



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

LAÊNIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES

**ATIVIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE
BIOFILME EM *Staphylococcus aureus***

JOÃO PESSOA-PB

2016

LAÊNIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES

**ATIVIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE
BIOFILME EM *Staphylococcus aureus***

JOÃO PESSOA-PB

2016

LAÊNIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES

**ATIVIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE
BIOFILME EM *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.
Área de concentração: Análise e controle de qualidade de alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

JOÃO PESSOA-PB

2016

L864a Lopes, Laênia Angélica Andrade.
 Atividade de compostos fenólicos na inibição da formação
 de biofilme em *Staphylococcus aureus* / Laênia Angélica
 Andrade Lopes.- João Pessoa, 2016.
 63f. : il.
 Orientador: José Pinto de Siqueira Júnior
 Coorientador: Evandro Leite de Souza
 Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
 1. Nutrição. 2. Alimentos - análise - controle de qualidade.
 3. Compostos fenólicos. 4. *Staphylococcus* spp. 5. Biofilme.

UFPB/BC

CDU: 612.39(043)

LAÊNIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES

**ATIVIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE
BIOFILME EM *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Dissertação de Mestrado avaliada em: 01/03/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior-DBM/CCEN/UFPB
Coordenador da Banca Examinadora

Prof. Dra. Marciane Magnani -DEA/CT/UFPB
Examinador Interno

Prof. Dra. Cybelle de Oliveira Dantas – DGTA/CCHSA/UFPB
Examinador Externo

*Dedico estas linhas,
a Deus por me conceder a vida e a benção de chegar até aqui.
Aos meus pais Cristina e Nilson (in memoriam), pelo amor e ensinamentos que tão
sabiamente me passaram no breve tempo que compartilhamos.
A minha família pelo apoio, amor e dedicação em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Quero expressar a minha gratidão às pessoas que acreditaram e contribuíram para a realização desta conquista, meu agradecimento em especial:

À Deus, autor e consumidor da minha fé, pela força e proteção que recebi até aqui.

À Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição pela oportunidade de realização deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos ao longo do curso de mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior pela oportunidade e confiança durante estes dois anos de convivência.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Evandro Leite de Souza pelas contribuições ao trabalho e participação na elaboração do artigo aqui apresentado.

À Profa. Dra. Marciane Magnani pelos valiosos ensinamentos e pela constante dedicação e amizade.

À Profa. Dra. Cybelle de Oliveira Dantas pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Genética de Micro-organismos, Seu Bosco, pela dedicação à realização de nossas atividades.

Ao Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos que me recebeu de braços abertos.

Às amigas que a academia me deu: Sonalle, Adma, Tayanna, Celina, Tainá, Nayara, Whyara e Helena. Obrigada pelo apoio e incentivo nos momentos necessários.

À Jéssica, por todos os ensinamentos e pela sua amizade. Essa conquista divido com você.

Quero agradecer às pessoas que não fazem parte da academia, mas que sem elas não teria chegado até aqui:

As minhas grandes amigas Vanessa, Germana, Islânia e Yana. Existem amigos mais chegados que irmãos.

Ao meu namorado e companheiro Carlos Alberto por todo amor, carinho, paciência e compreensão ao longo dessa caminhada. Não teria sido a mesma história sem você.

A minha pequena, grande família, Glauber, Laise e Filipe, obrigada por sempre acreditarem em mim. Amo vocês.

Aos meus pais Cristina e Nilson (*in memoriam*), vocês sempre serão minha inspiração.

E a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Nós não somos o que gostaríamos de ser.
Nós não somos o que ainda iremos ser.
Mas, graças a Deus, não somos mais quem nós éramos.”
(Martin Luther King)

RESUMO

Os compostos fenólicos formam uma das principais classes de metabólitos secundários de plantas e podem ser categorizados em várias classes, incluindo os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos. Diversos compostos fenólicos têm demonstrado propriedades antimicrobianas e de inibição da formação de biofilmes por bactérias patogênicas, incluindo *Staphylococcus aureus*. Este estudo avaliou a eficácia de compostos fenólicos na inibição da formação de biofilmes por *S. aureus*. Foram testados os flavonoides hesperidina, hesperetina, miricitrina, miricetina, floedzina, floretina e o tanino ácido tânico. As cepas *S. aureus* RN4220 e *S. aureus* AS-119B que superexpressa genes para proteínas de efluxo foram utilizadas como cepas teste. Ainda, a cepa *S. aureus* ATCC259233, que não superexpressa genes conhecidos relacionados à bomba de efluxo, foi utilizada nos ensaios. A concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos fenólicos foi determinada por meio do método de microdiluição em caldo, enquanto a concentração mínima inibitória do biofilme (MBIC₅₀) foi determinada por meio do método de microdiluição em caldo seguida de quantificação da formação de biofilme a 595 nm. Os compostos fenólicos testados não apresentaram atividade antimicrobiana em concentrações igual ou inferiores a 512 µg.ml⁻¹ frente as cepas testadas. Entretanto, esses mesmos compostos apresentaram capacidade de inibição da formação de biofilme por parte das cepas testadas, com os valores de MBIC₅₀ variando de 1 a 256 µg.ml⁻¹, onde os valores mais baixos (1 e 2 µg.ml⁻¹) foram observados frente a *S. aureus* RN-4220. Os flavonoides agliconas apresentaram menores valores de MBIC₅₀ que suas respectivas formas glicosiladas. Miricetina, hesperetina, floretina e ácido tânico apresentaram percentual de inibição da formação de biofilme > 70% para *S. aureus* RN- 4220. Os resultados mostram que os compostos fenólicos testados apresentam potencial de inibição da formação de biofilme em cepas de *S. aureus* que superexpressam genes para proteínas de efluxo.

Palavras-chave: compostos fenólicos; *Staphylococcus* spp.; biofilme.

ABSTRACT

Phenolic compounds are one of the major classes of secondary metabolites of plants and can be categorized into several classes, including phenolic acids, flavonoids and tannins. Several phenolic compounds have shown antimicrobial properties and capability to inhibit the biofilm formation by pathogenic bacteria, including *Staphylococcus aureus*. This study evaluated the efficacy of phenolic compounds in inhibiting biofilm formation of *S. aureus*. Flavonoids have been tested hesperetin, hesperidin, myricetin, myricitrin, phloretin, phloridzin and the tannins tannic acid. RN4220 and *S. aureus* AS-119B strains, which overexpress efflux protein genes were used as test strain. The *S. aureus* ATCC259233 strain which does not overexpress genes related to efflux proteins was used in tests. The minimum inhibitory concentration (MIC) of phenolic compounds was determined by the microdilution in broth method, while the minimum concentration for biofilm inhibition (MICB₅₀) was determined by the microdilution in broth method with quantification of biofilm formation by absorbance at 595 nm. The tested phenolic compounds at 512 µg ml⁻¹ showed no inhibitory activity on the growth of the strains tested; however, at lower concentrations showed inhibitory effects on biofilm formation by these same strains, the MBIC₅₀ values varying between 1 to 256 µg ml⁻¹, with lower values (1 and 2 µg ml⁻¹) being observed against *S. aureus* RN-4220. Aglycone flavonoids showed lower MICB₅₀ values than their respective glycone forms. Myricetin, hesperetin, phloretin and tannic acid exhibited biofilm formation inhibition > 70% for *S. aureus* RN- 4220. The results indicate that the tested phenolic compounds have the potential of inhibiting biofilm formation by *S. aureus* strains that overexpress efflux pumps.

Keywords: phenolic compounds; *Staphylococcus* spp.; biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Dissertação

Figura 1 -	Estrutura química dos compostos fenólicos	17
Figura 2 -	Estrutura química da miricitrina	18
Figura 3 -	Estrutura química da miricetina	18
Figura 4 -	Estrutura química da hesperetina e hesperidina	19
Figura 5 -	Estrutura química da floretina	20
Figura 6 -	Estrutura química da floridzina	20
Figura 7 -	Estrutura química do ácido tânico	22

Artigo

Figura 1 -	Colorimetric scale used for the evaluation of <i>S. aureus</i> colonies in Congo Red Agar (CRA)	56
Figura 2 -	Percentage biofilm formation inhibition of <i>S. aureus</i> strains exposed to different concentrations of flavonoids	57

Outros Resultados

Figura 1 -	Percentual de inibição da formação de biofilme por cepas de <i>S. aureus</i> expostas a diferentes concentrações de ácido tânico	59
------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Dissertação

Tabela 1 -	Compostos fenólicos ensaiados	23
------------	-------------------------------	----

Artigo

Tabela 1 -	Chemical classification of flavonoids tested for inhibition of biofilm formation by <i>S. aureus</i>	52
Tabela 2 -	Characteristics of <i>S. aureus</i> strains used in the study, considering the capability to express efflux protein genes	53
Tabela 3 -	Minimum concentration for inhibition of biofilm formation of flavonoids against <i>S. aureus</i> strains, expressed as MBIC ₅₀	54
Tabela 4 -	Decreases of the minimum concentration for biofilm inhibition (MBIC ₅₀) in relation to the minimal inhibitory concentration (MIC) of aglycone flavonoids against <i>S. aureus</i> strains	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> e resistência antimicrobiana	14
2.2 Formação de biofilme	15
2.3 Compostos fenólicos	16
2.3.1 Flavonoides	17
2.3.2 Taninos	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Antibióticos e compostos fenólicos	23
3.2 Linhagens de teste e meios de cultura	23
3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	24
3.4 Caracterização fenotípica da produção de biofilme	24
3.5 Ensaio de inibição da formação do biofilme	25
3.6 Análise estatística	25
REFERENCIAS	26
APÊNDICE	
Apêndice 1 - Inhibitory effects of flavonoids on biofilm formation by <i>Staphylococcus aureus</i> overexpressing efflux protein genes	35
4 OUTROS RESULTADOS	58
REFERENCIAS	60
CONCLUSÕES	61

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus são bactérias gram-positivas que podem viver frequentemente como comensais colonizando humanos, ou como patógeno, possuindo a capacidade de causar diversas infecções (LISTER; HORSWILL, 2014). Uma característica adicional das cepas de *S. aureus* consiste na sua habilidade em formar biofilmes, o que favorece a sua sobrevivência (DI POTO et al., 2008). Os biofilmes compreendem comunidades complexas de bactérias com uma estrutura tridimensional ordenada, sendo estimado que, mais de 90% das bactérias existam na natureza sob essa forma (BAUGH et al., 2012). A composição da matriz do biofilme apresenta variações entre as linhagens, mas, são comumente formadas por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular (MONTANARO et al., 2011; CUE et al., 2012; FOSTER et al., 2014). A estrutura do biofilme protege as células bacterianas contra fagocitose, biocidas, forças hidrodinâmicas de cisalhamento e antibióticos (SOTO, 2013).

Em decorrência do aumento de relatos de infecções causadas por cepas de *S. aureus* multirresistentes, há um interesse pela descoberta de moléculas com capacidade de inibir o crescimento e sobrevivência destes micro-organismos (MAGESH et al., 2013). Os tratamentos para o controle de bactérias patogênicas envolvem o uso de antibióticos, entretanto alguns destes compostos têm se mostrado ineficientes na erradicação de bactérias organizadas na forma de biofilmes (PARK et al., 2012).

Compostos naturais têm despertado interesse como fontes de novos fármacos devido à diversidade de metabólitos secundários produzidos (TALEKAR et al., 2014). Nos últimos anos, estudos têm abordado uma variedade de propriedades biológicas de diferentes compostos fenólicos, principalmente, em decorrência das suas reconhecidas propriedades antioxidantes (CARRARO et al., 2014; ESPINOSA et al., 2015; FARHADI et al., 2015). Os compostos fenólicos constituem uma das principais classes de metabólitos secundários de plantas, apresentando uma grande variedade de estruturas. Embora o esqueleto básico seja o mesmo, as características estruturais, particularmente a posição e o número de grupos hidroxila no grupo fenol, apresentam forte influência nas propriedades biológicas dos compostos fenólicos (BORGES et al., 2013; CHOI et al., 2014). Os flavonoides e taninos estão entre os compostos mais abundantes encontrados em extratos vegetais (VAQUERO et al., 2011; LI et al., 2014).

