Como pode ser visto, em todas as formulações, os diâmetros das fibras estão a níveis de *micron* a *submicron*. Os diâmetros médios (d_{50}) foram 0,8, 0,95, 0,85, 0,7 e 0,6 μm para o controle PLGA, CCO-4, TTO-4, FUR-4 e LAC-4. Além disso, esses resultados mostram uma distribuição de tamanho de diâmetro maior para as amostras de CCO-4 e FUR-4 (indicado pela maior diferença entre os diâmetros d_{10} e d_{90}).

Sample	d_{10} (μm)	d_{50} (μm)	d_{90} (μm)
PLGA-Controle	0.3 ± 0.02	0.8 ± 0.2	1.5 ± 0.15
CCO-4	0.38 ± 0.08	0.95 ± 0.09	1.7 ± 0.15
TTO-4	0.32 ± 0.04	0.85 ± 0.18	1.3 ± 0.08
FUR-4	0.25 ± 0.03	0.7 ± 0.17	1.8 ± 0.1
LAC-4	0.2 ± 0.05	0.6 ± 0.08	1.1 ± 0.07

Tabela 1. Diâmetros característicos das fibras.

Para investigar se algum resíduo de solvente estava presente nas amostras de PLGA foram analisados por FTIR-ATR como ilustrado pela Figura 3. O DMSO exibe fortes absorções características a 10451 cm^{-1} devido a um alongamento da ligação $\text{S} = \text{O}$ (νSO). Para o clorofórmio a única absorção relevante aparece a 752 cm^{-1} , devido ao alongamento $\text{C}-\text{Cl}$. Para N, N-dimetilformamida, uma absorção forte a 1654 cm^{-1} associada ao alongamento $\text{C} = \text{O}$. Uma análise cuidadosa dos espectros das amostras de PLGA (Fig. 3) revelou que nenhuma das maiores absorções para os solventes foi observada. Estes resultados indicam que, se quaisquer resíduos de solventes estão presentes nas amostras PLGA, suas quantidades seriam insignificantes. Isto é esperado uma vez que os solventes são evaporados durante o processo de eletrospiação.

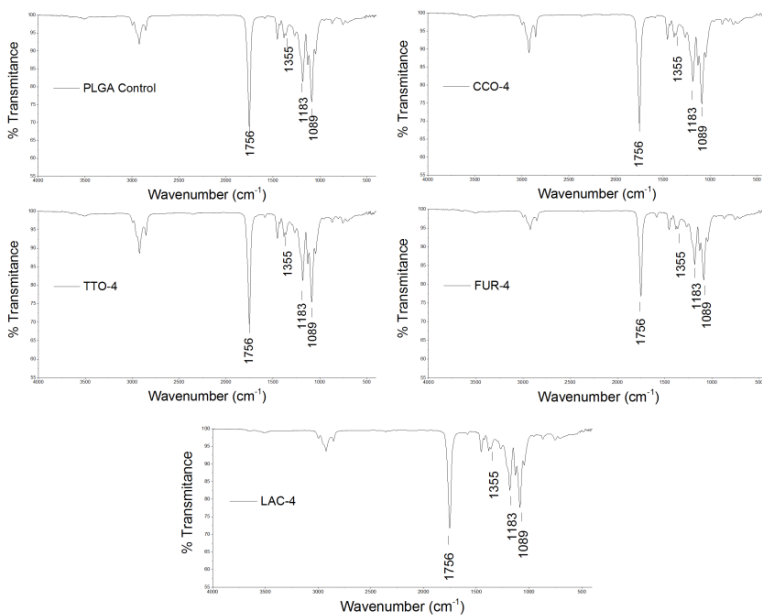


Fig. 3. Espectros FTIR-ATR das amostras de eletrofiocção.

No espectro do PLGA Controle e PLGA + aditivos (tea tree, *C. canephora*, lactama e furanona), uma banda forte na região de 1756 cm^{-1} , característica do estiramento de carbonil ($\text{C}=\text{O}$), pode ser observada. Foram observadas bandas de alongamento características para o grupo C-O entre 1300 e 1150 cm^{-1} . Além disso, foram identificadas bandas de absorção nas seguintes regiões: $3000\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ característicos do alongamento dos grupos metil CH , CH_3 e CH_2 ; Características de $1500\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ da deformação de grupos metil (CH_3 e CH_2); e $1350\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ características das vibrações do "tipo wag" dos grupos CH_2 e CH . Deve notar-se que os espectros para as amostras de PLGA e PLGA + aditivos são quase idênticos, indicando que as concentrações dos aditivos estão fora do limite de detecção desta técnica.

Para investigar ainda mais a liberação dos solventes utilizados na preparação das membranas, a análise de GC-MS foi realizada para identificar vestígios destes solventes. Para estas análises, as amostras do polímero contendo os aditivos foram mantidas num frasco a $25\text{ }^\circ\text{C}$ durante 96 h e a análise revelou que o clorofórmio não foi liberado por

nenhuma das amostras. Para o DMF, pequenas quantidades foram liberadas pelo controle PLGA, TTO-4, FUR-4 e LAC-4, enquanto o DMSO só foi liberado pela LAC-4.

3.4.2 Crescimento Planctônico

Conforme ilustrado na Fig. 4, os valores de DO_{630} para crescimento planctônico (24 h) não mostraram diferença estatística significativa entre os grupos, indicando que a adição de todos os compostos testados nas membranas de nanofibras não afetou o crescimento de *S. mutans*

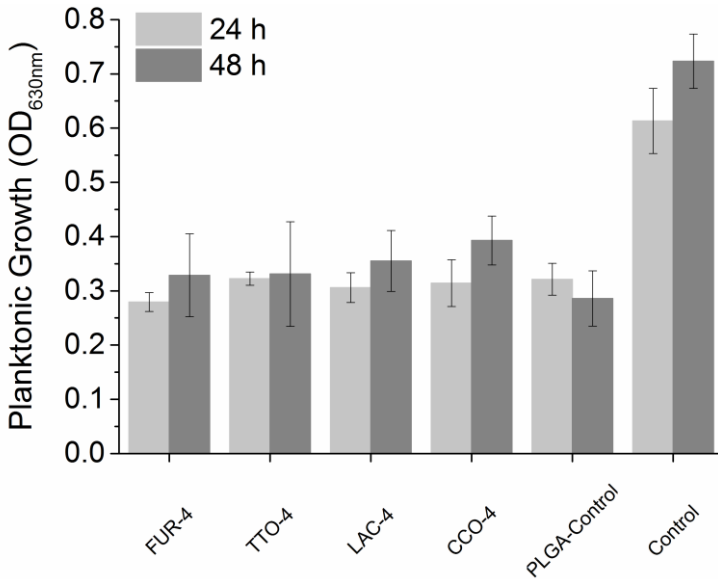


Fig. 4. Quantificação de crescimento planctônico de *S. mutans* (TSB, 24 e 48 h a 37 °C).

Após 48 h de incubação, as amostras ainda não apresentaram diferença estatística significativa para as taxas de crescimento planctônico de *S. mutans*, embora pudesse ser observada uma discreta tendência de aumento do crescimento planctônico no meio correspondente às membranas de CCO-4 (Fig. 4).

Quando comparado ao controle (sem fibras), todas as amostras de nanofibras apresentaram leituras de DO inferiores significativas para crescimento planctônico, tanto em 24 h quanto 48 h.

3.4.3 Análise de Biofilme

A atividade de inibição de biofilme foi avaliada por UFC/mL após desagregação bacteriana das membranas de nanofibras. A média de células viáveis aderidas no biofilme foi de aproximadamente $1,2 \times 10^2$ UFC/ml em membranas de furanona e $4,42 \times 10^2$ CFU/ml nas membranas do grupo PLGA Controle (Fig. 5). Estes resultados indicam uma redução significativa da ligação bacteriana às superfícies das membranas funcionalizadas contendo furanona. Além disso, as membranas de tea tree e lactama apresentaram dados notáveis de desmembramento do biofilme de *S. mutans* ($2,12 \times 10^2$ e $2,3 \times 10^2$ CFU/ml, respectivamente). Em contraste com os grupos mencionados anteriormente, as amostras de *C. canephora* não mostraram diferença estatística significativa em relação à contagem do grupo controle UFC/ml.

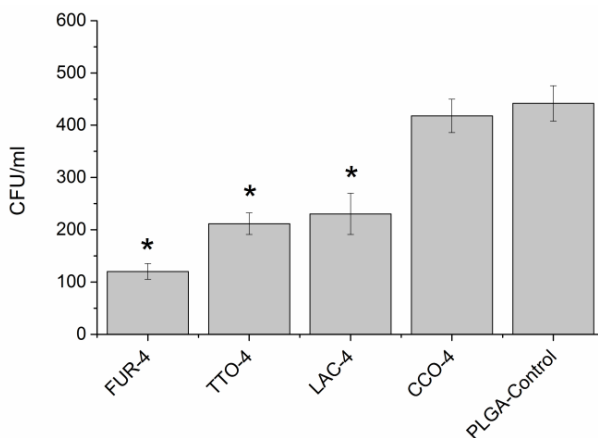


Fig. 5. Formação de biofilme de *S. mutans* (TSB, 48 h a 37 °C) sobre superfícies de membranas de nanofibras, por unidades formadoras de colônias (UFC/ml) (ANOVA e teste post-hoc de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$).

3.4.4 Viabilidade Celular

Neste estudo, as células CTMPs foram semeadas em membranas de nanofibras PLGA funcionalizadas com compostos antimicrobianos, incorporadas em 3 concentrações progressivas. Cada membrana com células foi cultivada durante 2 dias e as avaliações de

biocompatibilidade *in vitro* foram feitas utilizando MTS *Cell Proliferation Assay*. As membranas de furanona não apresentam diferença estatística significativa entre o grupo de PLGA-Control em todas as três concentrações distintas, indicando não haver efeito inibidor na proliferação celular. Contudo, observou-se uma densidade celular reduzida em amostras de Lactama e *C. canephora*, a concentrações de 0.004 e 0.008% (w/v). Os dados de absorvância também mostram que o crescimento de células em membranas do grupo tea tree exibiu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em comparação com amostras do grupo controle na sua maior concentração (Fig.6).

