



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR DE SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

LOUISE SOARES PITA

**ATIVIDADE ANTICARIOGÊNICA DO GALATO DE BUTILA OBTIDO
ATRAVÉS DA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO E SEUS
EFEITOS SOBRE O BIOFILME DENTAL DE *Streptococcus mutans*
ATCC 700610**

Vitória da Conquista, BA

2024

LOUISE SOARES PITA

**ATIVIDADE ANTICARIOGÊNICA DO GALATO DE BUTILA OBTIDO
ATRAVÉS DA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO E SEUS
EFEITOS SOBRE O BIOFILME DENTAL DE *Streptococcus mutans*
ATCC 700610**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regiane Yatsuda
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Mariluze Peixoto Cruz
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA

2024

P681

Pita, Louise Soares.

Atividade anticariogênica do galato de butila obtido através da esterificação do ácido gálico e seus efeitos sobre o biofilme dental de *Streptococcus mutans* ATCC 700610 / Louise Soares Pita. -- Vitória da Conquista, BA: UFBA, 2024.

25 f.; il.

Orientadora: Prof. Dr^a. Regiane Yatsuda.

Co-orientadora: Prof.^a. Dr^a. Mariluze Peixoto Cruz.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Bioiências) - Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2024.

1. Cárie Dental. 2. *Streptococcus mutans*. 3. Biofilme. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Yatsuda, Regiane. III. Cruz, Mariluze Peixoto. IV. Título.

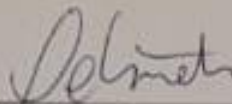
CDU: 616.314-002(043.2)

LOUISE SOARES PITA

**ATIVIDADE ANTICARIOGÊNICA DO GALATO DE BUTILA
OBTIDO ATRAVÉS DA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO E
SEUS EFEITOS SOBRE O BIOFILME DENTAL DE
Streptococcus mutans ATCC 700610**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em
Bióciências e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.

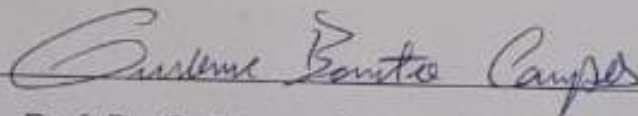
Vitória da Conquista – BA, 16/12/2024



Prof.ª Dr.ª Regiane Yatsuda (Orientadora)
(Universidade Federal da Bahia)



Prof. Dr. Bruno Oliveira Moreira (Examinador)
(Universidade Federal da Bahia)



Prof. Dr. Guilherme Barreto Campos (Examinador)
(Universidade Federal da Bahia)

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta dissertação representa um marco importante na minha trajetória acadêmica e pessoal, e nada disso seria possível sem o apoio e a contribuição de muitas pessoas a quem desejo expressar minha mais profunda gratidão.

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me permitido chegar até aqui. Sem a permissão dEle nada disso seria possível.

Agradeço a Regiane por sua amizade e orientação, paciência e dedicação ao longo de todo o processo. Seu conhecimento e conselhos foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também a coorientadora Mariluze Cruz, sem a sua orientação grande parte desse trabalho não seria possível ser realizado. Vocês são profissionais e mulheres incríveis!

À minha família, que sempre acreditou em mim e me apoiou incondicionalmente. Minha mãe Sirlene, minha irmã Nielle e meus sobrinhos Marco Túlio e Elys. Obrigado por serem a minha base e por estarem ao meu lado nos momentos de dificuldade.

Aos meus amigos e colegas de curso, que compartilharam comigo os desafios e alegrias dessa caminhada. As conversas, trocas de ideias e apoio mútuo foram fundamentais para manter a motivação.

Ao grupo Mutans, em especial a Brenda. Muito obrigada por ter sido meu braço direito e esquerdo nos diversos momentos dessa jornada, sem você teria sido tudo mais difícil. Aos membros que passaram por este grupo e que sou extremamente grata por toda a amizade e experiência compartilhada, Manu, Rafa, Iago e Lucas. A Patrick e Cecília, obrigada pelo apoio, amizade, risadas e por toda a ajuda nos experimentos.

A Talita pela amizade, paciência e conhecimento compartilhado. A ajuda dos técnicos na pessoa de Janeide; e à banca por aceitar o convite e por enriquecer ainda mais esse trabalho.

Aos meus amigos pelos momentos de descontração, palavras de incentivo e apoio. A Camila pelo companheirismo e por estar ao meu lado sempre.

Gostaria de agradecer também à UFBA - IMS campus Vitória da Conquista, FAPESB e CAPES, por fornecer os recursos necessários para a realização deste trabalho. Sem esse apoio, muitos aspectos desta pesquisa não teriam sido possíveis.

Por fim, agradeço a todos os professores, pesquisadores e colaboradores que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste projeto. Cada conselho, dúvida ou incentivo deixou uma marca no meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

A todos, o meu mais sincero muito obrigado!

“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber.”
(Confúcio)

RESUMO

PITA, L. S. **ATIVIDADE ANTICARIOGÊNICA DO GALATO DE BUTILA OBTIDO ATRAVÉS DA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO E SEUS EFEITOS SOBRE O BIOFILME DENTAL DE *Streptococcus mutans* ATCC 700610**. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

A cárie dental é uma doença oral infecciosa que tem como um dos agentes etiológicos mais importantes o *Streptococcus mutans*. Comprovadamente, as espécies vegetais vêm sendo alvo de isolamento de importantes compostos com atividade antimicrobiana, que possuem uma maior aceitação por ser de origem natural e apresentar pouco ou nenhum efeito adverso. Dentre os compostos antioxidantes que tem se destacado, atualmente, encontra-se o ácido gálico e seus derivados, que estão entre os maiores antioxidantes fenólicos encontrados em vinhos e chá verde. Esse ácido fitoquímico é bem conhecido pelas suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antimutagênicas, anticarcinogênicas, antivirais e analgésicas. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de identificar e purificar os compostos bioativos dos galatos obtidos através da esterificação do ácido gálico e avaliar sua atividade antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans* ATCC 700610. Galato de butila (GB), Galato de Propila (GP), Galato de Metila (GM) e Galato de Sec-Butila (GSB) foram testados na determinação de Concentração inibitória (CIM) e bactericida (CBM) mínima, inibição da aderência celular (CIMA) com células planctônicas de *S. mutans*. A reação de esterificação foi comprovada por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (CG-EM). A atividade antimicrobiana de GB foi avaliada *in vitro* quanto à inibição da formação do biofilme, inibição da via glicolítica (formação de polissacarídeos), inibição da produção de ácido (pH drop) e inibição da aciduricidade (permeabilidade à prótons). GB apresentou CIM – 62,5 µg/mL, CBM – 250 µg/mL e GP apresentou CIM – 31,25 µg/mL, CBM – 250 µg/mL. GB, GSB, GP e GM não apresentaram atividade sobre a inibição da aderência celular (CIMA) nas concentrações mais altas testadas. GB 6,25 mg/mL demonstrou atividade bactericida (diminuição CFU/biofilme), GB (62,5 mg/mL) reduziu a produção de ácido do biofilme de *S. mutans* no período de 15 a 120 min em comparação ao veículo ($p < 0,05$). O pH final em 120 min foi de 6,07 para clorexidina, 5,85 para GB e 4,94 para veículo. GB (6,25 mg/mL) reduziu a permeabilidade de prótons da membrana celular de *S. mutans* em 80, 82, 90, 110 e 120 min em comparação com o veículo ($p < 0,05$). Deste modo, o Galato de

butila possui atividade antimicrobiana e interfere com importantes fatores de virulência de *S. mutans* como aciduricidade e acidogenicidade, sendo necessário a realização de mais estudos para elucidação do seu mecanismo de ação e possível uso como anticariogênico.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*; Biofilme; Cárie; Galato de Butila; antimicrobiano; anticariogênico; ácido 3, 4, 5-tri-hidroxibenzoico.

ABSTRACT

ANTICARYOGENIC ACTIVITY OF BUTYL GALLATE OBTAINED THROUGH ESTERIFICATION OF GALLIC ACID AND ITS EFFECTS ON DENTAL BIOFILM OF *Streptococcus mutans* ATCC 700610

Dental caries is an infectious oral disease that has as one of the most important etiological agents *Streptococcus mutans*. Proven, plant species have been isolation of important compounds with antimicrobial activity, which have greater acceptance because it is of natural origin and has little or no adverse effect. Among the antioxidant compounds that has been highlighted today, Gallic acid and its derivatives, which are among the largest phenolic antioxidants found in wines and green tea. This phytochemical acid is well known for its antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antimutagenic, anticarcinogenic, antiviral and analgesic properties. This work was developed with the objective of identifying and purifying the bioactive compounds of the gallate obtained through sterification of gallic acid and to evaluate their antimicrobial activity on *Streptococcus mutans* ATCC 700610. Butyl gallate (BG), propyl gallate (PG), methyl gallate (MG) and sec-Butyl Gallate (SBG) were tested in the determination of minimal inhibitory concentration (MIC) and bactericide (MBC), inhibition of cell adherence (MICA) with planktonic cells of *S. mutans*. The sterification reaction was proven by Gas Chromatography Coupled to the Mass Spectrum (GC-MS). BG antimicrobial activity was evaluated in vitro regarding the inhibition of biofilm formation, inhibition of glycolytic pathway (polysaccharide formation), inhibition of acid production (pH drop), inhibition of acidity (permeability to protons). BG presented CIM - 62.5 µg/ml, MBC - 250 µg/ml and PG was the most bioactive fraction MIC - 31, 25 µg/ml, MBC - 250 µg/ml. BG, SBG, PG and MG did not present activity on the inhibition of cell adhesion (up) at the highest tested concentrations. BG 6.25 mg/mL demonstrated bactericidal activity (decrease in CFU/biofilm), reduction in the production of soluble and insoluble glucans, BG reduced the acid production of *S. mutans* biofilm in the period from 15 to 120 min compared to the vehicle ($p < 0.05$). The final pH at 120 min was 6.07 for chlorhexidine, 5.85 for GB and 4.94 for vehicle. GB reduced the proton permeability of the *S. mutans* cell membrane at 80, 82, 90, 110 and 120 min compared to the vehicle ($p < 0.05$).

Keywords: *Streptococcus mutans*; Biofilm; Caries; Butyl gallate; antimicrobial; anticariogenic; 3, 4, 5-trihydroxybenzoic acid.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

A	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BHI	Brain Heart Infusion
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	Hidroxiapatita
CBM	Concentração bactericida mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
EI	Endocardite infecciosa
CIM	Concentração inibitória mínima
CIMA	Concentração inibitória mínima da aderência
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eDNA	Ácido desoxirribonucleico extracelular
AG	Ácido Gálico
EtOAC	Acetato de etila
EtOH	Etanol
GB	Galato de butila
GP	Galato de propila
GSB	Galato de sec-butila
FFNSC1.3	Mass spectra of Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds
GM	Galato de metila
GTFs	Glicosiltransferases
HEX	Hexano
KCl	Cloreto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
MeOH	Metanol
NaOH	Hidróxido de sódio
NIST 08	National Institute of Standards and Technology - Mass Spectral Library
nm	Nanômetros

OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A.	Para Análise
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEC	Polissacarídeo extracelular
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
TE	Tampão TRIS HCl - EDTA
TMCS	Trimetilclorossilano
UESB	Universidade Estadual Do Sudoeste Da Bahia
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
WILEY 8	Mass Spectral Library

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - À esquerda, processo de esterificação sob refluxo. À direita, extração da fase orgânica em balão de separação.

Figura 2 - Esquema de síntese do Galato de Metila, Galato de Sec-Butila, Galato de *n*-propila e Galato *de n*-butila.

Figura 3 – À esquerda cromatografia em coluna líquida. À direita amostras obtidas em processo de secagem.

Figura 4 – À esquerda, Cromatografia de camada delgada (CCD) do GP e GSB comparado com o Ácido Gálico (AG). Ao centro, CCD das amostras purificadas em coluna líquida, com visualização sob luz UV 265nm, à direita: placas reveladas com vapores de iodo.

Figura 5 – Sequência da confecção dos corpos de prova: A- incisivo inferior permanente bovino hígido com a demarcação do tamanho dos blocos de esmalte; B- fragmento dentário no aparato confeccionado com fio ortodôntico; C- superfície sólida para formação do biofilme no tubo Falcon; D - tubo com bloco de dente inserido no caldo BHI com sacarose a 1% e inóculo bacteriano.

Figura 6: Representação das fases do ensaio de formação, *in vitro*, do biofilme por *S. mutans*: A- Corpo de prova; B - Corpo de prova já com biofilme; C- Lavagem em salina a 0,9%; D- Inserção da superfície sólida nas soluções de tratamento por duas vezes (por tempo de 30 segundos); E- lavagem em salina; F- Inserção no tubo de origem (contendo caldo BHI e sacarose). Os tratamentos foram realizados duas vezes ao dia.

Figura 7 - Fluxograma de trabalho para ensaio de biofilme.

Figure 1. Flowchart of the bioguided fractionation of gallates obtained through the esterification of gallic acid.

Figure 2. Influence of butyl gallate on glycolytic pH-drop in *Streptococcus mutans* ATCC 700610 in biofilms.

Figure 3. Influence of butyl gallate on proton permeability's of *Streptococcus mutans* ATCC 700610 in biofilms.

LISTA DE TABELAS

Table 1. Values of the yields of esterification reactions to obtain gallates.

Table 2. Values of Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibitory Concentration of Cell Adhesion (MICA) of the Methyl Gallate, Propyl Gallate, Butyl Gallate and Sec-Butyl Gallate against *Streptococcus mutans* ATCC 700610.

Table 3. Effects of Butyl Gallate on viability of *Streptococcus mutans* ATCC 700610 in biofilms.

Table 4. Effects of the butyl gallate on the composition of *Streptococcus mutans* ATCC 700610 in biofilms.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 <i>Streptococcus mutans</i> E BIOFILME CARIOGÊNICO	6
2.2. CÁRIE	8
3 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	12
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivos específicos	12
4 METODOLOGIA	13
4.1 Síntese dos ésteres	13
4.2 Purificação dos galatos	15
4.3 Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)	16
4.4 Microrganismos e Cultivo.....	17
4.5 Atividade antimicrobiana e inibição da aderência celular	17
4.5.1 Concentração inibitória mínima (CIM).....	17
4.5.2 Concentração bactericida mínima (CBM).....	18
4.5.3 Concentração inibitória mínima da aderência (CIMA).....	18
4.6 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>S. mutans</i>	18
4.6.2 Confecção dos discos para realização do biofilme	19
4.6.2 Preparo do inóculo e incubação de <i>Streptococcus mutans</i>	19
4.6.3 Biomassa (peso seco)	21
4.6.3 Viabilidade bacteriana (Contagem de UFC).....	22
4.6.4 Quantificação de polissacarídeos (solúvel em água, insolúveis, e solúveis em álcali).....	22
4.6.5 Queda de pH (via glicolítica)	23
4.6.6 Permeabilidade das células dos biofilmes a prótons	23
4.8 Análises estatísticas	23
5. REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO	31
ABSTRACT	33
KEYWORDS	33
1. INTRODUCTION	34
2. Material and methods.....	4

2.1 SYNTHESIS OF ESTERS	42.2 PURIFICATION OF GALLATES	
.....		4
2.3 ANALYSIS OF BUTYL GALLATE AND PROPYL GALLATE BY GAS CHROMATOGRAPHY COUPLED TO MASS SPECTROMETRY (GC-MS)	4	
2.4 MICROORGANISMS AND CULTIVATION	5	
2.5. ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND CELL ADHESION INHIBITION 5	
2.5.1. MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC)	5	
2.5.2. MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION OF ADHESION (MICA)	6	
2.6. Biofilms assays	6	
2.6.1. Inhibition of Biofilm Formation	6	
2.6.2. pH DROP test	7	
2.6.3. PROTON PERMEABILITY test	7	
2.7. STATISTICAL ANALYSIS	8	
3. RESULTS	8	
4. DISCUSSION	9	
5. CONCLUSION	13	
6. REFERENCES	19	

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são uma fonte promissora para o uso como fitoterápicos ou a geração de novos fármacos antimicrobianos, analgésicos, antioxidantes ou anti-inflamatórios (CRUZ et al., 2016), de baixo custo, com maior efetividade e com menos efeitos adversos. Essas plantas medicinais ou seus compostos ativos são utilizados para o tratamento habitual de várias condições patológicas (MICKYMARAY, 2019; SUKALINGAM; GANESAN; XU, 2017). Um grande número de metabólitos secundários é biossintetizado pelas plantas, sendo considerada uma capacidade adaptativa contra fatores estressantes ambientais (ISAH, 2019). No entanto, apesar de as plantas medicinais serem cultivadas e utilizadas pela população ao longo de séculos, muitas vezes ocorre a indicação do uso dessas plantas devido a transmissão oral entre gerações, sem padrões e análises sistemáticas consistentes sobre a sua eficácia e segurança (CALIXTO et al., 2004).