Os flavonoides apresentam uma estrutura composta por 15 átomos de carbono (C6 - C3 - C6) e são classificados em dez grupos diferentes (XIAO; MUZASHVILI; GEORGIEV, 2014). Estes compostos ocorrem como α ou β glicosídeos, incluindo flavonoides glicosídeos,

galactosídeos, rhamnosídeos, arabinosídeos e rutinosídeos (TAHERI et al., 2013). Os flavonoides glicosilados ocorrem principalmente como C-3 ou C-7 O-glicosídeo (BARRECA et al., 2014). Os taninos são compostos fenólicos de ocorrência natural, solúveis em água com a capacidade de complexar e precipitar proteínas em soluções aquosas. O peso molecular destes compostos varia entre 0.5 para 3 kDa, e são responsáveis pela adstringência em fontes herbáceas e caules de plantas, como também, potentes inidores de enzimas (SIMÕES et al., 2007; GILANI; XIAO; COCKELL, 2012).

Diversos compostos fenólicos têm demonstrado propriedades antimicrobianas bem como de inibição da formação de biofilmes por bactérias patogênicas, como *S. aureus* (BORGES et al. 2012; NOWATZKI et al. 2012; XING et al. 2012). Ainda, compostos fenólicos, tais como o diterpeno totarol, o tanino ácido tânico e o flavonoide tilirosídeo, têm demonstrado propriedades de modulação da resistência a diferentes antibióticos em cepas de *S. aureus* envolvendo sistemas de efluxo (SMITH et al., 2007; SILVA et al., 2009; KYAW; LIM; ZHOU, 2013). Sistemas de efluxo regulam os níveis intracelulares de compostos residuais do metabolismo celular no ambiente limitado da matriz do biofilme (KVIST; HANCOCK; KLEMM 2008; BAUGH et al., 2013). Desta forma, condições que influenciam a atividade de sistemas de efluxo em células bacterianas podem impactar diretamente na sua capacidade de formação e manutenção do biofilme (SOTO, 2013).

Considerando o aumento de linhagens resistentes aos antibacterianos e as diversas propriedades biológicas dos compostos fenólicos já relatados na literatura, este estudo teve como objetivos determinar a concentração inibitória mínima dos compostos fenólicos, estimar a capacidade da formação de biofilme por cepas de *S. aureus*, como também avaliar a eficácia dos compostos fenólicos na inibição da formação de biofilmes nestas mesmas cepas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Staphylococcus aureus* e resistência antimicrobiana

S. aureus são cocos gram-positivos amplamente distribuídos na natureza, compondo a microbiota da pele e mucosa de humanos. Como patógeno este micro-organismo pode desenvolver infecções graves como bacteremia, pneumonia e endocardite sendo um risco para a saúde pública (ARCURI et al., 2010). A importância de *S. aureus* está na combinação dos fatores de virulência mediados por seu caráter invasivo, seu perfil de resistência aos antimicrobianos e por suas toxinas que são fundamentais para que o processo inflamatório inicie e se perpetue (KÖCKRITZ-BLICKWEDE, 2011).

Cepas de *S. aureus* tem desenvolvido resistência a uma ampla gama de antibióticos incluindo meticilina da classe dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas, fluoroquinolonas, cloranfenicol, sulfonamidas, estreptomicina e tetraciclina, causando problemas na medicina clínica, em hospitais e indústrias de alimentos. Os principais mecanismos da resistência bacteriana incluem inativação da droga, modificação do alvo, formação de biofilme, alteração na acessibilidade a célula através de efluxo de drogas e diminuição da absorção (ABREU; MCBAIN; SIMÕES, 2012; SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013).

A expressão dos sistemas de efluxo permite que os micro-organismos regulem o seu ambiente interno através da remoção de substâncias tóxicas (SOTO, 2013). As bombas de efluxo são classificadas em 6 famílias de acordo com o número de componentes, o número de regiões transmembrana que atravessam, a fonte de energia usada e os tipos de moléculas que a bomba exporta (PIDOOCK, 2006). Sendo elas: superfamília MFS (*Major facilitator*), superfamília ABC (*ATP binding cassette*), família RND (*resistance nodulation division*), família MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*), família SMR (*small multidrug resistance*) e superfamília DMT (*drug metabolite transporter*) (SANCHEZ, 2003; KUMAR; SCHWEIZER, 2005). Bombas MFS prevalecem entre *S. aureus* e incluem bombas de efluxo resistente a múltiplas drogas (MDR) LmrS, NorA, NorB, NorC, MdeA, SdrM e QacA/B e os transportadores específicos de tetraciclina Tet38 e TetK (LI; NIKAIDO, 2009).

Transportadores não-MFS em *S. aureus* incluem MsrA (ABC), Sav1866 (ABC), QacC (pequenas MDR), MepA (MATE) e o transportador SepA (ROSS, 1989; SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013). Os perfis dos substratos destas bombas de MDR são capazes de transportar antibióticos (aminoglicosídeos, macrolídeos como eritromicina, fluoroquinolonas,

tetraciclina e estreptogramina), biocidas (compostos de amônio quaternário, monovalente e cátions divalentes) e corantes intercalantes (brometo de etídio, acriflavina e Hoechst 33342) (HASSAN; SKURRAY; BROWN, 2007; LI; NIKAIDO, 2009).

2.2 Formação de biofilme

Os biofilmes são definidos como uma associação de micro-organismos aderidos a uma superfície biótica ou abiótica, organizada em multicamadas finas, e envolvidas por uma matriz polimérica amorfa e hidratada, produzidas pelos próprios micro-organismos (BJARNSHOLT et al., 2013). Embora a composição dessa matriz apresente variações entre as linhagens e entre as diferentes condições de crescimento, os seus componentes incluem DNA extracelular, polissacarídeos, proteínas e fibras amiloides (BOLES; HORSWILL, 2011; SCHWARTZ et al., 2012). A formação do biofilme é um processo gradual e dinâmico que consiste na fixação das células bacterianas a superfície, crescimento e maturação, onde os micro-organismos produzem exopolissacarídeos e formam as microcolônias, e na dispersão das células planctônicas, onde podem formar biofilme em outros ambientes (SREY; JAHID; HA, 2013).

Experimentando um ambiente hostil, é importante para as bactérias formarem biofilme como uma estratégia de sobrevivência. Particularmente, os biofilmes permitem aos micro-organismos permanecerem no meio ambiente e resistirem à desidratação, luz UV e tratamento com antibióticos e biocidas (DI BONAVENTURA et al., 2008; SREY; JAHID; HÁ, 2013). Estima-se que 65-80% de todas as infecções estão relacionados com biofilme (JIANG; LI, 2013).

Diversos mecanismos são citados como responsáveis pela resistência antimicrobiana do biofilme:

1) baixa difusão de antibióticos através da matriz de polissacarídeo do biofilme (ACKER; DIJCK; COENYE, 2014);

2) alterações fisiológicas em resposta a escassez (oxigênio, privação de nutrientes e estresse ambiental) (WALTERS, 2003);

3) alteração fenotípica das células que formam o biofilme (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999);

4) *quorum sensing* (BROOUN; LIU; LEWIS, 2000);

5) expressão de bomba de efluxo (GILBERT; ALLISON; MCBAIN, 2002);

6) células persistentes: pequenas frações de bactérias que resistem à morte quando expostas a agentes antimicrobianos (LEWIS, 2007).

Existem evidências que a expressão de bombas de efluxo é mais acentuada no biofilme do que nas células planctônicas (ZHANG; MAH, 2008; ITO et al., 2009). O aumento da atividade de sistemas de efluxo é relatado como estratégia importante para regulação dos níveis intracelulares de compostos residuais do metabolismo celular no ambiente limitado da matriz do biofilme (KVIST; HANCOCK; KLEMM, 2008; BAUGH et al., 2013).

2.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente distribuídos na natureza, mais de 8000 compostos já foram detectados em plantas, apresentam uma diversidade de estruturas, simples e complexas, contendo um anel aromático e um ou mais substituintes hidroxilo (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; LI et al., 2014). Os flavonoides e taninos estão entre os compostos mais abundantes encontrados em extratos vegetais (BORGES et al., 2013; KHAN; ZILL-E-HUMA; DANGLES, 2014). Esse grande e complexo grupo apresenta atividade antioxidante, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de várias moléculas, particularmente de lipídios (CARRARO et al., 2014; ESPINOSA et al., 2015; FARHADI et al., 2016).

Estudos têm mostrado propriedades antimicrobianas dos compostos fenólicos, como também a capacidade para inibir a formação de biofilme em bactérias, inclusive em *S. aureus* (BORGES et al., 2012; NOWATZKI et al., 2012; XING et al., 2012). A posição e o número de hidroxilas no grupo fenol são considerados diretamente relacionados com a sua toxicidade aos micro-organismos (SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010; BORGES et al., 2013).

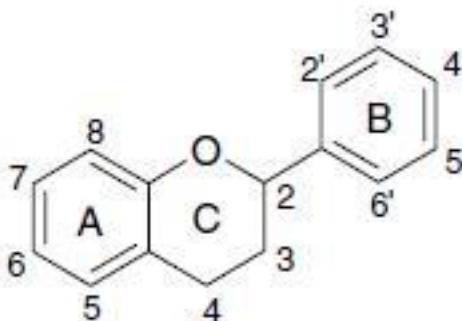
Os compostos fenólicos podem ser classificados em dois grupos: flavonoides e não-flavonoides (BORGES et al., 2013; KHAN; ZILL-E-HUMA; DANGLES, 2014). No grupo dos flavonoides estão incluídos as flavononas, proantocianinas, antocianidinas e isoflavonas (FARAH; DONANGELO, 2006). Na classe dos não-flavonoides existem predominantemente os ácidos hidroxicinâmico e hidrobenzoico. Sua atividade antioxidante está relacionada com o número e a posição dos grupos hidroxilas e também com a proximidade dos grupos -CO₂H em relação ao grupo fenil. Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta (RAJALAKSMI; NARASIMHAN, 1995; BURNS et al., 2001).

2.3.1 Flavonoides

Os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos, com mais de 5000 moléculas descritas. São pigmentos naturais das plantas e tem como função principal proteger estes organismos contra agentes oxidantes. Estudos têm ratificado as propriedades farmacológicas e biológicas dos flavonoides, sendo muitas espécies de plantas usadas como fito-medicamentos ou como alimentos funcionais (VUKICS; GUTTMAN, 2010; GEORGIEV et al., 2014). Ainda, tem sido demonstrada atividade antimicrobiana, que pode ser explicada pela sua capacidade de penetração nas membranas biológicas (WU et al., 2013).

Flavonoides são compostos de baixo peso molecular e apresentam uma estrutura química básica, conhecida como *flavilium*, formado por quinze átomos de carbono distribuídos em dois anéis aromáticos (A e B), os benzenos, unidos a uma estrutura heterocíclica central, o pirano (anel C), onde o primeiro benzeno é condensado com o carbono da posição seis do pirano, que na posição 2 carrega um grupo fenila conforme pode ser visualizado na Fig. 1 (CUSHNIE; LAMB, 2011; XIAO; MUZASHVILI; GEORGIEV, 2014). Estes compostos ocorrem como α ou β glicosídeos, incluindo flavonoides glicosídeos, galactosídeos, ramnosídeos, arabinosídeos e rutinosídeos (FANG et al., 2013; PUGLIESE et al., 2013; TAHERI et al., 2013). Os flavonoides glicosilados ocorrem principalmente como C-3 ou C-7 O-glicosídeo (CUSHNIE; LAMB 2011; BARRECA et al., 2014).