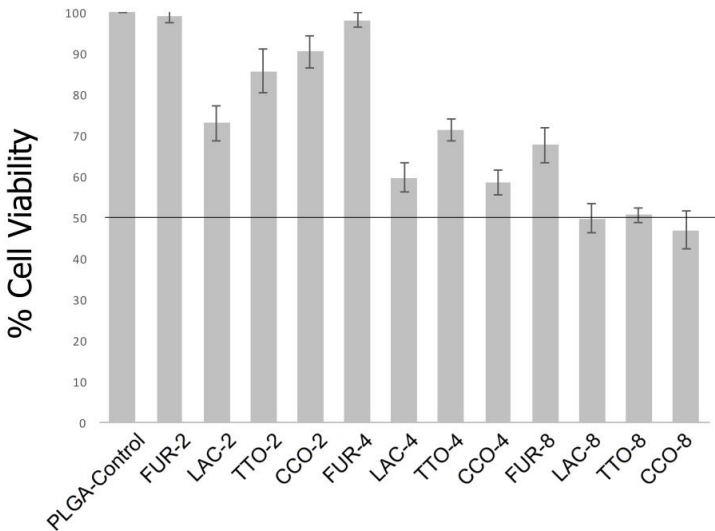


Fig.6. Proliferação de células CTMPs em membranas de nanofibras após 2 dias de cultura celular. A barra horizontal indica o *endpoint* de citotoxicidade, de acordo com FDA (50%) [43]. (ANOVA e Tukey's post-hoc teste com um nível de significância de $p < 0,05$).

3.5 DISCUSSÃO

As membranas produzidas neste estudo foram constituídas por nanofibras de orientação aleatória, que conferem características como propriedades mecânicas e força aprimoradas, bem como menor risco de infiltração de tecido fibroso, importante demanda na Regeneração Tecidual Guiada (RTG). De acordo com relatos anteriores, o diâmetro

médio dos poros na malha nanofibrosa alinhada é três vezes maior em comparação à malha orientada aleatoriamente, e a porosidade dos arcabouços alinhados é maior, portanto, não apresenta propriedades ideais para as membranas de RTG. Poros ideais, presentes em malhas de fibras aleatórias, de tamanho nano a micro (50 nm-5 μ m), podem permear oxigênio, nutrientes, fatores neurotróficos como fatores de crescimento e, sobretudo, prevenir a infiltração de tecidos fibrosos [38].

No presente estudo, os resultados da análise de biofilmes indicam que a maioria dos compostos testados, como a lactama **4**, tea tree, e furanona, são eficazes na supressão do desenvolvimento do biofilme de *S. mutans* nas membranas de nanofibras, com *C. canephora* apresentando taxas de inibição de biofilme relativamente baixas em comparação as demais amostras.

Dados fornecidos pela análise estatística da contagem de UFC (Fig. 5) formadas sobre as membranas funcionalizadas com furanona indicam uma inibição significativa na formação do biofilme quando comparadas aos biofilmes formados na ausência de qualquer inibidor ($p < 0,05$). Estes resultados corroboram com uma série de estudos anteriores, onde estes compostos foram apontados como inibidor ativo da formação de biofilme formação [39] - [41].

Além disso, resultados obtidos mostrando a redução das contagens de UFC das membranas funcionalizadas com U26 (aproximadamente $2,3 \times 10^2$ CFU/ml em comparação com $4,42 \times 10^2$ CFU/ml em amostras do grupo controle), estão de acordo com as referidas anteriormente, onde lactamas, derivadas de furanonas, testadas em forma solubilizada contra biofilme de *S. mutans* sobre titânio mostraram taxas de inibição de biofilme significativas [42].

As taxas de crescimento planctônico de *S. mutans* na presença de todos os compostos testados não mostraram diferença estatística significativa quando comparadas com as membranas do grupo controle (PLGA-Controle) (Fig. 4). Este resultado indica que nenhum dos compostos exibiu um efeito bactericida/bacteriostático nos meios circundantes, o que é uma indicação de que não deve ser esperado nenhum efeito sistêmico dos fármacos.

Curiosamente, quando comparado com a amostra de controle sem nanofibras, todas as amostras de nanofibras apresentaram leituras de DO inferiores para crescimento planctônico, tanto em 24 h quanto 48 h. Este resultado foi inesperado, já que trabalho anterior demonstrou que as membranas PLGA não inibem o crescimento bacteriano, tanto no estado planctônico quanto no biofilme. É possível que esse efeito inibitório no

crescimento bacteriano possa ser atribuído à modificações introduzidas no material pela própria técnica de eletrofição [29].

A avaliação da citotoxicidade dos compostos incorporados nas membranas de PLGA contra células CTMPs humanas (Fig. 6) revelou que as superfícies das membranas eletrofiadas podem proporcionar uma condição de suporte para a proliferação das células.

As superfícies incorporadas com furanona não exibiram efeito inibitório na viabilidade celular, a qualquer concentração testada, em comparação com as membranas do grupo controle ($p < 0,05$). Este é um avanço importante na área de biomateriais, logo que a cobertura de superfície e integração com as células de tecido hospedeiro é preconizada sobre a adesão / colonização bacteriana.

Os resultados obtidos para as membranas indicaram que a viabilidade celular foi afetada ($p < 0,05$) em duas das três concentrações testadas, reduzindo a taxa de viabilidade celular de 73 para 50%. Suspeita-se que esses números em escala decrescente possam estar associados aos vestígios residuais do solvente orgânico, DMSO, identificado na análise de GC-MS.

Uma vez que estudos de citotoxicidade anteriores não relataram a incorporação direta do solvente nas fibras de eletrofiadas, são necessários estudos adicionais, evidentemente, para confirmar a possível influência do processo nos resultados de DMSO.

As análises químicas das amostras foram conduzidas de forma a identificar traços de solvente nas membranas. A análise de FTIR-ATR não identificou traços de solvente na superfície da fibra. Estes resultados foram ainda suportados por posterior análise de GC-MS, nas quais foram identificados apenas vestígios residuais de DMF em amostras de PLGA Controle, TTO-4, FUR-4 e LAC-4, sem indício de citotoxicidade.

3.6 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi sintetizado, com êxito, membranas bioativas a partir do processo de eletrofição, a fim de produzir membranas de nanofibras aleatoriamente alinhadas adequadas para o uso na prevenção de infecções associadas ao biomaterial, e para a integração de células de tecido. A análise morfológica mostrou características de superfícies lisas e livre de grânulos, e com diâmetro variável de nanofibras, de acordo com o aditivo utilizado. Estas diferenças podem ser atribuídas às variações na viscosidade e condutividade relativas à incorporação de cada aditivo individualmente.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos nesse presente estudo indicam que as membranas eletrofiadas de PLGA representam uma matriz promissora para proliferação de células de tecido e barreira para infiltração de tecido fibroso, ao mesmo tempo que inibem a interação bacteriana. Os resultados da atividade antibiofilme e da citotoxicidade revelaram que a membrana de nanofibras funcionalizada com furanona pode ser promissora para o desenvolvimento de novos dispositivos biomédicos funcionalizados.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não apresentar conflitos de interesse. Não houve fontes de financiamento que pudessem ter influenciado os resultados deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da infraestrutura LABMASSA (Laboratório de Transferência de Massa –UFSC), apoio financeiro das agências governamentais de fomento à pesquisa CAPES, CNPq (SET-B 350091/2016-1 e Projeto 407369/2013-9, *Electrospun Nanofibers - Smart Textile Products for Industry Innovation*). LCAB agradece o fundos do CNPq (304341) e FAPEMIG (24391) pela síntese do novo composto antibiofilme. Os autores agradecem também Guerreiro-Filho O., Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Campinas, SP, Brasil. CVF agradece CAPES pelo financiamento CAPES (Projeto 2393/14-0)

3.7 REFERÊNCIAS

- [1] H. J. Busscher, H. C. van der Mei, G. Subbiahdoss, P. C. Jutte, J. J. A. M. van den Dungen, S. A. J. Zaat, M. J. Schultz, and D. W. Grainger, “Biomaterial-Associated Infection: Locating the Finish Line in the Race for the Surface,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 4, no. 153, p. 153rv10-153rv10, Sep. 2012.
- [2] A. G. Karakeçılı and M. Gümüşderehoğlu, “Comparison of bacterial and tissue cell initial adhesion on hydrophilic/hydrophobic biomaterials,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 13, no. 2, pp. 185–196, Jan. 2002.

- [3] P. Marsh, Michael Lewis, D. Williams, P. Marsh, M. Martin, M. Lewis, and D. Williams, *Oral Microbiology*, 5 th. 2009.
- [4] P. E. Kolenbrander, "Oral Microbial Communities: Biofilms, Interactions, and Genetic Systems 1," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 54, no. 1, pp. 413–437, Oct. 2000.
- [5] B. Nyvad and M. Kilian, "Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals.," *Caries Res.*, vol. 24, no. 4, pp. 267–72, 1990.
- [6] W. Teughels, N. Van Assche, I. Sliepen, and M. Quirynen, "Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development.," *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 17 Suppl 2, pp. 68–81, Oct. 2006.
- [7] F. Costa, I. F. Carvalho, R. C. Montelaro, P. Gomes, and M. C. L. Martins, "Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 4, pp. 1431–1440, Apr. 2011.
- [8] H. Ceri, M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck, and A. Buret, "The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 37, no. 6, pp. 1771–1776, 1999.
- [9] N. U. Zitzmann and T. Berglundh, "Definition and prevalence of peri-implant diseases.," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 35, no. 8 Suppl, pp. 286–91, Sep. 2008.
- [10] C. T. Barrett and J. F. Barrett, "Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems?," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 14, no. 6, pp. 621–6, Dec. 2003.
- [11] J. P. Kennedy, S. P. McCandless, R. A. Lasher, and R. W. Hitchcock, "The mechanically enhanced phase separation of sprayed polyurethane scaffolds and their effect on the alignment of fibroblasts," *Biomaterials*, vol. 31, no. 6, pp. 1126–1132, Feb. 2010.