Os compostos bioativos derivados de plantas também podem possuir características tóxicas ao organismo, mesmo em menores doses. Muitos pesquisadores têm desdobrados esforços para elucidar e identificar os princípios bioativos por trás das plantas, incentivando cada vez mais seu uso (LUCHESE, 2017; PEREIRA et al., 2006). A síntese de análogos a partir de princípios ativos isolados naturalmente tem contribuído para a obtenção de novos agentes terapêuticos. Ao isolar-se uma substância química biologicamente ativa pode-se promover modificações moleculares em sua estrutura com a finalidade de otimizar tal atividade, incorporando-se novos grupamentos, ou até mesmo, simplificando a molécula. Como consequência, estas ações podem modificar a potência, a duração e, também, a natureza do efeito farmacológico (YUNES, 2001; FILHO, 2001).

A introdução de substituintes, por exemplo, pode alterar diversas propriedades físico-químicas de uma molécula como hidrofobicidade, conformação estrutural e conseqüentemente as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas; além de elucidar a importância desses substituintes na sua atividade biológica (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001).

Dentre os compostos antioxidantes que tem se destacado, atualmente, encontra-se o ácido gálico (ácido 3, 4, 5-tri-hidroxibenzoico) e seus derivados, que estão entre os maiores antioxidantes fenólicos encontrados em vinhos e chá verde (BERTELLI; DAS, 2009; BUTT; SULTAN, 2009; PAIXÃO et al., 2008).

O ácido gálico é um metabólito encontrado amplamente no reino vegetal, ocorrendo em muitas plantas, como por exemplo, raízes de *Paeonia rockii* (PICERNO et al., 2011), frutos de *Syzygium cumini* (TOBAL et al. 2012), folhas, caules e raízes de variedades diferentes de *Labisa pumila* Benth (KARIMI et al., 2011), *Alchornea glandulosa* (CALVO et al., 2007), entre muitos outros. Esse ácido fitoquímico é bem conhecido pelas suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antimutagênicas, anticarcinogênicas, antivirais e analgésicas (BIROSOVÁ; MIKULÁSOVÁ; VAVERKOVÁ, 2005; GIFTSON; JAYANTHI; NALINI, 2009; KANG et al., 2008; KIM et al., 2006; LOPES et al., 2011). O efeito benéfico dos seus ésteres também tem sido extensamente estudado, e, na maioria das vezes, apresentam atividade superior à do ácido gálico.

O galato de butila (GB) é um composto orgânico que apresenta atividade antibiofilme significativa contra diversas bactérias patogênicas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estudos demonstraram que o galato de butila é capaz de inibir a formação de biofilmes em até 80%, além de reduzir a viabilidade de bactérias já estabelecidas em biofilmes (KIM et al., 2019). Além disso, o GB inibiu a formação de biofilme e fatores de virulência, incluindo elastase, piocianina e ramnolipídeo, em *Pseudomonas aeruginosa* sem afetar a viabilidade celular (BOMIN et al., 2019).

Nesse contexto, *Streptococcus mutans* é um importante agente etiológico da cárie dentária humana. Reside principalmente em biofilmes que se formam nas superfícies dos dentes, também conhecidos como placa dentária. Além da cárie, *S. mutans* é responsável por casos de endocardite infecciosa com um subconjunto de cepas sendo indiretamente implicadas com o início de patologias extraorais adicionais (LE MOS et al., 2019). Esta bactéria sintetiza altas quantidades de glucanos extracelulares e frutanos da sacarose através das glicosiltransferases (Gtfs) e frutossiltransferase (Ftfs) (QUIVEY, 2001), e se adere na superfície dentária formando uma estrutura tridimensional composta por polissacarídeos extracelular (PEC), denominada biofilme.

A formação de biofilmes é um fator importante que contribui para a resistência bacteriana e serve como a primeira linha de defesa para bactérias. Estatísticas mostram que

pelo menos 80% das doenças infecciosas bacterianas envolvem a formação de biofilmes, e a maioria dos pacientes submetidos a tratamento com antibióticos pode apresentar infecções recorrentes de longo prazo devido à formação de biofilmes (CHEW et al., 2018). O biofilme é um microambiente protegido, formado pela agregação de microrganismos e de diversas biomoléculas, especialmente polissacarídeos, proteínas e DNA. *S. mutans* produz moléculas aderentes pela ação das enzimas glucosiltransferases (GTFs) que fornecem um arcabouço inicial para a colonização de superfícies (LEMOS et al., 2019). A comunicação por meio de *Quorum sensing* entre os microrganismos do biofilme aumenta sua virulência e capacidade de proliferação (SAXENA et al., 2019).

Assim, devido à escassez de antimicrobianos com menos efeitos colaterais contra *S. mutans*, torna-se imprescindível a execução de mais pesquisas farmacológicas para o desenvolvimento de novos medicamentos que impeçam a formação de cárie dental. Neste cenário, o uso do Galato de Butila como fitoterápico ou para a obtenção de compostos bioativos que possam exercer atividade antimicrobiana ou modular os fatores de virulência de *S. mutans* é promissor. Portanto, o propósito deste estudo foi sintetizar, purificar e identificar os compostos bioativos a partir do ácido gálico, bem como avaliar a atividade antimicrobiana e os impactos no biofilme dental de *Streptococcus mutans* ATCC 700610.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Streptococcus mutans* E BIOFILME CARIOGÊNICO

Streptococcus mutans são microrganismos pertencentes ao filo *Firmicutes*, são cocos gram-positivos e anaeróbios facultativos, assim sendo um dos principais agentes etiológicos na formação do biofilme dental em seres humanos, devido seus fatores de virulência (HAMADA; SLADE, 1980; LEITES; PINTO; SOUSA, 2006; MARCH, 2003). *S. mutans* são capazes de adquirir novas propriedades, permitindo a expressão de determinantes de patogenicidade que determinam sua virulência em condições ambientais específicas (KRZYŚCIAK et al., 2014). Existem estudos sugerindo que isolados de *S. mutans* têm maior capacidade de formar biofilme do que os isolados de outras espécies de *Streptococcus*, que colonizam o ambiente da cavidade oral humana (JAYKUS et al., 2009).

Estudos realizados em células de *S. mutans* que formam biofilme, provaram que elas apresentam uma expressão diferente de algumas proteínas em comparação com culturas planctônicas, por exemplo, um aumento na expressão de exopolifosfatase e uma diminuição

da expressão de lactato desidrogenase ou piruvato quinase (SVENSÄTER et al., 2001). Dessa forma, foi amplamente aceito que o potencial cariogênico de *S. mutans* reside em três atributos principais: (i) a capacidade de sintetizar grandes quantidades de polímeros extracelulares de glucano a partir da sacarose que auxiliam na colonização permanente de superfícies duras e no desenvolvimento da matriz polimérica extracelular *in situ*, (ii) a capacidade de transportar e metabolizar uma ampla gama de carboidratos em ácidos orgânicos (acidogenicidade) e (iii) a capacidade de sobreviver sob condições de estresse ambiental, particularmente pH baixo (aciduricidade) (LEMOS, 2008).

Os biofilmes presentes na cavidade oral são estruturas tridimensionais, constituídas por cepas bacterianas ancoradas em superfícies sólidas, como o esmalte dentário, raízes dentárias ou implantes dentários e estão incorporados numa matriz de exopolissacarídeos (ZIJNGE et al., 2010). Os polissacarídeos extracelulares (PECs) tem como fontes primárias a glucosiltransferase (GTF) e a frutossiltransferase (Ftf), que são produtos da interação com sacarose e hidrolisados de amido. (BOWEN, 2011; XIAO, 2012; SCHWAB, 2007). Além de sintetizar PECs, GTFs também sintetizam polissacarídeos intracelulares (PIC) a partir da sacarose (LEME et al., 2006). Os PEC, promovem o acúmulo bacteriano na superfície do dente e são produzidos quando há um excesso de açúcares da dieta que contribui permitindo a difusão de ácido na interface dentária (LEME et al., 2006). Os PIC, servem como uma reserva energética de carboidratos que podem ser metabolizados para produzir ácidos durante períodos de limitação de nutrientes e caso a fase de desmineralização se prolongue (LEME et al., 2006; KAWADA-MATSUO; OOGAI; KOMATSUZAWA, 2016).

A capacidade de *S. mutans* de se aderir a superfície do dente pode ser através da produção de três tipos de glicosiltransferases, *GtfB*, *-C* e *-D*, que metabolizam a sacarose transformando-a em glucanos. A enzima GTFB é codificada pelo gene *gtfB*, rica em ligações α -1,3 glicosídicas e catalisa a síntese de glucanos insolúveis em água; GTFC codificado pelo gene *gtfC*, sintetiza glucanos solúveis e insolúveis em água, com ligações α -1,3 e 1,6 glicosídicas. Em contrapartida, *gtfD* sintetiza glucanos solúveis em água, com ligações α -1,6-glicosídicas, codificado pelo gene *gtfD*, sendo importantes na patogênese da cárie (BOWEN; KOO, 2011; LIU et al., 2017; MATSUMOTO-NAKANO, 2018). Em relação a composição do biofilme formado na superfície dos dentes, 10–20% do peso seco são glucanos, 1–2% do peso seco são frutanos e 40% do peso seco são proteínas. Além disso, são compostos de lipídios, cálcio, magnésio, flúor e fósforo, sendo seus níveis variados de acordo com a dieta (BOWEN; KOO, 2011).

Existem também relatos de casos de endocardite infecciosa (EI) com o envolvimento de *Streptococcus mutans* (JUNG et al., 2012). O desenvolvimento da EI é observado quando ocorre dano endocárdico seguido pela formação de um microcoágulo, no qual as plaquetas desempenham um papel crucial. Se, ao mesmo tempo, microrganismos entrarem na corrente sanguínea, eles podem usar essas condições favoráveis de crescimento para deposição e formação de biofilme (TAKAHASHI et al., 2013).

2.2. CÁRIE

A cárie dentária, uma doença oral relacionada ao biofilme, é causada pelo desequilíbrio entre bactérias comensais e bactérias cariogênicas (ABRANCHES et al., 2018). Esta doença oral infecciosa se caracteriza pela erosão das camadas dentárias, causada pela ação dos ácidos produzidos pela fermentação microbiana a partir dos carboidratos disponíveis através da alimentação. (GOMES, 2018). Em indivíduos saudáveis, há um equilíbrio entre o número de bactérias cariogênicas e espécies comensais não cariogênicas, no entanto, a exposição frequente a carboidratos advindos da dieta cria um ambiente disbiótico, no qual a geração de ácidos orgânicos, como ácido lático, como subprodutos da fermentação, permite que *S. mutans* e outras espécies acidúricas superem bactérias comensais menos tolerantes a ácidos presentes cariogênicas (ABRANCHES et al., 2018). Dessa forma, a acidificação repetitiva do pH oral abaixo de 5,5 leva à desmineralização do esmalte e consequente aparecimento de cavidades na superfície do dente (RANDSEN; PEDRAZZOLI, 1991).

Dados sobre a Carga Global de Doenças revelou que a cárie não tratada em dentes permanentes é a doença humana mais prevalente em todo o mundo, com a cárie não tratada em dentes primários sendo a décima doença mais prevalente (BENJAMIN, 2010) e, além disso, sendo a doença crônica mais comum em crianças (cinco vezes mais comum que a asma) e é um dos principais contribuintes para a perda de dentes em adultos (KASSEBAUM et al., 2015). Foi demonstrado que a ingestão de açúcares aumenta com a idade, a partir de 1 ano, sendo mais elevado entre as crianças e adolescentes em idade escolar (BREDA; JEWELL; KELLER, 2019; NEWENS; WALTON, 2016). Os carboidratos são um dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da cárie, pois ajudam na sobrevivência e o desenvolvimento de bactérias cariogênicas, como por exemplo, *Streptococcus mutans* (BARBIERI et al., 2007; MATSUMOTO-NAKANO, 2018).

O metabolismo de carboidratos pelas bactérias produz ácidos e provoca a desmineralização dos dentes e leva a formação de cavidades nas estruturas dentárias, gerando uma seleção e agregação de bactérias patogênicas acidúricas que contribuem com a progressão da doença (FIORETTI; HAÏKEL, 2010; LIMA, 2007; SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). Fisiologicamente, componentes da saliva como íons cálcio, fosfato e proteínas compõem o sistema tamponante que impede grandes flutuações no pH, sendo que estes precipitam e remineralizam os dentes (SIMMER et al., 2020). A remineralização é um processo natural do dente com mecanismo de reparo, por causa da difusão de minerais presentes na saliva na superfície dentária desmineralizada (PEDERSEN; BELSTRØM, 2019; NEEL et al., 2016; STRUŻYCKA, 2014). O esmalte dentário é constituído de aproximadamente 95% de hidroxiapatita, formado por fosfato de cálcio cristalino ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), um mineral pouco solúvel em água, porém que se dissolve em ácidos. Sendo assim, devido a formação de ácidos orgânicos como produto da fermentação dos açúcares advindo da dieta por bactérias cariogênicas, o pH diminui no biofilme, levando a desmineralização desse mineral. (GUTIÉRREZ-SALAZAR; REYES-GASGA, 2003).

O controle da formação da cárie é feito com o uso de agentes químicos e mecânicos, e a prática mais disseminada é a de escovação aliada ao uso de fio dental, e antissépticos bucais podem auxiliar na eliminação de restos alimentares e microrganismos cariogênicos, com o objetivo de diminuir a formação de biofilmes (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). O antibiótico de referência utilizado nas condições de saúde que afetam a cavidade oral é o gluconato de clorexidina a 0,12%, apesar de conhecido como o padrão-ouro, este medicamento apresenta uma série de efeitos adversos aos tecidos presentes na boca, como o escurecimento dos dentes e língua, perda do paladar, dor, e gosto desagradável. (PEGORARO et al., 2014).

2.3 PLANTAS MEDICINAIS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O Brasil possui uma grande biodiversidade, além de uma riqueza em conhecimento e tradição sobre o uso de plantas medicinais. A Organização Mundial de Saúde (OMS) propõe o reconhecimento e incorporação das Medicinas Tradicionais e Complementares nos sistemas nacionais de saúde, além de incentivar a implantação e regulamentação das práticas, produtos e de seus praticantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Várias espécies silvestres e cultivadas tem um impacto considerável no cotidiano e bem-estar da população através da incorporação nos cuidados de saúde (TEIXIDOR-TONEU; JORDAN; HAWKINS, 2018). A

população tem acesso direto à natureza e aos seus produtos naturais, o que facilita e enriquece o conhecimento sobre as mesmas. A OMS define medicina tradicional (MT) como uma junção de conhecimentos, habilidades e práticas providas de povos antigos utilizados na manutenção da saúde e do bem-estar; e que, medicamentos à base de plantas fazem parte desse conhecimento, podendo incluir ervas, preparações ou produtos acabados com ativos vegetais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

No último século, a sociedade, por sua vez, avançou no conhecimento sobre química e biologia, o que permitiu o isolamento de novas moléculas de plantas, animais e microrganismos, bem como o desenvolvimento de moléculas sintéticas, dando origem à atual geração de medicamentos convencionais. No entanto, apesar dos progressos significativos observados no campo farmacêutico, problemas relacionados a muitos dos medicamentos convencionais, como altos custos e efeitos colaterais, são complicações presentes do uso excessivo de medicamentos (CARDOSO et al, 2019). Essas moléculas são encontradas em todas as variedades do reino vegetal, muito visadas e estudadas em plantas comestíveis e medicinais (WINK, 2010). Os efeitos terapêuticos vão desde antibacteriano, anticâncer, antidepressivo, antienvelhecimento, antifúngico, anti-helmíntico, anti-inflamatório, antiofídico, antioxidante, antitumoral, antiviral, citoprotetor, diurético, neuro estimulante e tratamento da dor (CRUZ, 2013).

O uso de plantas medicinais está se tornando cada vez mais importante, especialmente na última década. Parte disso se deve a um retorno aos princípios de lidar com algumas doenças, enquanto, em outra direção, a capacidade atual da ciência de provar tanto a eficácia quanto a segurança das plantas usadas como medicamentos também desempenha um papel (HOAREAU; SILVA, 1999; PETROVSKÁ, 2012). Entre suas vantagens sobre os medicamentos convencionais, as plantas medicinais tornam moléculas orgânicas biossintetizadas altamente complexas disponíveis naturalmente, reduzindo os custos de uso como medicamentos, com menos efeitos colaterais.

No Nordeste Brasileiro, a região da Caatinga representa uma rica diversidade de plantas medicinais, utilizada como uma alternativa terapêutica para o tratamento de diversas doenças (CERQUEIRA et al., 2020). Desta forma, as plantas medicinais têm contribuído fortemente para a geração de novas estratégias terapêuticas, visando o bem estar da população (SARQUIS et al., 2019). Além disso, o tratamento com fitoterápicos demonstra ser muitas vezes uma das formas mais seguras e com menos efeitos colaterais comparado com o tratamento convencional

(YOO; NAM; LEE, 2018).

Na odontologia, a procura por novos agentes terapêuticos tem sido estudada, utilizando plantas medicinais como profilaxia ou tratamento para doenças bucais, como a cárie (JEON et al.,2011). Os métodos convencionais de prevenção da cárie podem se tornar ineficazes frente a medidas preventivas comuns, como a escovação, à medida que o biofilme dental se torna mais resistente. Sendo assim, devido à alta prevalência da doença em todo o mundo, sobretudo nas populações com baixas condições socioeconômicas, são necessários mais estudos que visam encontrar fontes para inibir os fatores de virulência do *Streptococcus mutans*.