Fig. 1 Estrutura química dos compostos fenólicos



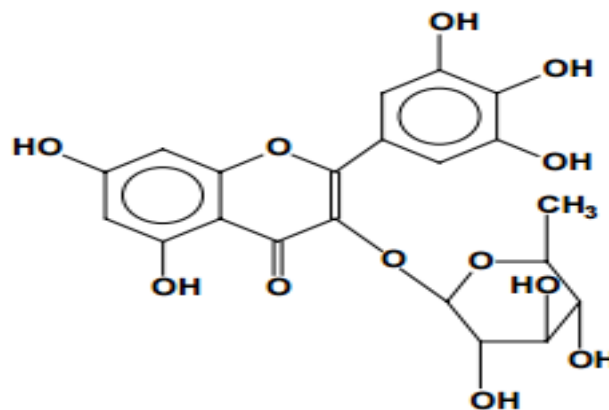
Fonte: SILVA et al. (2015)

O grupo dos flavonoides pode ser subdividido em diversas classes, de acordo com o grau de hidrogenação e variações do anel C: flavonois, flavanois (ou catequinas), flavonas,

flavanonas, antocianinas, isoflavonoides e dihidrochalconas (VEITCH; GRAYER, 2011). Os flavonóis apresentam atividade antioxidante, que confere um efeito protetor às diversas desordens patológicas. Na classe dos flavonóis, os principais constituintes estudados são: quercetina, miricetina e caempferol (IACOPINI et al., 2008).

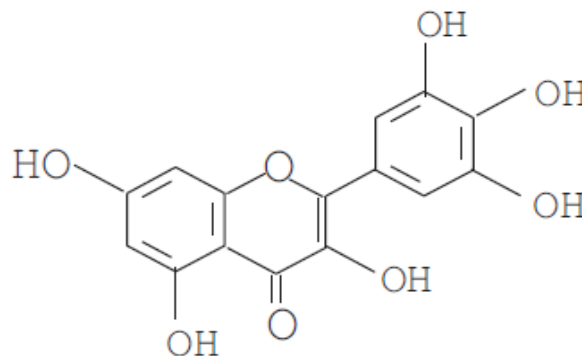
A miricetina é formada por dois grupos fenil (A e B) unidos por uma cadeia de três carbonos (C) (Fig. 3). A presença do grupo pirrogalol (3 oxidrilas livres no anel B) é muito importante para a atividade antioxidante (SAWAI et al., 2005). A sua forma glicosilada, miricitrina, apresenta um monossacarídeo ligado ao pirano no carbono da posição 3 (Fig. 2). Miricetina e miricitrina são encontradas principalmente em frutas como o marmelo e sapoti e em folhas de pitanga e jambolão (MA et al., 2004).

Fig. 2 Estrutura química da miricitrina



Fonte: WANG (2010)

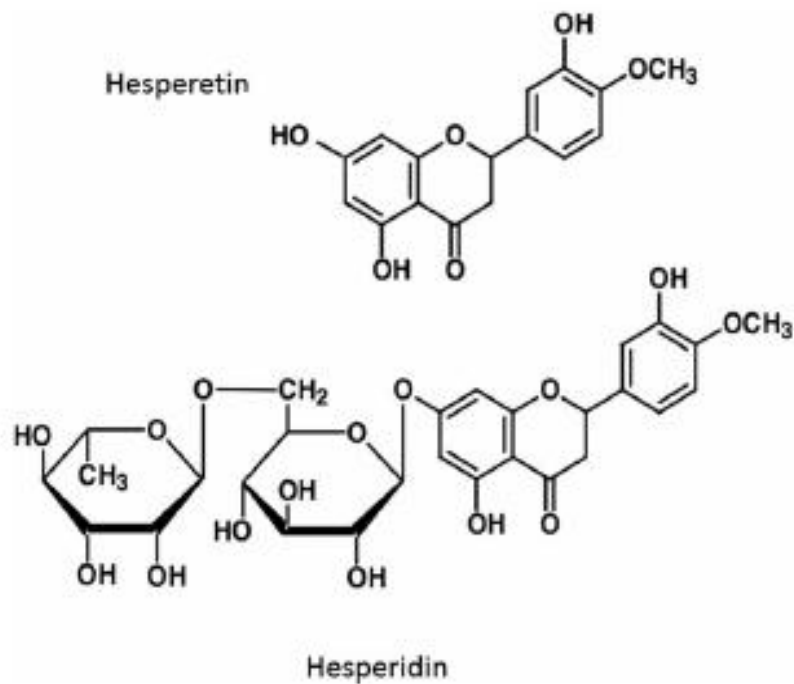
Fig. 3 Estrutura química da miricetina



Fonte: WANG (2010)

As flavanonas estão na forma de mono ou diglicosídeos e contribuem com o sabor cítrico dos alimentos, sendo encontradas em frutas como laranja e limão. São exemplos de flavanonas: a hesperidina, a narirutina, a naringenina, e a neohesperidina. A hesperidina é estruturalmente classificada como β -glicosídeo com um dissacarídeo rutinose (ramnose e glicose) ligado ao pirano no carbono da posição 7. A sua forma aglicona, a hesperetina, é uma 3',5,7-triidroxi-4'-metoxiflavona (Fig. 4). Hesperidina e hesperetina apresentam diversas propriedades farmacológicas incluindo atividade antioxidante e anti-inflamatória (HAIDARI et al., 2009; LEE et al., 2010).

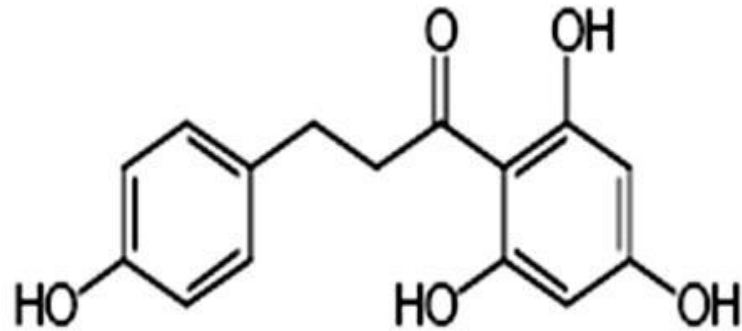
Fig. 4 Estrutura química da hesperetina e hesperidina



Fonte: Souza et al. (2015)

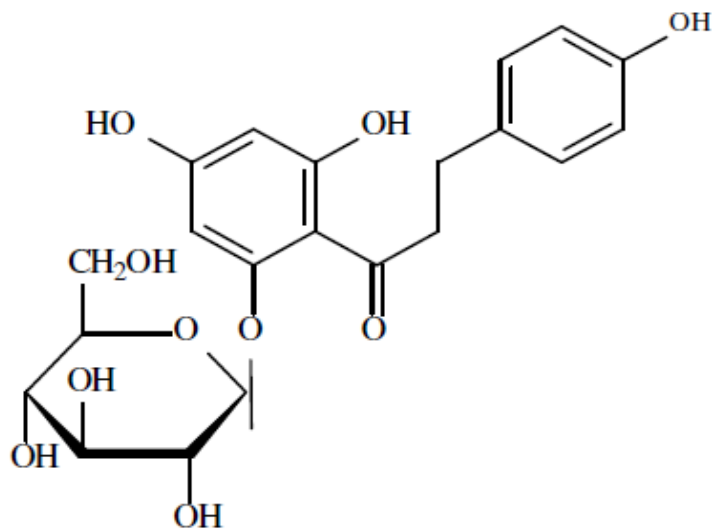
Dihidrocalconas são flavonoides raros encontrados em cerca de 30 espécies de plantas, sendo a floretina (Fig. 5) e a sua forma glicosilada (floridzina) ricamente presentes nas cascas e nas polpas de maçãs (BOURVELLEC; GUYOT; RENARD, 2009). A floridzina apresenta um dissacarídeo (glicose e xiloglicose) ligado ao pirano no carbono da posição 3 (Fig. 6). Floretina e floridzina apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana (LEE, 2010).

Fig. 5 Estrutura química da floretina



Fonte: CSEH et al. (2000)

Fig. 6 Estrutura química da floridzina



Fonte: CSEH et al. (2000)

2.3.2 Taninos

Taninos são compostos fenólicos não-flavonoides de ocorrência natural com a capacidade de complexar e precipitar proteínas em soluções aquosas. Os pesos moleculares

variam entre 0.5 para 3 kDa, sendo responsáveis pela adstringência em fontes herbáceas e caules de plantas, como também, potentes inidores de enzimas, protegendo as plantas contra ataque de micro-organismos (GILANI; XIAO; COCKELL, 2012).

Taninos exercem atividade antimicrobiana através de ligação às paredes das células, perturbando a integridade da membrana, se ligando às proteínas, inibindo a atividade enzimática ou inibindo o metabolismo microbiano através da fosforilação oxidativa (COWAN, 1999; LI et al., 2013).

Os taninos (Fig. 7) são classificados, de acordo com sua origem biossintética, em dois grupos:

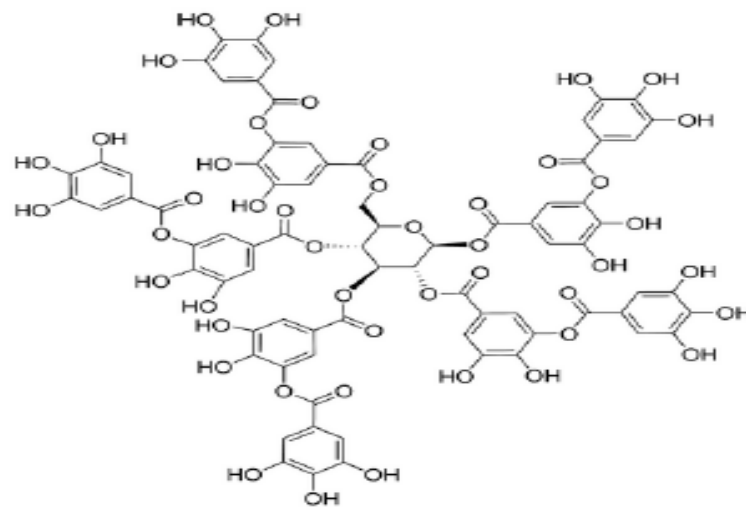
a) taninos hidrolisáveis são compostos que tem como base um ácido fenólico, o ácido gálico (taninos gálicos) e o ácido elágico (taninos elágicos) ligados a uma molécula de açúcar. Na maior parte dos casos, estes encontram-se na natureza sobre a forma de ésteres múltiplos com açúcares, nomeadamente a D-glicose formando estruturas complexas. Esta molécula é a base da biossíntese dos taninos hidrolisáveis mais complexos como o ácido tânico encontrado em partes não comestíveis de plantas (SERRANO et al., 2009; ZHANG et al., 2012).

b) os taninos condensados ou proantocianidinas são distribuídos por todo o mesocarpo da fruta, porém com maiores concentrações no epicarpo, aparecem como dímeros, oligômeros e polímeros de flavonoides, especificamente de flavanois. Quando hidrolisados apresentam-se como ácidos gálicos glicosilados, incluindo galotaninos e elagitaninos (KHANBABAEI; VAN REE, 2001).

As formas hidrolisáveis são facilmente hidrolisadas por ácidos, bases, e algumas enzimas, enquanto os taninos condensados, principalmente produtos polimerizados de flavanol (catequina) e flavandiolo ou a mistura destes, são resistentes à hidrólise (GILANI; XIAO; COCKELL, 2012).

O ácido tânico (AT) é um importante tanino pertencente à classe hidrolisável (AKIYAMA et al., 2001). Composto por uma molécula de glicose central, onde estão ligadas cinco cadeias compostas por duas moléculas de ácido gálico ligadas por esterificação (Fig. 7). (XU et al., 2015). Está presente em diversos alimentos como, uvas, lentilhas, chocolate, vinho tinto, cerveja, café, chá preto e chá verde (ZENGIN et al., 2014).