- [12] M. B. Miller and B. L. Bassler, "Quorum Sensing in Bacteria," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 55, no. 1, pp. 165–199, Oct. 2001.
- [13] C. M. Waters and B. L. Bassler, "Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria.," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 21, pp. 319–46, Jan. 2005.
- [14] M. Hentzer, "Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors," *EMBO J.*, vol. 22, no. 15, pp. 3803–3815, Aug. 2003.
- [18] J. Lönn-Stensrud, F. C. Petersen, T. Benneche, and A. A. Scheie, "Synthetic bromated furanone inhibits autoinducer-2-mediated communication and biofilm formation in oral streptococci," *Oral Microbiol. Immunol.*, vol. 22, no. 5, pp. 340–346, Oct. 2007.
- [19] D. Ren, J. J. Sims, and T. K. Wood, "Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone," *Environ. Microbiol.*, vol. 3, no. 11, pp. 731–736, Nov. 2001.
- [20] D. S. Blehert, R. J. Palmer, J. B. Xavier, J. S. Almeida, and P. E. Kolenbrander, "Autoinducer 2 Production by *Streptococcus gordonii* DL1 and the Biofilm Phenotype of a *luxS* Mutant Are Influenced by Nutritional Conditions," *J. Bacteriol.*, vol. 185, no. 16, pp. 4851–4860, Aug. 2003.
- [21] A. Yoshida, T. Ansai, T. Takehara, and H. K. Kuramitsu, "LuxS-Based Signaling Affects *Streptococcus mutans* Biofilm Formation," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 5, pp. 2372–2380, May 2005.
- [22] V. C. Kalia, "Quorum sensing inhibitors: An overview," *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 2, pp. 224–245, Mar. 2013.
- [23] J. T. Olivero, N. P. Pajaro, and E. Stashenko, "Antiquorum Sensing Activity of Essential Oils Isolated from Different Species of the Genus *Piper*," *Vitae, Rev. la Facultad Quim. Farm.*, vol. 18, no. 1, pp. 77–82, 2011.
- [24] A. J. Mossi, V. Astolfi, G. Kubiak, L. Lerin, C. Zanella, G.

- Toniazzo, D. de Oliveira, H. Treichel, I. A. Devilla, R. Cansian, and R. Restello, "Insecticidal and repellency activity of essential oil of *Eucalyptus* sp. against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae).," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 91, no. 2, pp. 273–7, Jan. 2011.
- [25] Y.-H. Li, N. Tang, M. B. Aspiras, P. C. Y. Lau, J. H. Lee, R. P. Ellen, and D. G. Cvitkovitch, "A Quorum-Sensing Signaling System Essential for Genetic Competence in *Streptococcus mutans* Is Involved in Biofilm Formation," *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 10, pp. 2699–2708, May 2002.
- [26] M. S. A. Khan, M. Zahin, S. Hasan, F. M. Husain, and I. Ahmad, "Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 49, no. 3, pp. 354–360, Sep. 2009.
- [27] F. M. Husain, I. Ahmad, M. S. Khan, E. Ahmad, Q. Tahseen, M. S. Khan, and N. A. Alshabib, "Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria," *Front. Microbiol.*, vol. 6, May 2015.
- [28] C. F. Carson, K. A. Hammer, and T. V. Riley, "Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 19, no. 1, pp. 50–62, Jan. 2006.
- [29] E. Yüksel and A. Karakeçili, "Antibacterial activity on electrospun poly(lactide-co-glycolide) based membranes via Magainin II grafting," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 45, pp. 510–518, Dec. 2014.
- [30] U. A. Pereira, L. C. A. Barbosa, C. R. A. Maltha, A. J. Demuner, M. A. Masood, and A. L. Pimenta, " γ -Alkylidene- γ -lactones and isobutylpyrrol-2(5H)-ones analogues to rubrolides as inhibitors of biofilm formation by gram-positive and gram-negative bacteria.," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 24, no. 4, pp. 1052–6, Feb. 2014.
- [31] J. C. M. Souza, M. Henriques, R. Oliveira, W. Teughels, J.-P.

- Celis, and L. A. Rocha, "Biofilms Inducing Ultra-low Friction on Titanium," *J. Dent. Res.*, vol. 89, no. 12, pp. 1470–1475, Dec. 2010.
- [32] J. C. M. Souza, P. Ponthiaux, M. Henriques, R. Oliveira, W. Teughels, J.-P. Celis, and L. A. Rocha, "Corrosion behaviour of titanium in the presence of *Streptococcus mutans*," *J. Dent.*, vol. 41, no. 6, pp. 528–534, Jun. 2013.
- [33] A. M. Beg, M. N. Jones, T. Miller-Torbert, and R. G. Holt, "Binding of *Streptococcus mutans* to extracellular matrix molecules and fibrinogen.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 298, no. 1, pp. 75–9, Oct. 2002.
- [34] H. Kobayashi, M. Oethinger, M. J. Tuohy, G. W. Procop, and T. W. Bauer, "Improved Detection of Biofilm-formative Bacteria by Vortexing and Sonication: A Pilot Study," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 467, no. 5, pp. 1360–1364, May 2009.
- [35] L. Paula and M. De Leo, "Infrared Spectroscopy Studies on Stability of Dimethyl Sulfoxide for Application in a Li – Air," no. September 2014, 2013.
- [36] N. B. Colthup, D. L. H., and S. E. Wiberley, *Introduction to infrared and raman spectroscopy*, Second Edi. New York: Academic Press, 1975.
- [37] J. I. Kim, T. I. Hwang, L. E. Aguilar, C. H. Park, and C. S. Kim, "A Controlled Design of Aligned and Random Nanofibers for 3D Bi-functionalized Nerve Conduits Fabricated via a Novel Electrospinning Set-up," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 23761, Mar. 2016.
- [38] S. H. Oh, J. H. Kim, K. S. Song, B. H. Jeon, J. H. Yoon, T. B. Seo, U. Namgung, I. W. Lee, and J. H. Lee, "Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit," *Biomaterials*, vol. 29, no. 11, pp. 1601–1609, Apr. 2008.
- [39] Y. Han, S. Hou, K. A. Simon, D. Ren, and Y.-Y. Luk, "Identifying the important structural elements of brominated furanones for inhibiting biofilm formation by *Escherichia coli*."

Bioorg. Med. Chem. Lett., vol. 18, no. 3, pp. 1006–10, Feb. 2008.

- [40] Z. He, Q. Wang, Y. Hu, J. Liang, Y. Jiang, R. Ma, Z. Tang, and Z. Huang, “Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its luxS mutant strain,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 40, no. 1, pp. 30–35, Jul. 2012.
- [41] D. Ren, J. J. Sims, and T. K. Wood, “Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone.,” *Let. Appl. Microbiol.*, vol. 34, no. 4, pp. 293–9, 2002.
- [42] J. G. Xavier, T. C. Geremias, J. F. D. Montero, B. R. Vahey, C. A. M. Benfatti, J. C. M. Souza, R. S. Magini, and A. L. Pimenta, “Lactam inhibiting *Streptococcus mutans* growth on titanium,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 68, pp. 837–841, Nov. 2016.
- [43] Li W, Zhou J, Xu Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing medical devices. *Biomed reports*. 2015;3:617–20.

4 ARTIGO EM INGLÊS

FUNCTIONALIZATION OF PLGA NANOFIBROUS MEMBRANES WITH ANTIBIOFILM COMPOUNDS

4.1 ABSTRACT

Objective: The aim of this work was to develop and analyze the activity of antibiofilm functionalized membranes in preventing *Streptococcus mutans* biofilm formation on PLGA electrospun membranes.

Material and Methods: PLGA nanofibers were prepared with different additives: *Melaleuca alternifolia* (tea tree) and *Coffea canephora* essential oils, furan-2(5*H*)-one and a novel synthetic lactam, in three concentrations (0.002, 0.004 and 0.008% w/v). Membrane samples were characterized by SEM, FTIR-ATR, and CG-MS and exposed to *S. mutans* cultures. Following a 48h incubation, planktonic growth was determined by spectrophotometry and biofilm formation was evaluated by colony forming units (CFU·ml⁻¹) counts. Cytotoxicity of the new biomaterials was assessed by MTS assay, through the quantification of viable placenta-derived stem cells (p-SCs) grown over the functionalized nanofibrous membranes.

Results: Observation of the electrospun membranes on SEM images revealed the smooth and bead-free morphology of the nanofibers. No solvent residues were observed by FTIR-ATR but the GC-MS results showed that *N,N*-dimethylformamide and dimethylsulfoxide were present as residues in the membranes after functionalization. Biofilm formation results exhibited a significant reduction in the bacterial attachment to the functionalized membrane surfaces (ANOVA and Tukey's post-hoc test with a significance level of $p < 0.05$). Cytotoxicity results showed that furan-2(5*H*)-one-functionalized membranes demonstrated no statistically significant difference in the cell viability compared to the control membranes.

Conclusion: Taken together, results presented indicate that the membranes developed here show a good potential for the development of biomaterials with activity in preventing associated infections and compatibility for further tissue integration.

Keywords: Antibiofilm activity; polymers, *Streptococcus mutans*; Lactams; Bacterial adhesion; *Quorum sensing*, PLGA, electrospinning.

4.2 INTRODUCTION

Bacterial infection is considered to be one of the most serious complications associated with implanted biomaterials and consequent implant loss.^{1,2} Furthermore, some bacteria can form biofilms, which protect them against the action of antibiotics. In the case of the oral cavity, the process of biofilm formation occurs in a sequential manner, with primary colonizers adhering to a glycoprotein receptors present on the acquired pellicle minutes after cleaning.³ Different bacteria are present in the oral cavity, but *Streptococci* and *Actinomyces* are the major initial colonizers⁴ and, during the first hours of biofilm formation, the early microbiota is dominated by *Streptococci*,⁵.

Once initial bacterial adhesion occurs, bacterial colonization develops into a protective mature biofilm often leading to the removal of the implant and the requirement for prolonged treatments.^{1,2} This is mainly due to the fact that, when organized under biofilms, bacteria are able to survive traditional antibiotic treatments at concentrations up to a thousand times higher than those used to kill their planktonic counterparts.⁶ Conventional systemic antibiotic therapies used in the control of biofilms decrease the symptoms of infection by eliminating the circulating planktonic microbial population, although they remain ineffective against microbes buried within the biofilm extra-polymeric matrix,^{6,7} which emphasizes the need to develop therapies aimed at the inhibition of biofilm formation.