2.4 ÁCIDO GÁLICO E GALATO DE BUTILA

A busca por compostos isolados puros que são responsáveis pelos efeitos biológicos dos extratos para serem utilizados como um recurso farmacológico, leva a investigação científica e a necessidade de uma integração das áreas como biologia, farmacologia, metabolômica, metagenômica dentre outras, pois permite estudos mais efetivos e abrangentes, para esclarecer os aspectos químicos e biológicos (JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; BERLINCK et al.,2017).

O ácido gálico (AG) ou ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzoico, é um metabólito secundário natural e amplamente isolado de várias frutas, plantas e nozes, que tem recebido cada vez mais atenção nos últimos anos por suas poderosas propriedades anti-inflamatórias (BAI et al, 2021). Entre muitos polifenóis, o AG é um composto tri-fenólico de baixo peso molecular com excelentes atividades anti-inflamatórias e antioxidantes (NOURI; HEIBATI; HEIDARIAN, 2020). Além disso, o AG possui diversos efeitos farmacológicos evidentes, incluindo antitumoral, antibacteriano, antidiabetes, antiobesidade, antimicrobiano e anti-isquemia miocárdica (CHANG et al., 2012). Diversos estudos relataram que o ácido gálico possui também atividade de indução de apoptose em linhagens de células tumorais e fibroblastos renais (CHEN et al., 2012) e tem efeitos pró-apoptóticos e anti-inflamatórios em sinoviócitos semelhantes a fibroblastos de pacientes com artrite reumatoide (YOON et al., 2013).

Galato é um termo geral usado para descrever sais e ésteres de ácido gálico com o grupo galoíla. Alguns compostos de galato, tipicamente galatos de catequina e proantocianidina,

foram desenvolvidos para aplicações farmacológicas (TSUKIYAMA et al., 2006). Os galatos de alquila por sua vez, são usados como agentes antibacterianos e antivirais e afetam a viabilidade das células microbianas, a atividade do vírus, e a proliferação de células de leucemia humana (TAKAI, HIRANO, SHIRAKI, 2011). Dessa forma, a atividade farmacológica dos galatos de alquila aumenta concomitantemente com o comprimento de sua cadeia alquílica (LEAL et al., 2006). Pesquisas relataram que os galatos de alquila afetam diferencialmente a virulência, a formação de biofilme e o quorum sensing (QS) em *Pseudomonas aeruginosa* (KIM et al., 2019), onde o galato de butila (GB) inibiu a formação de biofilme e fatores de virulência, incluindo elastase, piocianina e ramnolipídeo, em *P. aeruginosa* sem afetar a viabilidade celular (KIM et al., 2019).

3 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo geral

Sintetizar, identificar e purificar os compostos obtidos através da esterificação do ácido gálico e avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme contra *Streptococcus mutans* ATCC 700610.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana bacteriostática e bactericida dos ésteres obtidos do ácido gálico sobre *Streptococcus mutans* ATCC 700610 na forma planctônica;
- Avaliar a atividade antiaderente dos ésteres obtidos através do ácido gálico sobre *Streptococcus mutans* ATCC 700610 na forma planctônica;
- Avaliar a ação do éster com maior atividade antimicrobiana sobre a inibição de formação de biofilme de *Streptococcus mutans* ATCC 700610 quanto a viabilidade bacteriana e formação de biomassa;
- Avaliar a ação do éster com maior atividade antimicrobiana sobre a via glicolítica na inibição da formação de biofilme de *Streptococcus mutans* ATCC 700610;
- Avaliar a ação do éster com maior atividade antimicrobiana sobre a permeabilidade da membrana a prótons na inibição da formação de biofilme de *Streptococcus mutans* ATCC 700610;

- Avaliar a ação do éster com maior atividade antimicrobiana sobre a produção de polissacarídeos na inibição da formação de biofilme de *Streptococcus mutans* ATCC 700610;
- Separar e identificar o(s) composto(s) bioativos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas do éster que apresentar o melhor desempenho nos testes biológicos.

4 METODOLOGIA

4.1 Síntese dos ésteres

A metodologia foi descrita por CRUZ et al., 2013. A reação de esterificação foi feita usando 7,2g de ácido gálico solubilizado em 60 mL dos solventes orgânicos: Metanol, Propanol, Butanol e Butanol Secundário e 0,6 mL de ácido sulfúrico 96% por 8 horas sob refluxo (Figura 1). O balão foi neutralizado com 40 mL de bicarbonato de sódio a 10% (40 mL de água + 0,4g de bicarbonato). A extração foi realizada utilizando 60 mL (3x de 20 mL) de acetato de etila, e posteriormente, eliminada por evaporador rotativo. A substância sintetizada foi analisada por cromatografia em camada delgada (CCD) para confirmar a presença das substâncias apresentadas na Figura 2. Em seguida, os galatos obtidos foram lavados com 15 mL de H₂O destilada gelada num sistema de bomba a vácuo, e posteriormente foram deixados à temperatura ambiente para secagem.



Figura 1 – À esquerda, processo de esterificação sob refluxo. À direita, extração da fase orgânica em balão de separação. Fonte: Grupo de pesquisa

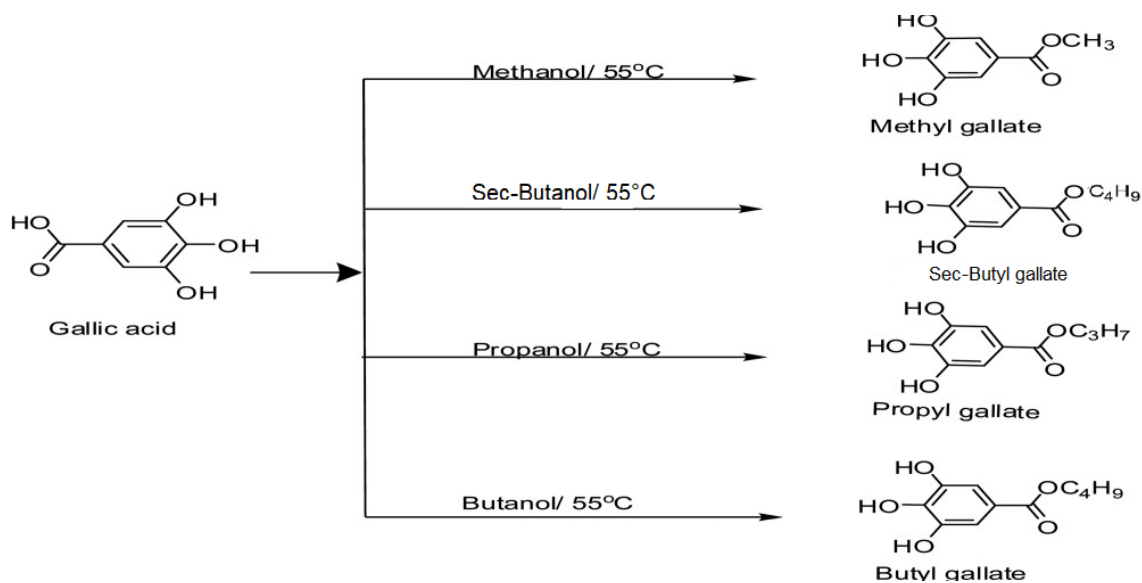


Figura 2 – Esquema de síntese do Galato de Metila, Galato de Sec-Butila, Galato de *n*-propila e Galato *de* butan-1-ol.

4.2 Purificação dos galatos

A purificação dos galatos foi feita através da cromatografia líquida, onde a coluna de vidro de 5,5cm de diâmetro foi preenchida até a altura de 24 cm com sílica gel 60 com diâmetro de partícula entre 0,063-0,200 nm (70-230 mesh, Merck) como fase estacionária (figura 3). A fase móvel foi constituída de uma mistura de EtOAc/Hexano(C₆H₁₄) 6:4, e em cada coluna foi utilizado cerca de 2g da amostra solubilizada na fase móvel e incorporada em sílica. As subfrações formadas foram analisadas através de cromatografia em camada delgada (CCD) comparativa utilizando placas pré-preparadas de sílica gel 60, 20 cm x 20 cm F254 da Merck (sílica gel de 0,25 mm com indicador de fluorescência UV254), sendo EtOAc/Hexano(C₆H₁₄) 6:4 a fase móvel utilizada. As placas foram reveladas com luz UV λ 254 e 365 nm no gabinete de análises de fluorescência (Spectroline - Modelo CM-10), e posteriormente revelada com vapores de iodo (figura 4).

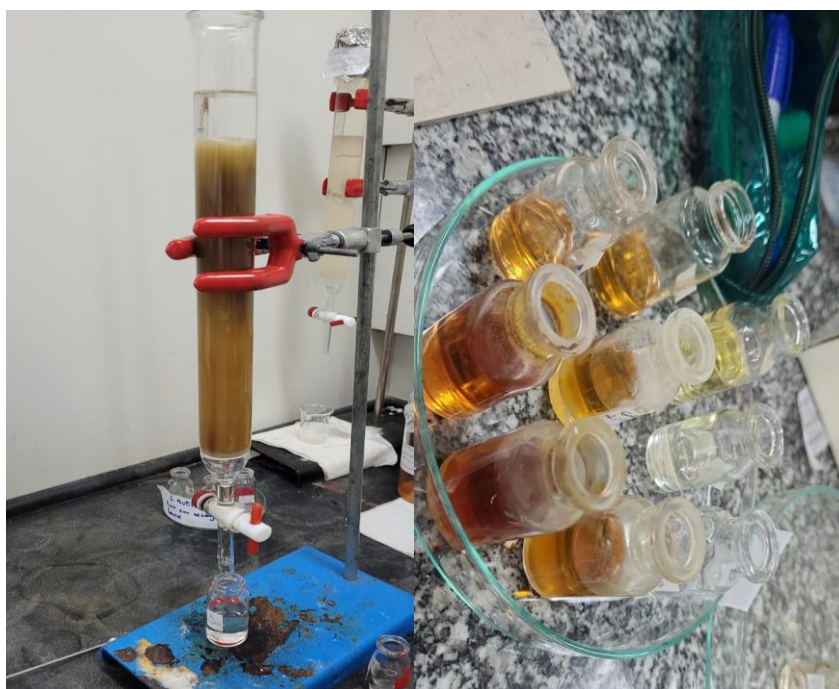


Figura 3 – À esquerda cromatografia em coluna líquida. À direita amostras obtidas em processo de secagem. Fonte: Grupo de pesquisa

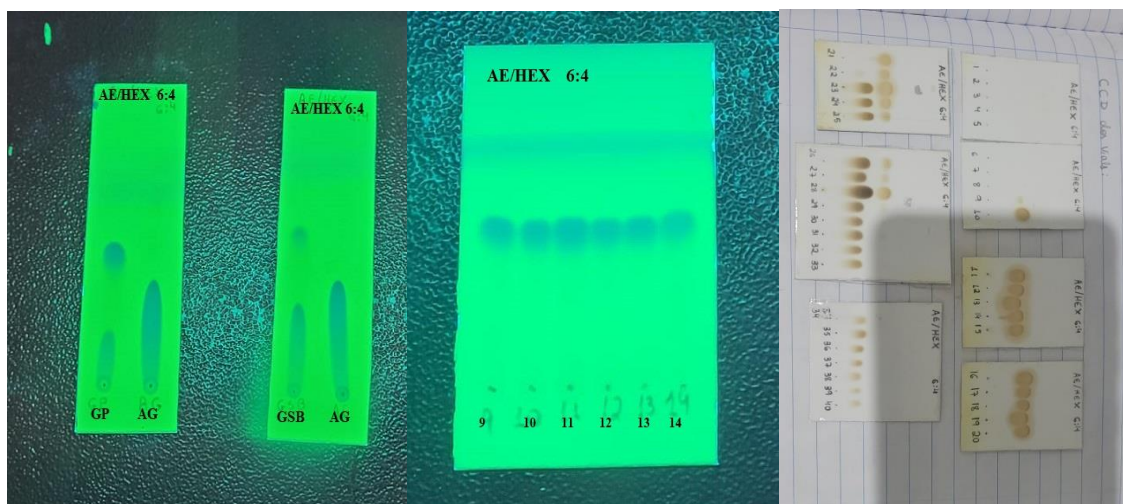


Figura 4 – À esquerda, Cromatografia de camada delgada (CCD) do galato de propila (GP) e galato de sec-butila (GSB) comparado com o Ácido Gálico (AG). Ao centro, CCD das amostras purificadas em coluna líquida, com visualização sob luz UV 265nm, à direita: placas reveladas com vapores de iodo. Fonte: Grupo de pesquisa

4.3 Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

Os ésteres GB e GP tiveram os seus perfis cromatográficos avaliados por CG-EM (Anexo A). As análises por CG-EM foram realizadas em aparelho QP2010SE (GC2010 Plus) usando coluna capilar de sílica fundida Rtx - 5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25 μm) e hélio como gás de arraste. Antes de serem analisados por cromatografia gasosa, a amostra foi submetida a derivatização por sililação. Para esta reação foram pesados 3 mg da amostra, onde foram diluídos em 60 μL de piridina. A esta solução foi adicionada 100 μL da mistura reacional de N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1% de trimetilclorosilano (TMCS) (Sigma-Aldrich®). Essa mistura foi aquecida a 70 °C por 30 minutos e 1 μL da mistura foi injetado no CG-EM (CRUZ et al., 2016).

Foi utilizado CG-EM (QP2010SE -GC2010 Plus) da marca Shimadzu® usando coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de interface do 33 sistema CG-EM foram 290 °C. A temperatura inicial da análise foi de 80 °C por 5 min, aumentando a 285 °C na razão de 4 °C/min. A temperatura final permaneceu em 285 °C por 40 minutos (CRUZ, et al. 2016). O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas entre o intervalo de 30 a 600 Da. A identificação dos

compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas das amostras, com aqueles existentes no banco de dados do aparelho (NIST 08, FFNSC1.3 e WILEY8).

4.4 Microrganismos e Cultivo

A cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 700610 foi utilizada neste estudo, descongelada (-80°C), incubado durante 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂ em caldo BHI com 1% glicose. Repiques foram preparados em meio Litmus milk para a preservação dos microrganismos testes, sendo preservadas alíquotas de 1,5 mL em criotubos (capacidade de 2,0 mL) e armazenadas em ultrafreezer a - 80°C para posterior reativação e realização dos experimentos.

4.5 Atividade antimicrobiana e inibição da aderência celular

4.5.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços. O inóculo de *S. mutans* ATCC 700610 foi realizado com uma concentração bacteriana final em torno de $1-2 \times 10^8$ CFU/mL (escala de 0,5 McFarland). Em seguida, o inóculo foi diluído em meio caldo de infusão de coração- cérebro (BHI) (Kasvi[®]) na proporção de 1:1000. Nas microplacas, foram adicionados em cada poço 190 µL do meio com inóculo (concentração final $1-2 \times 10^5$ CFU/mL) e 10 µL do GB, GP, GSB e GM com as concentrações finais variando de 1000 a 31,25 µg/mL com diluição seriada em razão de 2. Os extratos foram preparados a partir da diluição de 0,08g do extrato em 4 mL de etanol P.A. As placas foram incubadas durante 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂ (RODRIGUES et al., 2020). Após a incubação, foi realizada a leitura visualmente para avaliação do crescimento, por meio da observação de turvação do meio e/ou presença de colônias no fundo dos poços. Nos poços em que não houve crescimento visual foi adicionado 20 µL do corante resazurina (Sigma[®]). A resazurina a 0,01%, um indicador de óxido-redução, apresenta a cor azul e é oxidada na presença de células viáveis a resofurina, substância de coloração róseo-avermelhada. Após 20 minutos de incubação com resazurina a presença de cor azul indicou ausência de crescimento, a cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002). Foi determinada a CIM a menor concentração que não houve crescimento bacteriano visível e confirmado com a resazurina.

4.5.2 Concentração bactericida mínima (CBM)

Para a determinação do CBM, foram selecionados os poços que não apresentarem crescimento bacteriano visível no ensaio de CIM para *S. mutans* ATCC 700610. Uma alíquota de 8 µL foi inoculada em placas com BHI ágar. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas, sendo feita leitura visual das mesmas. A CBM foi considerada como sendo a menor concentração testadas que causou 99,9% de morte celular, ou seja, ausência de crescimento bacteriano visível na superfície do ágar (YATSUDA et al., 2005).

4.5.3 Concentração inibitória mínima da aderência (CIMA)

O inóculo de *S. mutans* ATCC 700610 foi padronizado em uma concentração final em torno de $1-2 \times 10^8$ CFU/mL (escala de 0,5 McFarland). Em seguida, o inóculo foi diluído na proporção de 1:1000 em caldo BHI suplementado com sacarose (concentração final de 1%). Em cada poço de uma microplaca foram adicionados 190 µL da suspensão bacteriana ($1-2 \times 10^5$ UFC/mL) e em seguida foram adicionados 10 mL do GB, GSB, GP e GM, cuja concentração foi sub-CIM, em diluição seriada de razão de 2, e as placas foram incubadas em estufa de CO₂, 37 °C por 24 horas. Após a incubação, foi feita a lavagem das placas, com água destilada, para remoção das células não aderidas e coradas com cristal de violeta 0,1%. A leitura foi feita visualmente, considerando a concentração inibitória da aderência celular desses microrganismos, a menor concentração dos extratos em que não houve aderência revelada pelo corante (KOO et al., 2002; YATSUDA et al., 2005).