Fig. 7 Estrutura química do ácido tânico



Fonte: NAKAMURA et al. (2003)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Antibióticos e compostos fenólicos

Os antibióticos norfloxacina (Nor), eritromicina (Eri), e os compostos fenólicos foram obtidos da Sigma-Aldrich (pureza $\geq 98\%$; St. Louis, USA). Os estoques das soluções de Nor foram preparados em uma mistura de 1M NaOH e água destilada estéril (proporção 1:9) e os de Eri em álcool absoluto (P.A), de acordo com CLSI (2012). Os compostos fenólicos ensaiados (Tabela 1) foram dissolvidos em uma mistura de dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada estéril (4:1). O DMSO na sua concentração mais elevada após diluição em caldo (4%) não inibi o crescimento bacteriano.

Tabela 1 - Compostos fenólicos ensaiados

Flavonoides		Tanino
O-glicosídeos		Ácido tânico
Glicosilados	Agliconas	
Miricetina	Miricitrina	
Hesperetina	Hesperidina	
Floretina	Floridzina	

3.2 Linhagens de teste e meios de cultura

As linhagens de *S. aureus* ensaiadas foram a SA-1199B, que super expressa o gene *norA* codificador da proteína de efluxo NorA, a RN-4220 que possui o plasmídeo pUL5054, o qual, tem o gene que codifica a proteína para efluxo de macrolídeos (MsrA) (ROSS et al., 1989), ambas gentilmente cedidas pelo Dr. Simon Gibbons (University of London - UK), e a *S. aureus* ATCC-25923, que não superexpressa genes conhecidos para proteínas de efluxo.

Os estoques das linhagens foram mantidos em caldo nutritivo de infusão cérebro-coração (Brain Heart Infusion - BHI, Himedia) contendo glicerol (15 mL/100mL) a - 20 °C. As cepas foram inoculadas em caldo BHI a 37°C por 18 - 24 horas (até o final da fase exponencial). Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação (4500 g, 15 min, 4 °C), lavadas duas vezes em solução salina estéril (NaCl 0,85% w/v) e ressuspensas para

obter as suspensões celulares padrão. A leitura em densidade óptica (OD) a 660 nm da suspensão das células foi de 0,1 e a contagem de células viáveis de aproximadamente 8 log ufc/mL.

3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos fenólicos foram determinadas através do ensaio de microdiluição, seguindo procedimento padrão descrito por CLSI (2012). As placas de 96 poços foram preparadas dispensando 180 µL de caldo BHI contendo suspensão bacteriana de 5 log ufc/mL e 20 µL de solução dos composto fenólicos testados (concentração variando de 512 a 0,25 µL/mL). Cada placa incluiu o controle positivo sem os compostos fenólicos. A CIM foi definida como a menor concentração dos compostos fenólicos capaz de inibir o crescimento das cepas após incubação à 37 °C por 18 - 24 h.

3.4 Caracterização fenotípica da produção de biofilme

O ensaio de quantificação da formação de biofilme foi realizado através de ensaios de microdiluição utilizando procedimentos descritos por Stepanovic et al. (2007). As placas de 96 poços foram preparadas dispensando 200 µL de caldo BHI suplementados com glicose (1g/100mL) contendo suspensão bacteriana de 5 log ufc/mL, com posterior incubação estática a 37 °C por 18 - 24 h. Simultaneamente, foi preparado o controle negativo (meio de cultura). Após o período de incubação, o meio de cultivo foi descartado, os poços lavados com solução tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,2 e as células fixadas foram coradas com solução de Cristal Violeta de Gram (0,5 g/100 mL).

O desenvolvimento do biofilme foi avaliado pela absorbância a 570 nm (A_{570}) das bactérias coradas, medido com o uso de leitor de microplaca (BioTek EONTM, USA). Para quantificar a intensidade da formação do biofilme, a média da OD de cada cepa foi comparada com o OD_C (densidade óptica do controle negativo + 3 x (desvio padrão)). Os resultados foram classificados de acordo com o que se segue $OD_{570} \leq OD_C$ = não produtor de biofilme; $OD_C < OD_{570} \leq 2 \times OD_C$ = fraco produtor de biofilme; $2 \times OD_C < OD_{570} \leq 4 \times OD_C$ = produtor moderado de biofilme; $4 \times OD_C < OD_{570}$ = forte produtor de biofilme.

A caracterização da produção do biofilme em Ágar Vermelho Congo (CRA) foi conduzida de acordo com procedimento descrito por Arciola et al. (2002). O CRA utilizado nos ensaios foi preparado por meio da adição de 0,8 g do corante vermelho congo e 36 g de

sacarose (Sigma, Missouri, EUA) a 1 L de ágar BHI. Todas as cepas foram cultivadas em CRA e incubadas por 48 h à 37 °C e, subsequentemente, 2 - 4 dias à temperatura ambiente.

Para uma avaliação precisa de todas as possíveis variações cromáticas exibidas pelas colônias cultivadas, foi utilizada uma escala de seis cores, com faixa de escala de muito negra para muito vermelha. As colônias negras foram consideradas produtoras de biofilme, as colônias cinzas fracas produtoras de biofilme, enquanto as colônias vermelhas e roxas não produtoras de biofilme.

3.5 Ensaio de inibição da formação do biofilme

O efeito dos compostos fenólicos na formação de biofilme pelas cepas teste foi realizado utilizando método de microdiluição descrito por Xu, Zhou e Wu (2011), usando suspensão de 5 log ufc/mL e uma variação dos compostos fenólicos testados de 256 a 0,25 µL/mL. Cada placa incluiu o controle positivo sem os compostos fenólicos. Em seguida, o sistema foi incubado de forma estática a 37°C por 24 h.

Após o período de incubação, o meio de cultivo foi descartado, os poços lavados com solução tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,2 e as células foram coradas com solução de Cristal Violeta de Gram (0,1 g/100 mL). O biofilme corado foi solubilizado pela adição de etanol a 95% e a absorbância à 595 nm (A_{595}) foi medida com o uso de leitor de microplaca (BioTek EONTM). A porcentagem de inibição para cada concentração dos compostos ensaiados foi calculada utilizando a equação $(1 - A_{595}/A_{595}$ do controle não tratado) x 100. A concentração inibitória mínima dos compostos fenólicos frente ao biofilme (MBIC₅₀) foi definida como a menor concentração que resultou em 50% ou mais de inibição da formação de biofilme.

3.6 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes (repetições), os resultados foram expressos com os valores médios dos ensaios. Os resultados da CIM e MBIC₅₀ foram expressos em valor modal, porque não foi observada variação entre os resultados replicados (McMAHON et al., 2008). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sigma-Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, Califórnia).

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. C.; MCBAINB, A. J.; SIMÕES M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, v. 29, p. 1007–1021, 2012.
- ACKER, H. V.; DIJCK, P. V.; COENYE, T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. **Trends in Microbiology**, n. 6, v. 22, 2014.
- AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMASAKI, O.; OONO, T.; IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, p. 487–491, 2001.
- ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINIA, S.; CERVELLATIA, M.; DONATIA, E.; MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. **Biomaterials**, v. 23, p. 4233–4239, 2002.
- ARCURI, E. F.; ANGELO, F. F.; GUIMARAES, M. F. M.; TALON, R.; BORGES, M. F.; LEROY, S.; LOISEAU, G.; LANGE, C. C.; ANDRADE, N. J.; MONTET, D. Anti-biofilm formation of a novel stainless steel against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, v. 12, v. 2148–2349, 2010.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.
- BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; LAGANA, G.; GINESTRA, G.; BISIGNANO, C. Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosylated derivatives present in apple and kumquat. **Food Chemistry**, v. 160, p. 292–297, 2014.
- BAUGH, S.; EKANAYAKA, A. S.; PIDDOCK, L. J. V.; WEBBER, M. A. Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, p. 2409–2417, 2012.
- BAUGH, S.; PHILLIPS, C. R.; EKANAYAKA, A. S.; PIDDOCK, L. J. V.; WEBBER, M. A. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 1–9, 2013.
- BJARNSHOLT, T.; ALHEDE, M.; EICKHARDT-SORENSEN, S. R.; MOSER, C.; KUHL, M.; JENSEN, P. O.; HOIBY, N. The in vivo biofilm. **Trends in Microbiology**, v. 21, p. 466–474, 2013.
- BOLES, B. R; HORSWILL, A. R. Staphylococcal biofilm disassembly. **Trends Microbiology**, v. 19, p. 449–455, 2011.

BOURVELLEC, C. L.; GUYOT, S.; RENARD, C. M. G. C. Interactions between apple (*Malus domestica* Borkh) polyphenols and cell walls modulate the extractability of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 251-261, 2009.

BORGES, A.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. **Biofouling**, v. 28, p. 755-767, 2012.

BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, p. 256-265, 2013.

BROOUN, A.; LIU, S.; LEWIS, K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 640-646, 2000.

BURNS, J.; GARDNER, P. T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G. G.; LEAN, M. E.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Food Chemistry**, v.49, p. 5797-5808, 2001.

CARRARO, L. FASOLATO, L; MONTEMURRO, F.; MARTINO, M. E.; BALZAN, S.; SERVILI, M.; NOVELLI, E.; CARDAZZO, B. Polyphenols from olive mill waste affect biofilm formation and motility in *Escherichia coli* K-12. **Microbial Biotechnology**, v. 7, p. 265–275, 2014.

CHOI, J. S.; ISLAM, N.; ALI, Y.; JI KIM, E.; MYEONG KIM, Y.; AH JUNG, H. Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 27–33. 2014.

CLSI. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

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

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564–582, 1999.

CSEH, R.; HETZER, M.; WOLF, K.; KRAUS, J.; BRINGMMAN, G.; BENZ, R. Interaction of phloretin with membranes: on the mode of action of phloretin at the water-lipid interface. **European Biophysics Journal**, v. 29, p. 172-183, 2000.

CUE, D.; LEI, M. G.; LEE, C. Y. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 38, 2012.

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 99–107, 2011.

DI BONAVENTURA, G.; PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D.; D'ORIO, V.; VERGARA, A.; CONTER, M.; IANIERI, A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria*

monocytogenes on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1552-61, 2008.

DI POTO, A.; SBARRA M. S.; PROVENZA, G.; VISAI, L.; SPEZIALE, P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defense mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. **Biomaterials**, v. 30, p.3158– 3166, 2008.

ESPINOSA, R. R.; INCHINGOLO, R.; ALENCAR, S. M.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; CASTRO, I. A. Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters. **Food Chemistry**, v. 182, p. 95-104, 2015.

FANG, R.; VEITCH, N. C.; KITE, G. C.; PORTER, E. A.; SIMMONDS, M. S. J. Enhanced profiling of flavonol glycosides in the fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, p. 3868-3875, 2013.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 23-36, 2006.

FARHADI, K.; ESMAEILZADEH, F.; HATAMI, M.; FOROUGH, M.; MOLAIE, R. Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in west Azerbaijan province, Iran. **Food Chemistry**, v. 199, p. 847-855, 2015.

FOSTER, T. J; GEOGHEGAN, J. A.; GANESH, V. K.; HÖÖK, M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 49-62, 2014.

GILANI, G. S.; XIAO, C. W.; COCKELL, K. A. Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and the bioavailability of amino acids and on protein quality. **British Journal of Nutrition**, v. 108, p. 315–332, 2012.

GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; MCBAIN, A.J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 98-110, 2002.

H Aidari, F.; KESHAVARZ, S. A.; RASHIDI, M. R.; SHAHI, M. M. Orange juice and hesperetin supplementation to hyperuricemic rats alter oxidative stress markers and xanthine oxidoreductase activity. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 45, p. 285-291, 2009.

HASSAN, K. A.; SKURRAY, R. A.; BROWN, M. H. Active export proteins mediating drug resistance in staphylococci. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 3–4, p. 180–196, 2007.

IACOPINI, P.; BALDIB, M.; STORCHIC, P.; SEBASTIANA, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, in vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 589-598, 2008.