Many bacteria are known to regulate their cooperative activities, such as biofilm formation, through a mechanism called quorum sensing (QS), through which bacterial cells communicate with each other by releasing, sensing and responding to small diffusible signal molecules.⁸ Intra- and inter-bacterial communications that result in coordinated gene expression and lead to a “community behavior” of bacteria are common phenomena in nature. Different signaling molecules are responsible for this type of communication, but those in the class of *N*-acylhomoserine lactones (AHL) are the most common mediators, or self-inducers, of the expression of genes regulated by QS in bacteria.^{8,9}

Several studies have shown that the use of QS inhibitors can be very effective in biofilm control. Various natural (**1**) and synthetic (**2a-g**) furanones and lactam (**3** and **4**) (Figure 1) have been used successfully

for inhibition of bacterial adherence.^{10–16} However, a number of synthetic and natural compounds obtained from algae, fungi and other organisms, although displaying inhibitory activity toward QS, have little or no therapeutic value due to their unstable nature or associated toxicity. Therefore, efforts have been directed towards the development of safe and effective QS inhibitor compounds, both synthetic or from natural sources.¹⁷

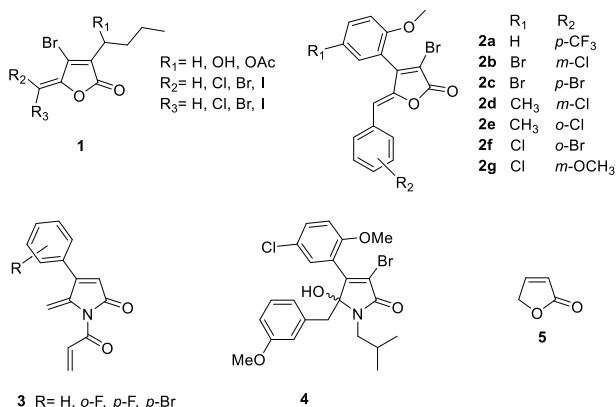


Fig.1 Structure for natural (1) and synthetic furanones (2a-g), synthetic lactams (3, 4) and furan-2(5H)-one (5).

Recent studies suggest that essential oils from *Coffea canephora*, *Melaleuca alternifolia* (tea tree) and *Cinnamomum verum* could interfere with the QS mechanism.^{18–21} Kahn *et al.* studied 21 essential oils and evaluated their anti-QS activity using the bacterium *Chromobacterium violaceum*.²¹ They showed that essential oils from *Cinnamomum verum* (cinnamon), *Lavandula angustifolia* (lavender), *Syzygium aromaticum* (clove) and *Mentha piperita* (peppermint) show anti-QS activity. Other studies using mint oil (present in peppermint oil) showed that this oil can strongly interfere with the *N*-acylhomoserine lactone signaling molecules in *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*.²² These compounds and the essential oils can be incorporated in different materials, for example in membranes, micro-capsules or electrospun nanofibers. Hence, an important aspect in the preparation of these materials is the production process, which is relevant to the characteristics of the final product. Different techniques are used for the production of the mentioned materials, but the most promising is

electrospinning.^{23–27} The use of electrospinning for the production of nanofibrous membranes for biomedical applications has attracted much attention in recent years. Several studies have shown that electrospun membranes are suitable for tissue engineering,²⁸ the immobilization of enzymes and catalysts,^{29–31} dressings for wounds,^{32,33} barriers to bacterial adhesion³⁴ and controlled drug delivery.^{33,35} However, while strategies to inhibit initial bacterial adhesion to prevent infection are extremely important, electrospun membranes can provide a support for the adhesion and proliferation of cells due to similarities with human tissue structure in terms of physical properties.³⁶ Thus, the development of electrospun nanofibers with antibiofilm activity represents a promising field for the development of functionalized biomaterials.

Considering the importance of the problems caused by biofilm formation in different materials used in the medical field, in this study we developed randomly-aligned electrospun membranes with selective permeability using poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), and functionalized with biofilm inhibitor compounds at different concentrations based on the literature and previous studies: *Tea tree* and *C. canephora* essential oils, the γ -hydroxy- γ -lactam (**4**) and furan-2(5*H*)-one (**5**) (Figure 1). PLGA was chosen due to its broad range of applications as a biomaterial and its biocompatibility, mechanical properties and biodegradability.³⁷

4.3 MATERIALS AND METHODS

4.3.1 Nanofiber materials

The PLGA used was PURASORB PLG 8218. Australian tea tree oil (Desertessence®) was purchased on the local market and used as received. *Coffea canephora* oil was prepared by Guerreiro Filho group and used as received. Also, furan-2(5*H*)-one (**5**) (Sigma Aldrich®). Chloroform (Vetec®), *N,N*-dimethylformamide (DMF) (Synth®) and dimethylsulfoxide (DMSO) (Vetec®) were used. Prior to incorporation lactam **4** was first dissolved in DMSO to a concentration of 50% (w/v). Lactam **4** was prepared as previously described.³⁸ The compound was fully characterized by IR, nuclear magnetic resonance (¹H and ¹³C NMR), and mass spectrometry. All physical and spectroscopic data were in agreement with those previously reported.¹⁵

4.3.2 PLGA membrane production

For the preparation of the nanofibers, PLGA was first solubilized (10% w/v) in a solution containing chloroform and *N,N*-dimethylformamide (95:5 v/v) for 8 h. For each agent to be tested (essential oils, lactam **4** and furan-2(5*H*)-one **5**, a given quantity of the polymer solution (PLGA + chloroform + DMF) was separated and the additives were added in different concentrations to a final volume of 2 mL. Solutions were placed in plastic syringes (5.0 mL) and injected through stainless steel needles, connected to a high voltage power supply, using a voltage of 13 kV with a flow rate of 2 mL h⁻¹. The distance between the needle and the collector was 15 cm and the collector was comprised of a rectangular metal plate. In addition to fibers containing the different oils, PLGA mats were also prepared and used as the reference (PLGA Control). The concentrations and the codes for the samples used in this study are: CCO-2, CCO-4 and CCO-8 (oil from *C. canephora* at 0.002, 0.004 and 0.008 w/v, respectively), TTO-2, TTO-4 and TTO-8 (for oil from *M. alternifolia* - tea tree oil - at 0.002, 0.004 and 0.008% w/v, respectively), FUR-2, FUR-4 and FUR-8 (for furan-2(5*H*)-one **5** at 0.002, 0.004 and 0.008% w/v) and LAC-2, LAC-4 and LAC-8 (for lactam **4** at 0.002, 0.004 and 0.008% w/v).

4.3.3 Bacterial strains and growth conditions

Streptococcus mutans ATCC 25175 was grown under microaerophilic conditions for 48 h at 37 °C on brain-heart infusion (BHI) agar plates (Bacto®, Difco), supplemented with 3.0 g L⁻¹ of yeast extract (Bacto®, Difco) and 200 g L⁻¹ of sucrose (Bacto®, Difco, USA). For the biofilm assays, *S. mutans* cells were inoculated in Tryptic Soy Broth (TSB) (Bacto®, Difco) supplemented with 3.0 g L⁻¹ of yeast extract and 200 g L⁻¹ of sucrose, and incubated for 18 h at 37 °C. After incubation, cells were harvested by centrifugation at 5000 rpm for 10 min at 4 °C and washed twice in a phosphate buffer solution (PBS).

4.3.4 Biofilm formation and analysis

After growth and harvest following the conditions described above, *S. mutans* cells were re-suspended in TSB medium supplemented with mucin (2.5 g L⁻¹), peptone (5 g L⁻¹), urea (1 g L⁻¹), yeast extract (2 g L⁻¹) and sucrose (200 g L⁻¹) to obtain a suspension with an optical density (OD₆₃₀) of 0.6, corresponding to approximately 1 × 10⁸ CFU mL⁻¹.

OD₆₃₀ was measured using a spectrophotometer (BioTek®, USA).^{39,40} This inoculation concentration was chosen according to preliminary studies to determine the inoculation concentration that would produce the structured and robust biofilm in the period which our study was carried out. Before sampling, samples were agitated to ensure that all bacteria not in biofilm were suspended in the medium.

Electrospun membranes were cut in 0.8 x 0.8 cm to cover the 24-well plate and sterilized under UV radiation for 12 h. Sterile nanofibrous membrane samples were placed into 24-well plates containing 2 mL of a *S. mutans* suspension in TSB medium, and incubated for 48 h at 37 °C, under microaerophilic conditions. Subsequently, 200 µL of these cultures was used to quantify the planktonic growth by OD₆₃₀ determination on a microplate reader (BioTek®, USA).

For the biofilm quantification, electrospun nanofibrous membranes, recovered from the 24-well plates after incubation with *S. mutans*, were washed twice with PBS. Adherent bacteria were detached from the membrane surfaces by proteinase K treatment. Briefly, samples were then placed on 24-well plates containing 1 mL of PBS and 1% proteinase K (Sigma-Aldrich®), and incubated at 37 °C for 60 min.⁴¹ After proteinase K treatment, a physical method was used to increase the biofilm detachment, and adherent bacteria were further removed from the membranes by vortex treatment for 1 min as described elsewhere.⁴² Suspensions were then serially diluted in PBS (up to 10⁻⁶) and 100 µL were plated on BHI agar and incubated as previously described, to determine the CFUs mL⁻¹. These experiments were performed in triplicate and carried out in three independent assays.

4.3.5 Surface analysis

For the microscopy analysis, membrane samples were sputter-coated with gold, and analyzed by scanning electron microscopy (SEM) (JEOL JSM-6390LV, Japan) at 15 kV. SEM images were further analyzed using DiameterJ plugin of ImageJ software®.

The fiber diameters were then measured on five positions and three different samples and reported as d₁₀, d₅₀ and d₉₀ values, which are the diameters at which 10, 50 and 90% of the sample is comprised of fibers with a diameter lower than this value. The d₅₀ value is the median diameter of the fibers whereas the difference between d₁₀ and d₉₀ indicates the magnitude of the diameter of fibers: in this case, a greater difference between these values indicates a larger fiber diameter distribution.

4.3.6 Chemical analyses

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra were obtained on a Cary 600 Series FTIR Spectrometer (Agilent Technologies) using the attenuated total reflectance (ATR) module with a ZnSe crystal. The analysis was carried out in the region of 4000-400 cm^{-1} at a resolution of 2 cm^{-1} .

Headspace gas chromatography–mass spectrometry analysis was carried out on an Agilent gas chromatograph (7890A GC System) equipped with an Agilent autosampler (GC Sampler 80) and a quadrupole 5975C Agilent Technologies with triple axis detector. All compounds were separated using an Agilent capillary column HP-5MS (3 0 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μm). Injector and detector temperatures was set at 250 and 180 $^{\circ}\text{C}$ respectively and the oven temperature was programmed as follows: 40 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min and ramped linearly to 145 $^{\circ}\text{C}$ (3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) and then to 280 $^{\circ}\text{C}$ (10.0 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$), held for 10 min. High-purity (99.99%) He was used as the carrier gas with a flow rate of 3 mL min^{-1} .

Prior to analysis, a sample of 0.02 mg was packed in sealed 5 mL vials. In all cases. The samples were kept at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 96 hours before 1000 μL of the head space sample were injected. The concentration of each constituent was calculated as the percentage of the corresponding peak area to the total area of all peaks observed in the chromatogram. Composites were identified using a NIST database.