4.6 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *S. mutans*

4.6.1 Obtenção dos dentes bovinos

Sessenta dentes bovinos (incisivos centrais superiores) foram removidos da cavidade bucal após o abate dos animais para comercialização da carne. Estes seriam descartados com o restante da carcaça dos animais e, por isso, foram doados pelo Frigorífico Vale do Sol LTDA, localizado na cidade de Jequié – BA para a realização desta pesquisa. O projeto foi submetido para avaliação da Comissão de Ética em Uso de Animais

(CEUA) do IMS/UFBA, sendo aprovado (protocolo N° 127/2023) antes do início das atividades laboratoriais de biofilme (ANEXO B).

4.6.2 Confeção dos discos para realização do biofilme

O projeto foi submetido para avaliação da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do IMS/UFBA após aprovação do projeto e antes do início das atividades laboratoriais de biofilme. Inicialmente foi determinado o composto isolado mais ativo nos testes *in vitro* de CIM e CBM. Desta forma, após a aprovação foram utilizados pequenos blocos de esmalte dentário bovino, removidos da superfície vestibular de incisivos inferiores permanentes e hígidos, extraídos de animais recém-abatidos em frigoríficos. O tamanho dos blocos de esmalte (7x7 mm) foi demarcado e cortado com o auxílio de discos de aço diamantados dupla-face montados em mandril para ponta reta odontológica, sendo os blocos de esmalte posteriormente fixados com fio ortodôntico (LIMA, 2012). O fio ortodôntico com os fragmentos foi então fixado nas tampas dos tubos falcons de 15 mL, colocados nos respectivos tubos e esterilizados em autoclave (Figura 5).

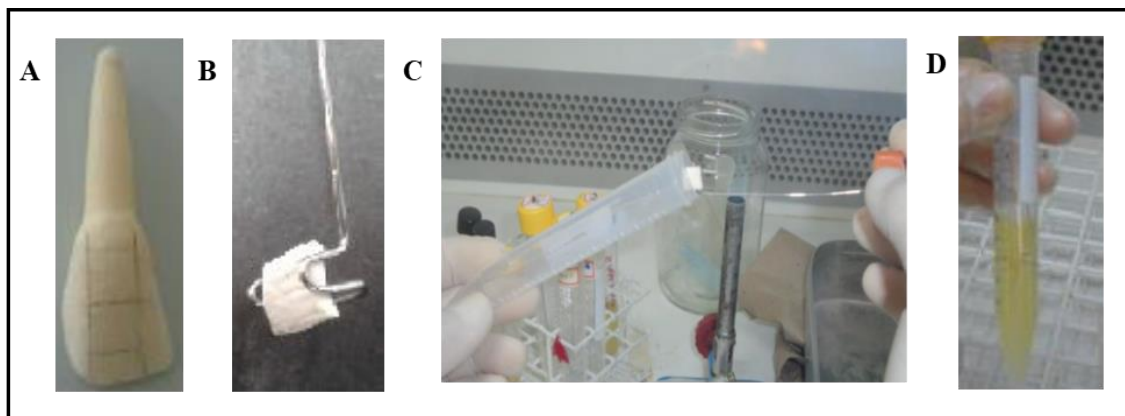


Figura 5 – Sequência da confecção dos corpos de prova: A- incisivo inferior permanente bovino hígido com a demarcação do tamanho dos blocos de esmalte; B- fragmento dentário no aparato confeccionado com fio ortodôntico; C- superfície sólida para formação do biofilme no tubo Falcon; D - tubo com bloco de dente inserido no caldo BHI com sacarose a 1% e inóculo bacteriano. Fonte: Grupo de pesquisa

4.6.2 Preparo do inóculo e incubação de *Streptococcus mutans*

S. mutans ATCC 700610 foram reativados em caldo BHI suplementado com glicose a 1%. Estes foram incubados em estufa a 37° C e 5% de CO₂, por 24 horas. Para formação do biofilme, nos tubos esterilizados contendo o fragmento de dente bovino foi adicionado o inóculo de *S. mutans* na proporção de 1:1000 em caldo BHI suplementado com sacarose (concentração final 1%). Os tubos foram colocados em posição vertical e incubados a 37°C e 5% de CO₂ como descrito por KOO et al. (2006), DUARTE et al. (2003) RODRIGUES et al. (2020). Após incubação, os biofilmes foram tratados duas vezes por dia com a concentração de 50 mg/mL do Galato de butila, às 10h00min e 16h00min, do terceiro dia até o quinto dia do período experimental (biofilme de 120 horas). O Galato de butila foi escolhido devido a boa atividade antimicrobiana, e o seu maior rendimento em relação aos extratos testados, pois para realização do teste foi usado 100 vezes o resultado do CBM (2 g/mL), veículo controle (salina 0,9% - controle negativo, 8 mL) e clorexidina 0,12% (controle positivo – 8 mL).

O biofilme foi exposto aos tratamentos durante 1 minuto, enxaguados por duas vezes em solução salina estéril e transferidos para novo meio de cultura fresco (Figura 6), bem como aos respectivos tratamentos num total de seis vezes e os testes foram realizados em triplicata no número total de três experimentos (n = 9).

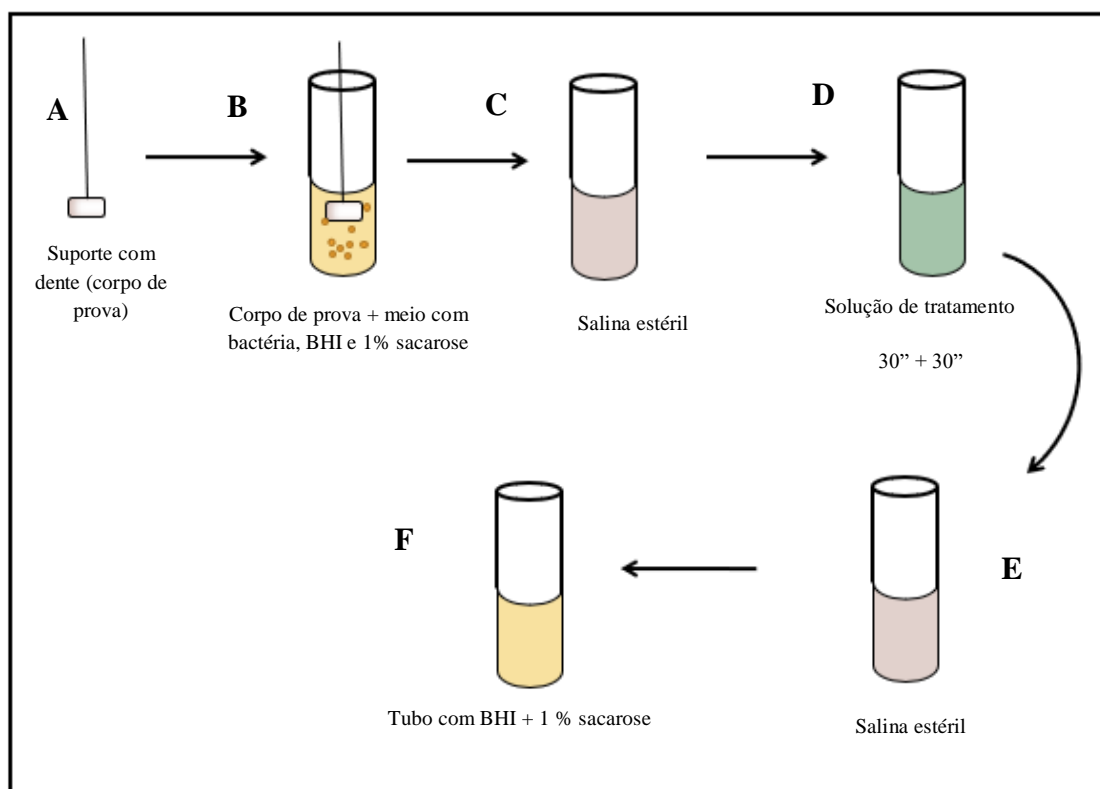


FIGURA 6: Representação das fases do ensaio de formação, *in vitro*, do biofilme por *S. mutans*: A- Corpo de prova; B - Corpo de prova já com biofilme; C- Lavagem em salina a 0,9%; D- Inserção da superfície sólida nas soluções de tratamento por duas vezes (por tempo de 30 segundos); E- lavagem em salina (30 segundos); F- Inserção no tubo de origem (contendo caldo BHI e sacarose). Os tratamentos foram realizados duas vezes ao dia.

Os biofilmes tratados foram analisados quanto à biomassa (peso seco), viabilidade bacteriana (Contagem de UFC), quantidade de polissacarídeos (solúvel e insolúvel em água, solúveis em álcali), queda de pH (via glicolítica) e permeabilidade das células dos biofilmes a prótons (Figura 7).

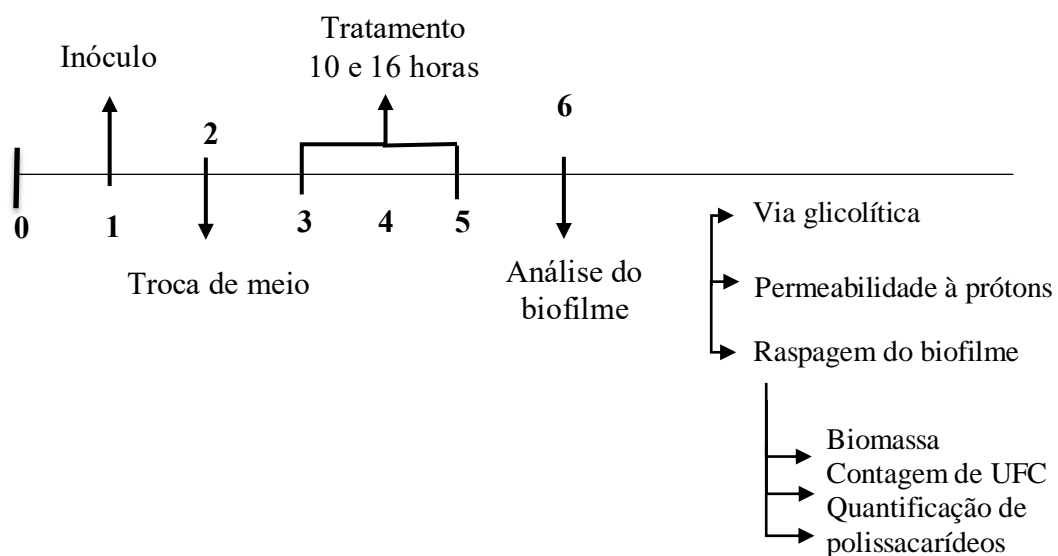


FIGURA 7: Fluxograma de trabalho para ensaio de biofilme.

4.6.3 Biomassa (peso seco)

O biofilme formado nos dentes bovinos e nos fios ortodônticos foi raspado utilizando espátula estéril. Em seguida, material obtido foi colocado em tubos contendo 4 mL de salina a 0,9%,

levado para o sonicador e por fim para a centrífuga a 14000 RPM por 10 minutos. A secagem do biofilme foi feita no dessecador para posterior determinação do peso seco (Figura 7).

4.6.3 Viabilidade bacteriana (Contagem de UFC)

Após a raspagem e dissolução em sonicador, os biofilmes formados foram diluídos seriadamente em salina estéril de 10^{-1} até 10^{-7} , e posteriormente plaqueados 20 μ L do biofilme diluído em placas contendo BHI ágar. As placas foram incubadas durante 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação, foi realizada a leitura visualmente para avaliação do crescimento, por meio da observação e contagem das colônias (Figura 7).

4.6.4 Quantificação de polissacarídeos (solúvel em água, insolúveis, e solúveis em álcali)

Os fragmentos dentários foram raspados em tubo de vidro contendo 2 mL de solução salina 0,9% estéril e sonicados, transferidos para tubo falcon de 15mL, e os tubos de vidro lavados com 3 mL de salina e unidos ao primeiro volume. Dessa forma, 800 μ L foram retirados para microtubos de 2 mL de peso conhecido, completou-se o volume com EtOH, centrifugados a 14000 RPM por 10 min a 4° C, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado novamente com 2 mL de EtOH P.A, e seco em dessecador e o peso seco determinado. Do volume que restou, foi realizado a separação dos polissacarídeos solúveis, insolúveis em água e solúveis em álcali. Para separação dos solúveis e insolúveis em água foi realizada centrifugação a 3800 RPM por 10 min 4°C. O sobrenadante (solúvel) foi transferido para tubo falcon de 50 mL e o precipitado formado (insolúvel) foi lavado 2 vezes com 4 mL de água destilada, sempre transferindo o sobrenadante para o tubo da fração solúvel. Ao fim foi adicionado 5 mL de água destilada para ressuspender o precipitado, fração insolúvel. Ao sobrenadante, foi adicionado 36 mL de EtOH P.A gelado para precipitação dos polissacarídeos solúveis, centrifugados a 9000 RPM por 10 min 4°C e o sobrenadante descartado. O solúvel em álcali foi obtido a partir de 500 μ L da fração insolúvel em microtubo de 1,5mL de peso conhecido, centrifugados a 14000 RPM por 10 min a 4° C, e o precipitado foi colocado em dessecador para secagem. Após secagem, o microtubo foi pesado e adicionou-se 300 μ L de NaOH 1M para cada mg de material seco para extração dos polissacarídeos solúveis em álcali. Os tubos foram incubados por 2h a 37°C com agitações esporádicas em vórtex, centrifugados a 14000 RPM por 10 min 4°C, e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Esse procedimento foi realizado 2 vezes e os sobrenadantes

unidos. A quantidade de polissacarídeos (solúvel em água, insolúveis, e solúveis em álcali) foi determinada por ensaios colorimétricos pelo método fenol-sulfúrico conforme detalhado por Koo e colaboradores (2003) (Figura 7).

4.6.5 Queda de pH (via glicolítica)

Os biofilmes de *Streptococcus mutans* ATCC 700610 que foram formados e tratados com o galato de butila receberam o último tratamento no quinto dia de crescimento. Após esse tratamento, os biofilmes foram lavados em solução de sais balanceada, por três vezes, posteriormente colocados em bécker com 10,8 mL de solução de sais (pH 7,0), incubados por 1 hora (37 °C, 5% de CO₂). Após a incubação, o pH corrigido para 7,2 com KOH (0,5 Molar). Quando o pH estabilizou (pH=7,2), foram adicionados 1,2 mL de glicose a 10% seguido de medição do pH nos tempos de 15, 30, 45 minutos, 1 e 2 horas (BELLI et al., 1995) (Figura 7).

4.6.6 Permeabilidade das células dos biofilmes a prótons

Os biofilmes de *S. mutans* ATCC 700610 foram formados e tratados como descrito. No sexto dia, os biofilmes foram lavados em solução de tampão fosfato potássico com 1 mM MgCl₂ + 50mM KCl (pH 7,2) e incubados em solução de sais balanceada por 1 hora. O pH foi corrigido para 4,2 com solução de 100 mM HCl + 50 mM KCl ou 100 mM HCl + 50 mM KCl. O pH foi estabilizado em 4,2 e medido em intervalos de 10 minutos. No intervalo de 80 minutos, foram adicionados 1,2 mL de 1-Butanol para desestabilizar a membrana celular sendo o pH mensurado novamente nos intervalos de 82 a 120 minutos (PHAN et al., 2004) (Figura 7).

4.8 Análises estatísticas

As comparações estatísticas entre os grupos foram feitas com análise de variância (ANOVA) seguida pelos pós teste de Dunnett. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados em triplicata em três momentos diferentes (n = 9).

5. REFERÊNCIAS

- Abranches, J. et al. Biology of Oral Streptococci. **Microbiol Spectrum**, v. 6, n. 5, p. 1–18, 2018.
- A. Nouri, F. Heibati, E. Heidarian. Gallic acid exerts anti-inflammatory, anti-oxidative and nephroprotective effects against paraquat-induced renal injury in male rats. Arch Naunyn Schmiedeberg. **Pharmacol.** (2020) , 10.1007/s00210-020-01931-0.
- Bai J, Zhang Y, Tang C, Hou Y, Ai X, Chen X, Zhang Y, Wang X, Meng X. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. **Biomed Pharmacother.** 2021 Jan; 133:110985. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110985. Epub 2020 Nov 16. PMID: 33212373.
- Barbieri, D. D. S. A. V. et al. Analysis of the in vitro adherence of Streptococcus mutans and Candida albicans. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 624–631, 2007.
- Belli, W. A.; Buckley, D. H.; Marquis, R. E. Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by Streptococcus mutans GS-5. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 785–791, 1 set. 1995.
- Benjamin RM. Oral health: The silent epidemic. **Public Health Rep** 2010; 125: 158–159.
- Bowen WH, Koo H. Biology of glucosyltransferases derived from Streptococcus mutans: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res.** 2011;45(1):69–86. doi: 10.1159/000324598.
- Breda, J.; Jewell, J.; Keller, A. The Importance of the World Health Organization Sugar Guidelines for Dental Health and Obesity Prevention. **Caries Research**, v. 53, n. 2, p. 149–152, 2019.
- Cardoso, Jc; Oliveira, Mebs; Cardoso, Fci. 2019. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira** 37: 124-132. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620190201>.
- Cerqueira, T. M. G. et al. The Use of Medicinal Plants in Maceió, Northeastern Brazil: An Ethnobotanical Survey. **Medicines**, v. 7, n. 2: 7, p. 1- 12, 2020.