- ITO, A.; TANIUCHI, A.; MAY, T.; KAWATA, K.; OKABE, S. Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4093-4100, 2009.
- JIANG, T.; LI, M. *Quorum sensing* inhibitors: a patent review. **Expert Opinion Ther Patents**, v. 23, p. 867–94, 2013.
- KHAN, M. K.; ZILL-E-HUMA; DANGLES, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33 p. 85–104. 2014.
- KHANBABAEE, K.; VAN REE, T. Tannins: classification and definition. **Natural Products Reports**, v. 18, p. 641–649, 2001.
- KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M. V. Pathogen's swiss army knife. **Infection and Immunity**, v.78, p. 4445-4453, 2009.
- KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1486-1513, 2005.
- KVIST, M.; HANCOCK, V.; KLEMM, P. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 7376–7382, 2008.
- KYAW, B. M.; LIM, C. S.; ZHOU, W. Tannic acid as phytochemical potentiator for antibiotic resistance adaptation. **APCBEE Procedia**, v. 7, p. 175-181, 2013.
- LEE, K. H.; YEH, M. H.; KAO, S. T.; HUNG, C. M.; YEH, C. C. The inhibitory effect of hesperidin on tumor cell invasiveness occurs via suppression of activator protein 1 and nuclear factor- κ B in human hepatocellular carcinoma cells. **Toxicology Letters**, v. 194, p. 42–49, 2010.
- LEWIS, K. In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology Impact**, v. 3, p. 247-254, 2000.
- LEWIS K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nature Review Microbiology**, v. 5, p. 48-56. 2007.
- LI, X. Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. **Drugs**, v. 69, p. 1555–1623, 2009.
- LI, N.; LOU, M.; FU, Y.; ZU, Y.; WANG, W.; ZHANG, L.; YAO, L.; ZHAO, C.; SUN, Y. Effect of corilagin on membrane permeability of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 1517- 1523, 2013.
- LI, A. N.; LI, S.; ZHANG, L.; XU, X.; CHEN, Y.; LI, H. Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, v. 6, p. 6020-6047, 2014.
- LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, 2014.

MA, J.; YANG, H.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three Pouteria species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5873-5878, 2004.

MAGESH, H.; KUMAR, A.; ALAM, A.; SEKAR, U. P.; SUMANTRAN, V. N.; VAIDYANATHAN, R. Identification of natural compounds which inhibit biofilm formation in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, p. 764-772, 2013.

MCMAHON, M. A. S.; TUNNEY, M. M.; MOORE, J. E.; BLAIR, I. S.; GILPIN, D. F.; MCDOWELL, D. A. Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 263-268, 2008.

MONTANARO, L.; POGGI, A.; VISAI, L.; RAVAIOLI, S.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P.; ARCIOLA, C. R. Extracellular DNA in biofilms. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 34, p. 824-831, 2011.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: application to tannic acid metabolism in the rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 331-339, 2003.

NOWATZKI, P. J.; KOEPEL, R. R.; STOODLEY, P.; MIN, K.; HARPER, A.; MURATA, H.; DONFACK, J.; HORTELANO, E. R.; EHRLICH, G. D.; RUSSELL, A. J. Salicylic acid-releasing polyurethane acrylate polymers as anti-biofilm urological catheter coatings. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 1869-1880, 2012.

PARK, A.; JEONG, H.; LEE, J.; LEE, C. The inhibitory effect of phloretin on the formation of *Escherichia coli* O157:H7 biofilm in a microfluidic system. **BioChip Journal**, v. 6, p. 299-305, 2012.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 382-402, 2006.

PUGLIESE, A.G. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (cupuassu) pulp and seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 2720-2728, 2013.

RAJALAKSMI, D.; NARASIMHAN, S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. **Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives**, p. 65-157, 1995.

ROSS, J. I.; FARRELL, A. M.; EADY, A. E.; COVE, J. H.; CUNLIFFEA, W. J. Characterization and molecular cloning of the novel macrolide-streptogramin B resistance determinant from *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 24, p. 851-862. 1989.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 7, p. 283–294, 2010.

SANCHEZ, P. D. Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 16, p. 172-187, 2003.

SAWAI, Y.; MOON, J. H.; SAKATA, K.; WATANABE, N. Effects of structure on radical-scavenging abilities and antioxidative activities of tea polyphenols: NMR analytical approach using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3598-3604, 2005.

SCHINDLER, B. D.; JACINTO, P. E.; KAATZ, G.W. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. **Future Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 491–507, 2013.

SCHWARTZ, K.; SYED, A.K.; STEPHENSON, R. R.; RICKARD, A. H.; BOLES, B. R. Functional Amyloids Composed of Phenol Soluble Modulins Stabilize *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Plos Pathogens**, v. 8, p. 1-6, 2012.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; DAUER, A.; AURA, A. M.; SAURA CALIXTO, F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, p. 310-329, 2009.

SILVA, V. S. F.; SILVA, D. A.; SOUZA, M. F. V.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae). **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1367-1370, 2009.

SILVA, L. R.; Martins, L. V.; Calou, I. B. F.; DEUS, M. S. M.; Ferreira, P. M. P.; Peron, A. P. Flavonoids: chemical composition, medical actions and toxicity. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 23, p. 36-43, 2015.

SMITH, E. C. J.; KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; WAREHAM, N.; WILLIAMSON, E. M.; GIBBONS, S. The phenolic diterpene totarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, p. 4480–4483, 2007.

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

SOUZA, V. T.; FRANCO, E. P. D.; ARAÚJO, M. E. M. B.; MESSIAS, F. B. M. P.; Sawaya, A. C. H.; CARVALHO, P. O. Characterization of the antioxidant activity of aglycone and glycosylated derivatives of hesperetin: an in vitro and in vivo study. **Journal of Molecular Recognition**, v. 29, p. 80–87, 2015.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. D. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food Control**, v. 31, p. 572–585, 2013.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G. D.; DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of

testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 115, p. 891-899, 2007.

TAHERI, R.; CONNOLLY, B. A.; BRAND, M. H.; BOLLING, B. W. Underutilized chokeberry (*Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia*, *Aronia prunifolia*) accessions are rich sources of anthocyanins, flavonoids, hydroxycinnamic acids, and proanthocyanidins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 61, p. 8581-8588, 2013.

TALEKAR, S. J.; CHOCHUA, S.; NELSON, K.; KLUGMAN, K. P.; QUAVE, C. L. 220D-F2 from *Rubus ulmifolius* kills *Streptococcus pneumoniae* planktonic cells and pneumococcal biofilms. **Plos One**, v. 9, 2014.

VAQUERO, M. J. R.; FERNÁNDEZ, A. P. A.; NADRA, M. M. C.; SAAD, S. A. M. Effect of phenolic compounds from argentine an red wines on pathogenic bacteria in a meat model system. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, p. 425–431, 2011.

VEITCH, N. C.; GRAYER, R. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1626–1695, 2011.

VUKICS, V.; GUTTMAN, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 29, 2010.

WALTERS, M. C.; ROE, F.; BUGNICOURT, A.; FRANKLIN, M. J.; STEWART, P. S. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, p. 317-323, 2003.

WANG, Q. Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in icaADBC-positive and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, p. 2707–2711, 2010.

WU, T.; HE, M.; ZANG, X.; ZHOU, Y.; QIU, T.; PAN, S.; XU, X. A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1828, p. 2751–2756, 2013.

XIAO, J.; MUZASHVILI, T. S.; GEORGIEV, M. I. Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids. **Biotechnology Advances**, 2014.

XING, M.; SHEN, F.; LIU, L.; CHEN, Z.; GUO, N.; WANG, X.; WANG, W.; ZHANG, K.; WU, X.; WANG, X.; LI, Y.; SUN, S.; YU, L. Antimicrobial efficacy of the alkaloid harmaline alone and in combination with chlorhexidine digluconate against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* grown in planktonic and biofilm cultures. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, p. 475-482, 2012.

XU, X.; ZHOU, X. D.; WU, C. D. Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing gtf genes. **Archives of Oral Biology**, v. 57, p. 678–83, 2011.

XU, F.; WENG, B.; GILKERSON, R.; MATERON, L. A.; LOZANO, K. Development of tannic acid/chitosan/pullulan composite nanofibers from aqueous solution for potential applications as wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 16–24, 2015.

ZHANG, L.; MAH, T. F. Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 4447–4452, 2008.

ZHANG, X. F.; DAI, Y.; ZHONG, W.; TAN, M.; LV, Z.; ZHOU, Y.; JIANG, X. Tannic acid inhibited norovirus binding to HBGA receptors, a study of 50 Chinese medicinal herbs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1616–1623. 2012.

ZENGIN, A. C. A.; COLAK, S. M.; ZENGIN, G.; KILIC, E. Eco-friendly soaking process using tannic acid as an alternative bactericide. **Archives of Environmental Protection**, v. 40, p. 3–12, 2014.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

Inhibitory effects of flavonoids on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* overexpressing efflux protein genes

Manuscrito submetido para avaliação de publicação no periódico:

Letters in Applied Microbiology

ISSN: 0266-8254

F.I.: 1.659

Qualis CAPES: B1

(2014)

Inhibitory effects of flavonoids on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* overexpressing efflux protein genes

Running title: Flavonoids inhibit biofilm formation

Laênia Angélica Andrade Lopes¹, Jéssica Bezerra dos Santos Rodrigues², Marciane Magnani², Evandro Leite de Souza^{3*}, José P. Siqueira-Júnior¹

¹ *Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil*

² *Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil*

³ *Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil*

* Corresponding author:

Evandro Leite de Souza

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

E-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Phone: + 55 83 3216 7807; Fax number: + 55 83 3216 7094

Abstract

This study evaluated the efficacy of flavonoids in inhibiting biofilm formation of *Staphylococcus aureus* RN4220 and *S. aureus* AS-119B strains, which overexpress efflux protein genes. The *S. aureus* ATCC259233 strain which does not overexpress genes related to efflux proteins was also used in tests. The minimum inhibitory concentration (MIC) of flavonoids was determined by the microdilution in broth method, while the minimum concentration for biofilm inhibition (MICB₅₀) was determined by the microdilution in broth method with quantification of biofilm formation by absorbance at 595 nm. The tested flavonoids at 512 µg ml⁻¹ showed no inhibitory activity on the growth of the strains tested; however, at lower concentrations showed inhibitory effects on biofilm formation by these same strains. MBIC₅₀ values varied between 1 to 256 µg ml⁻¹, with lower values (1 and 4 µg ml⁻¹) being observed against *S. aureus* RN-4220. Aglycone flavonoids showed lower MICB₅₀ values than their respective glycone forms. Myricetin, hesperetin and phloretin exhibited biofilm formation inhibition > 70% for *S. aureus* RN-4220. The results indicate that the tested flavonoids have the potential of inhibiting biofilm formation by *S. aureus* strains that overexpress efflux pumps. However, these effects are more strongly established by flavonoids in their aglycone forms.

Keywords: flavonoids; glycosylation; *Staphylococcus* spp.; inhibitory effect; biofilm.

Significance and impact of the study: The biofilm formation capacity of *Staphylococcus aureus* is recognized as a characteristic that contributes to the persistence of this pathogen in the environment. This study demonstrates the efficacy of flavonoids to inhibit biofilm formation in *S. aureus*, suggesting the potential of these compounds for controlling biofilm formation, particularly when used in the aglycone form.

1. Introduction

Staphylococcus aureus are bacteria that can live as commensals; however, they frequently colonize humans as pathogens causing different infections (Lee et al., 2011). When colonizing surfaces, *S. aureus* can form a structured community named biofilm, in which the cells are embedded in a polymer matrix. Although the composition of the biofilm matrix may vary, the main components include extracellular DNA, polysaccharides, proteins and amyloid fibrils (Schwartz et al., 2012).

Due to the increase in reports of infections caused by multi-resistant *S. aureus* strains, there is an interest in the search for molecules with the ability to inhibit the growth and survival of these microorganisms (Magesh et al., 2013). Treatments for the control of pathogenic bacteria involve the use of antibiotics; however, some of these compounds have been shown inefficient in eradicating bacterial populations arranged in biofilm forms (Park et al., 2012).