4.3.7 Cell viability assays

Placenta-derived stem cells (p-SCs) were kindly donated by Prof. Márcio Alvarez da Silva, from the Department of Cell Biology, Embriology and Genetics of the Federal University of Santa Catarina (Brazil). Due to their multipotency, immuno-privilege and non-tumorigenicity these cells represent the normal human cell type for rapid, reliable and cost-effective screening of toxic drugs compounds. Also, the use of this particular cell line is more advantageous due to their easy availability, isolation with abundant cell supply and less ethical issues. The p-SCs were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco®) supplemented with 1% penicillin/streptomycin, 5% horse serum (Gibco®) and 5% calf serum (Gibco®) at 37 $^{\circ}\text{C}$ with 5% CO_2 in an incubator. Electrospun membranes were cut in 0.8 x 0.8 cm to cover the cell culture plate

(TPP®). After sterilization under UV radiation for 12 h, membranes were washed 3 times with PBS. The p-SCs were seeded (3×10^3 per well) over the sterile electrospun mats and cultured in DMEM medium in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. Membranes were then transferred to individual 96-well culture plates where, after 48 h of culture, cell proliferation over the nanofibrous membranes was measured using the cell counting MTS Cell Proliferation Assay Kit (BioVision's®). At pre-determined time points, the MTS solution was added to each well followed by incubation for 2 h at 37 °C with 5% CO₂. The absorbance was measured at 490 nm using a microplate reader (BioTek®, USA). All testes were carried out three times in triplicate.

4.3.8 Statistical analysis

Results were statistically analyzed by ANOVA and Tukey's post-hoc test with a significance level of $p < 0.05$.

4.4 RESULTS

4.4.1 PLGA membrane characterizations

The PLGA membranes were characterized by SEM and results are showed in Figure 2. From these images it can be observed that all nanofibers obtained were homogeneous and without the presence of beads. In addition, the PLGA Control and TTO-4 (Figures 2 A and C, respectively) sample were more homogeneous without the presence of coarse fibers. Samples containing *C. canephora* oil, *tea tree* oil and PLGA control (Figures. 2 A, B and C, respectively) produced fibers with larger diameters, leading to a greater dispersion of the diameter size of the fibers.

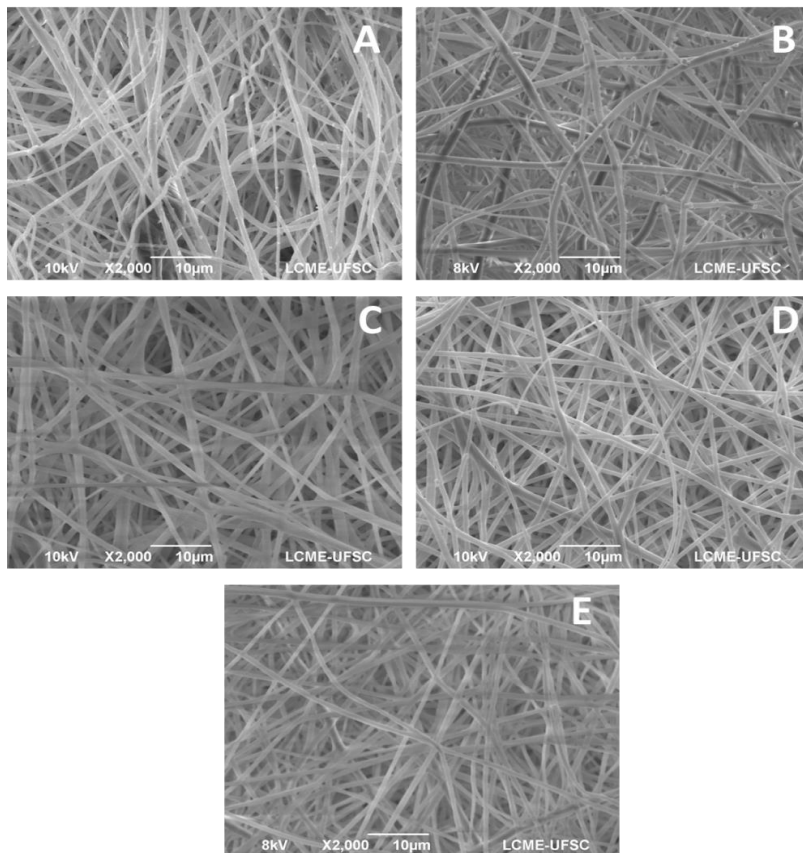


Fig. 2 SEM images of electrospun nanofibers: A) PLGA Control, B) CCO-4, C) TTO-4, D) FUR-4, and E) LAC-4.

The characteristic diameters of the fibers are shown in Table I. As can be seen, in all formulations the fiber diameters are at micron to submicron levels. Mean diameters (d_{50}) were 0.8, 0.95, 0.85, 0.7 and 0.6 μm for the PLGA control, CCO-4, TTO-4, FUR-4 and LAC-4. In addition, these results show a larger diameter size distribution for the CCO-4 and FUR-4 samples (indicated by the greater difference between the d_{10} and d_{90} diameters).

Sample	d_{10} (μm)	d_{50} (μm)	d_{90} (μm)
PLGA Control	0.3 ± 0.02	0.8 ± 0.2	1.5 ± 0.15
CCO-4	0.38 ± 0.08	0.95 ± 0.09	1.7 ± 0.15
TTO-4	0.32 ± 0.04	0.85 ± 0.18	1.3 ± 0.08
FUR-4	0.25 ± 0.03	0.7 ± 0.17	1.8 ± 0.1
LAC-4	0.2 ± 0.05	0.6 ± 0.08	1.1 ± 0.07

Table 1. Characteristic Fiber Diameters

To investigate if any solvent residue was present in the PLGA samples were analyzed by FTIR-ATR as illustrated by Figure 3. DMSO exhibits strong characteristic absorptions at 10451 cm^{-1} due to a stretching of S=O bond (νSO).⁴³ For chloroform the only relevant absorption appears at 752 cm^{-1} , due to C-Cl stretching. For *N,N*-dimethylformamide a strong absorption at 1654 cm^{-1} associate to the C=O stretching.⁴⁴ A careful analysis of the PLGA samples spectra (Figure 3) revealed that none of the major absorptions for the solvents were observed. These results indicate if any solvent residues are present in the PLGA samples, their quantities would be negligible. This is expected since the solvents are evaporated during the electrospinning process.

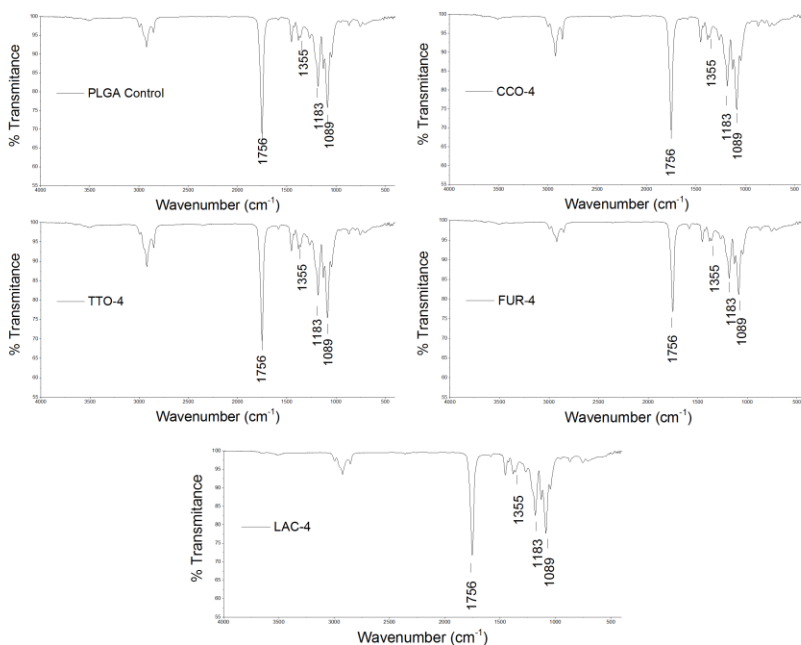


Fig.3 FTIR-ATR spectra of the electrospun samples.

In the spectra for the pure PLGA (control) and PLGA+additive (tea tree essential oil, *C. canephora* essential oil, lactam and furanone) a strong band in the region of 1756 cm^{-1} , characteristic of the carbonyl stretching ($\text{C}=\text{O}$), can be observed. Characteristic stretching bands for the C-O group were observed between 1300 and 1150 cm^{-1} . Also, absorption bands in the following regions were identified: 3000 - 2900 cm^{-1} characteristic of the stretching of the methyl groups CH , CH_3 and CH_2 ; 1500 - 1250 cm^{-1} characteristics of the deformation of methyl groups (CH_3 and CH_2); and 1350 - 1150 cm^{-1} characteristics of "wag type" vibrations of the groups CH_2 and CH .⁴⁴ It should be noted that spectra for the PLGA and PLGA+additive samples are almost identical, indicating that the concentrations of the additives lie outside the detection limit of this technique.

To further investigate the release of the solvents used in the membrane preparation, GC-MS analysis was carried out to identify any traces of these solvents. For these analyses samples of the polymer containing

additives were kept in a vial at 25 °C for 96 hours and the chromatograms of the head space vapor revealed that chloroform was not released by none of the samples. For the DMF small quantities were released by PLGA control, TTO-4, FUR-4 and LAC-4, while DMSO was only released by LAC-4.

4.4.2 Planktonic growth

As shown in Figure 4, the OD₆₃₀ values for planktonic growth (24 h) showed no statistically significant difference between the groups, indicating that the addition of the compounds tested to the nanofibrous membranes did not affect the growth of *S. mutans*.

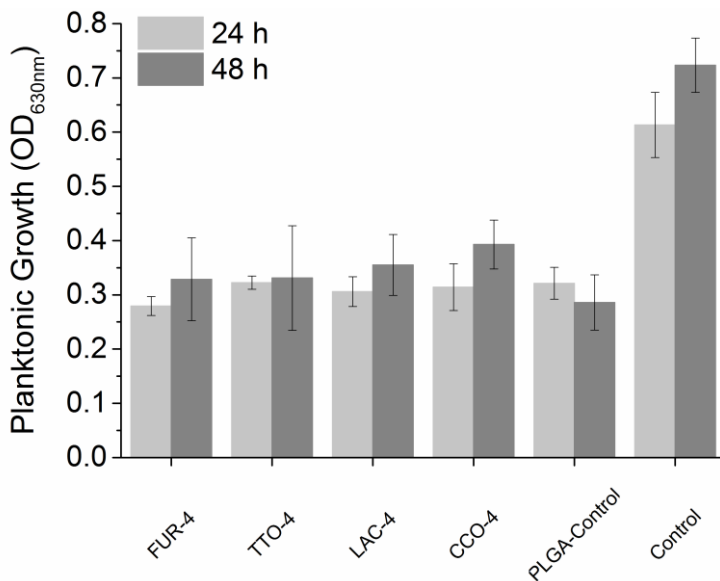


Fig. 4 Quantification of planktonic growth of *S. mutans* (TSB, 24 and 48 h at 37°C).