Chen Cy, Chen Kc, Yang Ty, Liu Hc, Hsu S. Gallic acid induces c-Jun NH₂-terminal kinase-dependent apoptosis triggered by reactive oxygen species in lung fibroblasts. **Evidence-Based Complementary Alt Med.** 2013; DOI: 10.1155/613950.

Costa, C.E.S. Da, 2017. Adstringens On *Streptococcus mutans* Londrina, 2017. Londrina. **Unopar strict. sensu postgraduate program in dentistry.**

Cruz, M. P. Isolation and Identification of Bioactive Compounds from *Mimosa hostilis* BENTH. p. 205, 2013. **Doctoral Thesis.** Federal University of Bahia, Salvador, Brazil.

Fejerskov O, Kidd Rcdadestc, 1. Ed. São Paulo: Santos, 2005. Cárie Dentária - a Doença e Seu Tratamento Clínico. 2^a Ed ed: **SAT - SANTOS (GRUPO GEN)**; 2011.

Fioretti, F.; Haïkel, Y. Carie et sucres. **Medecine des Maladies Metaboliques**, v. 4, n. 5, p. 543–549, 2010.

Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu CY. Salivary biomarkers for dental caries. **Periodontol** 2000. 2016 Feb;70(1):128-41. doi: 10.1111/prd.12100. PMID: 26662487.

Gutiérrez-Salazar, P.; Reyes-Gasga, J. Microhardness and Chemical Composition of Human Tooth. **Materials research**, v. 6, n. 3, p. 367–373, 2003.

Hamada, S.; Slade, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiological reviews**, v. 44, n. 2, p. 331–384, 1980.

Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, A.G., Nakamura, C.V., Prado, B., Filho, D., 2002. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 97, 1027–1031.

Hoshino, T., Fujiwara, T. & Kawabata, S. Evolution of Cariogenic Character in *Streptococcus mutans*: Horizontal Transmission of Glycosyl Hydrolase Family 70 Genes. **Sci Rep** 2, 518 (2012). <https://doi.org/10.1038/srep00518>.

Jaykus LA, Wang HH, Schlesinge LS. Micróbios transmitidos por alimentos: moldando o ecossistema hospedeiro. **Washington: ASM Press**; 2009. p. 124.

Jeon, J. G. et al. Natural products in caries research: Current (limited) knowledge, challenges and future perspective. **Caries Research**, v. 45, n. 3, p. 243–263, 2011.

Jung CJ, Yeh CY, Shun CT, Hsu RB, Cheng HW, Lin CS, Chia JS. As plaquetas aumentam a formação de biofilme e a resistência de estreptococos indutores de endocardite na válvula cardíaca lesionada. **J Infect Dis.** 2012;205(7):1066–1075. doi: 10.1093/infdis/jis021

Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M et al. Carga global de cáries não tratadas: Uma revisão sistemática e metarregressão. **J Dent Res** 2015;

Kim B, Park Js, Choi Hy, Kwak Jh, Kim Wg. Differential effects of alkyl gallates on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Sci Rep.** 2019 May 23;9(1):7741. doi: 10.1038/s41598-019-44236-w. PMID: 31123307; PMCID: PMC6533263.

Koo, H., Hayacibara, M.F., Schobel, B.D., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Park, Y.K., Bowen, W.H., 2003. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **J. Antimicrob. Chemother.** **52**, 782–789. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg449>

Koo, H., Pearson, S.K., Scott-Anne, K., Abranches, J., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Park, Y.K., Marquis, R.E., Bowen, W.H., 2002. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. **Oral Microbiol. Immunol.** **17**, 337–343. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302X.2002.170602.x>

Klein, M. I. Et Al. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p. 10, fev. 2015.

Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2014 Apr;33(4):499-515. doi: 10.1007/s10096-013-1993-7. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24154653; PMCID: PMC3953549.

Kawada-Matsuo, M.; Oogai, Y.; Komatsuzawa, H. Sugar Allocation to Metabolic Pathways is Tightly Regulated and Affects the Virulence of *Streptococcus mutans*. **Gene**, v. 8, n. (1), p. 11, 2016.

Leal Pc, Mascarello A, Derita M, Zuljan F, Nunes Rj, Zacchino S, Yunes Ra. 2009. Relationship between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 19, 1796–1796.

Leites, A.; Pinto, M. B.; Sousa, E. R. D. Aspectos microbiológicos da cárie dental. **Salusvita**, v. 25, n. 2, p. 135-148, 2006.

Leme, A. F. P. et al. The Role of Sucrose in Cariogenic Dental Biofilm Formation- New Insight. **Journal of dental research**, v. 6, n. 10, p. 247–253, 2009.

Lemos JA, Burne RA. 2008. Um modelo de eficiência: tolerância ao estresse por *Streptococcus mutans*. **Microbiologia** **154:3247–3255**.

Lima, J. E. de O. Cárie dentária: um novo conceito. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 12, n. 6, p. 119–130, dez. 2007.

Marsh, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v. 149, n. 2, p. 279–294, 2003.

Matsumoto-Nakano, M. Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. **Japanese Dental Science Review**, v. 54, n. (1), p. 22–29, 2018.

Ministério Da Saúde, 2012. Sb Brazil 2010: **National Research on Oral Health: main results**.

Neel, E. A. A. N. et al. Demineralization – remineralization dynamics in teeth and bone. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4743–4763, 2016.

Newens, K. J.; Walton, J. Dietary Surveys: A review of sugar consumption from nationally representative dietary surveys across the world. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 29, n. 2, p. 225–240, 2016.

Parekh, J.; Karathia, N.; Chanda, S. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegata* L. bark. **African Journal of Biomedical Research**, v. 9, p. 53–57, 2006.

Pedersen, A. M. L.; Belstrøm, D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. **Journal of Dentistry**, v. 80, n. August 2018, p. S3–S12, 2019.

Phan, T.-N. Et Al. Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 1, p. 31–38, fev. 2004.

Pitts, N; Zero, Domenick. White Paper on Dental Caries Prevention and Management. **FDI World Dental Federation**, p. 1-59,2012.

Quivey, R. G., W. L. Kuhnert, And K. Hahn. 2001. Genetics of acid adaptation in oral streptococci. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.** 12:301–314.

Randsen Ev, Pedrazzoli V, Kilian M. 1991. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. **Oral Microbiol Immunol** 6:129–13.

Rodrigues, J. Z. De S. Et Al. Antimicrobial activity of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 against *Streptococcus mutans* UA159. **Microbial Pathogenesis**, v. 142, p. 104063, maio 2020.

S.S. Chang, Lee V.S, Y.L. Tseng, K.C. Chang, K.B. Chen, Y.L. Chen, C.Y. Li. Gallic acid attenuates platelet activation and platelet-leukocyte aggregation: involving pathways of akt and GSK3 β Evid. **Complement. Alternat. Med.** (2012), Article 683872, 10.1155/2012/683872.

Sarquis, R. S. F. R. et al. The Use of Medicinal Plants in the Riverside Community of the Mazagão River in the Brazilian Amazon, Amapá, Brazil: Ethnobotanical and Ethnopharmacological Studies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, n. 1, p. 1- 25, 2019.

Schwab C, Walter J, Tannock GW, Vogel RF, Gänzle MG. Utilização de sacarose e impacto da sacarose na expressão da glicosiltransferase em *Lactobacillus reuteri*. **Syst Appl Microbiol.** 2007;30(6):433–443. doi: 10.1016/j.syapm.2007.03.007

Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Dental caries. **The Lancet**, 369(9555), 51–59.

Simmer, J. Et Al. How fluoride protects dental enamel from demineralization. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v. 10, n. 2, p. 134, 2020.

Strużycka, I. The Oral Microbiome in Dental Caries. **Polish Journal of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 127–135, 2014.

Soto, C.; Padilla, C.; Lobos, O. Archives of Oral Biology Mutacins and bacteriocins like genes in *Streptococcus mutans* isolated from participants with high, moderate, and low salivary count. **Archives of Oral Biology**, v. 74, p. 1–4, 2017.

Svensäter G, Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Hamilton IR. Expressão de proteína por células planctônicas e de biofilme de *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol Lett.** 2001;205(1):139–146. doi: 10.1016/S0378-1097(01)00459-1.

Takahashi Y, Urano-Tashiro Y, Konishi K. **Adesinas de estreptococos orais**. Nihon Saikingaku Zasshi. 2013;68(2):283–293. doi: 10.3412/jsb.68.283.

Teixidor-Toneu, I.; Jordan, F. M.; Hawkins, J. A. Comparative phylogenetic methods and the cultural evolution of medicinal plant use. **Nature Plants**, v. 4, n. 10, p. 754 – 761, 2018.

Takai E, Hirano A, Shiraki K. Effects of gallate alkyl chain length on self-association and membrane binding. **J Biochem.** 2011; 150: 165–171.

Tsukiyama F, Nakai Y, Yoshida M, Tokuhara T, Hirota K, Sakai A, Hayashi H, Katsumata T. 2006. Gallate, the component of HIF-inducing catechins, inhibits HIF prolyl hydroxylase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 351, 239–239.

Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR, 3^o, Heydorn A, Koo H. A matriz de exopolissacarídeo modula a interação entre arquitetura 3D e virulência de um biofilme oral de espécies mistas. **PLoS Pathog.** 2012;8(4):e1002623. doi: 10.1371/journal.ppat.1002623.

Yoo, S.; Nam, H.; Lee, D. Phenotype-oriented network analysis for discovering pharmacological effects of natural compounds. **Nature Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1- 25, 2018.

Yoon Ch, Chung Sj, Lee Sw, Park Yb, Lee Sk. Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Joint Bone Spine.** 2013; 80:274–279.

Wink, M. Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological Functions of Secondary Metabolites. In: WINK, M. (Ed.). **Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**. Wiley Online Books. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010. p. 1–19.

Zijngel V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, Harmsen HJ. Arquitetura do biofilme oral em dentes naturais. **PLoS One**. 2010;5(2):e9321. doi: 10.1371/journal.pone.0009321.

CAPÍTULO I

ANTICARYOGENIC ACTIVITY OF BUTYL GALLATE OBTAINED THROUGH ESTERIFICATION OF GALLIC ACID AND ITS EFFECTS ON DENTAL BIOFILM OF *Streptococcus mutans* ATCC 700610

Anticaryogenic activity of butyl gallate obtained through esterification of gallic acid and its effects on dental biofilm of *Streptococcus mutans* ATCC 700610

Louise Soares Pita¹, Brenda Oliveira Lima¹, Cecília de Moura Caçado Couto¹, Patrick Peterson Rocha de Souza¹, Mariluze Peixoto Cruz¹, Regiane Yatsuda^{1*}.

1 Multidisciplinary Health Institute, Federal University of Bahia, 58 Hormindo Barros Street, Vitória da Conquista – Bahia, Brazil.

* Correspondence:

Regiane Yatsuda.

Federal University of Bahia, 58 Hormindo Barros Street, Vitória da Conquista – Bahia.

E-mail: reyatsuda@yahoo.com. Phone: +55(77) 988772610

ABSTRACT

Dental caries is an infectious oral disease that has one of the most important etiological agents *Streptococcus mutans*. Proven, plant species have been isolated of important compounds with antimicrobial activity, which have greater acceptance because it is of natural origin and has little or no adverse effect. Gallic acid and its derivatives are significant phenolic antioxidants found in wines and green tea and are well known for their antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antimutagenic, anticarcinogenic, antiviral, and analgesic properties. This work was developed with the objective of identifying and purifying the bioactive compounds of the gallate obtained through sterification of gallic acid and evaluating their antimicrobial activity on *Streptococcus mutans* ATCC 700610. Butyl Gallate (BG), Propyl Gallate (PG), Methyl Gallate (MG), and Sec-Butyl Gallate (SBG) were tested in the determination of minimal inhibitory concentration (MIC), and bactericide (MBC), inhibition of cell adherence (MICA) with planktonic cells of *S. mutans*. The sterification reaction was proven by Gas Chromatography Coupled to the Mass Spectrum (GC-MS). BG antimicrobial activity was evaluated *in vitro* regarding the inhibition of biofilm formation, inhibition of glycolytic pathway (polysaccharide formation), inhibition of acid production (pH drop), and inhibition of acidity (permeability to protons). BG presented CIM - 62.5 µg/ml, MBC - 250 µg/ml and PG was the most bioactive fraction MIC - 31, 25 µg/ml, MBC - 250 µg/ml. BG, SBG, PG, and MG did not present activity on the inhibition of cell adherence (up) at the highest tested concentrations. BG 6.25 mg/mL reduced biofilm biomass, BG (62.5 mg/mL) reduced the acid production of *S. mutans* biofilm in the period from 45 to 120 min compared to the vehicle ($p < 0.05$), and reduced the aciduric capacity between 40 min and 80 min. Butyl gallate shows promise for the development of new drugs and natural product formulations that possess antibiofilm activities for oral health. Further research will be necessary in the future to clarify the antimicrobial potential of other gallates and to understand their mechanisms of action against *Streptococcus mutans*.

KEYWORDS

Streptococcus mutans; Biofilm; Caries; Butyl gallate; antimicrobial; anticariogenic; 3, 4, 5-trihydroxybenzoic acid.

1. INTRODUCTION

Dental caries is an oral biofilm-related disease caused by an imbalance between commensal and cariogenic bacteria [1]. Considered an infectious oral disease, it is characterized by the erosion of the dental layers caused by the action of acids produced by microbial fermentation from carbohydrates available through food [2]. *Streptococcus mutans* is a gram-positive, facultative anaerobic pathogen [3] and is mostly known for its importance in the etiology of dental caries and occasional association with subacute infective endocarditis [4].

However, constant contact with dietary carbohydrates creates a dysbiotic environment where the production of organic acids, such as lactic acid, as byproducts of fermentation, allows *S. mutans* and other aciduric species to outcompete less acid-resistant commensal bacteria present in dental plaque. Occasionally, constant acidification of the environment below the critical point (pH 5.5) results in demineralization of the enamel and subsequent cavitation of the tooth surface. [1,6]. It has been largely accepted that the cariogenic potential of *S. mutans* resides in three core attributes: (i) the ability to synthesize large quantities of exopolysaccharides (EPS) of glucan from sucrose that aid initial attachment, colonization and accumulation of hard surfaces and in the development of the extracellular polymeric matrix, (ii) the ability to transport and metabolize a wide range of carbohydrates into organic acids (acidogenicity), and (iii) the ability to thrive under environmental stress conditions, particularly low pH (aciduricity) [5-8].

EPS are mainly glucans produced by glucosyltransferases (Gtfs) that provide binding sites for microorganism accumulation on the tooth surface and formation of pathogenic biofilms, building a physical barrier to macrophages, phagocytes, and antimicrobial substances [7]. Moreover, *S. mutans* are great producers of adhesion proteins and extracellular DNA, components that form and stabilize biofilm, which in turn is a protected and complex microenvironment capable of maintaining active metabolism through the possibility of accessing nutrients and water, promoting resistance to antimicrobials and the spreading of microorganisms [6-8].

Natural products are a promising source for use as herbal medicines or for generating new antimicrobial, analgesic, antioxidant, or anti-inflammatory drugs [9], which are low-cost, more effective, and have fewer adverse effects. These medicinal plants or their active compounds are used for the routine treatment of various pathological conditions [10-11].

Bioactive compounds derived from plants can also have toxic properties for the body, even in smaller doses. Many researchers have made efforts to elucidate and identify the bioactive principles behind plants, increasingly encouraging their use [12]. The synthesis of analogs from naturally isolated active ingredients has contributed to the developing of new therapeutic agents. By isolating a biologically active chemical substance, molecular modifications can be made to its structure to optimize its activity, incorporating new groups or even simplifying the molecule. Consequently, these actions can modify the potency, duration, and nature of the pharmacological effect. Gallic acid (GA) and its derivatives are among the most significant phenolic antioxidants found in wines and green tea. [13]. Gallic acid is a naturally occurring and widely isolated secondary metabolite from various fruits, plants, and nuts, which has received increasing attention in recent years for its powerful anti-inflammatory properties [14]. Among many polyphenols, GA is a low molecular weight tri-phenolic compound with excellent anti-inflammatory and antioxidant activities [15]. Gallate is a general term used to describe salts and esters of gallic acid with the galloyl group. Some gallate compounds, typically catechin and proanthocyanidin gallates, have been developed for pharmacological applications [16]. Research has reported that alkyl gallates differentially affect virulence, biofilm formation, and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*, where butyl gallate (BG) inhibited biofilm formation and virulence factors, including elastase, pyocyanin, and rhamnolipid, in *P. aeruginosa* without affecting cell viability [17].

In this context, the purpose of this study was to synthesize, identify, and isolate bioactive compounds from gallic acid, as well as to evaluate the antimicrobial activity and impacts on the dental biofilm formation of *Streptococcus mutans* ATCC 700610.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 SYNTHESIS OF ESTERS

The methodology was described by CRUZ et al., 2013. The esterification reaction was performed using 7.2 g of gallic acid solubilized in 60 mL of the organic solvents: Methanol, Propanol, Butanol, and Secondary Butanol and 0.6 mL of 96% sulfuric acid for 8 hours under reflux (Figure 1). The flask was neutralized with 40 mL of 10% sodium bicarbonate (40 mL of water + 0.4 g of bicarbonate). Extraction was performed using 60 mL (3x of 20 mL) of ethyl acetate and subsequently eliminated by rotary evaporator. The synthesized substance was analyzed by thin-layer chromatography (TLC) to confirm the presence of the substances (Figure 1). Then, the gallates obtained were washed with 15 mL of ice-cold distilled H₂O in a vacuum pump system and, after that, they were left at room temperature for drying.