In recent years, studies have addressed a variety of biological properties of different phenolic compounds, mainly due to their antioxidant properties (Espinosa et al., 2015; Farhadi et al., 2015). Phenolic compounds are one of the major classes of secondary metabolites of plants and can be categorized into several classes, including phenolic acids, flavonoids and tannins (Borges et al., 2013; Khan, Zill-E-Huma and Dangles, 2014). Characterized by a structure composed of 15 carbon atoms (C6 - C3 - C6), flavonoids can be classified into two different groups (Xiao, Muzashvili and Georgiev, 2014). They occur as α -glycosides or β -glycosides, including glycosylated flavonoids, galactosides, rhamnosides, arabinosides and rutinosides (Taheri et al., 2013). Glycosylated flavonoids occur primarily as C-3 or C-7 O-glycosides (Barreca et al., 2014). Despite the basic skeleton being the same, the structural characteristics (especially the position and number of hydroxyl groups in the

phenolic ring) have a strong influence on the biological properties of phenolic compounds (Borges et al., 2013; Choi et al., 2014).

Several phenolic compounds have shown antimicrobial properties and capability to inhibit the biofilm formation by pathogenic bacteria, including *S. aureus* (Nowatzki et al., 2012; Xing et al., 2012). However, some phenolic compounds such as the diterpene totarol, tannic acid (tannin) and tiliroside flavonoids have shown properties to modulate the resistance to various antibiotics in *S. aureus* involving efflux pump inhibition (Silva et al., 2009; Smith et al., 2007; Kyaw, Lim and Zhou, 2013). Increased expression of efflux systems in bacteria cells is reported as an important strategy for regulating intracellular amounts of waste compounds from cellular metabolism in the limited biofilm matrix environment (Kvist, Hancock and Klemm, 2008; Baugh et al., 2013). Thus, conditions influencing efflux systems activity in bacterial cells may directly impact their capability to form and maintain biofilm.

Considering these aspects, the objective of this study was to evaluate the efficacy of different flavonoids in inhibiting the biofilm formation by *S. aureus* strains that overexpress genes for efflux proteins.

2. Results and discussion

The results of assays for biofilm quantification and CRA (Congo Red Agar) tests showed that all the *S. aureus* strains used in the study are biofilm producers. CRA tests revealed that *S. aureus* ATCC-25923 presented black coloration according to the reference scale, while *S. aureus* RN- 4220 and *S. aureus* SA-1199B presented an almost black coloration (Fig. 1).

All tested flavonoids showed weak antimicrobial activity ($MIC > 1024 \mu g ml^{-1}$, Van Vuuren, 2008) for all the tested *S. aureus* strains (Van Vuuren, 2008). However, the tested flavonoids presented inhibitory effects toward biofilm formation by all the tested strains, with

exception for myricitrin and phloridzin toward *S. aureus* SA-1199B (Table 3). MBIC₅₀ values varied between 1 to 256 µg ml⁻¹, among the tested flavonoids and strains. In general, the lowest MBIC₅₀ values (1 µg ml⁻¹) were observed against *S. aureus* RN-4220, with exception of myricitrin that presented MBIC₅₀ value of 128 µg ml⁻¹.

MBIC₅₀ values of the assayed flavonoids were considerably lower (4 to 256-fold) than the respective MIC values (Table 4). These data show that although flavonoids had no inhibitory effect on the growth of the tested *S. aureus* strains at the assayed concentrations, these compounds at subinhibitory concentrations showed inhibitory effects toward the biofilm formation by these same strains. Still, flavonoids in their aglycone forms (phloretin, hesperetin, myricitrin) showed lower MBIC₅₀ values against *S. aureus* RN-4220 and *S. aureus* SA-1199B than their respective glycone forms.

Previous studies found that aglycone flavonoids have higher antioxidant effects compared to their respective glycone forms, with such differences being related to difference in hydroxyl groups and double bonds between carbon in positions 2 and 3 of the molecules (Pyu, Lee and Lee, 2005; Souza et al., 2015). Furthermore, the *O*-glycosidic bond in the molecules is associated with reduced ability to interact with bacterial cells due to a lack of affinity for phospholipid bilayer or specific receptors located on the cell membrane (Gomes et al., 2011). Although the relationship between structure and activity has already been observed in studies evaluating the antibacterial effects of different glycone and aglycone flavonoid forms (Stafford, 1990; Mandalari et al., 2007), reports of such influence on the inhibitory effects toward the biofilm formation in bacteria are still scarce or inexistent.

A previous study found that strains of methicillin-resistant *S. aureus* have a reduced capability to form biofilms when growing in the presence of subinhibitory concentrations of ellagic acid (MBIC₅₀ 50 - 200 µg ml⁻¹), with MBIC₅₀ values being significantly lower than the verified MIC (Quave et al., 2012). In another study, the presence of epigallocatechin gallate in

growth medium inhibited the biofilm formation by *Streptococcus mutans* with MBIC₅₀ of 312.5 µg ml⁻¹ (Xu, Zhou and Wu, 2012).

Myricetin at concentrations varying from 64 to 256 µg ml⁻¹, hesperetin from 32 to 256 µg ml⁻¹ and phloretin from 8 to 256 µg ml⁻¹ presented biofilm formation inhibition > 70% against *S. aureus* RN- 4220, while the inhibition was lower against *S. aureus* ATCC-25923 and *S. aureus* SA-1199B, respectively. For the majority of the concentrations tested, the highest biofilm formation inhibition was established against *S. aureus* RN-4220 (Fig. 2).

Studies have verified that plant compounds at subinhibitory concentrations can inhibit biofilm formation by *S. aureus* resistant strains (Lin et al., 2011; Christena et al., 2015), interfering with the function of efflux systems (Kvist et al., 2008). Thus, the exposure to subinhibitory concentrations of the studied flavonoids may have influenced the function of efflux system expressed by *S. aureus* RN4220 and *S. aureus* SA-1199B strains, consequently interfering with the capability to produce biofilm. However, the strength of the inhibitory effects on biofilm formation by the tested flavonoids may also be related to the type of efflux system expressed in each strain.

3. Material and methods

3.1 Antibiotics and flavonoids

Norfloxacin (Nor), erythromycin (Ery) and flavonoids were obtained from Sigma-Aldrich (purity ≥ 98%; St. Louis, USA). Nor stock solutions were prepared from a mixture of 1 mol l⁻¹ NaOH and sterile distilled water (1 : 9 ratio) and Ery in absolute alcohol according to a previously described procedure (CLSI, 2012). The tested flavonoids (Table 1) were dissolved in a mixture of dimethyl sulfoxide (DMSO) and distilled water (4 : 1 ratio). DMSO at its highest concentration tested after final dilution in broth (4%, v/v) did not inhibit the bacterial growth.

3.2 Test strains and growth conditions

S. aureus RN4220 and *S. aureus* SA-1199B, which overexpress genes for efflux proteins, were kindly provided by Dr. S. Gibbons (University of London – UK); and *S. aureus* ATCC-25923 that does not overexpress genes for efflux proteins (Table 2), were used as test strains. Stock cultures were maintained on Brain Heart Infusion broth (BHIB; Himedia, India) containing glycerol (15 mL 100 mL⁻¹) at - 20 °C. For the inoculum preparation, each strain was grown in BHI broth at 37 °C for 18 - 24 h (until the end of exponential growth phase). Then, the cells were collected by centrifugation (4500 g, 15 min, 4 °C), washed twice with sterile saline solution (0.85% w/v NaCl) and re-suspended in sterile saline solution to obtain the cell suspensions. The OD reading at 660 nm of each cell suspension was 0.1 and provided viable cell counts of approximately 8 log cfu mL⁻¹.

3.3 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The MIC of the flavonoid was determined in BHIB using a microdilution in both standard procedure (CLSI, 2012). The 96-well plates were prepared by dispensing 180 µL of BHI broth containing 1.8 µL of bacterial suspension (final viable counts of approximately 5 log cfu mL⁻¹). Then, 20 µL of the solution of each flavonoid tested was added to each well. Each plate included positive controls without flavonoids (final concentration varying from 512 to 0.25 µL mL⁻¹). The microplates were incubated at 37 °C for 24 h. After the incubation period, the MIC was defined as the lowest concentration that was capable to inhibit visually the growth of the test bacterial strain.

3.4 Phenotypic characterization of biofilm production

The assay for quantification of biofilm formation was performed using a microdilution procedure described previously (Stepanovic et al., 2007), 5 log cfu mL⁻¹ bacterial suspensions

in BHI broth. The mixtures were incubated statically at 37 °C for 18 - 24 h. After the incubation period, the growth medium was discarded, the wells were washed with phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2) and fixed cells were stained with a crystal violet solution (0.5 g 100 ml⁻¹). BHI broth without inoculation of the test strains or flavonoids were used as negative control. Biofilm development was assessed by absorbance at 570 nm (A_{570}) of staining bacteria cells. A cut-off value (OD_C) of A_{570} was established, defined as three standard deviations (SD) above the OD negative control average: $OD_C = \text{negative control average} + (3 \times \text{negative control SD})$. $OD_{570} \leq OD_C = \text{no producer}$; $OD_C < OD_{570} \leq 2 \times OD_C = \text{weak producer}$; $2 \times OD_C < OD_{570} \leq 4 \times OD_C = \text{moderate producer}$; and $4 \times OD_C < OD_{570} = \text{strong producer}$.

The characterization of biofilm production by Congo Red agar (CRA) method was performed according to previously described procedure (Arciola et al., 2002). All strains were grown in CRA, incubated for 48 h at 37 °C and subsequently left at room temperature for 2 - 4 days. An internal reference with a six-color scale was used to evaluate colony growth, ranging between very black (VB) to very red (VR) (Fig. 1). Black colonies were considered biofilm producers, gray colonies weak biofilm producers, while red and purple colonies were not biofilm producers.

3.5 Inhibition of biofilm formation assay

The effect of flavonoids on biofilm formation by test strains was performed using a microdilution in broth method described previously (Xu, Zhou and Wu, 2011), using 5 log cfu ml⁻¹ bacterial suspensions in BHI broth and the tested flavonoids in final concentrations range of 256 - 0.25 $\mu\text{L ml}^{-1}$. The systems were statically incubated at 37 °C for 18 - 24 h. After the incubation period, the growth medium was removed and the wells were washed with PBS to remove planktonic cells. The biofilm was stained with crystal violet (0.1 g 100 mL⁻¹). The

stained biofilm was solubilized by adding 95% ethanol and absorbance at 595 nm (A_{595}) was recorded in a microplate reader (BioTek EONTM, USA). Mixtures without the addition of flavonoids were tested as untreated (positive) control. The percentage of inhibition for each concentration of the tested flavonoids was calculated using the equation: $(1 - A_{595}/A_{595}$ of the untreated control) \times 100. The minimum biofilm inhibitory concentration ($MBIC_{50}$) of flavonoids was defined as the lowest concentration that resulted in 50% or more inhibition of biofilm formation.

3.6 Statistical analysis

Assays were performed in triplicate, in three independent experiments (replicates), and the results were expressed as average values of assays. The MIC and $MBIC_{50}$ results were expressed in modal value because no variation among replicated results was observed (McMahon et al., 2008). Statistical analyzes were performed using Sigma-Stat 3.5 software (Jandel Scientific Software, San Jose, California).

4. Conclusion

The results of this study show that flavonoids have the potential for inhibiting biofilm formation by *S. aureus* strains that overexpress efflux protein genes. These effects were strongly established by the aglycone forms of myricetin, hesperetin and phloretin, when compared to their respective glycone forms. However, further studies are necessary to elucidate the mechanisms involved in the inhibition of biofilm formation in the test strains by these flavonoids.

Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. Simon Gibbons (University of London, UK) for his kind and valuable collaboration, CNPq (Brazil) for the financial support and CAPES (Brazil) for the scholarship granted to the first author (Lopes, L.A.A.).

References

Arciola, C. R., Campoccia, D., Gamberinia, S., Cervellatía, M., Donatía E., Montanaro, L. (2002) Detection of slime production by means of an optimised congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials* 23, 4233–4239.