After 48 h of incubation, the samples still showed no statistically significant difference for planktonic growth rates of *S. mutans*, compared to the control, although a slight tendency toward enhanced planktonic growth could be noted with the CCO-4 membranes as the medium.

When compared to the control (without fibers), all electrospun nanofibers samples displayed significant lower OD readings for planktonic growth, at both 24 h and 48 h.

4.4.3 Biofilm analysis

The biofilm inhibition activity was assessed by counting the CFU mL⁻¹ after bacterial disaggregation from the nanofibrous membranes. The average value obtained for adhered viable cells in the biofilm was approximately 1.2×10^2 CFU mL⁻¹ in the furanone membranes and 4.42×10^2 CFU mL⁻¹ in the PLGA control membrane (Figure 5). These results indicate a significant reduction in the bacterial attachment to the functionalized membrane surfaces containing furanone. Also, data obtained for the Tea tree and Lactam containing membranes indicated notable *S. mutans* biofilm disruption (2.12×10^2 and 2.3×10^2 CFU mL⁻¹ respectively). In contrast to the above-mentioned groups, the CFU counts for the *C. canephora* samples showed no statistically significant difference compared with the control group.

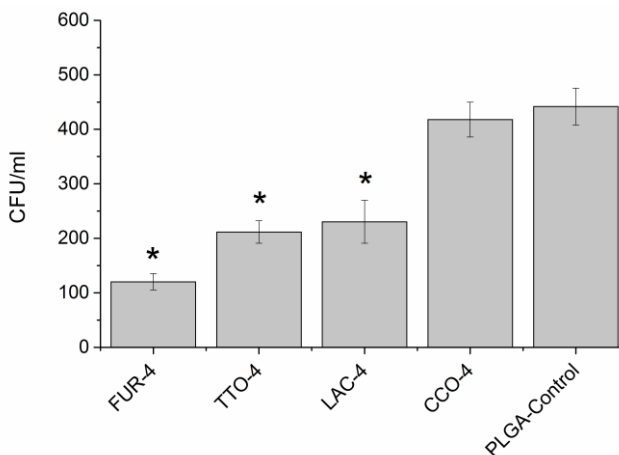


Fig. 5 *Streptococcus mutans* biofilm formation (TSB, 48 h at 37°C) over nanofibrous membrane surfaces, measured by counting the colony forming units (CFU mL⁻¹) (ANOVA and Tukey's post-hoc test with a significance level of $p < 0.05$).

4.4.4 Cell viability

In this study, p-SCs cells were seeded on PLGA nanofibrous membranes

functionalized with antimicrobial compounds, incorporated in 3 progressive concentrations. Each membrane with cells was cultured for 2 days and the *in vitro* biocompatibility was evaluated using the MTS cell proliferation assay. The furanone containing membranes exhibited no statistically significant difference in relation to the PLGA control group for the three distinct concentrations, indicating no inhibitory effect on cell proliferation. However, a reduced cell density was noted for the lactam **4** and *C. canephora* samples, at concentrations of 0.004 and 0.008% (w/v). Measurement of the absorbance also showed that the cell growth on the tea tree membranes decreased significantly ($p < 0.05$) compared to the PLGA samples at the highest concentration as showed in Figure 6.

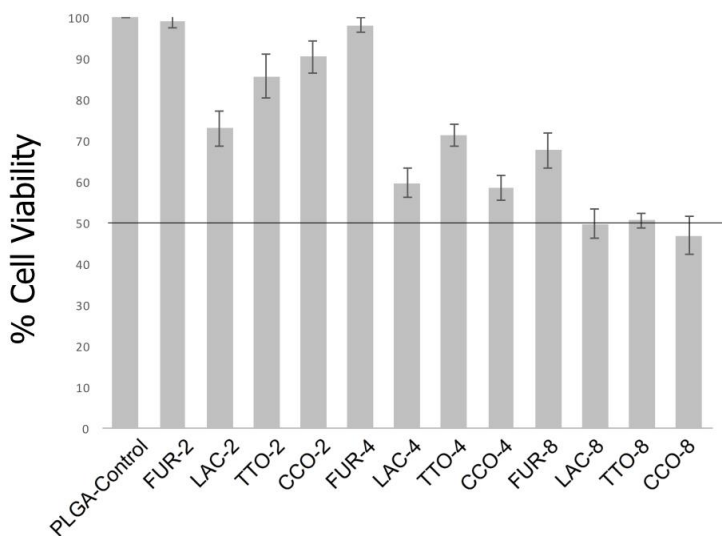


Fig.6 (p-SC) proliferation on nanofibrous membranes after 2 days of cell culture. The horizontal bar indicates the FDA recommended cytotoxicity endpoint (50%)⁽⁴⁵⁾. ANOVA and Tukey's post-hoc test with a significance level of $p < 0.05$).

4.5 DISCUSSION

The membranes produced in this study were composed of randomly-oriented nanofibers, which confer characteristics such as enhanced mechanical properties and strength as well as reduced risk of fibrous

tissue infiltration, which is an important requirement for guided tissue regeneration (GTR). According to previous reports, the average diameter of the pores in the aligned nanofibrous mat is three times larger than that in the randomly-oriented mat, and the porosity of the aligned nanofibrous scaffolds is greater, therefore not presenting ideal properties for GTR membranes. Moreover, in randomly-oriented nanofibrous mats the conduit has nano- to micro-sized pores (50 nm-5 μm) through which oxygen, nutrients and neurotrophic factors such as growth factors can permeate, but they prevent the infiltration of fibrous tissues.^{45,46}

In the study reported herein, the results obtained from the biofilm analysis indicate that most of the compounds tested (synthetic lactam **4**, tea tree oil and furanone **5**) are effective in suppressing *S. mutans* biofilm development on nanofibrous membranes, with *C. canephora* presenting relatively low biofilm inhibition rates compared to the other compounds.

Data provided by the statistical analysis of the counting data (CFU; Figure 5) for the biofilm formed over the furanone-functionalized membranes indicate a significant inhibition when compared to biofilms formed in the absence of an inhibitor ($p < 0.05$). These results corroborate a series of previous studies, where these compounds were shown to actively inhibit biofilm formation.⁴⁷⁻⁴⁹

In addition, the reduced CFU counts for the biofilm detached from the lactam-functionalized membranes (approximately 2.3×10^2 CFU mL^{-1} compared to 4.42×10^2 CFU mL^{-1} for the control samples) are in agreement with results reported in the literature,⁵⁰ where similar synthetic lactams, derived from furanones, were tested in solubilized form against the biofilm formation of *S. mutans* grown over titanium mats.

The planktonic growth rates for *S. mutans* in the presence of all compounds tested showed no statistically significant difference when compared to the control membranes (Figure 4). This result indicates that none of the compounds added to the surrounding medium displayed a bactericide/bacteriostatic effect, which is an indication that no systemic effects of the drugs would be expected.

Interestingly, when compared to the no-PLGA control sample, all electrospun nanofibers samples displayed significant lower OD readings for planktonic growth, at both 24 h and 48 h. This result was unexpected, since previous work had already demonstrated that PLGA membranes and disks do not inhibit bacterial growth, either in planktonic or biofilm state³⁷. It is possible that this inhibitory effect in

bacterial growth could be attributed to modifications introduced in the material by the electrospinning technique itself .

As the incorporation of these compounds does not interfere with planktonic growth, these additives are supposed to act as biofilm inhibitors. Further studies have to be conducted in order to determine the mechanism of biofilm inhibition of these compounds, but studies already conducted in solution showed that furanones and lactams could act as a quorum sensing inhibitors.³⁸ In the case of essential oils, as they are composed of various compounds it is difficult to determine which of them could present a quorum sensing inhibition activity. Also, it should be mentioned that as the activity of the individual compounds present in essential oils were not yet studied regarding their effect on bacteria, it is not known if, besides affecting biofilm formation, they also interfere with other bacterial metabolic pathways. Although in our study the compounds did not affect bacterial viability, it cannot be excluded that, at different concentrations than those used in this study, other metabolic pathways could also be affected.

The evaluation of the cytotoxicity of the compounds incorporated into the PLGA membranes against human p-SCs (Figure 6) revealed that the surface of the electrospun membranes can provide a support for the proliferation of the cells.

Furanone-incorporated surfaces did not exhibit an inhibitory effect on cell viability, at the concentrations tested, as observed through a comparison with the PLGA control membranes ($p < 0.05$). This is an important advance in the area of biomaterials, allowing surface coverage and integration with the host tissue cells prior to bacterial adhesion/colonization. The results obtained for membranes containing lactam **4** indicated that cell viability was affected ($p < 0.05$) on applying two out of the three concentrations tested, reducing the percentage of viable cells from 73 to 50%. Since in previous studies solubilized did not display significant cytotoxic against human cells, this decrease in cell viability showed here could be associated with residual traces of the organic solvent, DMSO, identified in the GC/MS analysis. Also, the direct incorporation of the solvent into the electrospun fibers has not been determined in previous cytotoxicity studies, further studies are necessary to confirm the possible influence of the process on the DMSO results.

Chemical analysis of samples was conducted in order to identify solvent traces in the membranes. From the FTIR/ATR analysis solvent traces on the fiber surface could not be detected. These results were further supported by GC-MS analysis, where only residual traces of DMF were

identified in the PLGA Control, TTO-4, FUR-4 and LAC-4 samples, with no cytotoxicity being presented.

4.6 CONCLUSIONS

In this study, we successfully synthesized bioactive membranes by the electrospinning process in order to produce randomly-aligned nanofiber mats suitable for use in the prevention of biomaterial-associated infections and for tissue cell integration. Morphological analysis verified the smooth and bead-free surface features of the nanofibers, and the nanofiber diameter varied according to the additive used. These differences can be attributed to variations in the viscosity and conductivity due to the incorporation of additives.

Incorporation of compounds in nanofibers leads to a reduction in biofilm formation with best results being obtained for *tea tree* oil, furanone and lactam. *Coffea canephora* oil showed only marginal biofilm inhibition. Furanone is reported in literature to act interfering with bacterial communication leading to a biofilm formation inhibition. In the case of essential oils, it should be noted that they have a heterogeneous composition and their mode of action in the biofilm formation could be by interfering with bacterial communication but it cannot be excluded that they could interfere with other metabolic pathways.