2.2 PURIFICATION OF GALLATES

The purification of gallates was done through liquid chromatography, where the 5.5 cm diameter glass column was filled to a height of 24 cm with silica gel 60 with particle diameter between 0.063-0.200 nm (70-230 mesh, Merck) as stationary phase. The mobile phase consisted of a mixture of EtOAc/Hexane (C₆H₁₄) 6:4, and in each column, approximately 2 g of the sample solubilized in the mobile phase and incorporated in silica was used. The subfractions formed were analyzed by comparative thin layer chromatography (TLC) using pre-prepared silica gel 60, 20 cm x 20 cm F254 plates from Merck (0.25 mm silica gel with UV254 fluorescence indicator), with EtOAc/Hexane (C₆H₁₄) 6:4 as the mobile phase used. The plates were revealed with UV light λ 254 and 365 nm in the fluorescence analysis cabinet (Spectroline - Model CM-10), and subsequently revealed with iodine vapors (Figure 1).

2.3 ANALYSIS OF BUTYL GALLATE AND PROPYL GALLATE BY GAS CHROMATOGRAPHY COUPLED TO MASS SPECTROMETRY (GC-MS)

The chromatographic profiles of the esters Butyl Gallate (BG) and Propyl Gallate (PG) were evaluated by GC-MS. GC-MS analyses were performed on a QP2010SE (GC2010 Plus)

apparatus using an Rtx - 5MS fused silica capillary column (30 m; 0.25 mm inner diameter; 0.25 μm film) and helium as the attraction gas. Before being analyzed by gas chromatography, a sample was subjected to silylation derivatization. For this purpose, 3 mg of the sample was weighed and diluted in 60 μL of pyridine. To this solution was added 100 μL of the reaction mixture of N,O-Bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) containing 1% trimethylchlorosilane (TMCS) (Sigma-Aldrich®). This mixture was heated at 70 °C for 30 min and 1 μL of the mixture was injected into the GC-MS [11]. GC-MS (QP2010SE - GC2010 Plus) from Shimadzu® was used using a fused silica capillary column Rtx-5MS (30 m; 0.25 mm inner diameter; interface film of the GC-MS system was 290 °C. The initial temperature of the analysis was 80 °C for 5 min, increasing to 285 °C at a rate of 4 °C/min. The measurements occurred at 285 °C for 40 minutes [11]. The mass detector operated with electron impact ionization (70 eV) and mass scanning between the range of 30 to 600 Da. This was performed by comparing the mass spectra of the samples with those existing in the instrument database (NIST 08, FFNSC1.3, and WILEY8).

2.4 MICROORGANISMS AND CULTIVATION

Streptococcus mutans ATCC 700610 was grown in BHI (Brain Heart Infusion - KASVI) medium at 37 °C and 5% CO₂, for 24 h and stored at – 80 °C.

2.5. ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND CELL ADHESION INHIBITION

2.5.1. MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC)

The antimicrobial activity was determined by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) [20]. Serial dilution was performed with the substances to obtain concentrations ranging from 31.25 to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. When necessary, concentrations below 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were evaluated. For MIC determination, the starting inoculum was $1-2 \times 10^8$ CFU/mL. This test was performed in 96-well microplates, in which each well was filled with 190 μL BHI with inoculum (inoculation 1:1000), except the negative control wells. The plates were incubated for 24 hours, at 37°C and 5% CO₂. In the wells where there was no visual growth, 20 μL of the resazurin dye (Sigma©) was added, and after 20 minutes of incubation, the presence of blue color indicated the absence of growth, and pink color the presence of bacterial growth. MIC was determined at the lowest concentration of extracts that there was no visible bacterial growth and confirmed with resazurin.

For the determination of MBC, an aliquot (8 μ L) of suspensions from the wells where there was no bacterial growth was inoculated in plates with BHI agar and incubated for 24 hours, 5% CO₂, at 37°C. The MBC was defined as the lowest concentration that enables no growth on the agar (99.9% killed). Tests were conducted in triplicate at three different times (n = 9).

2.5.2. MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION OF ADHESION (MICA)

For the cell adhesion assay, bacterial suspensions of the *S. mutans* ATCC 700610 strain were prepared as described for the MIC, however, the BHI medium was supplemented with 1% sucrose and the test was conducted in sub-MIC concentrations [20]. Sterility control (BHI), growth control (BHI + inoculum), and positive control (BHI + inoculum + 0.12% chlorhexidine) were done. The plates were incubated at 37 and 5% CO₂ for 24 hours. After incubation, the culture medium was discarded, the plate was washed with distilled water, and the wells were stained with 200 μ L of violet crystal at 1% for 30 min at room temperature, followed by another three washes with distilled water to remove the excess dye. After drying, the results were analyzed visually by comparison with the controls. The inhibitory concentration of cell adhesion was considered the lowest concentration in which there is no visible adhesion on the surface. Tests were conducted in triplicate at three different times (n = 9).

2.6. BIOFILMS ASSAYS

2.6.1. INHIBITION OF BIOFILM FORMATION

Biofilms of *S. mutans* ATCC700610 were formed on fragments of bovine tooth placed in a vertical position in BHI culture with 1% sucrose at 37 °C and 5% CO₂ for 5 days, as described by Rodrigues et al. (2020) [20]. The starting inoculum was $1-2 \times 10^8$ CFU/mL. Each tube was filled with 8 mL of BHI with inoculum (inoculation 1:1000), except the negative control tube. The biofilms were grown undisturbed for 24 h to allow initial biofilm formation. At this point (24 h old), the biofilms were treated twice daily (10 a.m. and 4 p.m.) until the fifth day of the experimental period (120 h old biofilm) with the BG in the concentration of 6.250 mg/mL, chlorhexidine gluconate 0.12% (positive control) and vehicle (saline 0,9% – negative control). The biofilms were exposed to the treatments for 1 min, double dip rinsed in a sterile saline solution and transferred to a fresh culture medium. The

culture medium was replaced daily. Each biofilm was exposed to the respective treatments a total of eight times. The treated biofilms were analyzed for biomass formation (dry weight), bacterial viability, and the composition of polysaccharides (soluble, soluble in alkali, and insoluble) determined by colorimetric assays as described by Koo et al. (2003) [21]. The tests were performed in three repetitions at three different times (n = 9).

2.6.2. pH DROP TEST

The effects of BG on glycolysis were measured by standard pH drop test in a biofilm model as previously described by [22] Biofilms of *S. mutans* ATCC 700610 were grown as described before at 2.5.1., and treated with BG at 6.250 mg/mL, as previously described before. After the biofilm formation, the biofilms were washed in phosphate buffer three times, then incubated in saline solution (50 mM KCl and 1 mM MgCl₂) with pH 7.0 for 1 hour (37 °C, 5% CO₂). After incubation, the excess biomass formed in the apparatus was removed, leaving only the biofilms adhered to the enamel disc. The biofilms were then removed with 10.8 mL of saline (50 mM KCl and 1 mM MgCl₂) and the pH corrected to 7.2 with KOH (0.5 molar). When the pH stabilized (pH = 7.2), 1.2 mL of 10% glucose was used followed by pH at 15, 30, 45 minutes, 1, and 2 hours. Tests were conducted in triplicate at three different times (n = 9).

2.6.3. PROTON PERMEABILITY TEST

The test Proton Permeability was also done with BG (6.25 mg/mL), and *S. mutans* biofilms were grown as described before at 2.5.1., initially washed with salt solution (50 mmol/L of KCl plus 1 mmol/L of MgCl₂). Subsequently, they were incubated in a salt solution at a constant pH value of 7.2 and adjusted to a pH of approximately 4.6. The subsequent rise in pH associated with the movements of protons across the cell membrane into the cytoplasm was monitored with a glass electrode. The initial rate of proton entry was also estimated because changes in initial rates of proton uptake give the best measure of disruptive effects on the membrane. A rapid rise in pH followed, indicating of loss of Δ pH between the cytoplasm and the environment. The proton entry rate was calculated using the pH changes 0–80 min (biofilms) incubation period. Butanol (final concentration: 10%, V/V) was added to the 80 min (biofilms) to damage the cell membrane [23]. Tests were conducted in triplicate at three different times (n = 9).

2.7. STATISTICAL ANALYSIS

All variables were tested for normal distribution and homogeneous variance. For the data with non-parametric distribution, the statistical comparisons between groups were made using the Kruskal-Wallis test, comparing all pairs with Dunn's multiple comparisons. For parametric distribution, analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparing test. The level of significance was set at 5%. Data was analyzed using graphpad prism software (5.01).

3. RESULTS

The synthesis of the esters, described by [11], was carried out from 7.2 g of gallic acid solubilized in 60 mL of the organic solvents: Methanol, Propanol, Butanol, and Secondary Butanol and 0.6 mL of 96% sulfuric acid for 8 hours under reflux. The time of 8 hours was standardized because in all the reactions carried out with this duration, a yield above 90% of the product was obtained, as shown in Table 1.

The esters had their chromatographic profiles evaluated by GC-MS to confirm whether the esterification reaction under reflux was successful. It was possible to observe the presence of a pure compound, as can be seen in the total ion chromatogram obtained by GC-MS (Figure 1), with a location time of 38 min and an area equivalent to 100%, proving that Butyl Gallate was obtained through the reaction.

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), and Minimum Inhibitory Concentration for Cell Adhesion (MICA) values of Butyl Gallate (BG) against *S. mutans* ATCC 700610 were determined *in vitro*. BG was chosen for antimicrobial testing because it had a higher yield (99.99%). The MIC for BG was 62.5 $\mu\text{g/mL}$ and the MBC was 250 mg/mL . BG did not show antiadhesion activity at the highest concentrations tested. The lowest MIC value obtained was for Propyl Gallate – PG (31.25 $\mu\text{g/mL}$) and MBC (250 $\mu\text{g/mL}$), while Sec-Butyl Gallate (SBG) presented MIC (62.5 $\mu\text{g/mL}$) and MBC (500 $\mu\text{g/mL}$). Methyl Gallate (MG) demonstrated MIC (62.5 $\mu\text{g/mL}$) and did not present results for MBC at the highest concentration tested. BG, PG, SBG, and MG did not show antiadherence activity against *S. mutans* ATCC 700610, as shown in Table 2.

After the determination of the antimicrobial activity of the BG, PG, MG, and SBG on planktonic cells of *S. mutans* ATCC 700610, butyl gallate was tested in a biofilm model to evaluate the viability of *S. mutans*, as described in Table 3. The biofilm treated with BG at 50 mg/mL ($8.58 \times 10^8 \pm 3.16 \times 10^8$ CFU/mL) was not able to reduce viable *S. mutans* cells in biofilms when compared to saline treatment ($1.28 \times 10^9 \pm 3.31 \times 10^8$ CFU/mL) ($p > 0.05$). Only 0.12% Chlorhexidine ($3 \times 10^6 \pm 2 \times 10^6$) showed antimicrobial activity, reducing viable cells compared to the saline biofilm ($p < 0.05$).

The biofilms were also analyzed for dry weight, the biomass of biofilm (Table 4). The treatment with chlorhexidine 0.12% reduced the total biomass of biofilm to 19.7 ± 3.38 mg per biofilm and the BG reduced the biomass to 18.63 ± 3.48 mg per biofilm, while the biomass of saline control was 35.58 ± 2.67 mg per biofilm ($p < 0.05$). Although, the quantity of glucans soluble in alkali, insoluble glucans and soluble glucans were not reduced by the treatment of 0.12% Chlorhexidine, and BG concerning saline treatment ($p > 0.05$).

Acid production by *S. mutans* in biofilms was significantly reduced by butyl gallate (2 mg/mL) as determined by glycolytic pH-drop test in the presence of excess of glucose (Figure 2). The butyl gallate and chlorhexidine showed statistically reduction in the production of acids when compared to the saline biofilm, in the period of 45 min to 120 min ($p < 0.05$). The final pH value at 120 min was 4.94 for saline group, 6.07 for the Butyl Gallate and 5.85 for the chlorhexidine treatment ($p > 0.05$). The chlorhexidine and Butyl Gallate differ in the reduction in the production of only at 60 min ($p < 0.05$).

Butyl gallate was able to reduce the acid tolerance of *S. mutans* in biofilms when compared to the saline group from 40 min to 80 min ($p < 0.05$) (Figure 3). Chlorhexidine reduced acid tolerance from 40 min to 80 min compared to the saline control group ($p < 0.05$). At 30 min, no difference was observed between BG and Chlorhexidine ($p > 0.05$). The final pH value at 120 min was 4.97 for the saline group and 5.09 for butyl gallate and 5.09 for chlorhexidine ($p > 0.05$).

4. DISCUSSION

Dental caries is a major health problem in most industrialized countries, in which the majority of children and adults experience the disease [24]. Considered a worldwide oral

health problem that can affect people throughout life, it is given little public health priorities in many countries [8]. Thus, to prevent and treat oral diseases, particularly bacterial biofilms, a promising strategy is the development of innovative therapies based on natural products that have proven effectiveness and cause minimal damage to the host body [25]. Since medicinal plants produce a variety of substances with antimicrobial properties, screening programs can be expected to discover candidates for the development of new antimicrobial agents [26].

The present study evaluated the antimicrobial activity of the Butyl gallate *against S. mutans* ATCC 700610. Quantitative tests were used to evaluate the ability of the plant to inhibit bacterial growth and cause irreversible damage to the planktonic bacterial cell. Holetz et al, 2002, apply a classification for MICs lower than 100 µg/mL indicating good antimicrobial activity; 100 to 500 µg/mL, moderate antimicrobial activity; 500-1000 µg/mL consider the antimicrobial activity as weak, and inactive at concentrations greater than 1000 µg/mL. Considering this classification, the butyl gallate can be classified as a good antimicrobial because it had a MIC of 62.5 µg/mL. The propyl gallate, methyl gallate, and sec-butyl gallate also showed good bacteriostatic antimicrobial activity. Concerning bactericidal activity, moderate bactericidal activity was demonstrated for butyl gallate and propyl gallate (250 µg/mL). Sec-butyl gallate showed a weak bactericidal activity (500 µg/mL). Methyl Gallate did not show bactericidal activity in the highest concentrations tested.

In our study, we also evaluated the antimicrobial effect of butyl gallate on the biofilm formation of *S. mutans* ATCC 700610 in a bovine dental model, evaluating the viable cell count and the determination of synthesized polysaccharides. Acid tolerance and acid production were also evaluated. *S. mutans* ATCC 700610 biofilms treated with butyl gallate were able to inhibit biofilm formation, reducing the total mass of biofilm formed, with no reduction of viable cells. A higher concentration of BG was used in biofilms than in planktonic assays, a concentration two hundred times higher than MBC. This occurs because when bacterial cells are organized into biofilms, they have a higher biomass density, which makes it difficult for BG to penetrate the biofilm, and they can survive stressful conditions more easily than if they were in the planktonic form [27]. Kacergius et al. (2017) [44] demonstrated that MG reduced the biofilm biomass of *S. mutans* ATCC 700610 grown for 24 h on polystyrene surfaces in a dose-dependent manner, exhibiting its greatest effect at concentrations of 1 mg/mL, with biofilm inhibition of up to 93%. Kang et al. (2008) [38] demonstrated using wire-beaker tests that 1 mg/mL MG significantly reduced the wet-weight biofilm biomass of *S. mutans* Ingbritt compared to untreated bacteria, after 24 h of incubation

in a medium containing 5% sucrose. In our study, BG was able to reduce the biofilm biomass. Furthermore, our biofilm was cultivated for 5 days, having greater biomass and complexity than biofilms with 24-hour growth, making penetration and action on the biofilm difficult.

The ability of *S. mutans* to adhere to the tooth surface may be through the production of three types of glycosyltransferases, GtfB, -C, and -D, which metabolize sucrose transforming it into glucans [28]. The GTFB enzyme is encoded by the *gtfB* gene, rich in α -1,3 glycosidic bonds, and catalyzes the synthesis of water-insoluble glucans; GTFC encoded by the *gtfC* gene, synthesizes water-soluble and insoluble glucans, with α -1,3 and 1,6 glycosidic bonds. In contrast, GTFD synthesizes water-soluble glucans, with α -1,6-glycosidic bonds, encoded by the *gtfD* gene, being important in the pathogenesis of caries [29-30]. The formation of glucans is important virulence factors that contribute to the stability and structural integrity and the formation of dental biofilm [28]. These water-insoluble glucans are the main constituents of the biofilm matrix [31]. BG was not able to reduce the production of insoluble, soluble, and soluble glucans in alkali in the biofilm of *S. mutans* ATCC 700610. Lower levels of this glucan or inhibition of Gtfs activity in biofilms are important to reduce the virulence of cariogenic biofilms, with reduced attachment of microorganisms to the matrix, leading to reduced biomass formation [32].