Barreca, D., Bellocco, E., Laganà, G., Ginestra, G. and Bisignano, C. (2014) Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosylated derivatives present in apple and kumquat. *Food Chemistry* 160, 292–297.

Baugh, S., Phillips, C.R., Ekanayaka, A.S., Piddock, L.J.V. and Webber, M.A. (2013) Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69, 1–9.

Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M.J. and Simões, M. (2013) Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance* 19, 256-265.

Choi, J.S., Islam, N., Ali, Y., Ji Kim, E., Myeong Kim, Y. and Ah Jung, H. (2014) Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. *Food and Chemical Toxicology* 64, 27–33.

Christena, L.R., Subramaniam, S., Vidhyalakshmi, M., Mahadevan, V., Sivasubramanian, A. and Nagarajan, S. (2015) Dual role of pinostrobin-a flavonoid nutraceutical as an efflux pump inhibitor and antibiofilm agent to mitigate food borne pathogens. *Royal Society of Chemistry Advances* 5, 61881–61887.

CLSI. (2012) *Performance standards of antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement*. CLSI document M100-22. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 151.

Espinosa, R.R., Inchingolo, R., Alencar, S.M., Rodriguez-Estrada, M.T. and Castro, I.A. (2015) Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters. *Food Chemistry* 182, 95-104.

Farhadi, K., Esmaeilzadeh, F., Hatami, M., Forough, M. and Molaie, R. (2015) Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in west Azerbaijan province, Iran. *Food Chemistry* 199, 847-855.

Freeman, D.J., Falkiner, F.R. and Keane, C.T. (1989) New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology* 42, 872-874.

Gomes, R.A., Ramirez, R.R.A., Maciel, J.K.S., Agra, M.F., Souza, M.F.V., Falcão-Silva, V.S. and Siqueira-Junior, J.P. (2011) Phenolic compounds from *Sidastrum micranthum* (A. St.-Hil.) Fryxell and evaluation of acacetin and 7,4'-di-O-methylisoscuteellarein as modulator of bacterial drug resistance. *Química Nova* 34, 1385-1388.

Khan, M. K., Zill-E-Huma, Dangles, O. (2014) A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* 33, 85–104.

Kvist, M., Hancock, V. and Klemm, P. (2008) Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 7376–7382.

Kyaw, B.M., Lim, C.S. and Zhou, W. (2013) Tannic acid as phytochemical potentiator for antibiotic resistance adaptation. *APCBEE Procedia* 7, 175-181.

Lee, J., Regmi, S.C., Kim, J., Cho, M.H., Yun, H., Lee, C. and Lee, J. (2011) Apple flavonoid phloretin inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats. *Infection and Immunity* 79, 4819-4827.

Lin, M.H., Chang, F.R., Hua, M.Y., Wu, Y.C. and Liu, S.T. (2011) Inhibitory effects of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucopyranose on biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemother* 55, 1021– 1027.

Magesh, H., Kumar, A., Alam, A., Sekar, U.P., Sumantran, V.N. and Vaidyanathan, R. (2013) Identification of natural compounds which inhibit biofilm formation in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia*. *Indian Journal of Experimental Biology* 51, 764-772.

Mandalari, G., Bennett, R.N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C.B., Gasson, M.J. and Narbad, A. (2007) Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot

(*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2056–2064.

Mariana, N.S., Salman, S.A., Neela, V. and Zamberi, S. (2009) Evaluation of modified congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin–resistance *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research* 3, 330-338.

McMahon, M.A.S., Tunney, M.M., Moore, J.E., Blair, I.S., Gilpin, D.F. and McDowell, D.A. (2008) Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). *Letters in Applied Microbiology* 47, 263-268.

Nowatzki, P.J., Koepsel, R.R., Stoodley, P., Min, K., Harper, A., Murata, H., Donfack, J., Hortelano, E. R., Ehrlich, G.D. and Russell, A.J. (2012) Salicylic acid-releasing polyurethane acrylate polymers as anti-biofilm urological catheter coatings. *Acta Biomaterialia* 8, 1869-1880.

Park, A., Jeong, H., Lee, J. and Lee, C. (2012) The inhibitory effect of phloretin on the formation of *Escherichia coli* O157:H7 biofilm in a microfluidic system. *BioChip Journal* 6, 299-305.

Pyo, Y.H., Lee, T.C. and Lee, Y.C. (2005) Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Food Research International* 38, 551-559.

Quave, C.L., Estevez-Carmona, M., Compadre, C.M., Hobby, G., Hendrickson, H., Beenken, K.E. and Smeltzer, M.S. (2012) Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *PLoS One* 7, 1-16.

Sarkisian, S.A., Janssen, M.J., Matta, H., Henry, G.E., Laplante, K.L. and Rowley, D.C. (2012) Inhibition of Bacterial Growth and Biofilm Production by Constituents from *Hypericum* spp. *Phytotherapy Research* 26, 1012-1016.

Schwartz, K., Syed, A.K., Stephenson, R.E., Rickard, A.H. and Boles, B.R. (2012) Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathogens* 8.

Silva, V.S.F., Silva, D.A., Souza, M.F.V. and Siqueira-Júnior, J.P. (2009) Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae). *Phytotherapy Research* 23, 1367-1370.

Souza, V.T., Franco, E.P.D., Araújo, M.E.M.B.A., Messias, M.C.F., Priviero, F.B.M., Sawaya, A.C.H.F. and Carvalho, P.O. (2015) Characterization of the antioxidant activity of aglycone and glycosylated derivatives of hesperetin: an in vitro and in vivo study. *Journal of Molecular Recognition* 29, 80–87.

Smith, E.C.J., Kaatz, G.W., Seo, S.M., Wareham, N., Williamson, E.M. and Gibbons, S. (2007) The phenolic diterpene totarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 4480–4483.

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G.D., Djukić, S., Ćirković, I. and Ruzicka, F. (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 115, 891-899.

Taheri, R., Connolly, B.A., Brand, M.H. and Bolling, B.W. (2013) Underutilized chokeberry (*Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia*, *Aronia prunifolia*) accessions are rich sources of anthocyanins, flavonoids, hydroxycinnamic acids, and proanthocyanidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 61, 8581-8588.

Van Vuuren, S.F. (2008) Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 462-472.

Xiao, J., Muzashvili, T.S. and Georgiev, M.I. (2014) Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids. *Biotechnology Advances* 32, 1145–1156.

Xing, M., Shen, F., Liu, L., Chen, Z., Guo, N., Wang, X., Wang, W., Zhang, K., Wu, X., Wang, X., Li, Y., Sun, S. and Yu, L. (2012) Antimicrobial efficacy of the alkaloid harmaline alone and in combination with chlorhexidine digluconate against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* grown in planktonic and biofilm cultures. *Letters in Applied Microbiology* 54, 475-482.

Xu, X., Zhou, X.D. and Wu, C.D. (2011) The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 55, 1229–1236.

Xu, X., Zhou, X.D. and Wu, C.D. (2012) Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing gtf genes. *Archives of Oral Biology* 57, 678–683.

Table 1 Chemical classification of flavonoids tested for inhibition of biofilm formation by *S. aureus*

Flavonoids	
<i>O</i>-glycoside	
Glycosylated	Aglycones
Miricitrina	Myricetin
Hesperidin	Hesperetin
Phloridzin	Phloretin

Table 2 Characteristics of *S. aureus* strains used in the study, considering the capability to express efflux protein genes

Strains	Characteristics	Reference
<i>S. aureus</i> RN4220	Contains the pUL5054 plasmid, which carries the gene encoding the protein for macrolide efflux (MsrA)	Ross et al. (1989); Chan et al. (2013)
<i>S. aureus</i> SA-1199B	It overexpresses the gene <i>norA</i> , encoding the efflux protein NorA, responsible for efflux of fluoroquinolones and other substances that bind to nucleic acids, such as ammonium quaternary compounds and intercalating dyes (ethidium bromide)	Kaatz et al. (1993); Kaatz and Seo (1995); Gibbons and Udo (2000); Enslie et al. (1995)
<i>S. aureus</i> ATCC 259233	It does not overexpress genes related protein efflux pumps	Gibbons and Udo (2000)

Table 3 Minimum concentration for inhibition of biofilm formation of flavonoids against *S. aureus* strains, expressed as MBIC₅₀

Flavonoids	<i>S. aureus</i> RN- 4220	<i>S. aureus</i> SA-1199B	<i>S. aureus</i> ATCC-25923
	MBIC50 (µg ml ⁻¹)	MBIC50 (µg ml ⁻¹)	MBIC50 (µg ml ⁻¹)
Hesperetin	4	32	16
Hesperidin	32	128	4
Myricetin	1	32	64
Myricitrin	128	No inhibition	64
Phloretin	1	256	4
Phloridzin	16	No inhibition	32

MBIC₅₀: Minimum concentration for biofilm inhibition, defined as the lowest concentration capable of reducing biofilm formation by 50% or more compared to the control assay.

Table 4 Decreases of the minimum concentration for biofilm inhibition (MBIC₅₀) in relation to the minimal inhibitory concentration (MIC) of aglycone flavonoids against *S. aureus* strains

Aglycone flavonoids	Decrease of MBIC ₅₀ in relation to MIC		
	<i>S. aureus</i> RN- 4220	<i>S. aureus</i> SA-1199	<i>S. aureus</i> ATCC-25923
Hesperetin	64	8	16
Myricetin	256	8	4
Phloretin	256	1	128

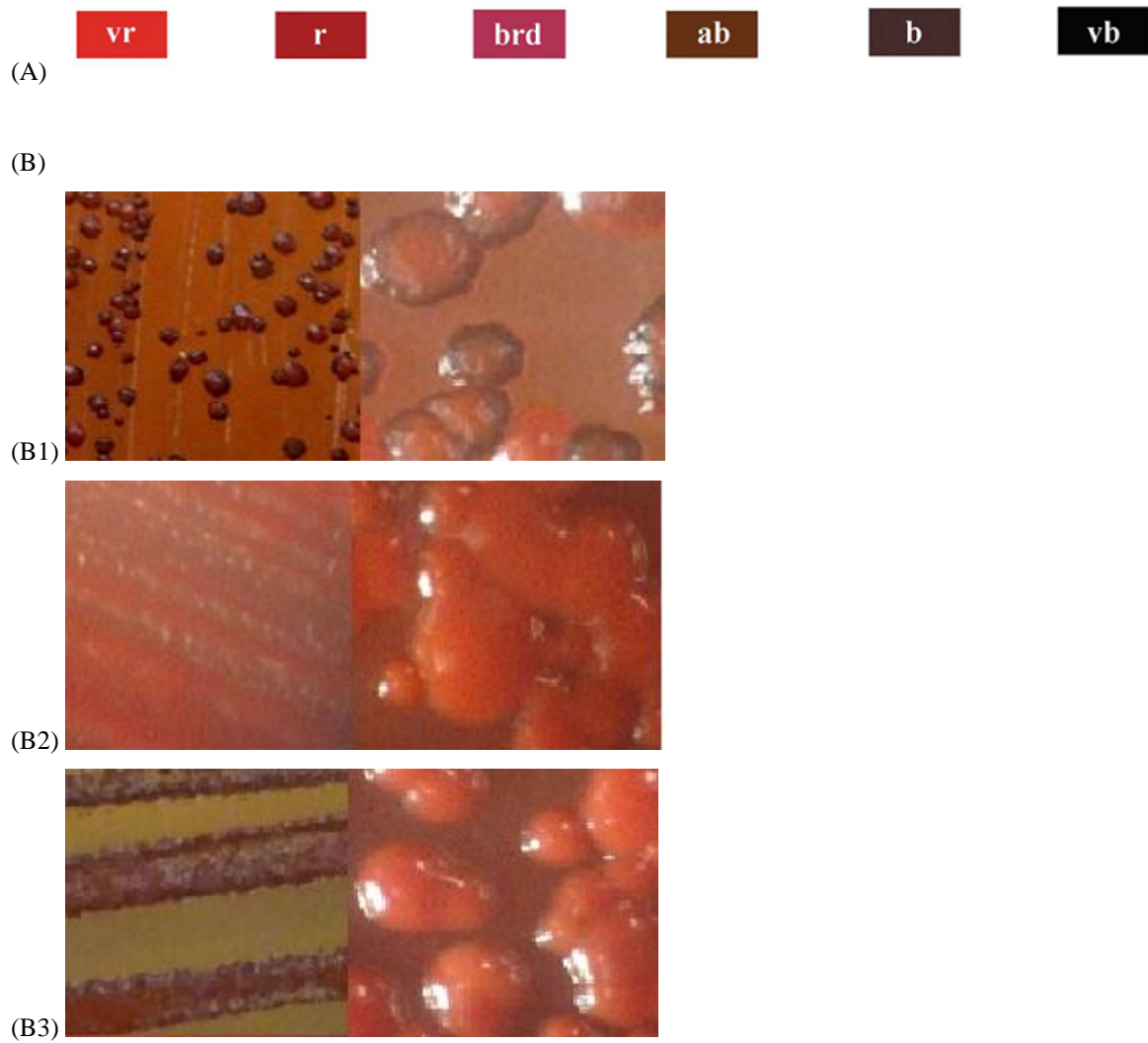


Fig. 1 Colorimetric scale used for the evaluation of *S. aureus* colonies in Cong Red agar (CRA): (A) reference scale (vr, very red; r, red; brd, bordeaux; ab, almost black; b, black; vb, very black); (B) appearance of colony on CRA, (B1) *S. aureus* ATCC-25923, (B2) *S. aureus* RN4220, (B3) *S. aureus* SA-1199B. Due to light reflection, digital images of colonies did not always perfectly match the appearance that resembles a direct visual observation