The results obtained indicate that the electrospun bioactive PLGA membranes prepared represent a promising matrix for tissue cell proliferation while acting as a barrier for fibrous tissue infiltration and inhibiting bacterial interaction. The antibiofilm activity and cytotoxicity data revealed that furanone-functionalized nanofibrous membranes might be a good candidate for developing new functionalized biomedical devices. It is possible that furanone **5** alone could be successfully used to protect biomaterials against antibiofilm contamination; nevertheless a much higher efficiency in biofilm inhibition might be achieved by combining one or more compounds in the structure of the material. With this in mind, studies are under way to test the efficacy of different antibiofilm compositions embedded in the biomaterial nanofibers.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to disclose. There were no sources of funding that could have influenced the outcome of this work.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the laboratorial infrastructure of LABMASSA (Laboratory of Mass Transfer – UFSC), the financial support provided by the government research funding agencies CAPES and CNPq (SET-B 350091/2016-1 and Project 407369/2013-9, Electrospun Nanofibers - Smart Textile Products for Industry Innovation). LCAB acknowledge the grants from CNPq (304341) and FAPEMIG (24391) to support the synthesis of new antibacterial compounds. Authors also thanks to Guerreiro-Filho, O., from the Coffee Division, Agronomic Institute of Campinas (IAC), Campinas, SP, Brazil, for kindly providing the *Coffea canephora* extracts. CVF thanks CAPES for providing financial support during his stay at Cornell University (Project 2393/14-0).

4.7 REFERENCES

1. Papaspyridakos P, Mokti M, Chen C-J, Benic GI, Gallucci GO, Chronopoulos V. Implant and Prosthodontic Survival Rates with Implant Fixed Complete Dental Prostheses in the Edentulous Mandible after at Least 5 Years: A Systematic Review. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014;16:705–17.
2. Del Fabbro M, Corbella S, Weinstein T, Ceresoli V, Taschieri S. Implant Survival Rates after Osteotome-Mediated Maxillary Sinus Augmentation: A Systematic Review. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012;14:e159–68.
3. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011;2:435–44.
4. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:413–37.
5. Nyvad B, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res.* 1990;24:267–72.
6. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:167–93.
7. Barrett CT, Barrett JF. Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems? *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14:621–6.
8. Miller MB, Bassler BL. Quorum Sensing in Bacteria. *Annu Rev*

- Microbiol. 2001;55:165–99.
9. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:319–46.
 10. Lönn-Stensrud J, Petersen FC, Benneche T, Scheie AA. Synthetic bromated furanone inhibits autoinducer-2-mediated communication and biofilm formation in oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:340–6.
 11. Ren D, Sims JJ, Wood TK. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environ Microbiol.* 2001;3:731–6.
 12. Blehert DS, Palmer RJ, Xavier JB, Almeida JS, Kolenbrander PE. Autoinducer 2 Production by *Streptococcus gordonii* DL1 and the Biofilm Phenotype of a *luxS* Mutant Are Influenced by Nutritional Conditions. *J Bacteriol.* 2003;185:4851–60.
 13. Yoshida A, Ansai T, Takehara T, Kuramitsu HK. LuxS-Based Signaling Affects *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:2372–80.
 14. Givskov M, Nys R de, Manefield M, Gram L, Maximilien R, Eberl L, Molin S, Steinberg PD, Kjelleberg S. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol.* 1996;178:6618–22.
 15. Pereira UA, Barbosa LCA, Maltha CRA, Demuner AJ, Masood MA, Pimenta AL. γ -Alkylidene- γ -lactones and isobutylpyrrol-2(5H)-ones analogues to rubrolides as inhibitors of biofilm formation by gram-positive and gram-negative bacteria. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24:1052–6.
 16. Ho KKK, Cole N, Chen R, Willcox MDP, Rice SA, Kumar N. Characterisation and in vitro activities of surface attached dihydropyrrol-2-ones against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Biofouling.* 2010;26:913–21.
 17. Kalia VC. Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnol Adv.* Elsevier Inc.; 2013;31:224–45.
 18. Olivero JT, Pajaro NP, Stashenko E. Antiquorum Sensing Activity of Essential Oils Isolated from Different Species of the Genus *Piper*. *Vitae, Rev la Faculdadd Quim Farm.* 2011;18:77–82.
 19. Mossi AJ, Astolfi V, Kubiak G, Lerin L, Zanella C, Toniazzo G, Oliveira D de, Treichel H, Devilla IA, Cansian R, Restello R. Insecticidal and repellency activity of essential oil of *Eucalyptus*

- sp. against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *J Sci Food Agric*. 2011;91:273–7.
20. Li Y-H, Tang N, Aspiras MB, Lau PCY, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG. A Quorum-Sensing Signaling System Essential for Genetic Competence in *Streptococcus mutans* Is Involved in Biofilm Formation. *J Bacteriol*. 2002;184:2699–708.
 21. Khan MSA, Zahin M, Hasan S, Husain FM, Ahmad I. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Lett Appl Microbiol*. 2009;49:354–60.
 22. Husain FM, Ahmad I, Khan MS, Ahmad E, Tahseen Q, Khan MS, Alshabib NA. Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria. *Front Microbiol*. 2015;6.
 23. Tiwari SK, Venkatraman SS. Importance of viscosity parameters in electrospinning: Of monolithic and core–shell fibers. *Mater Sci Eng C*. 2012;32:1037–42.
 24. Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Fabrication of uniaxially aligned 3D electrospun scaffolds for neural regeneration. *Biomed Mater*. 2011;6:25004.
 25. Okuda T, Tominaga K, Kidoaki S. Time-programmed dual release formulation by multilayered drug-loaded nanofiber meshes. *J Control Release*. 2010;143:258–64.
 26. Qin X. Coaxial electrospinning of nanofibers. *Electrospun Nanofibers*. Elsevier; 2017.
 27. Ranjbar-Mohammadi M, Zamani M, Prabhakaran MP, Bahrami SH, Ramakrishna S. Electrospinning of PLGA/gum tragacanth nanofibers containing tetracycline hydrochloride for periodontal regeneration. *Mater Sci Eng C*. Elsevier B.V.; 2016;58:521–31.
 28. Tang Y, Chen L, Zhao K, Wu Z, Wang Y, Tan Q. Fabrication of PLGA/HA (core)-collagen/amoxicillin (shell) nanofiber membranes through coaxial electrospinning for guided tissue regeneration. *Compos Sci Technol*. Elsevier Ltd; 2016;125:100–7.
 29. Jia H, Zhu G, Vugrinovich B, Kataphinan W, Reneker DH, Wang P. Enzyme-Carrying Polymeric Nanofibers Prepared via Electrospinning for Use as Unique Biocatalysts. *Biotechnol Prog*. 2002;18:1027–32.
 30. Tran DN, Balkus KJ. Enzyme Immobilization via Electrospinning. *Top Catal*. 2012;55:1057–69.
 31. WU L, YUAN X, SHENG J. Immobilization of cellulase in

- nanofibrous PVA membranes by electrospinning. *J Memb Sci.* 2005;250:167–73.
32. Sultana N, Khan TH. In Vitro Degradation of PHBV Scaffolds and nHA/PHBV Composite Scaffolds Containing Hydroxyapatite Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. *J Nanomater.* 2012;2012:1–12.
 33. Nazemi K, Azadpour P, Moztarzadeh F, Urbanska AM, Mozafari M. Tissue-engineered chitosan/bioactive glass bone scaffolds integrated with PLGA nanoparticles: A therapeutic design for on-demand drug delivery. *Mater Lett. Elsevier;* 2015;138:16–20.
 34. Zong X, Li S, Chen E, Garlick B, Kim K-S, Fang D, Chiu J, Zimmerman T, Brathwaite C, Hsiao BS, Chu B. Prevention of postsurgery-induced abdominal adhesions by electrospun bioabsorbable nanofibrous poly(lactide-co-glycolide)-based membranes. *Ann Surg.* 2004;240:910–5.
 35. Yao F, Weiyuan JK. Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non- degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010;7:429–44.
 36. Kennedy JP, McCandless SP, Lasher RA, Hitchcock RW. The mechanically enhanced phase separation of sprayed polyurethane scaffolds and their effect on the alignment of fibroblasts. *Biomaterials.* 2010;31:1126–32.
 37. Yüksel E, Karakeçili A. Antibacterial activity on electrospun poly(lactide-co-glycolide) based membranes via Magainin II grafting. *Mater Sci Eng C.* 2014;45:510–8.
 38. Pereira UA, Barbosa LCA, Maltha CRA, Demuner AJ, Masood MA, Pimenta AL. Inhibition of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by highly active lactones and lactams analogues of rubrolides. *Eur J Med Chem.* 2014;82:127–38.
 39. Souza JCM, Henriques M, Oliveira R, Teughels W, Celis J-P, Rocha LA. Biofilms Inducing Ultra-low Friction on Titanium. *J Dent Res.* 2010;89:1470–5.
 40. Souza JCM, Ponthiaux P, Henriques M, Oliveira R, Teughels W, Celis J-P, Rocha LA. Corrosion behaviour of titanium in the presence of *Streptococcus mutans*. *J Dent.* 2013;41:528–34.
 41. Beg AM, Jones MN, Miller-Torbert T, Holt RG. Binding of *Streptococcus mutans* to extracellular matrix molecules and fibrinogen. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;298:75–9.
 42. Kobayashi H, Oethinger M, Tuohy MJ, Procop GW, Bauer TW. Improved Detection of Biofilm-formative Bacteria by Vortexing

- and Sonication: A Pilot Study. *Clin Orthop Relat Res*. 2009;467:1360–4.
43. Mozhzhukhina N, Méndez De Leo LP, Calvo EJ. Infrared Spectroscopy Studies on Stability of Dimethyl Sulfoxide for Application in a Li–Air Battery. *J Phys Chem C*. 2013;117:18375–80.
 44. Colthup NB, H. DL, Wiberley SE. Introduction to infrared and raman spectroscopy. Second Edi. New York: Academic Press; 1975. 536 p.
 45. Li W, Zhou J, Xu Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomed reports*. 2015;3:617–20.
 46. Kim JI, Hwang TI, Aguilar LE, Park CH, Kim CS. A Controlled Design of Aligned and Random Nanofibers for 3D Bi-functionalized Nerve Conduits Fabricated via a Novel Electrospinning Set-up. *Sci Rep*. 2016;6:23761.
 47. Oh SH, Kim JH, Song KS, Jeon BH, Yoon JH, Seo TB, Namgung U, Lee IW, Lee JH. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. *Biomaterials*. 2008;29:1601–9.
 48. Han Y, Hou S, Simon KA, Ren D, Luk Y-Y. Identifying the important structural elements of brominated furanones for inhibiting biofilm formation by *Escherichia coli*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;18:1006–10.
 49. He Z, Wang Q, Hu Y, Liang J, Jiang Y, Ma R, Tang Z, Huang Z. Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its luxS mutant strain. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40:30–5.
 50. Ren D, Sims JJ, Wood TK. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Lett Appl Microbiol*. 2002;34:293–9.
 51. Xavier JG, Geremias TC, Montero JFD, Vahey BR, Benfatti CAM, Souza JCM, Magini RS, Pimenta AL. Lactam inhibiting *Streptococcus mutans* growth on titanium. *Mater Sci Eng C*. 2016;68:837–41.