Frequent exposure to dietary carbohydrates creates a dysbiotic environment in which the generation of organic acids, such as lactic acid, as byproducts of fermentation allows *S. mutans* and other aciduric species to outcompete less acid-tolerant commensal cariogenic bacteria [33]. Thus, repetitive acidification of oral pH below 5.5 leads to demineralization of the enamel and the consequent appearance of cavities on the tooth surface [34]. In the present study, butyl gallate reduced acid formation resulting from metabolism through the glycolytic pathway of carbohydrates, as observed in the pH drop assay. The final pH of the saline solution was almost 4.94, below the critical pH at which demineralization of tooth enamel occurs. However, butyl gallate presented a final pH close to 6.07 and chlorhexidine at 5.85. Butyl gallate and chlorhexidine almost completely stopped the production of acid from glucose, maintaining the final pH above the critical pH at which enamel demineralization occurs. Rates of pH drop reflect the acidogenic capacities of the cells, while the final pH values of the suspensions also reflect acid tolerance [23]. In addition to decreasing acid production from glucose, butyl gallate also sensitized cells to acidification to the point that final pH values were significantly higher (2.5 units) than those in the presence of the vehicle control. These effects may be related, in part, to the disruption of proton permeability of the *S.*

mutans cell membrane caused by the extract, which would affect the pH gradient (ΔpH) across the membrane, leading to inhibition of overall intracellular metabolism, including acid production [35]. Therefore, the butyl gallate can also inhibit glycolytic enzymes directly.

To thrive at low pH values (aciduricity), *S. mutans* mounts the so-called acid tolerance response, a robust transcriptional and physiologic adaptation mechanism that encompasses the induction of pathways that contribute to cytoplasm buffering and changes in membrane fatty acid composition, ultimately protecting the cellular machinery from acid damage and contributing to the survival of the bacteria during stress [4-36]. The increase in pH of a suspension as protons moved into the cell was recorded with a glass pH electrode. BG was able to increase the dynamic proton permeability of cell membranes between 40 and 80 min compared to the control, and the pH increases after the addition of butanol demonstrated this exposure. Thus, a change in cell membrane permeability may be one of the mechanisms that can affect the growth of *S. mutans*. To survive in an acidic environment, *S. mutans* uses the ATP-dependent active mechanism to extrude protons through the F-ATPase pump (F1F0-ATPase), whose transcription is induced under low pH conditions to alkalinize the cytoplasmic space, maintaining an intracellular pH approximately one pH unit higher than that of the extracellular environment, thus avoiding damage to enzymatic activity and damage to the genome that can be fatal [36]. Acid stress causes a series of changes in membrane permeability, and all together they are known as the acid tolerance response (ATR), also occurring changes in the plasma membrane with an increase in the proportion of monounsaturated fatty acids over the amount of saturated fatty acids, and by increasing the length of the carbon chains that make up these membrane fatty acids [37].

Butyl gallate (BG), propyl gallate (PG), methyl gallate (MG), sec-butyl gallate (BSG), and gallic acid (GA) are phenolic compounds with demonstrated pharmacological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activities, and can inhibit the growth of cariogenic bacteria *in vitro*, as well as the formation of *S. mutans* biofilms [38]. In another study, the MIC of GA isolated from black tea leaves against *S. mutans* was 2 mg/mL [39]. Shao et al. (2015) [40] obtained the MIC of GA at 8 mg/mL for *S. mutans*, and the inhibition effect of GA on biofilm may be due to factors other than the antibacterial effect: nutrient level, treatment temperature, and incubation time affect the inhibition activity of GA. Kang et al. (2008) [38] examined the ability of MG and GA on *Galla rhois*, and both had inhibitory effects on the growth of *S. mutans* and *S. sobrinus* (MIC < 8 mg/mL). Furthermore, at 4 mg/ml, both MG and GA significantly inhibited the formation of artificial biofilms of *S.*

mutans, by 79.0% and 69.2%, respectively). The gallic acid, a phenolic acid, is well known for its antimicrobial properties and different mechanisms, which may be destabilization and permeabilization of cytoplasmatic membranes, efflux pump inhibition, and enzyme inhibition by the oxidized products [41]. Mechanisms of action may be inhibition of extracellular microbial enzymes required for microbial growth or direct action on microbial metabolism through inhibition of oxidative phosphorylation [38]. Thus, there is no clear consensus on the antimicrobial mechanisms of gallic acid. The study by Borges et al. (2013) [42] observed that phenolic acids, in particular gallic acid, significantly altered the cell surface of bacteria, altering bacterial hydrophobicity. Furthermore, Zhang et al. (2015) [43] reported that GA was shown to inhibit enamel demineralization and enhance remineralization, and the inhibition effect is not influenced by pH, indicating that GA can be used in a wide pH range.

5. CONCLUSION

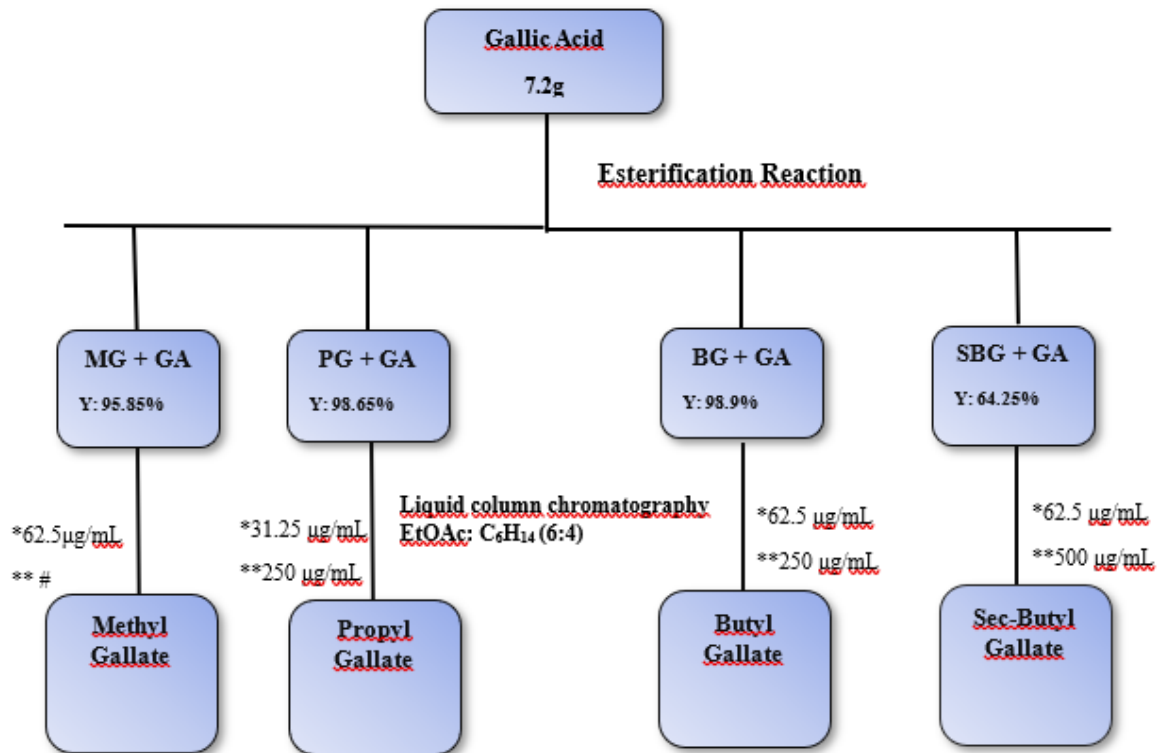
Butyl gallate and Propyl gallate showed great antimicrobial activity against *S. mutans* ATCC 700610 in planktonic cells. Furthermore, BG was able to inhibit 5-day biofilm formation by reducing biomass dry weight and also reduced the acidogenicity and aciduricity of *S. mutans* ATCC 700610 in biofilms. Therefore, butyl gallate is promising for the development of new drugs and natural product formulations with antibiofilm activities for oral health. Further studies will be needed in the future to elucidate the antimicrobial potential of other gallates and their mechanisms of action against *Streptococcus mutans*.

Funding sources

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior- Brasil (CAPES)- Finance Code 001.

Graphic and Tables

Figure 1. Flowchart of the bioguided fractionation of gallates obtained through the esterification of gallic acid.



Methyl gallate (MG), Propyl gallate (PG), Butyl gallate (BG), Sec-butyl gallate (SBG) and Gallic acid (GA). (*) MIC; (**) MBC; R: yield; (#) no activity was observed at the concentrations tested.

Table 1. Values of the yields of esterification reactions to obtain gallates.

Substance	Reaction yield* (%)
Methyl gallate	97.18
Propyl gallate	98.65
Butyl gallate	96.93
Sec-Butyl Gallate	31.43
Methyl gallate	94.53
Butyl gallate	99.99
Sec-Butyl gallate	97.07
Butyl gallate	99.80

*All substances with yield above 90% were standardized in 8 hours under reflux.

Table 2. Values of Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibitory Concentration of Cell Adhesion (MICA) of the Methyl Gallate, Propyl Gallate, Butyl Gallate and Sec-Butyl Gallate against *Streptococcus mutans* ATCC 700610.

	Antimicrobial activity against <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 700610		
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MICA ($\mu\text{g/mL}$)
Methyl Gallate	62.5	#	#
Propyl Gallate	31.25	250	#
Butyl Gallate	62.5	250	#
Sec-Butyl Gallate	62.5	500	#

MIC, MBC, and MICA values are expressed in $\mu\text{g/mL}$. The concentrations ranged from 31.25 to 500 $\mu\text{g/mL}$ for Methyl Gallate, Propyl Gallate, Butyl Gallate, and Sec-Butyl Gallate. # Not show antimicrobial and antiadherence activity at the highest concentrations tested.

Table 3. Effects of Butyl Gallate on viability of *Streptococcus mutans* ATCC 700610 in biofilms.

Treatments	CFU/biofilm
Saline	$1.28 \times 10^9 \pm 3.31 \times 10^{8a}$
Chlorhexidine 0.12%	$3 \times 10^6 \pm 2 \times 10^{6b}$
Butyl Gallate	$8.58 \times 10^8 \pm 3.16 \times 10^{8a}$

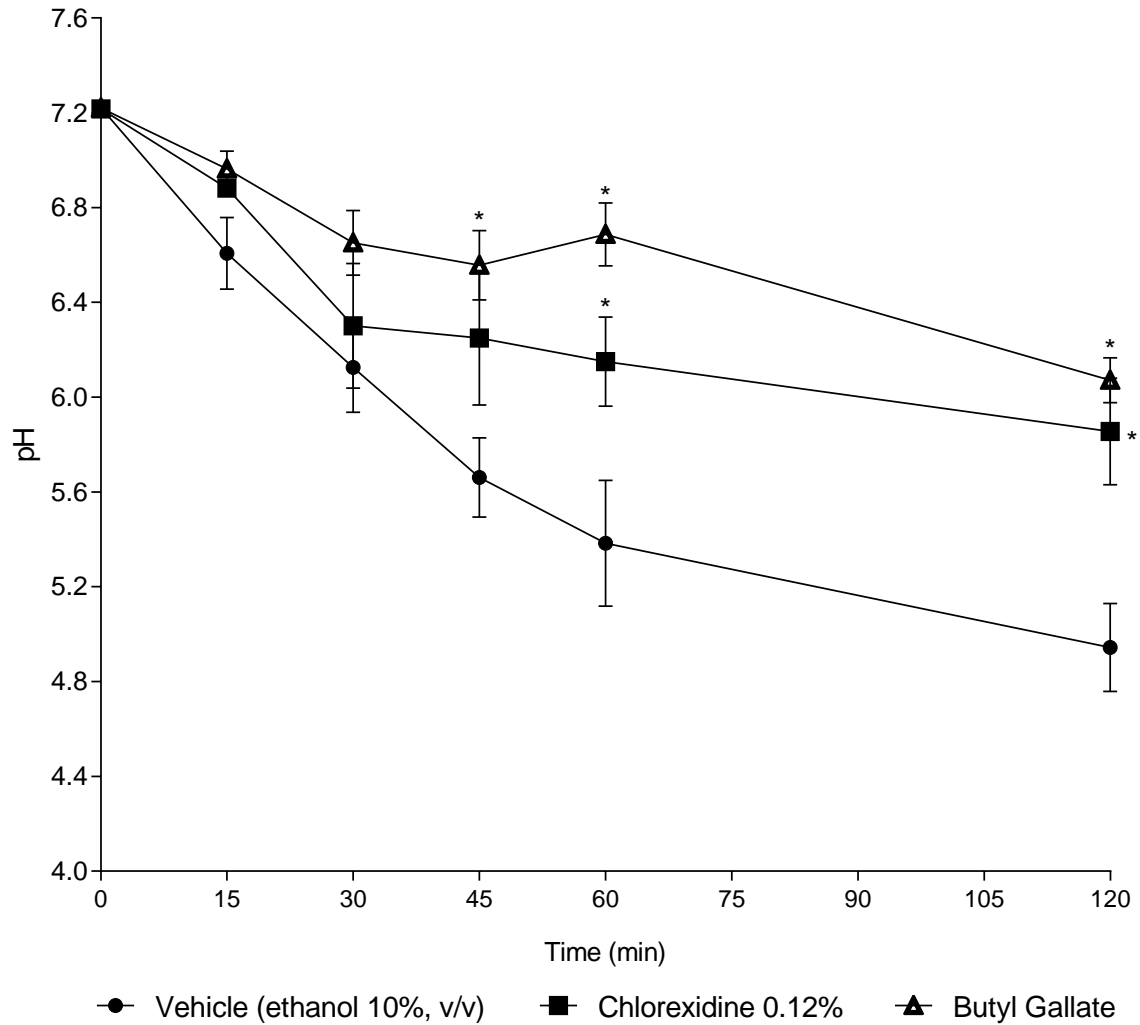
*Values followed by equal letters are statistically the same ($p > 0.05$). Statistical analysis was performed between chlorhexidine 0.12%, Butyl Gallate (50 mg/mL) compared to control by Kruskal-Wallis test, comparing all pairs with Dunn's Multiple Comparison Test (n = 18).

Table 4. Effects of the butyl gallate on the composition of *Streptococcus mutans* ATCC 700610 in biofilms.

Treatments	Soluble glucans in alkali mg/biofilm	Soluble glucans μ g/biofilm	Insoluble glucans mg/biofilm	Dry weight (mg)
Vehicle	0.22 ± 0.06^a	0.16 ± 0.01^a	1.07 ± 0.10^a	35.58 ± 2.67^a
Chlorhexidine 0.12%	0.11 ± 0.04^a	0.13 ± 0.02^a	1.67 ± 0.31^a	19.7 ± 3.38^b
BG	0.40 ± 0.08^a	0.13 ± 0.01^a	1.10 ± 0.17^a	18.63 ± 3.48^b

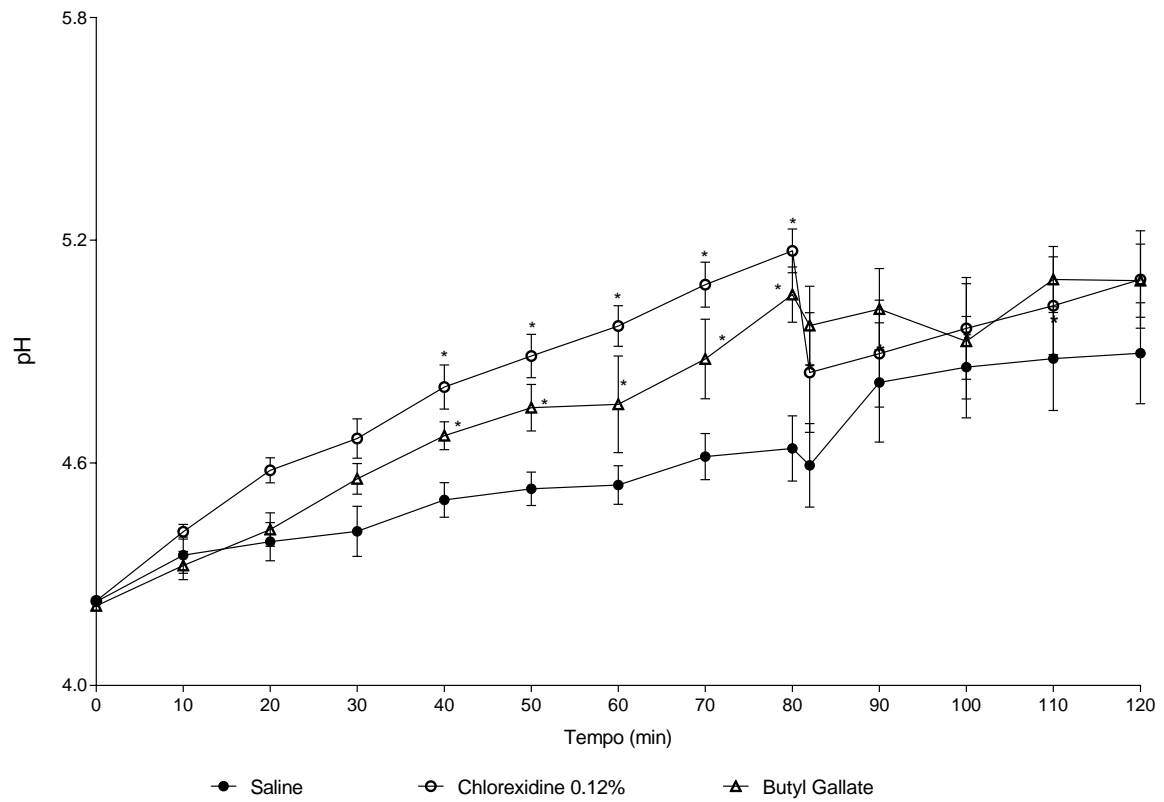
*Values followed by equal letters are statistically the same ($p > 0.05$). Statistical analysis was performed between chlorhexidine 0.12%, Butyl Gallate (50 mg/mL) compared to control by Kruskal-Wallis test, comparing all pairs with Dunn's Multiple Comparison Test (n = 18).