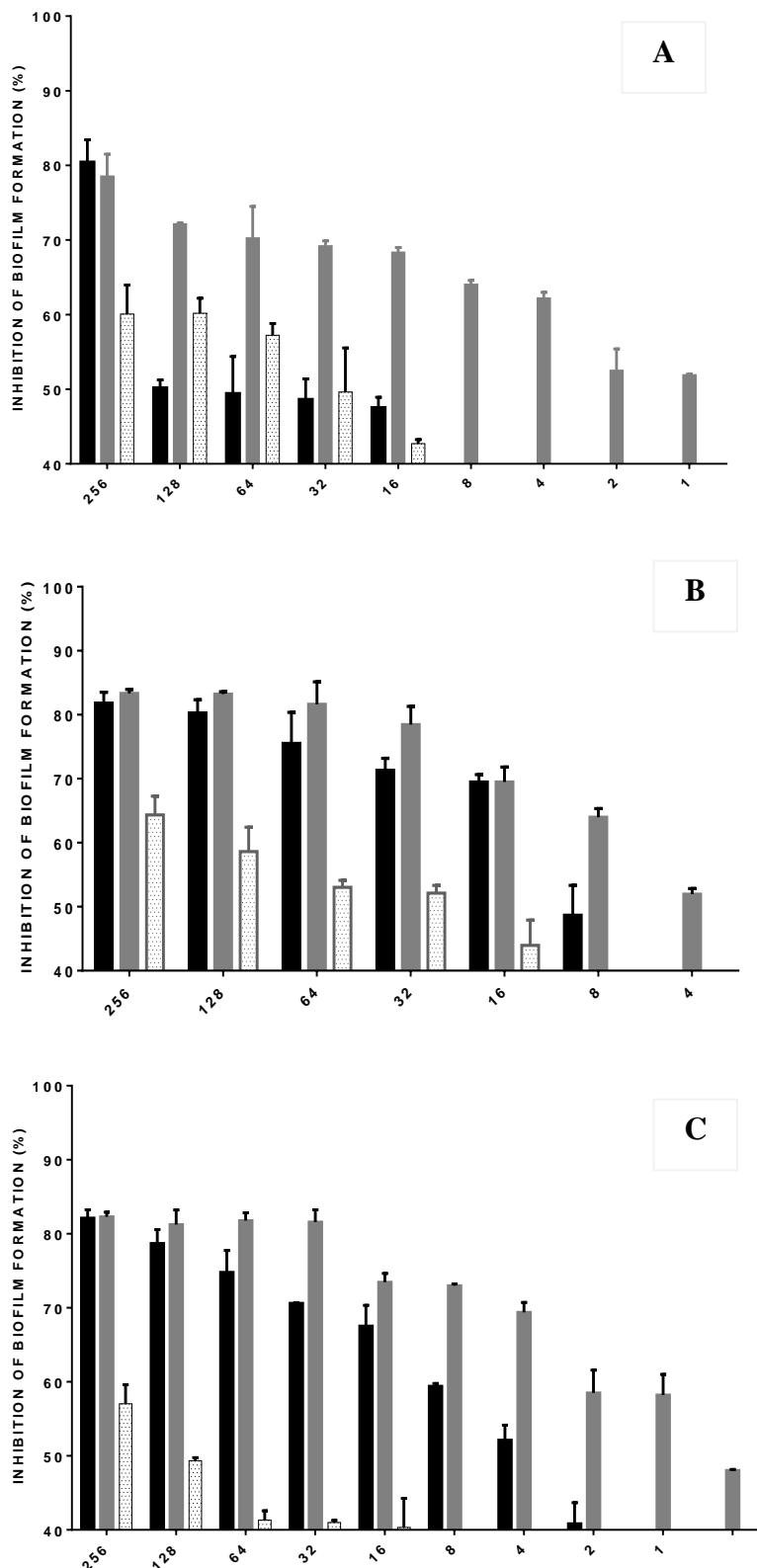


Fig. 2 Percentage biofilm formation inhibition of *S. aureus* strains exposed to different concentrations of flavonoids. Myricetin (A), Hesperetin (B) and Phloretin (C). black bar *S. aureus* ATCC 25923 control strain, gray bar *S. aureus* RN 4220; dotted bar *S. aureus* SA-1199B. Error bars indicate standard deviation

4 OUTROS RESULTADOS

O tanino ácido tânico (AT) ensaiado não apresentou atividade antimicrobiana à 512 µg/mL (CIM > 1024 µg/mL) frente as cepas de *S. aureus* testadas. Sendo que o AT apresentou capacidade de inibição da formação de biofilme por parte das cepas testadas em concentrações subinibitórias. Os valores de MBIC₅₀ foram de 2 µg/mL para *S. aureus* RN-4220 e 32 µg/mL para *S. aureus* SA-1199B e *S. aureus* ATCC-25923.

O AT na concentração de 32 µg/mL apresentou percentual de inibição da formação de biofilme > 70% para *S. aureus* RN-4220, enquanto estes percentuais foram inferiores para *S. aureus* SA-1199B e *S. aureus* ATCC-25923. Para todas as concentrações ensaiadas, os maiores percentuais de inibição da formação de biofilme foram estabelecidos frente a *S. aureus* RN-4220 (Fig. 1).

Um estudo prévio mostrou que o flavonoide floroglucinol inibiu a formação de biofilme por *S. aureus* e *S. epidermidis*, com MBIC de 1,95 µg/mL (SARKISIAN, et al., 2012). Em outro estudo, o flavonoide pinostrobin em concentrações sub-inibitórias de 500µg/mL inibiu 90% da formação de biofilme em *S. aureus* 1199-B (NorA) (CHRISTENA et al., 2015).

Estes dados mostram que, embora o AT não tenha apresentado efeito inibitório nas concentrações ensaiadas sobre as cepas de *S. aureus*, tal composto, em concentrações subinibitórias, apresentam potencial para inibir a formação de biofilme em cepas que superexpressam genes para proteínas de efluxo.

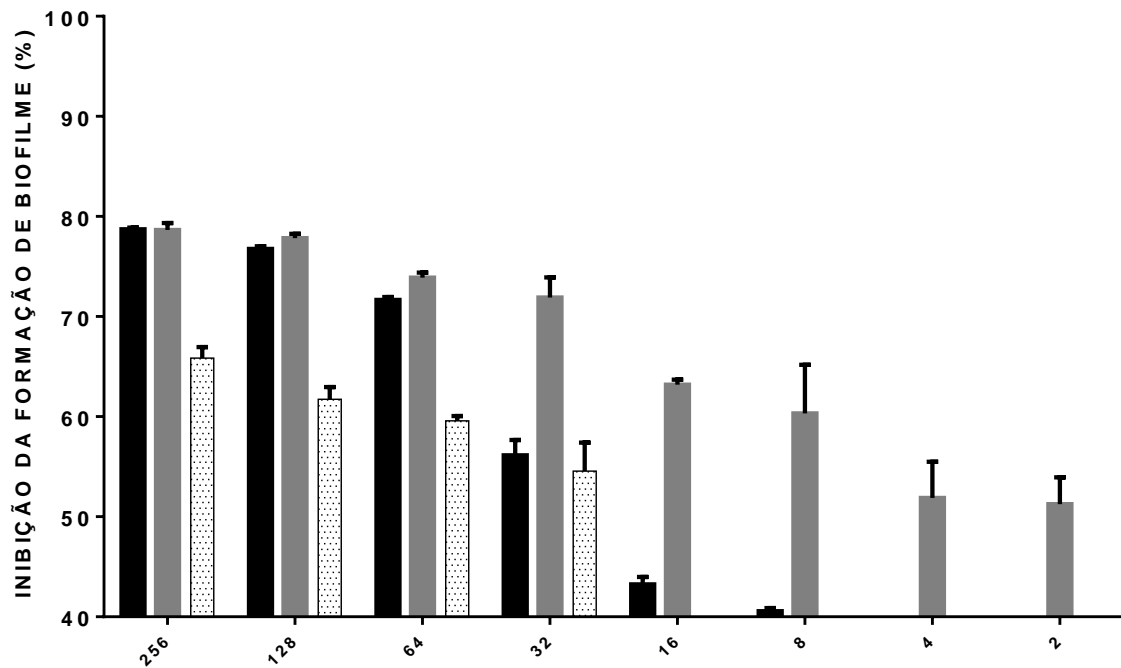


Fig. 1 Percentual de inibição da formação de biofilme por cepas de *S. aureus* expostas a diferentes concentrações de ácido tânico. Barra negra cepa controle de *S. aureus* ATCC-25923, barra cinza *S. aureus* RN-4220; barra pontilhada *S. aureus* SA-1199B. As barras de erro indicam o desvio padrão

REFERÊNCIAS

CHRISTENA, L. R.; SUBRAMANIAM, S.; VIDHYALAKSHMI, M.; MAHADEVAN, V.; SIVASUBRAMANIAN, A.; NAGARAJAN, S. Dual role of pinostrobin-a flavonoid nutraceutical as an efflux pump inhibitor and antibiofilm agent to mitigate food borne pathogens. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 5, p. 61881–61887, 2015.

SARKISIAN, S. A.; JANSSEN, M. J.; MATTA, H.; HENRY, G. E.; LAPLANTE, K. L.; ROWLEY, D. C. Inhibition of Bacterial Growth and Biofilm Production by Constituents from *Hypericum* spp. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 1012-1016, 2012.

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados atenderam aos objetivos propostos pelo estudo. As cepas de *S. aureus* utilizadas no trabalho mostraram capacidade para produzir biofilme. Ainda, os compostos fenólicos não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações ensaiadas. Sendo que, em concentrações subinibitórias apresentaram potencial para inibir a formação de biofilme frente as linhagem de *S. aureus* que superexpressam genes para proteínas de efluxo. Os efeitos das MBIC₅₀ foram mais fortemente estabelecidos pelos flavonoides nas suas formas agliconas quando comparados as suas respectivas formas glicosiladas. Entretanto, estudos futuros tornam-se necessários para a elucidação dos mecanismos envolvidos na inibição da formação de biofilme nas cepas teste por parte destes compostos fenólicos.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

LAÊNIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES

ATIVIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE
BIOFILME EM *Staphylococcus aureus*

JOÃO PESSOA-PB

2016