5 REFERÊNCIAS

- BARCZAK, A. K.; HUNG, D. T. Productive steps toward an antimicrobial targeting virulence. *Current Opinion in Microbiology*, v. 12, p. 1–7, 2009.
- BJARNSHOLT, T.; JENSEN, P. O.; BURMOLLE, M.; HENTZER, M.; HAAGENSEN, J. A. J.; HOUGEN, H. P.; CALUM, H.; MADSEN, K. G.; MOSER, C.; MOLIM, S.; HOIBY, N.; GIVSKOV, M. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology*, v. 151, p. 373–383, 2005.
- CEGELSKI, L.; MARSHALL, G. R.; ELDRIDGE, G. R.; HULTGREN, S. J. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews: Microbiology*, v. 6, p. 17-27, 2008.
- CERI, H.; OLSON, C.; STREMICK, R; REA, D; MORCK, D; BURET, A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms, *J. Clin. Microbiol.* 37, 6, p.1771–1776, 1999.
- CHA, C.; GAO, P.; CHEN, Y.C.; SHAW, P.D.; FARRAND, S.K. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.*, v. 11, n. 11, p. 1119-29, 1998.
- CHIAPASCO, M.; CASENTINI, P.; ZANIBONI, M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 24, p.237-259, 2009.
- COREY, J. M.; GERTZ, C.C.; WANG, B.; BIRELL, L. K.; JOHNSON, S. L.; MARTIN, D. C.; FELDMAN, E. L. The design of electrospun PLLA nanofiber scaffolds compatible with serum-free growth of primary motor and sensory neurons, *Acta Biomaterialia*, v. 4, p. 863-875, 2008.
- COSSEAU, C.; DEVINE, D.A.; DULLAGHAN, E.; GARDY, J.L.; CHIKATAMARLA, A.; GELLATLY, S.; YU, L.L.; PISTOLIC, J.;

FALSAFI, R.; TAGG, J.; HANCOCK, R.E. The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infect Immun.*, v.76, p. 4163–4175, 2008.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

CRIELAARD, W; ZAURA, E; SCHULLER, A.A.; HUSE, S.M.; MONTIJN, R.C.;

DAHLIN, C.; LINDE, A.; GOTTLow, J.; NYMAN, S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg.*, v. 81, n. 5, p. 672-6, May 1988.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.*, v. 2, n. 2, p. 114-22, 2003.

FAUST, K.; SATHIRAPONGSASUTI, J.F.; IZARD, J.; SEAGATA, N.; GEVERS, D.; RAES, J.; HUTTENHOWER, C. Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Comput Biol*, 8, e1002606, 2012.

FRENO, A.; CHRONAKIS, I. Polymer nanofibers assembled by electrospinning, *Curr. Opin. Colloid Inter. Sci.*, v. 8, p. 64-75, 2003.

GENTILE, P.; CHIONO, V.; CARMAGNOLA, I.; HATTON, P. V. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.*, v.15, p. 3640–3659, 2014.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.*, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.

HENTZER, M.; GIVSKOV, M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation*, v. 112, p. 1300–1307, 2003.

HUANG, Z.; ZHANG, Y.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Comp. Sci. Technol.*, v. 63, p. 2223-2253, 2003.

İNANÇ, B.; ARSLAN, Y. E.; SEKER, S.; ELÇİN, A. E.; ELÇİN, Y.M. Periodontal ligament cellular structures engineered with electrospun poly(DL-lactide-co-glycolide) nanofibrous membrane scaffolds, *J. Biom. Mat. Research. Part A*, v. 90(1), p. 186- 195, 2009.

IVANOV, I.I.; HONDA, K. Intestinal commensal microbes as immune modulators. *Cell Host Microbe.*, v.12, p. 496–508, 2012.

KEIJSER, B. J. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Med Genomics*, v. 4, p. 22, 2011.

KJELLEBERG, S.; STEINBERG, P.; GIVSKOV, M.; GRAM, L.; MANEFIELD, M.; DE NYS, R. Do marine natural products interfere with prokaryotic AHL regulatory systems? *Aquatic Microbial Ecology*, v. 13, p. 85-93, 1997.

LISTGARTEN, M. A. Dental plaque: its structure and prevention. *ASDC J Dent Child.*, v. 39, n. 5, p. 347-52, 1972.

LISTGARTEN, M. A. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol.*, v. 47, n. 1, p. 1-18, 1976.

LISTGARTEN, M. A.; MAYO, H. E.; TREMBLAY, R. Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol.*, v. 46, n. 1, p. 10-26, 1975.

MANEFIELD, M., de NYS, R., KUMAR, N., READ, R., GIVSKOV, M., STEINEBERG, P., KJELLEBERG, S. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL) mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology*, v. 145, p. 283-291, 1999.

MANEFIELD, M., RASMUSSEN, T.B., HENZTER, M., ANDERSEN, J.B., STEINBERG, P., KJELLEBERG, S. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*, v. 148, p. 1119-1127, 2002.

MARSCH, P.D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, v. 149, p.279–294, 2003.

MARSCH, P.D.; HEAD, D.A.; DEVINE, D. A. Prospects of oral disease control in the future – an opinion. *J Oral Microbiol.*, 2014.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 55, p. 165-199, 2001.

PEREIRA, U. A.; BARBOSA, L.C.; MALTHA, C.R.; DEMUNER, A.J.; MASOOD, M.A.; PIMENTA, A.L. γ -Alkylidene- γ -lactones and isobutylpyrrol-2(5H)-ones analogues to rubrolides as inhibitors of biofilm formation by gram-positive and gram-negative bacteria. *Bioorg Med Chem Lett.*, v. 24, n. 4, p. 1052-6, 2014a.

PEREIRA, U.A.; BARBOSA, L.C.A.; MALTHA, C.R.A; DEMUNER A.J.; MASOOD, M.A.; PIMENTA, A.L. Inhibition of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by highly active lactones and lactams analogues of rubrolides, *Eur. J. Med. Chem.*, v. 82, p. 127–138, 2014b.

RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO,W. ; LIM ,T.; MA, Z. An Introduction to Electrospinning and Nanofibers, World Scientific. Singapore, 2005

RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W.; YONG, T.; MA, Z., RAMASHESAN, R. Electrospun nanofibers: solving global issues, *Mater. Today*. 2006.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews: Drug Discovery*, v. 9, p. 117-128, 2010.

RASMUSSEN, T.B., BJARNSHOLT, T., SKINDERSOE, M.E., HENZTER, M., KRISTOFFERSEN, P., KÖTE, M., NIELSEN, J., EBERL, L., GIVSKOV, M. Screening for quorum-sensing inhibitors

(QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *Journal of Bacteriology*, v. 187, p. 1799-1814, 2005.

RASMUSSEN, T. B.; GIVSKOV, M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 296, 149-161, 2006.

REN, D.; SIMS, J. J.; WOOD, T. K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Lett Appl Microbiol.*, v. 34, n. 4, p. 293-9, 2002.

RETZEPI, M.; DONOS, N.; Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res.*, v. 21, n. 6, p. 567-76, 2010.

RICHARDS, J. J.; MELANDER, C. Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem.*, v.10, n. 14, p. 2287-94, 2009.

SALONEN, J. I.; PERSSON, G. R. Migration of epithelial cells on materials used in guided tissue regeneration. *J Periodontal Res.*, v. 25, n. 4, p. 215-21, Jul. 1990.

SCHIFFMAN, J.; SCHAUER, C. A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Application, *Polymer Reviews*, v. 48, p. 317-352, 2008.

SMITH, P.M.; GARRETT, W.S. The gut microbiota and mucosal T cells. *Front Microbiol.*, v. 2, p. 111, 2011.

SPASOVA, M.; STOILOVA, O.; MANOLOVA, N.; RaASHKOV, I. Preparation of PLLA/PEG nanofiber by electrospinning and potential application, *J. Bioact. Compat. Polym.*, v. 22, p.62-76, 2007

STAUDER, M.; PAPETTI, A.; MASCHERPA, D.; SCHITO, A. M.; GAZZANI, G.; PRUZZO, C.; DAGLIA, M. Antiadhesion and antibiofilm activities of high molecular weight coffee components against *Streptococcus mutans*. *J Agric Food Chem.* v. 24, 22, p. 11662-6, 2010.

SUBRAMANI, K.; JUNG, R.E.; MOLENBERG, A.; HÄMMERLE, C.H.F. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.24, p. 616, 2009.

TAKARADA, K.; KIMIZUKA, R.; TAKAHASHI, N.; HONMA, K., OKUDA, K.; KATO, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol.*, v.19, p.61-64, 2004.

WENG, Y.; HOWARD, L.; CHONG, V.J.; SUN, J.; GREGORY, R.L.; XIE, D. A novel furanone-modified antibacterial dental glass ionomer cement *Acta Biomaterialia*, v. 8, p. 3153–3160, 2012.

XAVIER, J.G.; GEREMIAS, T.C.; MONTERO, J.F.D.; VAHEY, B.R.; BENFATTI, C.A.; SOUZA, J.C.; MAGINI, R.S.; PIMENTA, A.L. Lactam inhibiting *Streptococcus mutans* growth on titanium, *Mater. Sci. Eng. C.*, v. 68, p. 837–841, 2016.

ZAURA, E.; KEIJSER, B.J.; HUSE, S.M.; CRIELAAR, W. Defining the healthy ‘core microbiome’ of oral microbial communities. *BMC Microbiol.*, v. 9, p. 259, 2009.

ZIJNGE, V.; VAN LEEUWEN, M.B.; DEGENER, J.E; ABBAS, F.; THURNHEER, T.; GMUR, R.; HARMSSEN, H.J. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS On*, v. 5, p. 9321, 2010.