Figure 2. Influence of butyl gallate on glycolytic pH-drop in *Streptococcus mutans* ATCC 700610 in biofilms.



*Statistical difference was found among the treatments with Chlorhexidine 0.12% and butyl gallate compared to saline treatment ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed by TWO-WAY ANOVA, comparing all pairs with the Bonferroni's test ($n = 18$).

Figure 3. Influence of Butyl gallate on proton permeability's of *Streptococcus mutans* ATCC 700610 in biofilms.



*Statistical difference was found among the treatments with Chlorhexidine 0.12% and Butyl gallate compared to saline treatment ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed by TWO-WAY ANOVA, comparing all pairs with the Bonferroni's test ($n = 18$).

6. REFERENCES

1. Abranches, J.Zeng., L, Kajfasz., Jk, Palmer., Sr, Chakraborty., B.Wen., Zt, Richards., Vp, Brady., Lj, Lemos. 2018. Biology of Oral Streptococci. **Microbiol Spectr** 6:10.1128/microbiolspec.gpp3-0042-2018
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0042-2018>.
2. Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu CY. Salivary biomarkers for dental caries. **Periodontol** 2000. 2016 Feb;70(1):128-41. doi: 10.1111/prd.12100. PMID: 26662487.
3. Hamada, S.; Slade, H.D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol. Rev.** 1980, 44, 331–384, doi:10.1128/MR.44.2.331-384.1980.
4. Lemos, J.A.; Quivey, R.G.; Koo, H.; Abranches, J. *Streptococcus mutans*: a new Gram positive paradigm? **Microbiology.** 2013, 159, 436–445, doi:10.1099/mic.0.0661340
5. Pedersen, A. M. L.; Belstrøm, D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. **Journal of Dentistry**, v. 80, n. August 2018, p. S3–S12, 2019.
6. LEMOS, J.A.; BURNE, R.A. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. **Microbiology.** 2008, 154, 3247–3255, doi:10.1099/mic.0.2008/023770-0.
7. Lemos, J.A.; Palmer, S.R.; Zeng, L.; Wen, Z.T.; Kajfasz, J.K.; Freires, I.A.; Abranches, J.; Brady, L.J. The Biology of *Streptococcus mutans*. **Microbiol. Spectr.** 2019, 7, 435–448, doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.
8. Pitts, N.B.; Zero, D.T.; Marsh, P.D.; Ekstrand, K.; Weintraub, J.A.; Ramos-Gomez, F.; Tagami, J.; Twetman, S.; Tsakos, G.; Ismail, A. Dental caries. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2017, 3, 17030, doi:10.1038/nrdp.2017.30.
9. Chen, L.; Ren, Z.; Zhou, X.; Zeng, J.; Zou, J.; Li, Y. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and virulence by an oxazole derivative. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2016, 100, 857–867, doi:10.1007/s00253-015-7092-1.
10. Neel, E. A. A. N. et al. Demineralization – remineralization dynamics in teeth and bone. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4743–4763, 2016.
11. Cruz, M. P. Isolation and Identification of Bioactive Compounds from *Mimosa hostilis* BENTH. p. 205, 2013. **Doctoral Thesis.** Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil.

12. Mickymaray, S. Efficacy and Mechanism of Traditional Medicinal Plants and Bioactive Compounds against Clinically Important Pathogens. **Antibiotics**, v. 8, n. 4: 257, p. 1- 57, 2019.
13. Sukalingam, K.; Ganesan, K.; Xu, B. *Trianthema portulacastrum* L. (giant pigweed): phytochemistry and pharmacological properties. **Phytochem Ver**, v. 16,n.1, p. 461-478, 2017.
14. Cardoso, Jc; Oliveira, Mebs; Cardoso, Fci. 2019. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira** 37: 124-132. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620190201>
15. Yuanqing Fu, Yan Zhang, Huiying Hu, Ying Chen, Rong Wang, Duo Li, Songbai Liu. Design and straightforward synthesis of novel galloyl phytosterols with excellent antioxidant activity, **Food Chemistry**. Vol. 163, 2014. Pages 171-177. ISSN 0308-8146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.093>.
16. Bai J, Zhang Y, Tang C, Hou Y, Ai X, Chen X, Zhang Y, Wang X, Meng X. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. **Biomed Pharmacother**. 2021 Jan; 133:110985. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110985. Epub 2020 Nov 16. PMID: 33212373.
17. A. Nouri, F. Heibati, E. Heidarian. Gallic acid exerts anti-inflammatory, anti-oxidative and nephroprotective effects against paraquat-induced renal injury in male rats. Arch Naunyn Schmiedeberg. **Pharmacol**. (2020), 10.1007/s00210-020-01931-0.
18. Tsukiyama F, Nakai Y, Yoshida M, Tokuhara T, Hirota K, Sakai A, Hayashi H, Katsumata T. 2006. Gallate, the component of HIF-inducing catechins, inhibits HIF prolyl hydroxylase. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 351, 239–239.
19. Kim B, Park Js, Choi Hy, Kwak Jh, Kim Wg. Differential effects of alkyl gallates on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Sci Rep**. 2019 May 23;9(1):7741. doi: 10.1038/s41598-019-44236-w. PMID: 31123307; PMCID: PMC6533263.
20. Rodrigues, J.Z. De S.; Passos, M.R.; Silva De Macêdo Neres, N.; Almeida, R.S.; Pita, L.S.; Santos, I.A.; Santana Silveira, P.H.; Reis, M.M.; Santos, I.P.; De Oliveira Negrão Ricardo, L.; et al. Antimicrobial activity of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 against *Streptococcus mutans* UA159. **Microb. Pathog**. 2020, 142, 104063, doi:10.1016/j.micpath.2020.104063.
21. Koo, H.; Hayacibara, M.F.; Schobel, B.D.; Cury, J.A.; Rosalen, P.L.; Park, Y.K.;

- Bowen, W.H. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt -farnesol. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*, 782–789, doi:10.1093/jac/dkg449.
22. Belli, W.A.; Buckley, D.H.; Marquis, R.E. Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. *Can. J. Microbiol.* 1995, *41*, 785–791, doi:10.1139/m95-108.
23. Phan, T.-N.; Buckner, T.; Sheng, J.; Baldeck, J.D.; Marquis, R.E. Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. *Oral Microbiol. Immunol.* 2004, *19*, 31–38, doi:10.1046/j.0902-0055.2003.00109.x.
24. Petersen, P.E, Bourgeois, D., Ogawa, H., Estupinan-Day, S., Ndiaye, C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ.* 2005; *83*: 661-669.
25. Palombo, E. A. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2011, *2011*.
26. Ahmad, I., Beg, A.Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on Indian plants against multi-drug resistant human pathogens, *J. of Ethnopharmacol.* *74*:113-123.
27. Marsh, P. D. Dental Plaque: Biological Significance of a Biofilm and Community Life-Style. *J. Clin. Periodontol.* 2005, *32*, 7–15.
28. Bowen WH, Koo H. Biology of glucosyltransferases derived from *Streptococcus mutans*: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011;*45*(1):69–86. doi: 10.1159/000324598
Matsumoto-Nakano, M. Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. *Japanese Dental Science Review*, v. 54, n. 1, p. 22–29, fev. 2018
29. Matsumoto-Nakano, M. Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. *Japanese Dental Science Review*, v. 54, n. 1, p. 22–29, fev. 2018
30. Kawada-Matsuo, M.; Oogai, Y.; Komatsuzawa, H. Sugar Allocation to Metabolic Pathways is Tightly Regulated and Affects the Virulence of *Streptococcus mutans*. *Gene*, v. 8, n. (1), p. 11, 2016.

31. Lemos, J. A. C.; Chen, Y. Y. M.; Burne, R. A. Genetic and Physiologic Analysis of the *groE* Operon and Role of the HrcA Repressor in Stress Gene Regulation and Acid Tolerance in *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.** **2001**, *183*, 6074–6084.
32. Ren, Z.; Cui, T.; Zeng, J.; Chen, L.; Zhang, W.; Xu, X.; Cheng, L.; Li, M.; Li, J.; Zhou, X. Molecule Targeting Glucosyltransferase Inhibits *Streptococcus mutans* Biofilm Formation and Virulence. **Antimicrob. Agents Chemother.** **2016**, *60*, 126–135.
33. Abranches, J. et al. Biology of Oral Streptococci. **Microbiol Spectrum**, v. 6, n. 5, p. 1–18, 2018.
34. Randsen Ev, Pedrazzoli V, Kilian M. 1991. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. **Oral Microbiol Immunol** 6:129–13.
35. Jeon, J. G.; Rosalen, P. L.; Falsetta, M. L.; Koo, H. Natural Products in Caries Research: Current (Limited) Knowledge, Challenges and Future Perspective. **Caries Res.** **2011**, *45*, 243–263.
36. Baker, J.L.; Faustoferri, R.C.; Quivey, R.G. Acid-adaptive mechanisms of *Streptococcus mutans* -the more we know, the more we don't. **Mol. Oral Microbiol.** **2017**, *32*, 107–117, doi:10.1111/omi.12162.
37. Fozo, E. M.; Quivey, R. G. Shifts in the Membrane Fatty Acid Profile of *Streptococcus mutans* Enhance Survival in Acidic Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 929–936, fev. 2004.
38. Kang, M.-S.; Oh, J.-S.; Kang, I.-C.; Choi, C.-H. Inhibitory Effect of Methyl Gallate and Gallic Acid on Oral Bacteria. **J. Microbiol.** **2008**, *46*, 744–750.
39. Yoshino, K.; Nakamura, Y.; Ikeya, H.; Sei, T.; Inoue, A.; Sano, M.; Tomita, I. Antimicrobial Activity of Tea Extracts on Cariogenic Bacterium (*Streptococcus mutans*). **Food Hyg. Saf. Sci. (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)** **1995**, *37*, 104–108.
40. Shao, D.; Li, J.; Li, J.; Tang, R.; Liu, L.; Shi, J.; Huang, Q.; Yang, H. Inhibition of Gallic Acid on the Growth and Biofilm Formation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. **J. Food Sci.** **2015**, *80*, M1299–M1305.
41. Borges, A.; Saavedra, M. J.; Simões, M. Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm The Activity of Ferulic and Gallic Acids in Biofilm Prevention and Control of Pathogenic Bacteria. **Biofouling** **2012**, *28*, 37–41.
42. Borges, A.; Ferreira, C.; Saavedra, M. J.; Simões, M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic. **Microb. Drug Resist.** **2013**, *19*, 256–265.

43. Zhang, J.; Huang, X.; Huang, S.; Deng, M.; Xie, X.; Liu, M.; Liu, H.; Zhou, X.; Li, J.; Martien, J.; Cate, T. E. N. Changes in Composition and Enamel Demineralization Inhibition Activities of Gallic Acid at Different pH Values. **Acta Odontol. Scand.** 2015, No. 14, 1–7.
44. Kacergius, T.; Lafi, S. A. B. U.; Kirkliauskiene, A.; Stukas, R.; Utkus, A.; Zeidan, M.; Rayan, A. Its Major Component Methyl Gallate on Streptococcus Mutans Biofilm Formation by Optical Profilometry: Potential Applications for Oral Health. **Mol. Med. Rep.** 2017, *16*, 949–956.

ANEXO A

Cromatogramas obtidos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa do Galato de Butila e Galato de Propila.

Figura 1 – Galato de Butila

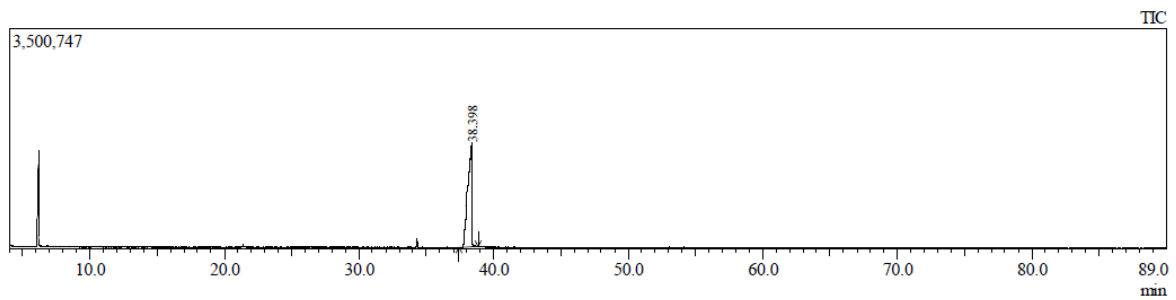
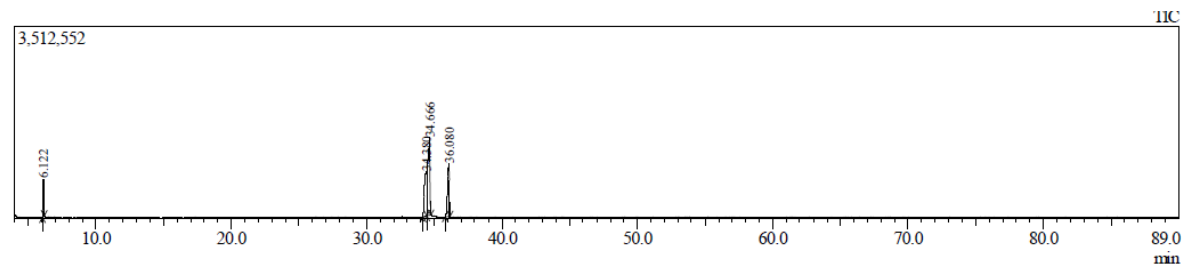


Figura 2 – Galato de Propila



Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	6.122	6.045	6.175	1847036	5.38	688858	17.88	2.68		Pentane, 2-methyl-4-keto-2-trimethylsil
2	34.380	34.165	34.425	7968258	23.20	794406	20.62	10.03		Benzoic acid, 3,4,5-tris(trimethylsiloxy)
3	34.666	34.425	34.770	17262284	50.26	1409444	36.58	12.25	V	Benzoic acid, 3,4,5-tris(trimethylsiloxy)
4	36.080	35.820	36.170	7270477	21.17	960062	24.92	7.57		Benzoic acid, 3,4,5-tris(trimethylsilyl)
				34348055	100.00	3852770	100.00			

ANEXO B

Figura 1 – Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em uso de animais (CEUA) para utilização de incisivos bovinos para realização dos testes de biofilme.

Página 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira
COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS - CEUA - IMS/CAT - UFBA



PROJETO DE PESQUISA		
Protocolo 127/2023 – 1ª Reapreciação em 30/11/2023 – Aprovado sem restrições		
<p>Protocolo nº 127/2023</p> <p>Projeto: Atividade antimicrobiana de compostos dos galatos obtidos através da esterificação do ácido gálico e seus efeitos sobre o biofilme dental de <i>Streptococcus mutans</i> UA159.</p> <p>Responsável: Regiane Yatsuda</p> <p>Instituição: Instituto Multidisciplinar em Saúde – Campus Anísio Teixeira – UFBA</p>		
INFORMAÇÕES DO PROTOCOLO 125/2023		
Tipo de Experimento	Isolamento de compostos bioativos do antioxidante ácido gálico e avaliação da sua atividade antimicrobiana sobre o biofilme com fragmentos de dente bovino inoculado com <i>Streptococcus mutans</i> . Serão doados 60 dentes pelo frigorífico.	
Forma de Eutanásia	Não se aplica	
Tipo de Analgesia	Não se aplica	
Características dos animais solicitados	Quantidade de animais solicitada	Não se aplica
	Quantidade de animais liberada	Não se aplica
	Espécie	Bovina
	Linhagem	-
	Sexo	Não se aplica
CERTIFICADO		
<p>A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA - IMS/CAT - UFBA) certifica que o projeto de pesquisa "Atividade antimicrobiana de compostos dos galatos obtidos através da esterificação do ácido gálico e seus efeitos sobre o biofilme dental de <i>Streptococcus mutans</i> UA159", Protocolo nº 127/2023, da pesquisadora Regiane Yatsuda, que foi submetido à avaliação desta Comissão, está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal e foi aprovado na 47ª Reunião Ordinária do dia 25 de outubro de 2023.</p>		
CERTIFICATE		
<p>The Ethics Committee on Animal Use (CEUA - IMS/CAT - UFBA) certifies that the research project "Antimicrobial activity of gallate compounds obtained through the esterification of gallic acid and its effects on the dental biofilm of <i>Streptococcus mutans</i> UA159", Protocol No. 127/2023, by researcher Regiane Yatsuda, which was submitted for evaluation by this Committee, is in accordance with the ethical principles of animal experimentation and was approved at the 47th Ordinary Meeting on October 25, 2023.</p>		

Vitória da Conquista, 30 de novembro de 2023.

Bruno Lopes Bastos

Bruno Lopes Bastos
 Coordenador CEUA - IMS/CAT - UFBA
 CEUA - IMS/CAT - UFBA